Science and Technology
RMUTT Journal

Vol.6 No.2 (2016) : 17-28
www.sci.rmutt.ac.th/stj
Online ISSN 2229-1547

การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางชีวภาพเพื่อการส่งเสริมการเจริญของพืช

Using Nitrogen Fixing Bacteria with Biological Supporting Media for Promoting the Plant Growth

สุทธวรรณ สุพรรณ[1*] ประดับรัฐ ประจันเขตต์[1] และ สิริแข พงษ์สวัสดิ์[1]

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110
*E-mail: sutthawan_s@rmutt.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและศึกษาโครงสร้างของชิ้นส่วนผักตบชวาตากแห้ง ซึ่งเป็นวัสดุตัวกลางชีวภาพที่ใช้สำหรับการยึดเกาะของแบคทีเรียเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการปลูกคะน้า (*Brassica alboglabra*) ผลการศึกษาสามารถคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ 6 ไอโซเลต ได้แก่ RD01, RD02, RD03, RD04, RD05 และ RD06 โดยไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพ การตรึงไนโตรเจนและการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือ RD02 ตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจน ในอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจนได้ 6.42 mg NH_3-N/L. หลังการบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนี สัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของ RD02 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุลอะโซโตแบคเตอร์ โครงสร้างภายในของวัสดุตัวกลางที่ศึกษาพบว่า มีลักษณะเป็นท่อขนาดใหญ่อยู่ตรงกลาง ล้อมรอบด้วยท่อพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก ทำให้เซลล์แบคทีเรียสามารถสะสมอยู่ได้ โดยตรวจพบเซลล์แบคทีเรีย จากชิ้นวัสดุตัวกลางที่ผสมเชื้อ RD02 ได้ 5.4×10^4 CFU/ml. ซึ่งมีจำนวนเซลล์มากกว่าที่พบในวัสดุตัวกลางที่ไม่ผสมกับเชื้อ RD02 นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางสำหรับการปลูกคะน้า สามารถช่วยให้ความสูงของลำต้นคะน้าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และขนาดความยาวของใบคะน้าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 เจริญเติบโตได้ดีกว่าคะน้าของชุดทดลองที่เติมเฉพาะแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนลงดิน

Received: July 15, 2016
Revised: December 30, 2016
Accepted: December 30, 2016

คำสำคัญ: แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน วัสดุตัวกลางชีวภาพ ผักตบชวา คะน้า

Abstract

This research was aimed to isolate of nitrogen fixing bacteria and study on structure of dried water hyacinth stem as a biological supporting media for bacterial immobilization to using them for enhancing the growth of Chinese Kale. (*Brassica alboglabra*) Six nitrogen fixing bacteria were isolated from soil and designed as RD01, RD02, RD03, RD04, RD05, and RD06. The result showed that RD02 is effective isolate of nitrogen fixing capability and growth characteristic which was the maximum of ammonia-nitrogen in nitrogen-free medium found 6.42 mg NH_3-N/L for72 hours of incubation. Colony, morphology and some biochemical characteristics of RD 02 showed that it similar to *Azotobacter* sp. Inside of the supporting media found a large tube at the center surrounded by microtubules that affected for bacterial cell collecting. 5.4 x 10^4 CFU/ml. of bacterial cell number were found from a piece of supporting media mixed with inoculum (RD02) which higher than the supporting media without inoculums. (control) Furthermore, the using inoculum of nitrogen fixing bacteria mixed with supporting media was promoted the stem 's hight and the leaf 's size of *Brassica alboglabra* at the second week and seventh week of cultivation respectively which significantly difference with the cultivated soil sample mixed inoculum of nitrogen fixing bacteria and uninoculated soil sample.

Keywords: Nitrogen Fixing Bacteria, Biological supporting material, Water Hyacinth, Chinese Kale

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จากอดีตจนถึงปัจจุบันทรัพยากรดินถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน เพื่อผลิตผลผลิตในภาคการเกษตร สำหรับผลิตอาหารให้เพียงพอและทันต่อความต้องการต่อจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งในประเทศ และส่งออกจำหน่ายไปยังตลาดต่างประเทศ ปัญหาสำคัญที่เกี่ยวข้องกับทรัพยากรดิน มีสาเหตุมาจากทั้งที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติและการกระทำของมนุษย์ เช่น ปัญหาดินเปรี้ยวดินเค็ม การทิ้งของเสียลงสู่ดิน ทำให้ไม่สามารถใช้ที่ดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเกิดมลพิษทางดินในหลายพื้นที่ทั่วประเทศนอกจากนี้ยังมีปัญหาสำคัญหนึ่งที่เกิดขึ้นกับดิน คือปัญหาดินขาดแร่ธาตุและเศษซากอินทรียสาร ซึ่งสาเหตุเกิดจากการเพาะปลูกพืชชนิดเดิม เป็นเวลานาน การกษัยการของดินและการทำลายพืชคลุมดิน ทำให้เกิดการพัดพาธาตุอาหารและจุลินทรีย์ดิน ประกอบกับภาวะโลกร้อน ที่มีผลโดยตรงต่อดิน โดยความร้อนที่เกิดขึ้น มีผลทำให้ดินแห้ง มีความชื้นน้อย จนดินแตกระแหง ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ อีกทั้งปัญหาการเผาวัชพืชของเกษตรกร ทำให้ดินมีวัสดุคลุมดินน้อย จากปัญหาดังกล่าวข้างต้น ทำให้ดินไม่เหมาะสมต่อการปลูกพืช เมื่อผลผลิตทางการเกษตรลดลง เกษตรกรส่วนใหญ่จึงนิยมใช้สารเคมีในการปรับปรุง คุณภาพดิน ทำให้ดินมีการสะสมของ

สารเคมี นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาปราบศัตรูพืชและแมลง ทำให้เกิดการสะสมของสารเคมีในพืช ดังนั้นการใช้ที่ดินอย่างผิดวิธีและขาดการบำรุงรักษาจะทำให้ดินค่อยๆ เสื่อมสภาพลง รวมทั้งจะส่งผลกระทบให้เกิดอันตรายต่อทั้งเกษตรกรที่ทำการเพาะปลูก ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมที่สำคัญคือจุลินทรีย์ดิน ที่ช่วยทำให้เกิดการหมุนเวียนแร่ธาตุและสารประกอบในดินก็จะลดจำนวนลง หรือไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการแก้ไขปัญหาการขาดแร่ธาตุของดิน นอกจากการใช้กระบวนการทางเคมี คือ การเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพลงในดิน เนื่องจากจุลินทรีย์ จะทำการตรึงธาตุอาหารและเพิ่มปริมาณสารประกอบที่จำเป็นต่อพืช มีผลทำให้มีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจน รวมทั้งความชื้นและความร่วนซุยเพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น การนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เช่น *Azotobacter chroococcum* มาเติมลงในดินเพื่อสนับสนุนการเจริญของพืช หลังจากเติมเชื้อ 4 สัปดาห์พบว่าขนาดและน้ำหนักของพืชเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังมีผลต่อการลดความเค็มของดินด้วย [1] แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนในจีนัสต่าง ๆ สามารถคัดแยกได้จากแหล่งดินที่เพาะปลูกพืชผลทางการเกษตร เช่น ไร่อ้อย โดยเฉพาะดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) นอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกได้จากโครงสร้างต่างๆ ของพืช เช่น รากและลำต้นพืช เป็นต้น แบคทีเรียที่คัดแยกได้เหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับ การปลูกพืชแทนการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้ [2] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การใช้แบคทีเรียที่คัดแยกจากดิน ยังมีบทบาทในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในดินด้วย [3] อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ดินกลุ่มต่าง ๆ ยังขึ้นอยู่กับอิทธิพลของสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงและการเกิดฝนตกเป็นระยะเวลานาน [4] ดังนั้นการที่จะช่วยทำให้จุลินทรีย์สามารถดำรงชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพพื้นที่เพาะปลูกจึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งเทคนิคที่สามารถช่วยในการแก้ไขปัญหาของ การลดจำนวนจุลินทรีย์ดินได้เป็นอย่างดี คือ การใช้วัสดุตัวกลางให้จุลินทรีย์ยึดเกาะ ตัวอย่างเช่น การใช้วัสดุที่หาได้จากธรรมชาติ เช่น ผักตบชวา ซึ่งเป็นวัชพืชน้ำชนิดหนึ่งที่เป็นปัญหาทั่วโลก [5] เนื่องจากเป็นพืชน้ำที่ยากต่อการควบคุมการเจริญ ทำให้เกิดปัญหาในการระบายน้ำและลดผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับออกซิเจนของแหล่งน้ำ น้ำจึงเน่าเสีย แต่ในอดีตถึงปัจจุบันก็มีการนำผักตบชวามาใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น นำมาใช้ผลิตเป็นถ่าน หรือใช้ในการผลิตเอธานอล นอกจากการใช้ผักตบชวาในการผลิตพลังงานแล้ว ยังนิยมนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุที่ผสมกับปุ๋ยหมักเพื่อช่วยในการบำรุงดินที่ขาดแร่ธาตุ จนถึงดินทรายจัด พบว่าสามารถช่วยทำให้ลักษณะทางกายภาพในการกักเก็บน้ำและสมบัติทางเคมีของดินดีขึ้น ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชและเพิ่มธาตุอาหารในดินได้ [6] ซึ่งข้อดีของการใช้วัสดุธรรมชาติ คือ เป็นวัสดุทางธรรมชาติ ที่สามารถย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีโครงสร้างที่สามารถดูดซับน้ำได้ดี ดังนั้นการคลุกดินหรือการมีวัสดุช่วยคลุมดินด้วยวัสดุใดๆ ก็ตาม เช่น ของเหลือทางการเกษตร หรือเศษซากพืช จะช่วยป้องกันการกัดกร่อน ลดแรงปะทะของเม็ดฝนและแรงลมพัด รักษาความชื้นของดินเอาไว้ได้นานขึ้น อีกทั้งช่วยเพิ่มความคงทนในการจับกันของก้อนดินไว้ได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระจากดินแหล่งต่าง ๆ ศึกษาสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมีบางประการเพื่อจำแนกสกุลของแบคทีเรีย ศึกษา

การเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกได้ ศึกษาสมบัติทางกายภาพ ลักษณะภายในของวัสดุชีวภาพและการกักเก็บเซลล์ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และศึกษาการใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางชีวภาพในการปลูกพืช

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การคัดแยกและศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ

ชั่งตัวอย่างดินน้ำหนัก 1 กรัม จากแหล่งดินต่างๆ ที่เป็นบริเวณที่มีการทับถมของอินทรียสาร และมีความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน จากนั้นนำมากระจายลงบน Azotobacter agar [7] นำไปบ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมา re-streak เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกมาทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ โดยถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Nitrogen - free medium [8] ปริมาตร150 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงโดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เพื่อนำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ มาวิเคราะห์แอมโมเนียโดยใช้ Nessler's reagent [8] จากนั้นทดสอบสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยการย้อมสีแกรมและวัดขนาดของเซลล์

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระและศึกษาสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย

คัดเลือกแบคทีเรีย ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ คือไอโซเลตของแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบแอมโมเนียเป็นสีเหลืองส้ม ในขั้นตอน 2.1 มาเพาะเลี้ยงใน Nitrogen - free medium อีกครั้ง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (strater) โดยปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายลงใน Nitrogen free medium ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (10 % v/v) บ่มเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่าง Nitrogen free medium ที่มีเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 50 มิลลิลิตรในแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจน โดยวิธี Distillation [9] เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ Nitrogen free medium ที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพการ ตรึงไนโตรเจนสูงที่สุดมาศึกษาสมบัติทางชีวเคมีบางประการ รวมทั้งศึกษาสมบัติทางชีวเคมีบางประการได้แก่ การทดสอบความต้องการอากาศ การทดสอบคะตาเลส (catalase test) การทดสอบ ออกซิเดส (oxidase test) การทดสอบ MR -VP (methy red - Voges Proskaue test) การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate utilization) การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test) การทดสอบอินโดล (indole test) และทดสอบการหมักแลกโตส (lactose fermentation test) [10]

2.3 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตโดย โดยการเก็บตัวอย่างสารละลายเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน Nitrogen free medium ของขั้นตอน 2.2 ทุก 12 ชั่วโมง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu UV1700) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นเลือกไอโซเลตของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพใน

การตรึงไนโตรเจนและการเจริญสูงที่สุดมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ โครงสร้างภายในของวัสดุชีวภาพ และการกักเก็บเซลล์ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนของวัสดุชีวภาพ

วัสดุชีวภาพที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ลำต้นผักตบชวา *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms ทำการเตรียมชิ้นส่วนของลำต้นผักตบชวา โดยนำมาตากแดดจนแห้ง จากนั้นตัดลำต้นผักตบชวาให้ได้ความยาวชิ้นละ 2 เซนติเมตร นำมาแช่ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ถูกชะจากชิ้นส่วนของผักตบชวา และนำมาศึกษาโครงสร้างภายในของลำต้นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Olympus SZ30) กำลังขยาย 40 เท่า สำหรับขั้นตอนการศึกษาการกักเก็บเซลล์ของวัสดุตัวกลาง ทำโดยถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนไอโซเลตที่มีการตรึงไนโตรเจนและการเจริญสูงที่สุด ลงในอาหารเหลว Nitrogen free medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวอย่างดินร่วนหนัก 50 กรัมที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการสเตอริไลเซชัน และเติมชิ้นส่วนลำต้นผักตบชวาจำนวน 10 ชิ้น คลุกให้เข้ากัน และบ่มทิ้งไว้อีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นส่วนของผักตบชวามาตากที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง ทำการตรวจนับเซลล์ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ยึดเกาะและถูกกักเก็บ โดยนำชิ้นส่วนของผักตบชวาที่แห้งแล้วมาเจือจางใน 0.85% NaCl และนำสารละลายเชื้อที่ได้มาเกลี่ย (spread) ลงบน Azotobacter agar เทียบกับชุดควบคุม คือชิ้นส่วนผักตบชวาที่ไม่ผ่านการผสมเชื้อ

2.5 การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและวัสดุตัวกลางชีวภาพในการปลูกพืช

บรรจุดินลงในภาชนะที่ใช้ปลูกในแต่ละชุด ดังต่อไปนี้

- ชุดทดลองที่ 1 คือ ดินร่วน 3 กิโลกรัมที่ผ่านการ สเตอริไลเซชัน และเติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่เพาะเลี้ยงใน Nitrogen - free medium ปริมาตร 1 ลิตร
- ชุดทดลองที่ 2 คือ ดินร่วน 2.95 กิโลกรัม ที่ผ่านการ สเตอริไลเซชัน เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่เพาะเลี้ยงใน Nitrogen - free medium ปริมาตร 1 ลิตร ผสมกับชิ้นส่วนลำต้นผักตบชวาตากแห้ง 300 ชิ้น (50 กรัม)
- ชุดควบคุม คือ ดินร่วน 3 กิโลกรัมที่ผ่านการ สเตอริไลเซชันและไม่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

เติมเมล็ดคะน้า (*Brassica alboglabra*) ชุดละ 100 เมล็ด คลุกเคล้าดิน หัวเชื้อ วัสดุตัวกลาง และเมล็ดคะน้าให้เข้ากัน รดน้ำ 1 ลิตร ทุกวัน ลงในแต่ละการทดลอง เก็บตัวอย่าง ต้นคะน้าที่เจริญ ครั้งละ 5 ต้น นำมาหาค่าเฉลี่ยของความยาวราก ความสูงของลำต้น ความยาวของใบ และนับจำนวนใบของคะน้า ทุก 7 วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ นำผลการทดลอง มาทดสอบค่าทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ทางเดียว (one - way ANOVA)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การคัดแยกและศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ

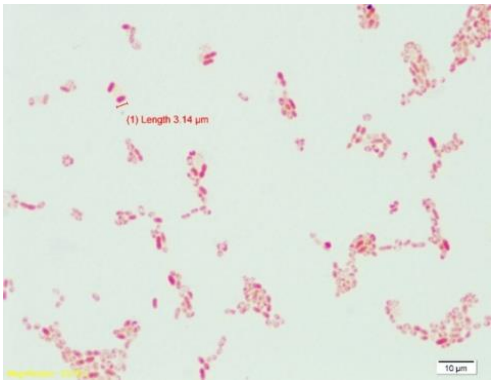
ผลการคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระจากตัวอย่างดิน 10 แหล่ง แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตเจนจากตัวอย่างดินแหล่งต่างๆ

แหล่งดินที่คัดแยก	โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	โคโลนีที่ให้ผลการทดสอบแอมโมเนียเป็นบวก	กำหนดไอโซ-เลต
1. ดินร่วน คณะวิทยาศาสตร์ มทร.ธัญบุรี	4	1	RD01
2. ดินเกษตร (ดินลำดวน)	4	1	RD02
3. ดินจากสระบัว มทร.ธัญบุรี	5	-	-
4. ดินบริเวณปากถ้ำ อ.หนองหิน จ.เลย	8	-	-
5. ดินมูลค้างคาว อ.ด้วง จ.เลย	9	1	RD03
6. ดินจากใต้ต้นก้ามปู มทร.ธัญบุรี	5	1	RD04
7. ดินบริเวณธารน้ำตกแก่งสามชั้น จ.นครนายก	3	-	-
8. ดินนาข้าว อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี	2	1	RD05
9. ดินในถ้ำ อ.หนองหิน จ.เลย	7	1	RD06
10. ดินสวนมะพร้าว อ.หนองม่วง จ.ลพบุรี	4	-	-

โคโลนีของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลต มีลักษณะเป็นเมือก สีขาวขุ่น รูปร่างเซลล์เป็นวงรี ติดสีแกรมลบ บางเซลล์ติดสีไม่สม่ำเสมอ ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 3 ไมโครเมตร เซลล์ที่พบมีทั้งเป็นเซลล์เดียวและเซลล์ที่เรียงติดกันเป็นคู่ เรียงตัวกระจัดกระจาย ตัวอย่างลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้แสดงดังรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

รูปที่ 1 ลักษณะของโคโลนีที่เจริญบน Azotobacter agar



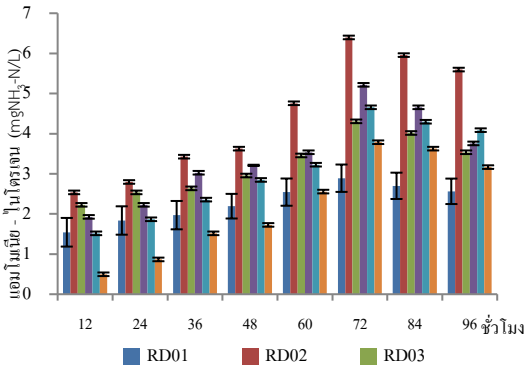
รูปที่ 2 สัณฐานวิทยาของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกได้

จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างดิน จากทุกแหล่ง มีการเจริญของแบคทีเรีย แต่มีเพียง 6 ไอโซเลต คือ RD01 RD02 RD03 RD04 RD05 และ RD06 ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอาหาร Azotobacter agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนได้ สอดคล้องกับรายงานการคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากดินแหล่งต่าง ๆ คือ การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้จากดินนาข้าว [11]

การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากดินบริเวณรอบรากพืช [12] และการคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากดินที่มีการปลูกธัญพืชแหล่งต่างๆ [13]

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระของแบคทีเรียและศึกษาสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในอาหารเหลว Nitrogen - free medium ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ที่คัดเลือกมาทดสอบแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจน (mgNH_3-N/L.) ที่พบในอาหารเหลว Nitrogen - free medium ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลตมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด ในชั่วโมงที่ 72 ของการบ่มเลี้ยง โดยพิจารณาจากปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากนั้นประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนจะลดลง ซึ่ง RD 02 เป็นไอโซเลตที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุดคือ 6.39 mg NH_3-N/L. จึงคัดเลือก RD02 มาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ผลการทดลองดังตารางที่ 2

เมื่อพิจารณาจากลักษณะโคโลนี สัณฐานวิทยา คือ รูปร่างและขนาดของเซลล์ ผลการย้อมสีแกรม การจัดเรียงตัวของเซลล์ และสมบัติทางชีวเคมีบางประการ เพื่อจำแนกสกุลของแบคทีเรียในเบื้องต้น พบว่า RD02 มีลักษณะคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุลอะโซโตแบคเตอร์ (Azotobacter) ซึ่งสอดคล้องกับดวงพร [14] ที่กล่าวว่า *Azotobacter* sp. เป็น

ตารางที่ 2 สมบัติทางชีวเคมีบางประการของไอโซเลต RD02

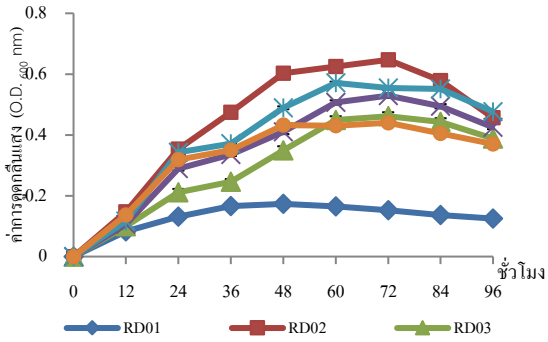
สมบัติทางชีวเคมีบางประการ	
การทดสอบความต้องการอากาศ	เชื้อเจริญบริเวณด้านบนของหลอดทดลอง
การทดสอบคะตาเลส	+
การทดสอบออกซิเดส	+
การทดสอบ MR	-
การทดสอบ VP	-
การทดสอบซิเตรต	+
การทดสอบการเคลื่อนที่	+
การทดสอบอินโดล	-
การทดสอบการหมักแลคโตส	-

แบคทีเรียแกรมลบ เซลล์เป็นรูปไข่ อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย สร้างซีสต์ แต่ไม่สร้างเอนโด-สปอร์ สามารถเคลื่อนที่โดยใช้แฟลเจลลาหลายเส้นที่อยู่รอบตัวเซลล์ และสามารถสร้างเมือกได้ นอกจากนี้ Kizilkaya [15] ได้กล่าวว่า *Azotobacter* sp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มแอโรบิค พบมากในดิน และในปัจจุบันมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับการนำเชื้อ *Azotobacter* sp. มาใช้

ในการเพิ่มธาตุอาหารในดิน ซึ่งผลการทดลองส่วนใหญ่พบว่า การเติมหัวเชื้อ *Azotobacter* sp. จะช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรและมีปริมาณธาตุไนโตรเจนในดินเพิ่มขึ้น จึงนิยมนำมาใช้ในการทำปุ๋ยชีวภาพ (Bio-fertilizers) ในการปรับปรุงและบำรุงดิน

3.3 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ผลการเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนของแต่ละ ไอโซเลตในช่วงเวลาต่างๆ แสดงดังรูป

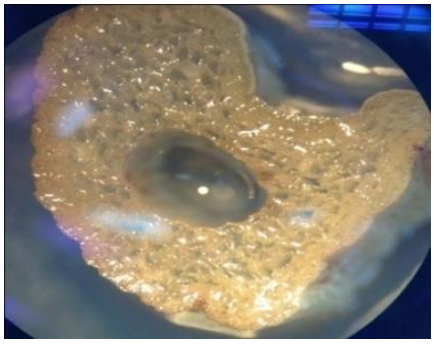


รูปที่ 4 การเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนไอโซเลตต่างๆ

จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ไอโซเลต สามารถเจริญเติบโตในอาหาร Nitrogen free medium ได้ โดยในช่วง 12 ชั่วโมงของการบ่มเลี้ยง แบคทีเรียทุกไอโซ-เลตจะปรับตัวให้เข้ากับอาหารใหม่ ต่อมาในช่วง 24 - 60 ชั่วโมง พบว่า RD03, RD04 และ RD05 สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะเห็นได้จากความขุ่นที่เพิ่มขึ้น ส่วน RD02 เป็นไอโซเลตที่มีการเพิ่มจำนวนได้สูงที่สุด จนถึงชั่วโมงที่ 72 ของการบ่มเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่ตรวจพบว่า มีค่าสูงที่สุดในช่วงเวลาเดียวกันของการบ่มเลี้ยงเชื้อ จากนั้นค่าความขุ่นจึงเริ่มลดลง

3.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ โครงสร้างภายในของวัสดุชีวภาพ และการกักเก็บเซลล์ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับวัสดุชีวภาพ

ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในชิ้นส่วนของลำต้นผักตบชวาตากแห้งที่จะนำมาใช้เป็นวัสดุตัวกลางให้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนใช้ในการยึดเกาะ แสดงดังรูป 5 ลักษณะของชิ้นส่วนผักตบชวาตากแห้งที่ผ่านการผสมกับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และจำนวนแบคทีเรียที่พบจากวัสดุตัวกลางแสดงดังรูปที่ 6 และตารางที่ 3



รูปที่ 5 ลักษณะภายในของชิ้นส่วนลำต้นผักตบชวาที่นำมาใช้เป็นวัสดุตัวกลางชีวภาพในการกักเก็บเซลล์

รูปที่ 6 ลักษณะของชิ้นส่วนผักตบชวาตากแห้งที่ผสมกับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและดิน

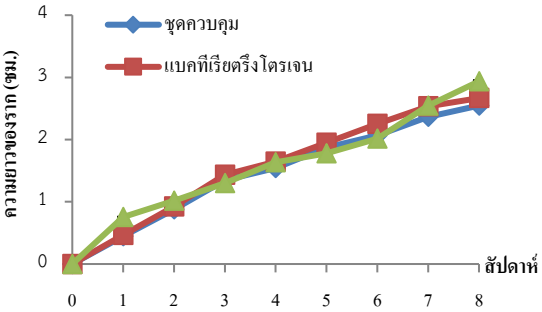
ตารางที่ 3 จำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบจากวัสดุตัวกลางที่ผสมและไม่ผสมกับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

วัสดุตัวกลาง	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml.)
วัสดุตัวกลางที่ผสมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและดิน	5.4×10^4
วัสดุตัวกลางที่ไม่ผสมแบคทีเรีย ตรึงไนโตรเจนและดิน (ชุดควบคุม)	1.5×10^1

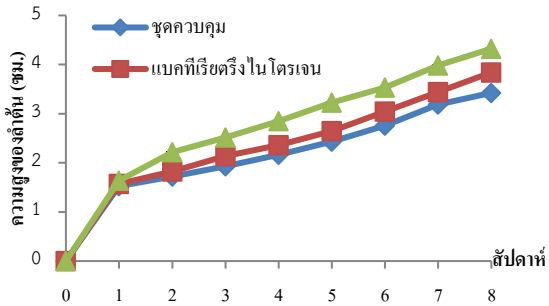
นอกจากนี้ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างของน้ำที่ชะออกจากชิ้นส่วนของลำต้นผักตบชวาตากแห้งตรวจวัดได้ 7.08 ซึ่งมีค่าเป็นกลาง แสดงให้เห็นว่าหากนำวัสดุชนิดนี้มาใช้เป็นตัวกลางและเติมลงดิน ก็จะไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรดด่างของดิน จากรูปที่ 5 ซึ่งเป็นภาพตัดขวาง (cross section) ของวัสดุชีวภาพที่ตัดให้มีขนาด 2 เซนติเมตร พบว่า โครงสร้างภายในเป็นท่อขนาดใหญ่อยู่กึ่งกลาง รวมทั้งมีรูพรุนขนาดเล็กอยู่โดยรอบ จึงทำให้น้ำสามารถซึมผ่านได้ทั่วทั้งชิ้น ดังนั้นเมื่อนำวัสดุตัวกลางดังกล่าวมาผสมคลุกเคล้ากับหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (RD02) และตัวอย่างดินที่ใช้ปลูกคะน้า จึงพบอนุภาคดินแทรกอยู่ภายในชิ้นส่วนของวัสดุตัวกลาง ดังรูปที่ 6 นอกจากนี้วัสดุตัวกลางที่ใช้ยังสามารถกักเก็บเซลล์แบคทีเรียไว้ภายในได้ ซึ่งพิจารณาจากการตรวจพบเซลล์จากวัสดุตัวกลางเมื่อนำมาทำการตรวจนับบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังตารางที่ 3

3.5 การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและวัสดุตัวกลางชีวภาพในการปลูกพืช

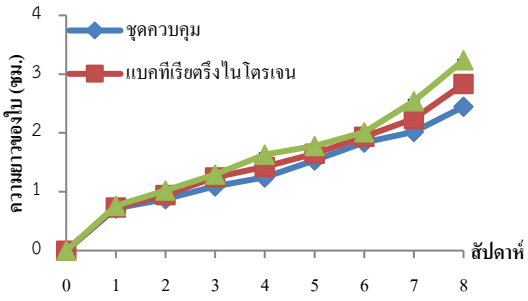
ผลการตรวจวัดความยาวราก ความสูงของลำต้น ความยาวของใบ จำนวนใบและตัวอย่างการเจริญของต้นคะน้าที่ทำการศึกษา แสดงดังรูปที่ 7, 8, 9, 10 และ 11 ตามลำดับ



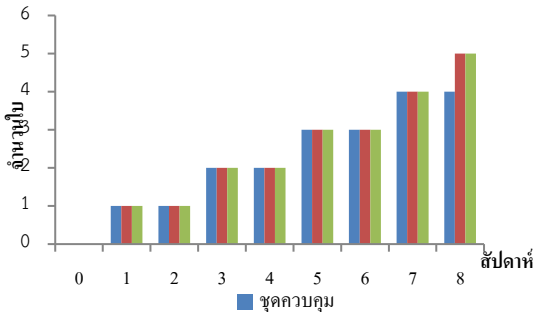
รูปที่ 7 ความยาวของรากคะน้าในแต่ละชุดการทดลอง



รูปที่ 8 ความสูงของลำต้นคะน้าในแต่ละชุดการทดลอง



รูปที่ 9 ความยาวของใบคะน้าในแต่ละชุดการทดลอง



รูปที่ 10 จำนวนใบของคะน้าในแต่ละชุดการทดลอง

รูปที่ 11 ตัวอย่างการเจริญของต้นคะน้าที่ทำการศึกษา

จากผลการศึกษา พบว่า ความยาวรากและจำนวนใบ ในแต่ละชุดการทดลองและชุดควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 แต่ความสูงของลำต้นคะน้า และความยาวของใบคะน้าของชุดทดลองที่ 2 คือ ดินที่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 กับชุดทดลองที่ 1 คือดินที่เติมเฉพาะแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และชุดควบคุมคือดินที่ไม่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Naluyange *et al.* [16] ที่ศึกษาการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมร่วมกับผักตบชวาสำหรับเร่งการเกิดปมรากและการเจริญของพืชตระกูลถั่ว พบว่าการใช้ปุ๋ยที่สูตรที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียจากมูลโคกระบือร่วมกับผักตบชวา และปุ๋ยสูตรที่ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (EM) ร่วมกับผักตบชวา ช่วยทำให้ต้นถั่วมีขนาดใหญ่ภายในระยะเวลาสั้นกว่าปกติ นอกจากนี้พืชที่มีการผสมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนยังมีความทนทานต่อโรคได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ผสมแบคทีเรีย

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำผักตบชวาแห้ง มาใช้เป็นวัสดุตัวกลางให้เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนยึดเกาะและกักเก็บเชื้อให้สามารถอยู่ในดินได้ ซึ่งนอกจากจะเป็นการช่วยลดต้นทุนในการใช้ปุ๋ยในการบำรุงดินและพืชแล้ว ยังสามารถนำผักตบชวาที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วจนทำให้เกิดมลพิษในแหล่งน้ำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุตัวกลางทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี

4. สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ 6 ไอโซเลต ได้แก่ RD01 - RD06 โดย RD02 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ การตรึงไนโตรเจนและการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือ ซึ่ง RD02 เป็นแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกับ *Azotobacter* sp. ซึ่งเป็นหนึ่งในสกุลของแบคทีเรียดินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดี สำหรับโครงสร้างวัสดุตัวกลางที่เลือกนำมาศึกษาพบว่า ภายในมีช่องว่างขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางซึ่งเป็นส่วนของ ท่อน้ำของลำต้นผักตบชวาล้อมรอบด้วยท่อเล็ก ๆ เป็นจำนวนมาก จึงทำให้เซลล์แบคทีเรียสามารถยึดเกาะและสะสมอยู่ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งแตกต่างกับวัสดุตัวกลางที่ไม่ได้ทำการผสมกับหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดแยกได้ นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางสำหรับการปลูกคะน้า สามารถช่วยให้ความสูงของลำต้นและความยาวของใบผักคะน้าสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า

ผักคะน้าในชุดทดลอง ที่เติมเฉพาะแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และผักคะน้าในชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนลงดิน ดังนั้นการใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางชีวภาพจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการเพิ่มธาตุอาหารไนโตรเจนในดิน เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผลทางการเกษตรได้นอกจากนี้การใช้วัสดุตัวกลางชีวภาพยังช่วยในการเก็บรักษากลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแร่ธาตุที่สำคัญในดินไม่ให้ถูกพัดพาออกจากพื้นที่เพาะปลูก

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้การสนับสนุนและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Rojas-Tapias, D., Moreno-Galvan, A., Pardo-Diaz, S., Obando, M., Rivera, D., and Bonilla, R. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (Zea mays). *Applied Soil Ecology*. 2012. 61 : 264 - 272.

[2] Beneduzia, A., Moreirab, F., B. Costab P., K. Vargasa L., B. Lisboaa B., Favretoa R., Ivo Baldanic J., P. Passagliab L.M. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*. 2013. 63 : 94 - 104.

[3] Dinesh, R., Anandaraja, M., Kumar, A., Binia, Y.K., Subilaa, K. P., Aravind R. characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*. 2015. 173 : 34 - 43.

[4] Aguilera, L. E., Armas, C., Cea, A. P., Gutierrez, J. R. Rainfall, microhabitat, and small mammals influence the abundance and distribution of soil microorganisms in a Chilean semi-arid shrubland. *Journal of Arid Environments*. 2016. 126 : 37–46.

[5] Rezania, S., Ponraj, M., Talaiekhozani A., Eva Mohamad S., Md Din M.F., Taib S.M. Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater. *Journal of Environmental Management*. 2015. 163 : 125 – 133.

[6] Rezania, S., Ponraj, M., MdDin, M., Songip, A.R., Md Sairan F., Chelliapan, S. The diverse application sofwater hyacinth with main focus on sustainable energy and production for newera. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015. 41 : 943–954.

[7] Atlas, R. M. *Handbook of Microbiology Media*. CRC Press, Boca Raton. 1993.

[8] Cappuccino, J.C., and Sherman, N., In: Microbiology: *A Laboratory Manual*, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York. 1992 : 125–179.

[9] APHA, AWWA and WP CF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.(18thed). Washington D.C. American Public Health Association. 1992.

[10] Tchan, Y.T., Azotobacteriaceae. In: Krieg, N.R.,Host, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Springer-Verlag, New York, LLC. 1984 : 219 - 234.

[11] Chennappa, G., Adkar-Purushothama, C. R., Suraj, U., Tamilvendan, K. and Sreenivasa, M. Y. Pesticide Tolerant *Azotobacter* Isolates from Paddy Growing Areas of Northern Karnataka, India. *World J Microbiol Biotechnol*. 1999. 30 : 1-7.

[12] Gauri S. S., Mandal, M. S., Mondal, C. K., Dey S., and Pati, R. B. Enhanced Production and Partial Characterization of an Extracellular Polysaccharide from Newly isolated *Azotobacter* sp. SSB81. *Bioresource Technology*. 2009. 100 : 4240 - 4243.

[13] Abdel-Aziez, M. S., Eweda, E. W., Girgis, M.G.Z., and Abdel Ghany, F. B. Improving the Productivity and Quality of Black Cumin (*Nigella sativa*) by Using Azotobacter as N_2 Biofertilizer. *Annals of Agricultural Science*. 2014. 59(1) : 95 - 108

[14] ดวงพร คันธโชติ. *อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์. กรุงเทพฯ. 2537.

[15] Kızılkaya, R. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. Ecological Engineering. 2008. 33:150–156.

[16] Naluyange, V.,. Ochieno, D. M.W., Maingi, J. M., Ombori, O., Mukaminega D., Amoding, A., Odendo, M., Okoth, S. A.,Shivoga, W, A, Muoma, J.V.O. Compatibility of Rhizobium inoculant and water hyacinth compost formulations in Rosecoco bean and consequences on *Aphis fabae* and *Colletotrichum lindemuthianum* infestations. Applied Soil Ecology. 2014. 76 : 68 - 77.