การประเมินคุณภาพดิน และจำแนกชนิดแบคทีเรียเอนโดไฟท์ผลิตกรดอินโดลอะซิติกที่คัดแยกได้จากข้าวเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี

สมคิด ดีจริง[1*] และวีรพงศ์ พันธุมิตร[2]

Soil Quality Assessment and Identification of Indole Acetic Acid Producing by Endophytic Bacteria Isolated from One Year Organic Rice Farming

Somkid Deejing[1*] and Weerapong Pantumit[2]

[1,2] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

[1,2] Faculty of Science, Maejo University, Sansai, Chiang Mai, 50290

*Coresponding author. E-mail : kittydeejing@gmail.com

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์มีความสำคัญต่อคุณภาพดิน การประเมินคุณภาพดินมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการจัดการทางการเกษตร ซึ่งแบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซิติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ งานวิจัยนี้ ได้วิเคราะห์คุณภาพดิน คัดเลือก รวมทั้งจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกจากข้าวเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี พบว่า ดินมีปริมาณอินทรียวัตถุ 1.50 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม 3.90 และ 34.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.30 มีค่าความหนาแน่นดิน ปริมาณน้ำในภาคสนาม และการนำน้ำของดินในสภาพอิ่มตัวด้วยน้ำเท่ากับ 1.47 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 22.70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ 0.46 เซนติเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งผลการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวมะลิแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ พบว่า ได้แบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 84 ไอโซเลท โดยแบคทีเรีย ISP2RR1 สามารถผลิตกรดอิน-โดลอะซิติกในอาหารเหลว Nutrient broth ที่เติม tryptophan 0.2 เปอร์เซ็นต์ได้ 53.29 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน และการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ISP2RR1 พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Chryseobacterium kwangyangense* ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการประเมินคุณภาพดินสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลแนะนำเกษตรกรเพื่อจัดการดิน ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกน่าจะมีศักยภาพประยุกต์ใช้ในระบบเกษตรอินทรีย์ต่อไป

คำสำคัญ: คุณภาพดิน การแยกเชื้อ แบคทีเรียเอนโดไฟท์ กรดอินโดลอะซิติก เกษตรอินทรีย์

Abstract

Microorganisms are important to soil quality. Theassessment of soil quality are useful in agricultural management. Indole acetic acid (IAA) producing bacteria play an important role in plant growth promoting. The present work deals with the study of soil analysis, selection and identification of indole acetic acid producing bacteria from one year of organic rice farming. It was found that organic matter content in soil samples was 1.50 %. The content of phosphorus and potassium in soil were 3.90 and 34.00 mg/kg, respectively. The soil samples showed pH 5.3. Soil samples showed bulk density, field water content and saturated hydraulic conductivity 1.47 g/cm^3, 22.70 % by weight and 0.46 cm/hr, respectively. The endophytic bacteria were isolated from Mali Dang organic rice on various kind of culture medium. It was found that eighty four isolates bacteria were obtained. Bacteria ISP2RR1 could produce indole acetic acid in Nutrient broth adding 0.2 % tryptophan at 53.29 mg/l.

Bacteria ISP2RR1 was Gram negative bacteric and rod shape. The genetic sequencing on 16S rRNA of this bacteria had similar to *Chryseobacterium kwangyangense* at 100 % similarity. The results of soil quality assessment can be used as a guide for management of farmers. The endophytic indole acetic producing bacteria had the potential for application in the organic farming.

Keyword : soil quality, isolation, endophytic bacteria, indole-3-acetic acid, organic agriculture

บทนำ

จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตพืชในระบบเกษตรอินทรีย์ การวิเคราะห์คุณภาพดินจะช่วยบ่งบอกความเป็นประโยชน์ของดินและสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการปรับปรุงดิน เพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้แก่ดินได้ โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ มีบทบาทสำคัญที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืชโดยไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Mano and Morisaki, 2008) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อมโดยการควบคุมทางชีวภาพ เช่น การผลิตสารเมแทบอไลท์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคพืช การแย่งจับธาตุบางชนิดกับเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยการผลิตไซเดอโรฟอร์ (Panwar and Swarnalakshmi, 2005) และยังมีกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางตรงโดยการให้ธาตุอาหารแก่พืช เช่น การตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสฟอรัส การผลิตฮอร์โมนพืช ซึ่งกรดอินโดลอะซิติก (indole-3-acetic acid, IAA) เป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตกล่าวคือ ช่วยในการแบ่งเซลล์การยืดยาวของลำต้น และการแตกรากได้มากขึ้น (Glick, 2012) สุจิตตรา และคณะ (2556) พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี สามารถละลายฟอสเฟตและผลิตกรด-อินโดลอะซิติกได้ 465.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 12.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในด้านอื่น เช่น ใช้แบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Bacillus* sp. ช่วยควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในข้าว (Hossain et al., 2016) ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว และมีผลช่วยเพิ่มน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของข้าว (Vejan et al., 2016) กรณี IAA ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดวัชพืช (Pazmiño et al., 2012) ซึ่ง Xia et al., 2015 กล่าวว่า การทำการเกษตรในระบบเกษตรอินทรีย์มีผลทำให้แบคทีเรียเอนโด-ไฟท์มีจำนวนและความหลากหลายมากกว่าระบบเกษตรทั่วไป จากที่กล่าวข้างต้น การวิเคราะห์คุณภาพดินและแบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซิติกสามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพดิน รวมทั้งการคัดแยก และจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกจากข้าวมะลิแดงในแปลงเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์น่าจะมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ประโยชน์ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และยังประยุกต์ใช้กรดอินโดลอะซิติกความเข้มข้นสูงช่วยกำจัดวัชพืชได้อีกด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตพืชในระบบเกษตรอินทรีย์และยังเป็นแนวทางที่น่าจะนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่ที่มีน้ำน้อย ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ เพื่อเป็นการช่วยเพิ่มผลผลิตให้มีทั้งปริมาณและคุณภาพสามารถแข่งขันกับนานาประเทศได้

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพดินแปลงเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีดิน ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) วัดโดย pH meter ตามวิธีของ Peech (1965) ปริมาณอินทรียวัตถุ (organic matter) ตามวิธีการของ Walkley and Black (1947) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Available phosphorus) ตามวิธีของ Bray and Kurtz (1945) ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangable potassium) ตามวิธีการของ Jackson (1958) ปริมาณโพแทสเซียม โดยใช้เครื่อง Flame Photometer และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน ได้แก่ ค่าความหนาแน่นดิน (soil bulk density) ตามวิธีของ Blake (1965) ปริมาณน้ำในภาคสนาม (field water content) ตามวิธีของ Gardner (1986) และค่าการนำน้ำของดินในสภาพอิ่มตัวด้วยน้ำ (saturated hydraulic conductivity) ตามวิธีของ Klute and Dirksen (1986)

การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวมะลิแดงในแปลงเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี

เก็บตัวอย่างต้นข้าวมะลิแดงในช่วงระยะต้นข้าวแตกกอ จากแปลงข้าวที่ทำเกษตรอินทรีย์เป็นเวลา 1 ปี จากอำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ ตัดชิ้นส่วนของข้าวมะลิแดง ได้แก่ ส่วนของราก ลำต้น และใบ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 8 ครั้ง นำชิ้นส่วนของข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางบนอาหารแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ Tryptic soy agar (TSA), Plate count agar medium (PCA), Pikovskaya's medium (PVK) และ International streptomyces projected medium 2 (ISP2) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และนำน้ำสุดท้ายที่ได้จากการล้างชิ้นส่วนของข้าวไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) โดยวิธี pour plate เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน แล้วทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี cross streak และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้บนอาหารวุ้นผิวเอียงเพื่อการศึกษาต่อไป

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก

นำแบคทีเรียเอนโดไฟท์บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิติกขั้นต้น โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Tryptone broth ที่บรรจุในหลอดทดลองปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นหยด Kovac's reagent 5 หยด ใส่ลงในอาหารเหลวที่มีเชื้อตัวอย่าง ซึ่งในสารละลายดังกล่าวมี Para-dimethyl-amino-benzaldehyde ทำปฏิกิริยากับวงแหวนอินโดล หากมีสีแดงเกิดขึ้นที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้นที่ผิวหน้าอาหารแสดงว่าเป็นผลลบ และเก็บเชื้อตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกไว้ศึกษาต่อไป

การผลิตและการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก

เพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 1.0 (มีจำนวนเซลล์ประมาณ 3×10^8 CFU/ml) ลงในอาหารเหลว Nutrient broth ที่เติม Tryptophan 0.2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Ahmad et al., 2008) และเก็บเชื้อตัวอย่างที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูงไว้สำหรับการศึกษาต่อไป

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก

การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ มาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง Nutrient agar และบันทึกลักษณะโคโลนี ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแบบแกรม แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ บันทึกการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ และศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ได้แก่ การผลิตเอนไซม์คะตาเลส เอนไซม์ออกซิเดส และการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เช่น ฟรุคโตส ซูโครส มอลโตส กลูโคส กาแลคโตส ไซลิทอล แลคโตส และ แมนนิทอล

การหาลำดับเบสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก

การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (Geneaid, Taiwan) และเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ Universal Primer คือ 27F ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' และวิเคราะห์ผลลำดับเบสของ 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

ผลการศึกษา

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีดินจากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพดินจากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี แสดงในตารางที่ 1 พบว่า ดินมีปริมาณอินทรียวัตถุ 1.50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม 3.90 และ 34.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.30 ค่าความหนาแน่นดิน ปริมาณน้ำในภาคสนาม และการนำน้ำของดินในสภาพอิ่มตัวด้วยน้ำ 1.47 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, 22.70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ 0.46 เซนติเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของดินจากแปลงข้าวที่ทำการเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี

อินทรียวัตถุ (%)	ฟอสฟอรัส (mg/kg)	โพแทสเซียม (mg/kg)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ความหนาแน่น (g/cm^3)	ปริมาณน้ำในภาคสนาม (%by weight)	การนำน้ำของดินในสภาพอิ่มตัวด้วยน้ำ (cm/hr)
1.50	3.90	34.00	5.30	1.47	22.70	0.46

การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวมะลิแดงที่ทำการเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี

ผลการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวมะลิแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2 พบว่า ได้แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนของราก ลำต้น และใบของข้าวมะลิแดงจำนวน 31, 31 และ 23 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 84 ไอโซเลท และไม่พบการเจริญของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำสุดท้ายของการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว

ตารางที่ 2 ผลการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวมะลิแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวมะลิแดง (ไอโซเลท)			
อาหารเลี้ยงเชื้อ	ราก	ลำต้น	ใบ	รวม
PCA	9	4	5	18
PVK	8	8	8	24
TSA	10	12	7	29
ISP2	4	6	3	13
รวม	31	30	23	84

การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์และปริมาณการผลิตกรดอินโดลอะซิติก

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดอะซิติกขั้นต้น จำนวน 84 ไอโซเลท พบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลทคือ แบคทีเรีย ISP2RR1 ที่ให้ผลบวก โดยมีปริมาณการผลิตกรดอินโดลอะซิติกในอาหาร Nutrient broth ที่เติมกรดอะมิโน tryptophan 0.2 เปอร์เซ็นต์ ได้ 53.29 มิลลิกรัมต่อลิตร

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก

แบคทีเรีย ISP2RR1 มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองออกส้ม รูปร่างโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวหน้านูน มันเงา (รูปที่ 1ก) ส่วนผลการย้อมสีแบบแกรม พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน เซลล์เดี่ยว (รูปที่ 1ข) และผลการทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรีย ISP2RR1 แสดงในตารางที่ 3 ส่วนผลการหาลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรีย ISP2RR1 โดยเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า มีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของแบคทีเรีย *Chryseobacterium kwangyangense* ที่ระดับความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

ก)

ข)

รูปที่ 1 ก) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย ISP2RR1 ข) รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรีย ISP2RR1

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก

ไอโซเลท	คะตาเลส	ออกซิเดส	ฟรุกโตส	ซูโครส	มอลโตส	กลูโคส	กาแลคโตส	ไซลิทอล	แลคโตส	แมนนิทอล
ISP2RR1	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–

หมายเหตุ + คือเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ หรือ สามารถใช้แหล่งคาร์บอน

– คือเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ หรือ ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกแบคทีเรียเอนโดไฟท์โดยหาลำดับเบส 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

ไอโซเลท	แบคทีเรีย	**Accession number**	**Query Cover**	**Identities**
ISP2RR1	*Chryseobacteriumkwangyangense*	EU169201.1	100 %	800/800 100%

อภิปรายผลการศึกษา

การวิเคราะห์ดิน พบว่า มีปริมาณอินทรียวัตถุในระดับต่ำถึงปานกลาง เกษตรกรควรปรับปรุงดินโดยการเพิ่มอินทรียวัตถุ ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก วัสดุเหลือใช้ที่มีลิกโนเซลลูโลส นอกจากนี้ การเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสลงไปในดิน โดย Xie et al., 2015 พบว่า การใส่ปุ๋ยคอกเป็นระยะเวลา ปี 25ทำให้มีน้ำตาลสะสมในดินและมีผลต่ออนุภาคของอินทรียวัตถุในดินมากขึ้น ส่งผลดีต่อการเจริญของทั้งพืชและจุลินทรีย์ดิน ในการทดลองนี้พบปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมต่ำ เกษตรกรควรปรับปรุงดินโดยการเพิ่มจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม ตัวอย่างดินในการทดลองนี้ จัดเป็นดินที่อยู่ในสภาพเป็นกรดจัด ซึ่งดินที่มีความเป็นกรดมีผลเสียต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน และยังมีผลต่อการใช้ธาตุอาหารของพืชอีกด้วย (Kemmitt et al., 2006) การปรับปรุงดินที่เป็นกรดทำได้โดยการใส่อินทรียวัตถุ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับธาตุอาหารและการเก็บความชื้นให้กับดินโดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์

การวิเคราะห์ค่าความหนาแน่นดิน พบว่า ตัวอย่างดินมีความหนาแน่นดินไม่สูงมาก ซึ่งหากความหนาแน่นดินมากเกินไป อาจเนื่องจากมีปริมาณอินทรียวัตถุในดินอยู่น้อย ซึ่งมีผลเสียคือทำให้รากพืชเจริญได้ไม่ดี ปัญหาดินมีความหนาแน่นมากเกินไปอาจแก้ไขได้โดยการใส่อินทรียวัตถุ ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำในภาคสนาม และค่าการนำน้ำของดินขณะอิ่มตัวด้วยน้ำ มีค่าไม่สูงมากนักซึ่งการใส่ปุ๋ยมูลสัตว์และปุ๋ยอินทรีย์ มีผลทำให้ดินมีสารคาร์บอนอินทรีย์และไนโตรเจน และดินมีการปลดปล่อยธาตุฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ดินมีค่าการนำไฟฟ้าดีขึ้น (Zhang et al., 2013)

การคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนของราก และลำต้นข้าวมะลิแดงมีมากกว่าส่วนของใบ ซึ่งบริเวณรากพืชมักจะพบจุลินทรีย์หนาแน่นกว่าบริเวณอื่น เนื่องจากบริเวณรากพืชมีการขับสารบางอย่างออกมา เช่น น้ำตาลและกรดอะมิโน ส่งผลสนับสนุนกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืชได้ (Rosenblueth and Romero, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ปรารถนา และคณะ, 2555 ที่พบแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส่วนของรากข้าวมากกว่าส่วนของลำต้น และใบ

ข้าว ส่วนในข้าวโพด มะเขือเทศ แตงโม และ พริกไทยก็พบแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในส่วนรากมากกว่าส่วนอื่น ๆ เช่นเดียวกัน (Xia et al., 2015) ซึ่งกระบวนการเข้าสู่พืชของแบคทีเรียเอนโดไฟท์โดยผ่านทางบาดแผลรากขนและบริเวณผิว ช่องเปิดธรรมชาติ หรือการใช้เอนไซม์ย่อยสลาย เช่น เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส (Nath and Joshi, 2016)

การคัดเลือกเชื้อและการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินโดลอะซิติก ในการทดลองนี้ พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท ISP2RR1 แยกได้จากส่วนของรากข้าว สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ 53.29 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกรดอินโดลอะซิติกที่ผลิตได้ไม่สูงมากนัก อาจเป็นผลมาจากการใช้อาหารทดสอบปริมาตรน้อย จึงอาจส่งผลให้เชื้อผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้น้อย ซึ่งยังมีปัจจัยอื่น ๆ เกี่ยวข้องอีก เช่น ความเข้มข้นของสารตั้งต้น คือกรดอะมิโนทริปโตเฟน ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ อัตราเร็วของการเขย่า และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (Mohite, 2013) Dasri et al., 2014 หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอินโดลอะซิติกโดยแบคทีเรีย DPY05 ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ พบว่า ผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้สูงสุดในอาหาร Kin-B medium เท่ากับ 67.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เติมกรดอะมิโนทริปโตเฟน 2.5 มิลลิโม-ลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

ในการทดลองนี้ จำแนกชนิดแบคทีเรีย ISP2RR1 โดยศึกษาลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบว่า เป็นเชื้อ *Chryseobacterium kwangyangense* ซึ่ง Suhandono et al., 2016 พบว่า *Chryseobacterium* sp. เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากผลเงาะ สามารถละลายธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ช่วยป้องกันเชื้อสาเหตุโรคพืช ช่วยผลิตฮอร์โมนพืช รวมทั้งช่วยเพิ่มการดูดซับแร่ธาตุต่าง ๆ ให้แก่พืชอีกด้วย และจากการคัดแยกได้จากรากข้าวมะลิแดงจากแปลงเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติก ซึ่งน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการปลูกพืชในระบบอินทรีย์ โดยพบรายงานการใช้ประโยชน์ของเชื้อดังกล่าวของ Pragash et al., 2009 คือ*Chryseobacterium aquaticum* PUPC1 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าวผลิตเอนไซม์โปรติเอสยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชและยังผลิตเอนไซม์ aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ที่จะช่วยป้องกันและช่วยให้พืชทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ทนน้ำท่วม ทนแล้ง ทนความเค็ม ทนต่อเชื้อก่อโรค รวมทั้งทนต่อสิ่งปนเปื้อนในดินได้เป็นอย่างดี (Glick, 2014) นอกจากนี้ Abdeljalil et al., 2016 รายงานว่า *Bacillus* sp., *Enterobacter cloacae*, *Chryseobacterium jejuense* และ *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากต้นมะเขือเทศ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และยังสามารถผลิตสารต้านเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในมะเขือเทศได้ ซึ่ง Radzki et al., 2013 พบว่า *Chryseobacterium* sp. C138 ผลิตไซเดอโรฟอร์เพื่อแย่งจับธาตุเหล็กกับเชื้อสาเหตุโรคพืช และยังมีรายงานของ Domenech et al., 2006 ที่ประยุกต์ใช้ *Chryseobacterium balustinum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* และ *Pseudomonas fluorescens* ร่วมกันเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญและช่วยควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวและโรคเน่าคอดินในมะเขือเทศและพริกไทย โดยพบว่า การใช้เชื้อร่วมกันได้ผลดีกว่าการใช้เชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง

สรุปผลการศึกษา

การประเมินคุณภาพดินจากแปลงข้าวเกษตรอินทรีย์อายุ 1 ปี พบว่า มีลักษณะทางเคมีและทางกายภาพอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง ซึ่งสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการแนะนำเกษตรกรให้ปรับปรุงบำรุงดินโดยใช้วิธีการทางชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าวอินทรีย์ในด้านปริมาณและคุณภาพ และแบคทีเรีย *Chryseobacterium kwangyangense* ที่สามารถผลิตกรดอินโดลอะซิติกได้ในการทดลองนี้น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเชื้อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มอื่นซึ่งอยู่ในรูปของเชื้อผสม หรือนำกรดอินโดลอะซิติกที่ผลิตได้ไปใช้เป็นสารกำจัดวัชพืช ซึ่งจะช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม และยังมีความปลอดภัยทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภคอีกด้วย ในอนาคตผู้วิจัยจะตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase และการผลิตไซเดอโรฟอร์ของเชื้อข้างต้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระบบเกษตรอินทรีย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2558

เอกสารอ้างอิง

ปรารถนา หงส์ฤทธิพันธุ์. (2555). การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนในข้าว. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

สุจิตตรา ปะนันโต ภาคภูมิ ตันเตชสาธิต ศิริลักษณ์ จิตรอักษร กรรณิการ์ สัจจาพันธ์ และ รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. (2556). เอนโดไฟติกแบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว, *Khon Kaen Agriculture Journal*, *41*, 457-468.

Abdeljalil, N.O.B., Vallance, J., Gerbore, J., Bruez, E., & Martins, G., (2016). Biocontrol of Rhizoctonia root rot in tomato and enhancement of plant growth using *Rhizobacteria* naturally associated to tomato. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 7, 356.

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

Blake, G.R. (1965). Particle density. Methods of soil analysis., Part I American society of agronomy monograph 9. Madison, Wisconsin, 371-373.

Bray, R.H., & Kurtz, L.T. (1945). Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, *59*, 39-45.

Dasri, K., Kaewharn, J., Kanso, S., & Sangchajirade, S. (2014). Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids. Khon Kaen University Research Journal, *19*, 268-275.

Domenech, J., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Ramos, B.,& Gutierrez-Mañero J. (2006). Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *Biocontrol*, *51*, 245-258.

Gardner, W.H. (1986). Water Content. In A. Klute et al. (eds.). Methods of soil analysis, Part I Physical and mineralogical methods. American society of agronomy monograph 9. Madison, Wisconsin, 493- 544.

Glick, B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. 1-15.

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

Hossain, M.T., Khan, A., Chung, E.J., Rashid, M.H., & Chung, Y.R. (2016). Control of rice bakanae by an endophytic *Bacillus oryzicola* YC7007. *Plant Pathology Journal Biological*, *32*(3), 228-241.

Jackson, M.L. (1958). Soil chemical analysis. Practice-Hall, Inc. Englewood Ciffs, 219-221.

Kemmitt, S.J., Wright, D, Goulding, K.W.T., & Jones, D.L.(2006). pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(5), 898-911.

Klute, A., & Dirksen, C. (1986). Hydraulic conductivity and diffusivity: Laboratory methods. In **A.** Klute et al.(eds.). Method of soil analysis Part I. American society of agronomy

monograph 9. Madison, Wisconsin, 687-734.

Mano, H., & Morisaki, H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes and Environment, 23,* 109-17.

Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA). *Journal of Soil Science* and *Plant Nutrition*, *13,* 638-49.

Nath, A., & Joshi, S.R. (2016). Endophytic fungi from tropical ethnoveterinary plants and their antibacterial efficacy against *Pasteurella multocida* Capsular Type A strain. *Revista de Biologia Tropical, 64*(2), 10-19.

Panwar, J.D.S., & Swarnalakshmi, K. (2005). PGPR: a new group of biofertilizer for sustainable crop productivity. New India Publishing Agency. New Dalhi. 159-180.

Pazmiño, D.M., María, C., Puertas, R., & Sandalio, L.M. (2012). Insights into the toxicity mechanism of And cell response to the herbicide 2,4-D in plants. *Plant Signaling and Behavior,* 7(3), 425-427.

Peech, M. (1965). Soil pH by glass electrode pH meter. Laboratory methods. In A. Klute et al. (eds.). Method of soil analysis Part I. American society of agronomy monograph Madison, Wisconsin, 687-734.

Pragash, G.M., Narayanan, K.B., Naik, P.R., & Sakthivel. N. (2009). Characterization of *Chryseobacterium aquaticum* strain PUPC1 producing a novel antifungal protease from rice rhizosphere soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 19*(1), 99-107.

Radzki, W., Gutierrez Mañero F. J., Algar, E., Lucas García, J. A., García-Villaraco A., & Ramos Solano, B. (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek, 104*(3), 321-330.

Rosenblueth, E., & Martínez-Romero, M. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 19,* 827-837.

Suhandono, S., Kusumawardhani, M.K., & Aditiawati, P. (2016). *Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from rambutan fruits (Nephelium lappaceum* L.) Cultivar Binjai. Hayati *Journal of Biosciences, 23,* 39-44.

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq, B.A. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A Review. *Molecules, 21*(5), 44-53.

Walkley, A., & Black, I.A. (1947). Chromic acid titration method for determination of soil organic matter. *Soil Science, 63*, 257.

Xia,Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott D., & Williams, M.A. (2015). Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontiers in Plant Science, 6,* 490.

Zhang, X., Chen, L., Li, Q., Qi X., & Yang, S. (2013). Increase in soil nutrients in intensively managed cash-crop agricultural ecosystems in the Guanting Reservoir catchment, Beijing, China. *Geoderma, 4,* 193-194.