

ความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกจากดินบริเวณรอบรากข้าวในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา

สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง^{1*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ ที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากข้าว ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา แล้วศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่แยกได้ ผลการวิจัยพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 5 แบบ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Burk's N-free medium ผลการทดสอบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด คือ Rifampicin, Erythromycin, PolymixinB, Ampicilin, Acitracin, Gentamycin, Streptomycin, Chloramphenical, Kanamycin และ Tetracyclin ของแบคทีเรียทั้ง 50 ไอโซเลต พบว่ามีรูปแบบที่หลากหลาย สามารถจัดกลุ่มได้ 13 รูปแบบ คัดเลือกเชื้อตัวแทนจากผลการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะแต่ละรูปแบบโดยการเลือกไอโซเลตที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 5 แบบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ พบว่า STM04, STM06, STM21, STM27 และ STM28 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับ *Agrobacterium* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia kururiensis*, *Bacillus megaterium* และ *Microbacteriaceae bacterium* ตามลำดับ

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช ดินบริเวณรอบรากข้าว

¹ อาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

* ผู้นิพนธ์หลัก e-mail: sujidkanlaya@gmail.com

DIVERSITY OF NITROGEN FIXING BACTERIA ISOLATED FROM RICE RHIZOSPHERE SOIL IN PHRANAKHON SI AYUTTHAYA PROVINCE.

Sujidkanlaya Maruekarajtinplaeng^{1*}

Abstract

The aim of this experiment was to isolate nitrogen fixing bacteria from rice rhizosphere soil in Phranakhon Si Ayutthaya Province and study the genetic diversity of the isolates. The results showed that a total of 50 isolates were obtained from the rice rhizosphere. Five different colony morphology type were observed on Burk's N-free medium. The ability to resist 10 types of antibiotics, namely Rifampicin, Erithromycin, PolymixinB, Ampicilin, Acitracin, Gentamycin, Streptomycin, Chloramphenical, Kanamycin and Tetracyclin was found that all 50 isolates could be grouped into 13 groups according to the resistance profiles of the test organism to each antibiotic. Five isolates possessed different types of colony morphologies which represented 13 antibiotic resistance patterns were selected for 16S rDNA sequence analysis. The result found that isolate STM04, STM06, STM21, STM27 and STM28 were closely related to genus *Agrobacterium* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia kururiensis*, *Bacillus megaterium* and *Microbacteriaceae bacterium*, respectively.

Keywords: genetic diversity, plant growth promoting bacteria, rice rhizosphere soil

¹ Department of Microbiology Faculty of Science and Technology Rajabhat Pranakhon si Ayutthaya University
Pranakhon Si Ayutthaya Province

* Corresponding author, e-mail: Sujidkanlaya@gmail.com

บทนำ

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินที่บริเวณรอบรากของพืชและมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญของพืชที่เรียกว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Hayat และคณะ, 2010) นั้น ใช้กลไกหลายอย่างเพื่อช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืช ยกตัวอย่างเช่น การที่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆ รากของพืชนั้นผลิตหรือสร้างสารที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ หรือการที่จุลินทรีย์ช่วยเปลี่ยนรูปธาตุอาหารที่พืชจำเป็นต้องใช้ในการเจริญที่มีอยู่ในดินซึ่งไม่ละลายน้ำให้ละลายน้ำได้เพื่อให้พืชสามารถดูดซึมไปใช้ในการเจริญได้ เช่นกรณีของเชื้อ *Bacillus megaterium* จะช่วยละลายธาตุฟอสฟอรัสที่ยึดติดอยู่กับอนุภาคของดิน ให้ละลายออกมาให้พืชสามารถดูดซึมไปใช้ในการเจริญ และนอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์อีกหลายสายพันธุ์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนรูปธาตุอาหารอื่นๆ เช่น กลุ่มจุลินทรีย์ที่ช่วยละลาย โฟสเฟต เชื้อกลุ่มจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณรอบรากพืชนั้นมีจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศซึ่งอยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ให้อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมไอออน ซึ่งพืชสามารถนำมาใช้เพื่อการเจริญได้

ธาตุไนโตรเจนนับว่าเป็นธาตุชนิดหนึ่งที่พืชขาดมากที่สุด ลักษณะของพืชที่ขาดไนโตรเจนคือ ใบเหลือง การออกดอกและผลไม่สมบูรณ์ ถึงแม้ว่าธาตุนี้จะมีปริมาณมากที่สุดในบรรยากาศแต่จะอยู่ในรูปที่พืชต่างๆ ไม่สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญได้ แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ ซึ่งเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของธาตุไนโตรเจน ที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน แบ่งออกได้เป็นสองประเภทใหญ่ๆ (Khan, 2005) ตามลักษณะความสัมพันธ์กับพืช กล่าวคือ ประเภทแรก เป็นจุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตเป็นอิสระ (non-symbiosis nitrogen fixing bacteria) และประเภทที่สอง เป็นพวกที่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่อยู่ร่วมกันแบบที่สิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนั้นต่างได้รับประโยชน์ร่วมกัน (symbiosis nitrogen fixing bacteria) การศึกษาข้อมูลทางด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์นั้นในปัจจุบันนิยมศึกษาโดยใช้ข้อมูลหลายด้านควบคู่กัน ทั้งสมบัติด้านสัณฐานวิทยา สมบัติด้านสรีรวิทยา และสมบัติด้านพันธุกรรม (Vandamme และคณะ, 1996) สมบัติด้านสัณฐานวิทยาที่ศึกษา เช่น รูปร่างของเซลล์ รูปร่างลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งประเภทต่างๆ สมบัติด้านสรีรวิทยาที่ศึกษา เช่น รูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะประเภทต่างๆ ส่วนสมบัติด้านพันธุกรรมที่ศึกษา เช่น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ส่วนต่างๆ รวมทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA เป็นต้น

การศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม ของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่มีส่วนส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณรอบรากข้าวในประเทศไทยนั้น มีผู้ที่ทำการศึกษาค่อนข้างน้อย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากข้าว จากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากพื้นที่การทำนาของเกษตรกรที่อาศัยอยู่ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกแบคทีเรียที่เจริญในโตรเจนอิสระที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากข้าว จากตัวอย่างดินในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่แยกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว

นำตัวอย่างดินจากบริเวณรอบรากข้าว 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 120 rpm นาน 30 นาที จากนั้นนำสารละลายดินมาทำการเจือจาง (serial dilution) จนได้ระดับความเจือจางเป็น 10^{-6} นำไปกระจาย (spread plate) บนอาหารรุ้นสูตร Burk's N-free medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มีลักษณะแตกต่างกัน ใช้ลูปแตะเชื้อมาขีดลาก (streak) บนอาหารรุ้นสูตร Burk's N-free medium บนจานอาหารใหม่จนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วจึงเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหารเยือก NA เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ แล้วให้เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บเชื้อไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหาร Burk's N-free medium

นำแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาลักษณะโคโลนีมาขีดลากบนจานอาหารรุ้นสูตร Burk's N-free medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร แล้วบันทึกผลการทดลอง

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ

เลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ บนอาหารรุ้นสูตร NA บ่ม ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว NB เลี้ยงจนกระทั่งเชื้อเจริญถึงระยะ mid log phase บนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 250 rpm จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ เทอาหาร NA ที่ยังไม่แข็งตัวลงในจานเพาะเชื้อ หมุนวนจานเพาะเชื้อเพื่อให้เชื้อและอาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งให้อาหารแข็ง จากนั้นนำแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยสารปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบมาวางบนจานเพาะเชื้อ ซึ่งในการวิจัยนี้ใช้สารปฏิชีวนะ 10 ชนิด (ผลิตโดยบริษัท Oxoid) คือ Gentamycin, Streptomycin, Tetracycline, Polymyxin B, Kanamycin, Rifampicin, Bacitracin, Chloramphenicol, Ampicillin และ Erythromycin บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบผลด้วยการสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้น ดังนี้ หากไม่เกิดบริเวณใสรอบแผ่นยาปฏิชีวนะ แสดงว่าเชื้อทดสอบสามารถเจริญได้ แต่หากเกิดบริเวณใสรอบแผ่นยาปฏิชีวนะแสดงว่าเชื้อทดสอบไม่สามารถเจริญได้เมื่อมียาปฏิชีวนะ

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA

ใช้วิธีพีซีอาร์โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท แมคโครเจน (MacroGen) ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพรเมอร์ 27f และ 1492r โปรแกรมปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ 94 องศาเซลเซียส 45 นาที, 55 องศาเซลเซียส 60 วินาที, 72 องศา

เซลล์เชื้อส 60 วินาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยไพรเมอร์ 4 ชนิด คือ

27F: AgA gTT TgA TCM TGG CTC Ag

1492R: TAC ggY TAC CTT gTT ACg ACT T

518F: CCA gCA gCC gCg gTA ATA Cg

800R: TAC CAg gg T ATC TAA TCC

ผลการวิจัย

ผลการแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากข้าว

ในงานวิจัยนี้ เก็บตัวอย่างดินรอบรากข้าว จากพื้นที่การทำการเกษตรของประชากรในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่แตกต่างกัน 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ เก็บจากพื้นที่การทำนาที่ทำนาแบบเกษตรอินทรีย์ และพื้นที่การทำนาที่มีการใช้ปุ๋ยเคมี มาทำการแยกเชื้อ โดยใช้อาหารที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (Burk's N-free medium) ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไอโซเลตแบคทีเรียที่แยกจากดินรอบรากข้าวในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา

ลำดับที่	ลักษณะการปลูกข้าว	พื้นที่	รหัสเชื้อ	จำนวนไอโซเลต
1	ใช้สารเคมี	อำเภอพระนครศรีอยุธยา	STM01-STM25	25
2	เกษตรอินทรีย์	อำเภอบางซ้าย	STM26-STM50	25
รวม				50

จากตารางที่ 1 พบว่า เมื่อใช้ดินจากนาข้าวแปลงที่มีการใช้สารเคมีในการทำนา และแปลงที่ทำนาแบบเกษตรอินทรีย์ สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ แหล่งละ 25 ไอโซเลต

ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร Burk's N-free medium

ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 50 ไอโซเลต บนอาหาร Burk's N-free medium พบว่ามีโคโลนีที่แตกต่างกัน สามารถแยกได้ 5 แบบ กล่าวคือ แบบแรก โคโลนีขนาดเล็ก ขอบไม่เรียบ ผลิตเมื่อปริมาณน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-0.2 มิลลิเมตร (STM01) แบบที่ 2 โคโลนีขนาดใหญ่ ขอบโคโลนีเรียบ ผลิตเมื่อปริมาณมาก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3-0.5 มิลลิเมตร (STM06) แบบที่ 3 โคโลนีขนาดเล็กมาก ขอบเรียบเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1 มิลลิเมตร (STM37) แบบที่ 4 โคโลนีขนาดเล็ก

STM39

ในงานวิจัยนี้ใช้สารปฏิชีวนะ 10 ชนิดในการทดสอบการ ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกจากดินรอบรากข้าว จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

[illegible]

[illegible]

Isolates	ชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ									
	Rifampicin	Erythromycin	PolymyxinB	Ampicillin	Bactracin	Gentamycin	Streptomycin	Chloramphenical	Kanamycin	Tetracycline
	5 µg	15 µg	300 units	10 µg				30 µg		
STM35	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
STM36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STM37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STM38	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
STM39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STM40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STM41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STM42	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
STM43	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
STM44	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
STM45	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
STM46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STM47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STM48	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
STM49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STM50	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย - หมายถึงเกิดบริเวณใสรอบแผ่นสารปฏิชีวนะที่ทดสอบ (sensitive)

เครื่องหมาย + หมายถึงไม่เกิดบริเวณใสรอบแผ่นสารปฏิชีวนะที่ทดสอบ (resistance)

จากตารางที่ 2 พบว่าเชื้อทดสอบทั้ง 50 ไอโซเลต มีรูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน สามารถจัดกลุ่มได้ ทั้งหมด 13 รูปแบบ

ผลการจำแนกแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วน 16S rDNA

ในงานวิจัยนี้ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วน 16S rDNA ทำโดยการส่งตัวอย่างแบคทีเรียไปวิเคราะห์ที่บริษัท แมคโครเจน (Macrogen) ประเทศเกาหลี โดยการเลือกเชื้อตัวแทนจากเชื้อที่มีรูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ 13 กลุ่ม และคัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 5 แบบ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกจากดินรอบรากข้าวจังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA

ลำดับที่	รหัสชื่อ	length	% Identities	Blast report
1	STM04	1447	99	<i>Agrobacterium</i> sp. DB14 16S
2	STM06	1407	99	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain ORS 3405
3	STM21	1483	98	<i>Burkholderia kururiensis</i>
4	STM27	1449	99	<i>Bacillus megaterium</i> strain MSC2
5	STM28	1487	97	<i>Microbacteriaceae bacterium</i> HLB-6

จากตาราง เมื่อจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA แล้วนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Gen Bank ของแบคทีเรียตัวแทน 5 ไอโซเลต ได้แก่ STM04, STM06, STM21, STM27 และ STM28 พบว่าเชื้อทดสอบ มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Agrobacterium* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia kururiensis*, *Bacillus megaterium* และ *Microbacteriaceae bacterium* ตามลำดับ ซึ่งผลการจำแนกในงานวิจัยนี้พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tran Van และคณะ (2000) ที่พบแบคทีเรียในจีนัส *Burkholderia* และ *Bacillus* (Burd และคณะ, 2000) จากดินบริเวณรอบรากข้าว ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองจีนัสดังกล่าวมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ ในงานวิจัยนี้พบแบคทีเรียทั้งสองจีนัสนั้นเช่นเดียวกัน ซึ่งต้องทำการวิจัยเพิ่มเติมด้านประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่แยกได้ต่อไป

สรุปและอภิปรายผล

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบรากข้าว ได้เชื้อทั้งหมด 50 ไอโซเลต โดยได้จากตัวอย่างดินที่ทำการปลูกข้าวแบบใช้สารเคมี และการปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์ จำนวน 25 ไอโซเลต ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากในเกษตรกรในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ทำนาตลอดทั้งปี ไม่ได้ปลูกพืชหมุนเวียนอื่นๆ ดังนั้นสภาวะแวดล้อมจะไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง และในระหว่างที่ทำนาจะต้องให้น้ำขังในพื้นที่เพื่อให้มีปริมาณน้ำที่เพียงพอต่อความต้องการของต้นข้าว ซึ่งส่งผลให้ปริมาณอากาศในดินจะมีจำกัด ทำให้มีเพียงจุลินทรีย์บางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถดำรงชีวิตในสภาพดังกล่าวได้ ซึ่งไม่ว่าจะเป็นการทำนาแบบใช้สารเคมี หรือ แบบเกษตรอินทรีย์สภาวะดังกล่าวจะเหมือนกัน ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่สนับสนุนได้ว่า ทำให้แยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวนเท่าๆ กัน จากตัวอย่างทั้งสองแหล่ง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ โดยการเลี้ยงในอาหาร Burk's N-free medium เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นประกอบการจัดกลุ่ม พบว่า มีลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน 5 แบบ การใช้ข้อมูลด้านนี้เพียง

ด้านเดียวจัดกลุ่มเพื่อคัดเลือกตัวแทนในการศึกษาขั้นต่อไปเป็นข้อมูลที่น้อยเกินไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้ผลการวิจัยส่วนนี้ควบคู่กับผลการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อ พบว่า ผลการทดสอบ การตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ ของเชื้อทั้ง 50 ไอโซเลต สามารถจัดกลุ่มเชื้อตามรูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะได้ 13 กลุ่ม โดยกลุ่มที่มีสมาชิกมากที่สุดคือ กลุ่มที่ sensitive ต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบทั้ง 10 ชนิด มี 24 ไอโซเลต ได้แก่ STM07, STM10, STM11, STM15, STM17, STM20, STM22, STM23, STM24, STM25, STM27, STM29, STM30, STM32, STM33, STM34, STM36, STM37, STM39, STM40, STM41, STM46, STM47 และ STM49 ส่วนกลุ่มที่เหลือ พบว่า มีสารปฏิชีวนะบางชนิด สามารถยับยั้งการเจริญได้ การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะนี้ นับว่าเป็นคุณสมบัติทางสรีรวิทยาอย่างหนึ่งที่น่าสนใจในการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มตรึงไนโตรเจนเพื่อการจัดจำแนก (หนึ่ง, 2554) ซึ่ง Kodobocz, L. และคณะ (2009) ก็ได้ใช้คุณสมบัติด้านการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ มาควบคู่กับการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่แยกจากพื้นที่ที่มีการปลูกพืชภายใต้สภาวะที่มีการใช้และไม่ใช้การเพาะปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ในประเทศไทย โดยนักวิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด โดยวิธี paper disc methods นอกจากนี้ Yokoyama, T. และคณะ (1999) ก็ใช้ลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อด้านความสามารถในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 7 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นข้อมูลประกอบการแยกและการจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียเช่นกัน ในงานวิจัยนี้ผลที่ได้จากการจัดกลุ่มตามรูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะสามารถจัดได้ 13 รูปแบบนั้น เมื่อนำมาจัดกลุ่มตามลักษณะโคโลนีของเชื้อ พบว่ามีโคโลนีที่แตกต่างกัน 5 แบบ ดังนั้นจึงคัดเลือกตัวแทนเชื้อที่มีโคโลนีต่างกัน 5 แบบ จากเชื้อที่มีรูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกับ มาจำแนกด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rDNA เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อ พบว่า ไอโซเลต STM04, STM06, STM21, STM27 และ STM28 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Agrobacterium* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia kururiensis*, *Bacillus megaterium* และ *Microbacteriaceae bacterium* ตามลำดับ ซึ่งผลการจำแนกในงานวิจัยนี้พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tran Van และคณะ (2000) ที่พบแบคทีเรียในจีนัส *Burkholderia* และ *Bacillus* (Burd และคณะ, 2000) จากการแยกและจำแนกจุลินทรีย์จากดินรอบรากข้าว การที่ในงานวิจัยนี้พบแบคทีเรียในสกุล *Agrobacterium* นั้นเนื่องจาก *Agrobacterium* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้ทั้งในพืชที่เป็นโรคและในดินรอบราก (Martha และคณะ, 1988) นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังพบ *Microbacteriaceae bacterium* ที่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียรอบรากและแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับพืช โดยสกุลของแบคทีเรียที่พบได้เสมอคือ *Agromyces*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Delftia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sphingobacterium* และ *Stenotrophomonas* (Leonardo และคณะ, 2012)

ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้เป็นการหาความหลากหลายของแบคทีเรียรอบรากข้าว เมื่อจำแนกโดยใช้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่ามีแบคทีเรียมากถึง 5 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ที่พบในงานวิจัยนี้มีทั้งสายพันธุ์ที่นักวิจัยทำการวิจัยก่อนหน้านี้พบที่มีความสอดคล้องของข้อมูล และมีบางสายพันธุ์ เช่น *Agrobacterium* sp. และ *Microbacterium* sp. เป็นสายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีนักวิจัยในประเทศไทยพบมาก่อนซึ่งเป็นข้อมูลที่น่าสนใจมากที่จะต้องทำการค้นคว้าทั้งด้านข้อมูลเพิ่มเติมและการพิสูจน์ว่าสายพันธุ์ที่พบในงานวิจัยนี้เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่แยกจากดินรอบรากข้าว (rice rhizosphere) ในประเทศไทย อีกทั้งงานวิจัยนี้ควรทำการวิจัยต่อเนื่องด้านประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อที่แยกได้ เพื่อค้นหาเชื้อที่มีศักยภาพเพียงพอที่นำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพที่สามารถนำกลับไปใช้ส่งเสริมการเจริญของข้าวในการทำนาแบบเกษตรอินทรีย์ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตด้านการใช้ปุ๋ยเคมีในไตรเจนในการทำนาของเกษตรกรซึ่งจะช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของดินได้อีกทางหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่พิจารณาสนับสนุนให้ทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่อำนวยความสะดวกด้านการบริหารจัดการงานวิจัย และขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำทดลองงานวิจัยขึ้นนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- หนึ่ง เตียอำรุง. (2554). แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อานัฐ ตันโช. (2549). เกษตรธรรมชาติประยุกต์ หลักการ แนวคิด เทคนิคปฏิบัติในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์หนังสือ สวทช.
- Alexander, M. (1977). Introduction to soil microbiology (2nd ed.). New York and London: John Wiley and sons.
- Burd, G., Dixon, DG., and Glick, BR., (2000). Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Canada Journal of Microbiology, 46, 237-245.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sata, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isana, T., Mitsui, H., and Minamisawa, K. (2001). Endophytic colonization and in plant and nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Apple Environmental Microbiology, 67, 5285–5293.

- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., and Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in Plant growth promotion. *Annals of Microbiology*, 60, 579-598.
- Khan, AG. (2005). Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18, 355-364.
- Kodobocz, L., Halbritter, A., Mogyorossy, T., and Kecskes, ML. (2009). Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia in cropping areas under intensive and organic agriculture in Hungary. *European Journal of Soil Biology*, 45, 394-399.
- Leonardo, E, de OC., Marisa V, de Q., Arnaldo, CB., and Celia, A, de ME. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1562-1575.
- Lei, S., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., and Song, W. (2008). Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microbial Ecology*, 55, 415-424.
- Martha, CH., Laura, YS., and Alan, JH. (1988). *Agrobacterium tumefaciens* Mutants Deficient in Chemotaxis to Root Exudates. *Molecular Plant-microbe interactions*, 1(4), 182-186.
- Oyaizu-Masuchi, Y., and Komagata, K. (1988). Isolation of free-living nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Journal of General Applied Microbiology*, 34(2), 127-164.
- Teaumroong, N., Teamtaisong, K., Sooksa-nguan, T., and Boonkerd, N. (2001). The diazotrophic Endophytic bacteria in thai rice. *Sustainable Rice Production*, 147-160.
- Tran Van, V., Berge O, Ke SN., Balandreau, J., and Heulin, T. (2000). Repeated neneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant and Soil*, 218, 273-284.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60(2) : 407-438.
- Yokoyama, T., Ando, S., and Tsuchiya, K. (1999). Serological properties and intrinsic antibiotic resistance of soybean *Bradyrhizobia* isolated from Thailand. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45(2), 505-515.