รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดแผนงานวิจัย

2. ชื่อโครงการวิจัย ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย

ชื่อกิจกรรม การศึกษาศักยภาพของจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตรในพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่แยกได้จากพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Study on the potential of PGPRs isolated from areas affected by climate change in Pai River Basin

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวกัลยกร โปร่งจันทึก	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายสุริยนต์ ดีดเหล็ก	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแม่ฮ่องสอน

5. บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่แยกได้จากพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปายในระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 ถึงกันยายน 2562 และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงเพื่อนำไปพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่มีประสิทธิภาพสูงและเหมาะกับทุกพื้นที่ โดยสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารวุ้นแข็งได้จำนวน 33 ไอโซเลท และจำแนกด้วยเทคนิคมัลดิทอฟ (MALDI-TOF) ได้ 2 สกุล คือ *Azospirillum* และ *Azotobacter* พร้อมทั้งทำการวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและความสามารถในการผลิต IAA ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ ซึ่งเป็นความสามารถหลักของเชื้อกลุ่มนี้เพื่อคัดเลือกไปทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตกับพืชทดสอบ ผลการทดลองพบว่า เชื้อสกุล *Azotobacter* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงว่าเชื้อสกุล *Azospirillum* แต่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ต่ำกว่า เมื่อนำ *Azospirillum* 5 สายพันธุ์ และ *Azotobacter* 4 สายพันธุ์ มาศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ 999 ข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง และกระเทียมพันธุ์พื้นเมืองในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียทั้งสองสกุลทุกไอโซเลทมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลท AP1 มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิดสูงที่สุด รองลงมา คือ แบคทีเรียไอโซเลท AT1

This research aimed to study on the potential of bacteria isolated from areas affected by climate change in Pai River Basin during October 2017 to September 2019 to promote the growth of plants and select some isolates with high potential for developing the highly efficient PGPR bio fertilizer product that suitable to use in all areas. Thirty three isolates were collected from agricultural and undisturbed soils. Classification using matrix assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) followed by statistical analysis revealed that those strains could be genus *Azospirillum* (AP) and *Azotobacter* (AT), as well as measuring nitrogen fixation and IAA production abilities of isolated bacteria which are the core competence of this group. The results showed that *Azotobacter* had a high nitrogen fixation ability more than *Azospirillum*, on the other hand *Azospirillum* gave a good IAA production capability. Five isolates of *Azospirillum* and 4 isolates of *Azotobacter* were tested the promotion of the growth of maize variety 999, native variety of upland rice and garlic in the laboratory. The results showed that the bacteria of two genus had different in their abilities to promote the growth of tested plants. The isolate AP1 was the most capable of promoting growth of all 3 tested plants, followed by isolate AT1.

6. คำนำ

การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (Climate change) เป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่มีความสำคัญในระดับภูมิภาคของโลก หลายภาคส่วนได้ตระหนักถึงความรุนแรงของปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศและเตรียมความพร้อมในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศสาเหตุหลักเกิดมาจากสภาวะโลกร้อน (Global warming) ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม เกิดภัยธรรมชาติที่รุนแรงมากขึ้น เช่น น้ำท่วม ฝนแล้ง พายุที่รุนแรง ส่งผลกระทบถึงการดำรงชีวิตของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ภาคการเกษตรเป็นส่วนหนึ่งที่ได้รับผลกระทบโดยตรงจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ ทำให้ศักยภาพในการผลิตลดลงเนื่องจากสภาพภูมิอากาศเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการทางสรีระวิทยาของพืช ตัวอย่างเช่น ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อระบบการผลิตข้าว พบว่าข้าวทุกสายพันธุ์มีความอ่อนไหวต่อการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ ทำให้อายุข้าวสั้นลงและผลผลิตข้าวลดลง นอกจากนี้ยังมีผลต่อการระบาดของโรคและแมลงศัตรูข้าวด้วย สภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงยังส่งผลกระทบโดยตรงต่อจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตรต่าง ๆ โดยปัจจัยทางภูมิอากาศ เช่น ปริมาณน้ำฝน การกระจายของน้ำฝน การทิ้งช่วงของฝน พร้อมทั้งอุณหภูมิเฉลี่ย อุณหภูมิสูงสุด ต่ำสุดที่เกิดขึ้นมีผลต่อ แหล่งที่อยู่อาศัย ชนิด และประชากรของจุลินทรีย์ดินทั้งสิ้น การเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศอาจทำให้จุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตรบางชนิดไม่สามารถปรับตัวได้ ทำให้เกิดแรงกดดันในการเคลื่อนย้ายเพื่อหาที่อยู่อาศัยใหม่ที่เหมาะสม ซึ่งปัจจุบันมีอุปสรรคจากการทำการเกษตรที่มีการใช้

สารเคมี และการบุกรุกพื้นที่ป่าเพื่อทำการเกษตร ทำให้จุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตรหลายชนิดอาจสูญพันธุ์ไปจากแหล่งที่อยู่อาศัยเดิม

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ดินที่ดำรงชีวิตอยู่ในสภาพพื้นที่ ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างพื้นที่ป่ากับพื้นที่ที่ถูกรบกวนจากการเขตกรรมในแต่ละช่วงเวลาในรอบ 1 ปี ซึ่งสามารถระบุชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ดินชนิดต่าง ๆ ที่อาจพบเพิ่มขึ้นหรือลดลงไปจากแหล่งอาศัยในระบบนิเวศน์นั้นๆ โดยข้อมูลเหล่านี้จะสามารถบ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของดิน รวมทั้งการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ดินบางชนิดที่สามารถปรับตัว และยังคงกิจกรรมที่ช่วยสนับสนุนเกื้อกูลต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งที่อยู่อาศัยนั้น ๆ โดยเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์ดินที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเป็นอีกกลุ่มที่เป็นตัวบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของดิน รวมถึงการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ดินที่แยกได้จากพื้นที่ที่ทำการศึกษาซึ่งเป็นจุลินทรีย์ดินที่ผ่านการปรับตัวให้มีชีวิตอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปเพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชในพื้นที่ ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ ซึ่งงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะผลิตพืชในชุมชนเกษตรของลุ่มน้ำปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ และเป็นพื้นที่ ที่เริ่มมีการบุกรุกป่าเพื่อทำการเขตกรรม นอกจากนี้ยังสามารถนำผลการศึกษาที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตพืชสำหรับพื้นที่อื่นๆ ที่กำลังจะได้รับผลกระทบจากสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลง เพื่อบรรเทาหรือหยุดยั้งผลกระทบและความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นได้อย่างเป็นรูปธรรมและทันต่อเหตุการณ์ โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตรเป็นองค์ประกอบสำคัญในการนำมาเพิ่มศักยภาพในการผลิตพืชให้ยั่งยืนต่อไป โดยการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่แยกได้จากพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดเพื่อนำไปพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่มีประสิทธิภาพสูงและเหมาะกับทุกพื้นที่

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียสกุล *Azospirillum brasilense* (DASF04003, DASF04005) และ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์–วัน และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์–ทู
2. เมล็ดพันธุ์ข้าว ข้าวโพด และกระเทียม
3. API 20NE kit
4. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

- วิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินจำนวน 4 จุด รวม 36 ตัวอย่าง ในพื้นที่การผลิตพืชในชุมชนเกษตรและพื้นที่ป่าของลุ่มน้ำปาย อำเภอปายและเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเฉพาะสำหรับแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโต เช่น อาหาร Nitrogen free semisolid matate (NFb), NFb + Congo red (RC) และ LGI โดยคัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน และเก็บเชื้อบนอาหารวุ้นเอียงสำหรับไว้ศึกษาต่อไป

2. วัดประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย ดังนี้

2.1 ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) เลี้ยงเชื้อในอาหารกึ่งเหลว NFb และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนจุกหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นจุกยางสำหรับเก็บก๊าซ ทำการอัดก๊าซอะเซทิลีนลงไปในส่วนปริมาตรเหนืออาหาร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หลังจากนั้นทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดก๊าซจากหลอดปริมาตร 1 มิลลิลิตร และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph

2.2 การผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.1 การผลิตฮอร์โมน IAA (Indole-3-Acetic Acid) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารจำเพาะของแต่ละสกุล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหาร NFb broth ที่เติม L–tryptophan 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม Salkowski reagent 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ IAA ที่แบคทีเรียสร้างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2.2 การผลิตจิบเบอเรลลิน (GA_3) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 2.1 และ 2.2.1 ในอาหารจำเพาะของแต่ละสกุล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 48 ชั่วโมง เติม tryptophan ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใส ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร มาทดสอบการผลิตปริมาณการผลิตจิบเบอเรลลินด้วยวิธีการของ Paleg (1965) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้ 5% HCl เป็น blank คำนวณปริมาณจิบเบอเรลลินที่แบคทีเรียสร้างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.3 การเพิ่มความเป็นประโยชน์ธาตุอาหารพืช

2.3.1 ความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส ศึกษาความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสบนอาหารแข็ง นำแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 2.1 และ 2.2.1 มา streak บนอาหารแข็งเฉพาะของแต่ละสกุล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำ spot inoculation บนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium และ Sundara Rao Sinha Medium (SRSM) แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน จากนั้นตรวจสอบวงใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้นจากการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

2.3.2 ความสามารถในการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ (siderophore) โดยนำแบคทีเรียคัดเลือกจากข้อ 2.1 และ 2.2.1 มา streak บนอาหารแข็งเฉพาะของแต่ละสกุล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อแตะโคโลนีของแบคทีเรียมา 1 โคโลนี แล้ว จิ้มบนอาหารแข็ง chrome azurol sulphonate (CAS) ที่เตรียมโดยวิธีการของ Alexander and Zuberer (1991) แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบวงใสรอบโคโลนี

3. จำแนกสกุลและชนิดโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคมัลดิทอฟ (MALDI-TOF)

3.1 การจำแนกโดยวิธีทางสรีระวิทยา ทำการจำแนกแบคทีเรียคัดเลือกจากข้อ 2.1 และ 2.2.1 โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งจำเพาะของแบคทีเรียแต่ละสกุล บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจเช็คลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง และทำการย้อมสีเซลล์ แบบ different straining และนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000x

3.2 การจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี ทำการจำแนกแบคทีเรียคัดเลือกจากข้อ 2.1 และ 2.2.1 โดยใช้ API 20NE kit (BioMerieux, France) นำผลที่บันทึกได้จากการทดสอบไปแปรผลจาก Analytical Profile index

3.3 การจำแนกโดยเทคนิคมัลดิทอฟ (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight: MALDI-TOF) ทำการจำแนกแบคทีเรียคัดเลือกจากข้อ 2.1 และ 2.2.1 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารสูตรจำเพาะหรืออาหารเลี้ยงเชื้อแบบทั่วไป

3.3.2 การสกัดและตกตะกอนโปรตีนของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกรดฟอร์มิกและแอลกอฮอล์

3.3.3 การตกผลึกโปรตีน (crystallization) ด้วย Matrix HCCA, portioned

3.3.4 วิเคราะห์ผลด้วยเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ แบบ MALDI-TOF

4. ศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในห้องปฏิบัติการ

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง จากข้อ 2 จำนวน 9 ไอโซเลท (*Azospirillum* 5 ไอโซเลท และ *Azotobacter* 4 ไอโซเลท) มาทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในห้องปฏิบัติการดังนี้

4.1 ทำการทดสอบในหลอดทดลอง ทำการเลี้ยงเชื้อเหลวในอาหารเฉพาะของแต่ละสกุล โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยดเชื้อเหลว 0.5 มิลลิลิตร ลงบนเมล็ดข้าวโพด ข้าว และกระเทียม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหลอดทดลองขนาดใหญ่ หลังจากนั้นเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 2 วัน นำออกจากที่มืด เติมน้ำกลั่นนึ่ง 0.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนครบ 7 วัน ทำการวัดความยาวรากและความสูงลำต้น

4.2 ทำการทดสอบในขวดแก้ว

4.2.1 ศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพด วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม ไม่ใส่จุลินทรีย์

กรรมวิธีที่ 2 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ *Azospirillum brasilense* (DASF04003)

กรรมวิธีที่ 3 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141)

กรรมวิธีที่ 4 แบคทีเรีย *Azospirillum* (AP1)

กรรมวิธีที่ 5 แบคทีเรีย *Azospirillum* (AP4)

กรรมวิธีที่ 6 แบคทีเรีย *Azotobacter* (AT1)

กรรมวิธีที่ 7 แบคทีเรีย *Azotobacter* (AT9)

4.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกระเทียม วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม ไม่ใส่จุลินทรีย์

กรรมวิธีที่ 2 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ *Azospirillum brasilense* (DASF04003)

กรรมวิธีที่ 3 แบคทีเรีย *Azospirillum* (AP1)

กรรมวิธีที่ 4 แบคทีเรีย *Azospirillum* (AP4)

กรรมวิธีที่ 5 แบคทีเรีย *Azotobacter* (AT1)

กรรมวิธีที่ 6 แบคทีเรีย *Azotobacter* (AT9)

4.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม ไม่ใส่จุลินทรีย์

กรรมวิธีที่ 2 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ *Azospirillum brasilense* (DASF04005)

กรรมวิธีที่ 3 แบคทีเรีย *Azospirillum* (AP1)

กรรมวิธีที่ 4 แบคทีเรีย *Azospirillum* (AP4)

กรรมวิธีที่ 5 แบคทีเรีย *Azotobacter* (AT1)

กรรมวิธีที่ 6 แบคทีเรีย *Azotobacter* (AT9)

ทำการเลี้ยงเชื้อเหลวในอาหารเฉพาะของแต่ละสกุล โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยดเชื้อเหลว 1 มิลลิลิตร ในขวดแก้วที่บรรจุทรายนึ่งฆ่าเชื้อ 300 กรัม ใส่เมล็ดข้าวโพด

ข้าว และกระเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อผิวภายนอก เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นเก็บไว้ในห้องที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการถอนแยกให้เหลือ 2 ต้นต่อขวด เติมสารละลาย N-free medium และรักษาความชื้นในทรายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตโดยวัดความสูง และความยาวราก

- เวลาและสถานที่

<u>ระยะเวลา</u> ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562

<u>สถานที่ทำการทดลอง</u> กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแม่ฮ่องสอน

5. วิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการของ Duncan's new multiple range test (DMRT)

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดแยกแบคทีเรีย และการศึกษาประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียที่แยกได้

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria or PGPR)" เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน เพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช สร้างสารซิเดอโรฟอร์ (siderophores) ซึ่งมีสมบัติเพิ่มการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์พืช โดยการแย่งจับธาตุเหล็กบริเวณรอบรากพืช ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชไม่สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ได้ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormones) เช่น ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (auxins) ซึ่งกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ การแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ สร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และลามินาริเนส (laminarinase) ย่อยเส้นใยเชื้อราโรคพืช สร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เป็นต้น (หนึ่ง, 2548; ธงชัย, 2550 และ Glick *et al*., 1999) ซึ่งในแบคทีเรียบางสกุลมีความสามารถหลายอย่างรวมกัน แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตพืชมีหลายสกุลด้วยกัน ได้แก่ *Azospirillum* sp. *Azotobacter* sp. *Beijerinckia* sp. และ *Gluconacetobacter* sp. เป็นต้น ซึ่งในการทดลองนี้สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินที่เก็บช่วงเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2562 ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารวุ้นได้จำนวน 36 ไอโซเลท พร้อมทั้งทำการวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและความสามารถในการผลิต IAA ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ ซึ่งเป็นความสามารถหลักของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1–2 โดยพบว่าแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* (AP) มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.042–0.903 ไมโครโมลเอทธิลีนต่อชั่วโมงต่อหลอด และผลิตฮอร์โมน IAA อยู่ในช่วง 10.42-77.21 ppm ส่วนแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* (AT) มี

ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 3.203–9.136 ไมโครโมลเอทธิลีนต่อชั่วโมงต่อหลอด และผลิตฮอร์โมน IAA อยู่ในช่วง 15.86–108.43 ppm และจากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่า เชื้อสกุล *Azotobacter* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงว่าแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* แต่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ต่ำกว่ายกเว้นไอโซเลทที่ 1 ที่มีความสามารถในการผลิต IAA สูงถึง 108.43 ppm ซึ่งสอดคล้องกับ Khambalkar and Sridar (2015) ที่รายงานว่า ปัจจัยทางด้านพันธุกรรมของแบคทีเรียที่สกุลต่างกันทำให้ปริมาณการตรึงไนโตรเจนมากน้อยต่างกันด้วย ส่วนการผลิตฮอร์โมน IAA แต่ละไอโซเลทจะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ ซึ่งประกอบด้วยความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิ (Mohite, 2013) การดูดของสารละลาย การจำกัดของคาร์บอน และปัจจัยทางด้านพันธุกรรมของแบคทีเรียในการผลิตฮอร์โมน IAA แบคทีเรียต่างชนิดกันส่งผลให้การผลิตฮอร์โมน IAA แตกต่างกันด้วย (Spaepen *et al*., 2007)

ตารางที่ 1 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและผลิต IAA ของเชื้อบริสุทธิ์สกุล *Azospirillum* ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

ไอโซเลท	ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (μmol C_2H_2/h/tube)	ความสามารถในการผลิต IAA (ppm)
AP1	0.903 ± 0.141	77.21
AP3	0.482 ± 0.253	68.70
AP4	0.640 ± 0.091	62.24
AP5	0.346 ± 0.206	57.63
AP6	0.069 ± 0.025	71.83
AP7	0.096 ± 0.031	87.54
AP8	0.054 ± 0.023	71.78
AP9	0.042 ± 0.031	69.31
AP10	0.071 ± 0.023	74.46
AP11	0.066 ± 0.011	53.95
AP12	0.065 ± 0.015	54.14
AP13	0.049 ± 0.003	48.58
AP14	0.053 ± 0.010	72.03
AP20	0.080 ± 0.020	10.42
AP21	0.700 ± 0.102	15.83
AP26	0.820 ± 0.058	17.84
AP27	0.740 ± 0.017	13.54
AP29	0.712 ± 0.135	19.96
AP31	0.602 ± 0.996	15.48

ตารางที่ 2 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและผลิต IAA ของเชื้อบริสุทธิ์สกุล *Azotobacter* ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

ไอโซเลท	ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (μmol C_2H_2/h/tube)	ความสามารถในการผลิต IAA (ppm)
AT1	7.952 ± 1.546	108.43
AT2	5.782 ± 1.453	19.48
AT3	5.785 ± 2.715	15.86
AT4	9.136 ± 0.542	39.94
AT6	4.410 ± 0.321	14.02
AT7	4.774 ± 0.614	16.48
AT9	5.861 ± 0.714	14.50
AT10	6.016 ± 1.007	13.50
AT11	3.203 ± 0.595	44.63
AT32	7.533 ± 0.548	25.12
AT35	6.214 ± 0.152	26.70
AT37	6.899 ± 0.167	32.02
AT38	7.778 ± 0.220	27.97
AT39	6.562 ± 0.179	20.00

จากการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ด้วยวิธี ARA และการผลิตฮอร์โมน IAA ด้วยวิธีการใช้ Salkowski reagent ทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียทั้งสองสกุลที่มีประสิทธิภาพและเจริญได้ดีในอาหารสังเคราะห์เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ โดยการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้งหมด 9 ไอโซเลท ไปทำการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตจิบเบอเรลลินและความสามารถในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (DASF04003 DASF04005 และ DASF04141) ผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งสองสกุลสามารถผลิตจิบเบอเรลลินอยู่ในช่วง 153.59–595.52 ppm และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในอาหาร SRSM ได้ทุกไอโซเลทแต่ไม่แสดงความสามรถในการละลายฟอสเฟตในอาหาร Pikovskaya’s medium (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kapagam and Nagalakshmi (2014) ที่รายงานว่าจุลินทรีย์ดินที่มีความสามารถในการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตมีหลายชนิดทั้งที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น *Azospirillum* sp. *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. *Rhizobium* sp. *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. เป็นต้น ซึ่งประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์นั้นมีความแตกต่างกันโดยได้รับอิทธิพลจากชนิดของดินและการเขตกรรมที่แตกต่างกัน (ธงชัย, 2550) วิธีการที่นิยมใช้ตรวจสอบคุณสมบัติในการสร้างซิเดอโรฟอร์ของเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น คือ การทดสอบบนอาหาร CAS ซึ่งสารซิเดอโรฟอร์เป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิธรรมชาติ (secondary metabolite) มี

ความจำเพาะต่อเฟอริกไอออนผลิตจากแบคทีเรียและรา เป็นตัวช่วยนำเหล็กเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณเหล็กจำกัด โดยชนิดของซิเดอโรฟอร์ที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และความสามารถในการผลิตซิเดอโรฟอร์นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ (มานิตา และวสุ, 2557) โดยผลการทดลองในตารางที่ 3 พบว่า แบคทีเรียทั้งสองสกุลที่แยกได้ทุกไอโซเลทไม่สามารถผลิตสารซิเดอโรฟอร์ ซึ่งแตกต่างกับรายงานของ Kapoor and Kar (1989) ที่พบว่า เชื้อสกุล *Azotobacter* สามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโต วิตามิน สารป้องกันเชื้อรา และสารซิเดอโรฟอร์ได้ เช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐานไอโซเลท DASF04141 (*Azotobacter vinelandii*) ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่มีความสามารถในการผลิตสารซิเดอโรฟอร์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลิน (GA_3) ความสามารถในการละลายฟอสเฟต และความสามารถในการผลิตสาร siderophore ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

ไอโซเลท	**ความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลิน (ppm)**	**ความสามารถในการละลายฟอสเฟต**		**ความสามารถในการผลิตสารซิเดอโรฟอร์**
		Pikovskaya' medium	SRSM	
Azopirillum brasilense (DASF04003)	180.77	+	+	+
Azopirillum brasilense (DASF04005)	210.01	+	+	+
Azotobacter vinelandii DASF04141	176.07	-	+	+
Azopirillum (AP1)	153.59	-	+	-
Azopirillum (AP3)	338.32	-	+	-
Azopirillum (AP4)	154.15	-	+	-
Azopirillum (AP5)	184.73	-	+	-
Azopirillum (AP7)	183.21	-	+	-
Azotobacter (AT1)	231.33	-	+	-
Azotobacter (AT4)	156.18	-	+	-
Azotobacter (AT9)	207.42	-	+	-
Azotobacter (AT10)	595.52	-	+	-

หมายเหตุ : + = ให้ผลเป็นบวกในการทดสอบ

- = ให้ผลเป็นลบในการทดสอบ

2. จำแนกสกุลและชนิดโดยวิธีทางสรีระวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคมัลดิทอฟ (MALDI-TOF)

2.1 การศึกษาทางสรีระวิทยา (Morphology)

Azospirillum

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Azospirillum* โดยการย้อมแกรมติดสีแดง (แกรมลบ) มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งเล็กน้อย ขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร มีเพอริทริคัสแฟลกเจลลา (peritrichous flagella) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ และโพลาร์แฟลกเจลลา (polar flagella) เพื่อใช้ในการแหวกว่าย มีการสะสมแกรนูลของ พอลิ-บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-ß-hydroxybutyrate; PHB) (Fibach-Paldi *et al*., 2012) *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินและมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระ จำนวน 15 species โดย species ที่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์กับพืชมากที่สุดคือ *A. brasilense ส่วน A. lipoferum A. amazonenze* และ *A. irakense* จะมีการยึดเกาะบริเวณผิวรากพืช (Cassan *et al*., 2015) สามารถปรับตัวให้เจริญเติบโตได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนน้อย โดยจะดำรงชีวิตแบบ microaerophilic

Azotobacter

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Azotobacter* โดยการย้อมแกรมติดสีแดง (แกรมลบ) เซลล์มีรูปร่างรีหรือทรงกลม สอดคล้องกับรายงาน Jensen (1954) และ Holt *et al.* (1994) ซึ่งบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Azotobacter* ว่าเซลล์มีขนาด 1-2 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่รูปร่างรี แท่ง หรือทรงกลม เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์อาจอยู่รวมเป็นกลุ่มหรือต่อกันเป็นสาย มีแฟลกเจลลา (flagella) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ และสร้างเมือก (mucus) และแคปซูล (capsule) บางชนิดสร้างเม็ดสี (pigment) เช่น สีเขียวอมเหลือง สีม่วง หรือสีน้ำตาลเข้ม

2.2 การศึกษาทางชีวเคมี

การศึกษาด้านชีวเคมีของเชื้อสกุล *Azospirillum* จำนวน 5 ไอโซเลทที่แยกได้ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE ซึ่งใช้ในการทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เชื้อจุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโต จากผลการทดลองพบว่า เชื้อสกุล *Azospirillum* ทั้ง 5 ไอโซเลท มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยการเปลี่ยนรูป (รีดิวซ์) NO_3 เป็น N_2O และเปลี่ยนรูป NO_3 เป็น N_2 สอดคล้องกับรายงานของ Alef and Nannipieri (1995) ที่รายงานว่า ความสามารถในการรีดิวซ์ NO_3 เป็น NO_2 พบใน *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* และ *A. iraken* แต่ความสามารถในการรีดิวซ์ NO_2 ไปเป็น N_2O นั้นพบเฉพาะใน *A. lipoferum*, *A. brasilense* และ *A. halopraeferens* เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อสกุล *Azospirillum* ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถใช้ Esculin ferric citrate, Gelatin (bovine origin), 4-nitrophenyl-**β**-D-galactopyranoside และ malic acid ในการเจริญได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลท AP1 และ AP3 สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสกุล *Azospirillum* ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทั้ง 3 ไอโซเลท (DASF 04003, DASF 04008 และ DASF 04141) พบว่า ทุกไอโซเลทที่แยกได้มีความความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การใช้ Esculin ferric citrate และ 4-nitrophenyl-**β**D-

galactopyranoside ในการเจริญ และยังพบว่า DASF 04003 และ AP7 สามารถใช้ Esculin ferric citrate, Gelatin (bovine origin), 4-nitrophenyl-**β**-D-galactopyranoside ในการเจริญได้ (ตารางที่ 4) ส่วนการศึกษาด้านชีวเคมีของเชื้อสกุล *Azotobacter* จำนวน 4 ไอโซเลท พบว่า มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยการเปลี่ยนรูป NO_3 เป็น N_2O และเปลี่ยนรูป NO_3 เป็น N_2 เช่นเดียวกับ DASF04141 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 3 ไอโซเลท คือ AT1, AT9 และ AT10 (ตารางที่ 5) ซึ่งไม่ตรงกับผลการทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเบื้องต้น (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่า ทุกไอโซเลทสามารถใช้ D-glucose, L-arginine, Urea และ Esculin ferric citrate ในการเจริญได้เช่นเดียวกับ DASF04141 โดยเฉพาะไอโซเลท AT4 ที่สามารถใช้ 4-nitrophenyl-**β**-D-galactopyranoside ได้เช่นเดียวกับเชื้อมาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 5 จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งสองสกุลมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและสามารถใช้ Esculin ferric citrate ในการเจริญได้เหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญได้มากกว่าเชื้อสกุล *Azotobacter* แต่ไม่สามารถใช้ D-glucose, L-arginine และ Urea ในการเจริญได้ (ตารางที่ 4 และ 5)

2.3 การจำแนกด้วยเทคนิคมัลดิทอฟ (MALDI-TOF)

ผลการทดลองพบว่าค่า score value ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท อยู่ระหว่าง 1.70. – 1.99 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ให้ผลวิเคราะห์ที่หน้าเชื่อถือการจำแนกในระดับสกุล โดยเชื้อที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ รหัส DASF 04003 และ DASF 04008 ผลการจำแนกเป็น *Azospirillum brasilense* รหัส DASF 04141 ผลการจำแนกเป็น *Azotobacter vinelandii* ส่วนไอโซเลท AP1 AP3 AP4 AP5 และ AP7 คือ *Azospirillum* spp. และ AT1 AT4 AT9 และ AT10 คือ *Azotobacter* spp. (ตารางที่ 6) การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเครื่องแมสสเปคโตรเมทรีโดยใช้เทคนิคมัลดิทอฟ (MALDI) มีหลักการทำงานคือ เป็นเครื่องมือวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสาร ซึ่งเป็นการตรึงโปรตีน (ribosomal protein) หรือเปปไทด์กับผลึกของ matrix (crystalline matrix) และยิงแสงเลเซอร์ลงบนตัวอย่างโปรตีนให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน แล้วเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้าเพื่อแยกโมเลกุลของสาร โดยสารที่มวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมาก และตกกระทบกับตัวตรวจจับ (detector) ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบกับตัวตรวจจับ เรียกว่า time-of-flight (TOF) มี Software ที่ใช้ในการควบคุมการทำงานของเครื่อง และใช้ในการประมวลผลทางด้านการวิเคราะห์ บ่งบอก และจัดจำแนกเชื้อ (Identification and Classification for microorganism) มี Reference Library หรือ In-house Library ของ peptide mass fingerprint (PMF) ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากตัวอย่าง (Hosseini and Martinez-Chapa, 2017) ในทางเดียวกันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ทางด้านการเกษตร โดยทดสอบศักยภาพของวิธีเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียในวงศ์ Rhizobiaceae ได้แก่ *Rhizobium, Ensifer Shinella, Mesorhizobium*, และ *Azorhizobium* เปรียบเทียบกับวิธี phylogenetic analyses พบว่าการใช้เทคนิคมัลดิทอฟให้ผลการจำแนกเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้สามารถจำแนก *Bradyrhizobium japonicum*

strain G49 *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 และ USDA257 ที่เจริญในปมรากของถั่ว (Ferreira *et al*., 2011; Ziegler *et al*., 2012; Jia *et al*., 2015)

ตารางที่ 4 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อสกุล *Azospirillum* โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

ไอโซเลท	NO_3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
DASF04008	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
DASF04003	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DASF04141	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AP1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AP3	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
AP4	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
AP5	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
AP7	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

NO_3 = reduction of NO_3 to N_2O and reduction of NO_3 to N_2, TRP = L-tryptophan, GLU = D-glucose, ADH = L-arginine, URE = Urea, ESC = Esculin ferric citrate, GEL = Gelatin (bovine origin), PNPG = 4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside, GLU = D-glucose, ARA = L-arabinose, MNE = D-mannose, MAN = D-mannital, NAG = N-acetyl-glucosamine, MAL = D-maltose, GNT = potassium gluconate, CAP = capric acid, ADI = adipic acid, MLT = malic acid, CIT = trisodium citrate and PAC = phenyl acetic acid

ตารางที่ 5 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อสกุล *Azotobacter* โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

ไอโซเลท	NO_3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
DASF04141	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT1	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT4	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT9	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT10	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NO_3 = reduction of NO_3 to N_2O and reduction of NO_3 to N_2, TRP = L-tryptophan, GLU = D-glucose, ADH = L-arginine, URE = Urea, ESC = Esculin ferric citrate, GEL = Gelatin (bovine origin), PNPG = 4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside, GLU = D-glucose, ARA = L-arabinose, MNE = D-mannose, MAN = D-mannital, NAG = N-acetyl-glucosamine, MAL = D-maltose, GNT = potassium gluconate, CAP = capric acid, ADI = adipic acid, MLT = malic acid, CIT = trisodium citrate and PAC = phenyl acetic acid

ตารางที่ 6 การจำแนกด้วยเทคนิคมัลดิทอฟ (MALDI-TOF)

รหัสเชื้อจุลินทรีย์	ผลการจำแนก	ค่า Score value*
DASF 04003	*Azospirillum brasilense*	2.35
DASF 04005	*Azospirillum brasilense*	2.20
DASF 04141	*Azotobacter vinelandii*	2.28
AP1	*Azospirillum*	1.75
AP3	*Azospirillum*	1.78
AP4	*Azospirillum*	1.72
AP5	*Azospirillum*	1.86
AP7	*Azospirillum*	1.19
AT1	*Azotobacter*	1.85
AT4	*Azotobacter*	1.81
AT9	*Azotobacter*	1.90
AT10	*Azotobacter*	1.80

* score ระหว่าง 0.00 - 1.69 แสดงผลเป็นสีแดง แปลผลว่า ไม่สามารถจำแนกได้

score ระหว่าง 1.70 - 1.99 แสดงผลเป็นสีเหลือง แปลผลว่า สามารถรายงานระดับสกุล (genus) ของจุลินทรีย์ที่ทำการวิเคราะห์

score ระหว่าง 2.00 - 3.00 แสดงผลเป็นสีเขียว แปลผลว่า สามารถรายงานระดับสกุล (genus) และชนิด (species) ของจุลินทรีย์ที่ทำการวิเคราะห์

3. การศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสกุลที่แยกได้โดยใช้เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ 999 ข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง และกระเทียมพันธุ์พื้นเมืองในห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วัน (ข้าวโพด และกระเทียม) และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-ทู (ข้าว) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตสูงสุดไปศึกษาต่อในระดับแปลงทดลอง โดยเบื้องต้นทำการทดลองในหลอดทดลองและเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตเมื่อครบ 7 วัน ผลการทดสอบการใส่เชื้อแบคทีเรียกับข้าวโพดพันธุ์ 999 พบว่า การใช้แบคทีเรียไอโซเลท AT4 ข้าวโพดมีความยาวรากสูงที่สุด คือ 7.89 เซนติเมตร รองลงมาคือ แบคทีเรียไอโซเลท AT4 และ AP1 (7.68 และ 7.11 เซนติเมตร) ในส่วนความสูงต้นข้าวโพดการใช้แบคทีเรียไอโซเลท AP1 ข้าวโพดมีความสูงต้นสูงสุด คือ 10.98 เซนติเมตร รองลงมา คือ แบคทีเรียไอโซเลท AT1 และ AT9 (10.98 และ 9.25 เซนติเมตร) แต่มีความยาวรากและความสูงต้นน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม (8.09 และ 10.60 เซนติเมตร) และเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04003 (8.05 และ 12.79 เซนติเมตร) จากผลการทดลองข้างต้นจึงทำการเลือกแบคทีเรียทั้งสองสกุล จำนวน 4 ไอโซเลท คือ AP1 AP4 AT1 และ AT9 ไปทำการ

ทดสอบในขวดแก้วเป็นระยะเวลา 3 อาทิตย์ ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลททำให้ข้าวโพดมีความยาวรากและความสูงต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยแบคทีเรียไอโซเลท AP1 มีความยาวรากสูงสุดใน 4 ไอโซเลท คือ 6.17 เซนติเมตร แต่น้อยกว่าแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04003 และ DASF04141 (6.67 และ 6.46 เซนติเมตร) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 7) ในส่วนของความสูงต้น พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AP1 ข้าวโพดมีความสูงต้นสูงที่สุด คือ 40.83 เซนติเมตร รองลงมา คือ แบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04003 ที่ข้าวโพดมีความสูงต้น 36.17 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับแบคทีเรียไอโซเลท AT1 และ AP4 ดังแสดงในตารางที่ 7 เช่นเดียวกับรายงานของ Bandahu and Adhikari (2013) ที่รายงานว่า นอกจาก *Azotobacter* จะสามารถตรึงไนโตรเจน ผลิต IAA และจิบเบอเรลลินได้แล้วยังช่วยเพิ่มการงอกของเมล็ดและส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดด้วย และ Spaepen *et al.* (2008) ที่พบว่า ฮอร์โมนพืชที่ผลิตโดยแบคทีเรียส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราก และการใส่เชื้อ *Azospirillum* ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวโพด ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจาก IAA ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

ตารางที่ 7 ผลของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในขวดแก้ว

ไอโซเลท	**ข้าวโพด**	
	ความยาวราก (ซม.)	**ความสูงต้น (ซม.)**
Control	5.83 ab	25.67 d
DASF04003	6.67 a	36.17 b
DASF04141	6.46 a	27.83 d
AP1	6.17 a	40.83 a
AP4	4.67 b	33.83 bc
AT1	4.83 b	34.17 bc
AT9	5.67 ab	31.67 c
C.V. (%)	**13.31****	**5.93****

การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกระเทียมพันธุ์พื้นเมืองในหลอดทดลอง พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AP1 กระเทียมมีความยาวรากสูงสุด คือ 1.53 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04003 ที่กระเทียมมีความยาวราก 1.38 เซนติเมตร รองลงมาคือ แบคทีเรียไอโซเลท AT9 และ AT1 (1.32 และ 1.05 เซนติเมตร) นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AP1 กระเทียมมีความสูงต้นสูงที่สุด คือ 2.98 เซนติเมตร สูงกว่าแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04003 ที่กระเทียมมีความยาวราก 2.72 เซนติเมตร รองลงมา คือ แบคทีเรียไอโซเลท AT9 และ AT1 จากผลการทดลองข้างต้นได้ทำการเลือกแบคทีเรียทั้งสองสกุล จำนวน 4 ไอโซเลท คือ AP1 AP4 AT1 และ AT9 ไปทำการทดสอบในขวดแก้วเป็นระยะเวลา 3 อาทิตย์ ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลททำให้กระเทียมมีความยาวรากและความสูงต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ทางสถิติ (ตารางที่ 8) โดยแบคทีเรียไอโซเลท AT9 กระเทียมมีความยาวรากสูงสุดใน 4 ไอโซเลท คือ 2.83 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04003 แบคทีเรียไอโซเลท AP1 และกรรมวิธีควบคุม (2.58 2.08 และ 2.07 เซนติเมตร ตามลำดับ) ส่วนผลของแบคทีเรียทั้งสองสกุลต่อความสูงของต้นกระเทียม พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AT9 กระเทียมมีความสูงต้นสูงที่สุด คือ 5.33 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04003 และกรรมวิธีควบคุมที่กระเทียมมีความสูงต้น 3.83 และ 3.17 เซนติเมตร (ตารางที่ 8) จากผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับรายงานของ Prisa (2019) ที่รายงานว่า การใช้ *Azospirillum brasilense* ในการผลิตกระเทียมทำให้คุณภาพและการเจริญเติบโตของกระเทียมเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากฮอร์โมน IAA และ GA ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

ตารางที่ 8 ผลของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อการการเจริญเติบโตของกระเทียมในขวดแก้ว

ไอโซเลท	กระเทียม	
	ความยาวราก (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)
Control	2.07 ab	3.17 b
DASF04003	2.58 a	3.83 b
AP1	2.08 ab	2.92 b
AP4	1.27 b	1.22 c
AT1	1.12 b	1.18 c
AT9	2.83 a	5.33 a
C.V. (%)	**36.03****	**23.87****

การทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองในหลอดทดลอง พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AP7 ข้าวมีความยาวรากสูงสุด คือ 5.15 เซนติเมตร รองลงมาคือ แบคทีเรียไอโซเลท AT1 และ AP1 (5.11 และ 5.04 เซนติเมตร) ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04005 ที่ข้าวมีความยาวราก 3.83 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AT1 ข้าวมีความสูงต้นสูงที่สุด คือ 5.86 เซนติเมตร รองลงมา คือ แบคทีเรียไอโซเลท AP1 และ AP4 (4.76 และ 4.73 เซนติเมตร) ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04005 ที่ข้าวมีความยาวราก 3.69 เซนติเมตร จากผลการทดลองข้างต้นได้ทำการเลือกแบคทีเรียทั้งสองสกุล จำนวน 4 ไอโซเลท คือ AP1 AP4 AT1 และ AT9 ไปทำการทดสอบในขวดแก้วเป็นระยะเวลา 3 อาทิตย์ ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลททำให้ข้าวมีความยาวรากและความสูงต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 9) โดยแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04005 ข้าวมีความยาวรากสูงที่สุด คือ 12.25 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับแบคทีเรียไอโซเลท AP1 AT1 AT9 และกรรมวิธีควบคุม ซึ่งข้าวมีความยาวราก 11.58 11.75 11.25 และ 11.18 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ส่วนผลของแบคทีเรียทั้งสองสกุลต่อความสูงของข้าว พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AP1 ข้าวมีความสูงต้นสูงที่สุด คือ 10.58 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าและ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับแบคทีเรียมาตรฐานไอโซเลท DASF04005 ที่ข้าวมีความสูงต้น 8.67 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 9 นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AT1 และ AT9 ข้าวมีความสูงต้น8.58 เซนติเมตร เท่ากันและไม่แตกต่างทางสถิติกับแบคทีเรียไอโซเลท AP1 (ตารางที่ 9) จากผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ พิมพ์ธิดาและคณะ (2552) ที่พบว่าการใช้แบคทีเรียไอโซเลท NK5-5 และ NK12-3 มีผลทำให้การตอบสนองความยาวต้นและความยาวรากอ่อนข้าวเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำ และการวิจัยของ เนตรนภาและคณะ (2558) พบว่าการตอบสนองของข้าวโดยการใช้แบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าวแต่ละพันธุ์ การใช้แบคทีเรียร่วมกับข้าวที่มีผลต่อการตอบสนองของความยาวต้นและความยาวรากอ่อนของข้าวนั้น ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวและแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วย ลักษณะที่ตอบสนอง ทิศทางการตอบสนองทำให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงระหว่างแบคทีเรียและพันธุ์ข้าวที่ทำการศึกษา

ตารางที่ 9 ผลของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อการการเจริญเติบโตของข้าวในขวดแก้ว

ไอโซเลท	**ข้าว**	
	ความยาวราก (ซม.)	**ความสูงต้น (ซม.)**
Control	11.18 a	6.83 c
DASF04005	12.25 a	8.67 b
AP1	11.58 a	10.58 a
AP4	8.83 b	4.67 d
AT1	11.25 a	8.58 bc
AT9	11.75 a	8.58 bc
C.V. (%)	**6.27****	**13.46****

จากการศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในห้องปฏิบัติการจากพืชทดสอบ 3 ชนิด คือ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ 999 ข้าวไร่พันธุ์เมือง และกระเทียมพันธุ์พื้นเมือง พบว่าแบคทีเรียทั้งสองสกุลทุกไอโซเลทมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลท AP1 มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิดสูงที่สุด รองลงมา คือ แบคทีเรียไอโซเลท AT1 เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองสกุลสามารถตรึงไนโตรเจนและผลิตฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินได้ สอดคล้องกับรายงานของ Shihui *et al.* (2006) ที่รายงานว่า ฮอร์โมน IAA เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินและยังสามารถช่วยกระตุ้นการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นและรากพืชได้ (Ying, 2012)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเติบโตของพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารวุ้นได้จำนวน 33 ไอโซเลท และจำแนกเป็น 2 สกุล คือ สกุล *Azospirillum* และ สกุล *Azotobacter* ผลของการวัดความสามารถ

ในการตรึงไนโตรเจนและความสามารถในการผลิต IAA ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ชี้ให้เห็นว่า เชื้อสกุล *Azotobacter* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงว่าเชื้อสกุล *Azospirillum* แต่มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ต่ำกว่า ส่วนการศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ 999 ข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง และกระเทียมพันธุ์พื้นเมือง แบคทีเรียทั้งสองสกุลทุกไอโซเลทมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลท AP1 มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิดสูงที่สุด รองลงมา คือ แบคทีเรียไอโซเลท AT1 เพื่อยืนยันผลของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของพืชควรทำการศึกษาในระดับแปลงทดลองต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากการทดลอง (AP1 AT1 และ AT9) ไปศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเพื่อเพิ่มผลผลิตกระเทียม ข้าวโพด และข้าวในพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย เพื่อนำข้อมูลและเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตสูงสายพันธุ์ใหม่ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพที่เหมาะสมกับพื้นที่ปลูกกระเทียม ข้าวโพด และข้าว

11. เอกสารอ้างอิง

ธงชัย มาลา. 2550. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 300 หน้า

เนตรนภา อินสลุด ปรียาภรณ์ แสงเรือน และ กานต์สิรี หลีชัยกูล. 2558. อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต IAA ต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์ กษ. 46(3)(พิเศษ): 625–628.

พิมพ์ธิดา เรืองไพศาล ฉวีวรรณ เหลืองวุฒิโรจน์ และ ดารารัตน์ โฮตาก้า. 2552. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างฮอร์โมนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช. วารสารดินและปุ๋ย. 4: 222–235.

มานิตา คำแจ่ม และ วสุ ปฐมอารีย์. 2557. สารไซเดอโรฟอร์จากจุลินทรีย์. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 30(1): 229–247.

หนึ่ง เตี่ยอำรุง. 2548. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). วารสารเทคโนโลยีสุรนารี 12(3): 249–258.

Alef, K. and P. Nanninpieri. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Harcourt Brace & Company. 576 p.

Alexander, D.B. and D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fert Soils. 12: 39-49.

Bandahu, R. B. and P. Adhikari. 2013. Effect of *Azotobacter* on growth and yield of maize. SAARC J. Agri. 11(2): 141–147.

Cassán, F.D., Y. Okon, and C.M. Creus. 2015. Handbook for *Azospirillum*. Springer International Publishing. 514 p.

Ferreira, L., F. Sanchez-Juanes, P. Gracia-Fraile, R. Rivas, P. Mateos, E. Martinez-Molina, J.M. Gonzales-Ziegler, D., A. Mariotti, V. Pfluger, M. Saad, G. Vogel, M. Tonolla and X. Perret. 2012. *In Situ* identification of plant-invasive bacteria with MALDI-TOF mass spectrometry. Plos one. 7(5): e37189

Fibach-Paldi, S., S. Burdman and Y. Okon. 2011. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiology Letters 326(2): 99-108.

Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin and D.M. Penrose. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, Waterloo, Ontario, Canada. 276 p.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T.Williams1 994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MS, USA.

Hosseini, S. and S.O. Martinez-Chapa. 2017. Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 68 p.

Jensen, H. L. 1954. The Azotobacteriaceae. Bacteriological Reviews18 (4): 195–214.

Jia, R.Z., R.J. Zhang, Q. Wei, W.F. Chen, I.K. Cho, W.X. Chen and Q.X. Li. 2015. Identification and Classification of Rhizobia by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. J Proteomics Bioinform. 8(6) : 98-107.

Kapagam, T. and P.K. Nagalakshmi. 2014. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agriculture soil. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3(3): 601–614.

Kapoor, I.J. and B. Kar. 1989. Antagonism of *Azotobacter* and *Bacillus* to *Fusarium Oxysporumlycopersici*. Indian Phytopathol. 42(3): 401–404.

Khambalker, P. and R. Sridar. 2015. Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing *Burkholderia* sp.. Int. J. Agri. Envi. Biotech. Plant Pathology. 681–689.

Mohite, B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. J. Soil Sci. Plant Nutr. 13(3): 638–649.

Paleg, L.G.. 1965. Physiological effects of the gibberellins. Annu. Rev. Plant Physiol. 16: 291.

Prisa Domenico. 2019. Effect of *Azospirillum brasilense* on garlic (*Allium sativum* L.) cultivation. WJARR. 02(03): 008–013.

Shihui, Y., Qiu, Z., Jianhua, G., Amy, O.C., Bernard, R.G., Mark, I., Donald, A.C. and H.Y. Ching. 2006. Effect of indole–3–acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. Appl. Environ. Microbiol. 4: 1,079–1,088.

Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A. and J. Vanderleyden. 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* indole–3–acetic acid production on inoculated wheat plants. Plant Soil. 312: 15–23.

Ying, J., Yue, W., Wensi, X., Yanhong, C., Jiandong, C., Li, X., Feng, H. and L. Huixin. 2012. IAA–producing bacteria and bacterial–feeding nematodes promote *Arabidopsis thaliana* root growth in natural soil. Eur. J. Soil Biol. 52: 20–26.

Ziegler, D., A. Mariotti, V. Pfluger, M. Saad, G. Vogel, M. Tonolla and X. Perret. 2012. In Situ identification of plant-invasive bacteria with MALDI-TOF mass spectrometry. Plos one 7 (5): e37189.