การกระตุ้นการเจริญของรากพืชโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน

Plant Root Stimulation by Purple Non-sulfur Photosynthetic Bacteria

สุคีตา ภัยพิทักษ์[1] จินตนาถ วงศ์ชวลิต[1] และ มาลี ศรีสดสุข[1*]

Suketa Paipitak[1] Jintanat Wongchawalit[1] and Malee Srisodsuk[1*]

Abstract

Nowadays, applications of microorganisms in agriculture become more interesting issue. Photosynthetic bacteria are a group of bacteria that can produce substances for plant growth promotion. In this experiment, purple non-sulfur photosynthetic bacteria were screened from mud and water resources by using 3 types of mediums. It was found that Glutamate-Malate medium was the best selection medium. In root growth stimulation studies of mung beans, it was found that bacterial isolate GM2-1 was the best in stimulation of root formation and root growth of 26.33 roots and 19.80 mm, respectively, in comparison with 50 µg/ml IAA. Moreover GM2-1 was able to stimulate root growth of rice and could produce auxin. Base on physiological characteristics and database comparisons of 16S r DNA nucleotide sequences, it was found that GM1, GM2-2 and GMA were most likely to be *Rhodopseudomonas* sp., while GM4 was similar to *Rhodopseudomonas palustris*., GM2-1 was similar to *Thauera* sp., GM5-2 and GM6 were similar to *Enterobacter* sp.

Keywords: purple non-sulfur photosynthetic bacteria, root stimulation, auxin production from bacteria

[1] โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม, 73140

Department of Microbiology, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

รับเรื่อง : กุมภาพันธ์ 2556

* Corresponding author: faasmls@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ทางการเกษตรได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญของพืชได้ งานวิจัยนี้จึงคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันจากโคลนและน้ำโดยใช้อาหารคัดเลือก 3 ชนิด พบว่าอาหาร Glutamate-Malate มีประสิทธิภาพในการแยกได้ดีที่สุด การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญของรากถั่วเขียวพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท GM2-1 สามารถกระตุ้นการ งอกรากและความยาวรากเฉลี่ยต่อต้นได้ดีที่สุดคือ 26.33 ราก และ 19.80 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย IAA ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการเจริญของรากข้าวและผลิตออกซินได้ การจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาและการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA กับฐานข้อมูล พบว่าไอโซเลท GM1, ไอโซเลท GM2-2 และ ไอโซเลท GMA มีลำดับเบสเหมือนกับ *Rhodopseudomonas* sp., ไอโซเลท GM4 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Rhodopseudomonas palustris,* ไอโซเลท GM2-1 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Thauera* sp., ไอโซเลท GM5-2 และ ไอโซเลท GM6 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Enterobacter* sp.

คำนำ

จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญ ในการสนับสนุนหรือเพิ่มความแข็งแรงและการเจริญเติบโตให้แก่พืช โดยผลิตสารที่ช่วยกระตุ้นการเจริญของพืช เพิ่มผลผลิต ลดการติดเชื้อโรค รวมทั้งลดความเครียดของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรค (Van Lon and Bakker, 2005: Lugternberg and Kamilova, 2009) นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชได้ เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนินและเอธิลีน (Patten and Glick, 1996)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญของพืชได้ ทำให้ปัจจุบันแบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน ได้รับความสนใจในด้านการศึกษาและวิจัยอย่างกว้างขวาง เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีเมแทบอลิซึมที่หลากหลายกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น สามารถเจริญได้โดยมีเมแทบอลิซึมทั้งแบบโฟโตออโตโทรฟ (photoautotroph) และโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (photoheterotroph) (Staley *et al.*,1989) มีการนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การบำบัดน้ำเสียและของเสีย การผลิตสารกำจัดวัชพืช การผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ การผลิตพลังงานทดแทน การใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์ การนำไปใช้ในทางการแพทย์ รวมถึงใช้ในทางการเกษตร Maki (2004) รายงานว่า ดินในบริเวณรากข้าวในระยะข้าวตั้งท้องจะมีสภาวะแบบไม่มีออกซิเจน ทำให้แบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบิคแบคทีเรียเจริญได้ดี ส่งผลให้เกิดการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ขึ้น ทำให้ไปยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมของรากข้าว เกิดความเป็นพิษต่อราก แต่เมื่อนำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงใส่ลงในดินในระยะเวลาดังกล่าว จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจะเปลี่ยนไฮโดรเจนซัลไฟด์ ให้อยู่ในรูปสารประกอบซัลเฟอร์ที่ไม่เป็นพิษต่อราก ทำให้รากข้าวเจริญงอกงามอย่างเห็นได้ชัดและลักษณะของต้นข้าวก็มีความแข็งแรง ส่งผลให้ผลผลิตของเมล็ดข้าวมากขึ้นตามไปด้วย

งานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นการศึกษาแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันถึงความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของรากพืช เพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีที่มีราคาแพงและทำลายสิ่งแวดล้อม ทำให้ลดต้นทุนในการผลิตของเกษตรกร และเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรที่ปลอดภัยจากสารเคมีเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน

สุ่มเก็บตัวอย่างจากโคลนและน้ำจำนวน 60 ตัวอย่าง ในจังหวัดนครปฐม เพื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน ในอาหารคัดเลือก 3 ชนิด คือ Basal medium (Pfennig and Truper, 1992), Glutamate-Malate medium (Carr, 1969) และ G5 medium (Kohlmiler and Gest, 1951) ภายใต้การทดสอบการให้แสงไฟจากหลอดไฟที่ความเข้มแสง 3,750 ลักซ์ เปรียบเทียบกับแสงจากธรรมชาติ ใน anaerobic box เป็นเวลา 5 – 7 วัน สังเกตการเจริญโดยดูจากความขุ่นและสารสีที่แบคทีเรียสร้างขึ้น คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างสารสีแดงถึงม่วง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกระตุ้นการเจริญของรากถั่วเขียวและรากข้าว

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Glutamate-Malate medium (GM) เป็นเวลา 3 วัน โดยให้เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 cfu/ml นำต้นถั่วเขียวอายุประมาณ 1 สัปดาห์ หรือหลังจากที่มีใบคู่แรก มีลักษณะลำต้นที่สมบูรณ์แข็งแรง ตัดรากออกภายใต้น้ำเพื่อลดแรงดัน ตามวิธีของ Turetskaia (1961) แช่ในแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในเซลล์แขวนลอยในอาหาร GM ตัวเซลล์ที่ผ่านการแยกอาหาร GM ออก และส่วนของอาหาร GM ที่เอาเซลล์ออกเปรียบเทียบกับน้ำประปา อาหาร GM และสารละลาย IAA ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อครบกำหนดเวลา นำต้นถั่วเขียวมาล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ และนำไปแยกเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ คัดเลือกไอโซเลทที่มีผลการกระตุ้นการเจริญของรากถั่วเขียวดีที่สุด มาทำการทดลองแบบเดียวกันกับต้นข้าว เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อแบคทีเรียมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันหรือไม่

3. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อในอาหาร GM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางเชื้อใน 0.85% NaCl (normal saline) ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ Mcfaland เบอร์ 0.5 นำเชื้อที่เจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปลูกลงในอาหารเหลว GM ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ ให้แสงไฟที่ 3,570 ลักซ์ วัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ทุกๆ 6 ชั่วโมง

4. การทดสอบการผลิตออกซิน

การทดสอบการผลิตออกซินประยุกต์มาจากการวิธีการของ Glickmann และ Dessaux (1995) และ Patten และ Glick (2002) โดยนำแบคทีเรียไอโซเลทที่กระตุ้นการเจริญของรากได้ดีที่สุด ปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่เลี้ยงในอาหาร GM ปลูกเชื้อลงในอาหาร nutrient broth (NB; Beef 3 g, peptone 5 g, distilled water 1 L) และ Glucose Peptone Agar Medium (GPAM; D-glucose 5 g, peptone 5 g, K_2HPO_4 5 g, distilled water 1 L) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีและไม่มี tryptophan 100 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง แล้วดูดส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Salkowski's reagent (Gordon and Weber, 1951) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่ม 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA ที่ความเข้มข้น 0.03 ถึง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. การแยกและวิเคราะห์ออกซินด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

การแยกและวิเคราะห์ออกซินชนิด IAA ประยุกต์จากวิธีของ Chung และคณะ (2003) โดยนำส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขั้นตอนการทดสอบการผลิตออกซินมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที กรองด้วย Ultra filter membrane ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 2.5 ด้วย 5 N ของ hydrogen chloride เติม ethyl acetate ปริมาตร 1 ต่อ 1 ผสมให้เข้ากันในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของสาร แยกเอาเฉพาะชั้นบนของสารประกอบมาทำการระเหย ethyl acetate ออกจากสารประกอบออกซินด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้ง(evaporator) จากนั้นละลายด้วยตัวทำละลาย methanol: acetic acid (25%:1%) ปรับ pH ให้เท่ากับ 4.5 จากนั้นนำมาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาด 5 × 10 เซนติเมตรปริมาตร 3 ไมโครลิตร ระยะห่างระหว่างจุดเท่ากับ 0.7 เซนติเมตร ใช้ mobile phase เป็น n-hexane:ethyl acetate: isopropanol:acetic acid (40:20:5:1) จากนั้นนำมาพ่นด้วย Salkowski's reagent บ่มในที่มืด 20 นาที ตรวจสอบ

โดยเทียบกับสารละลาย IAA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การจัดจำแนกแบคทีเรีย

การจัดจำแนกแบคทีเรียใช้ลักษณะทางสรีระวิทยา สัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี โดยดูจากรูปร่าง การติดสี แกรม ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และการทดสอบทางชีวเคมีในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ไพร์เมอร์ 27F (5/- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3/) และ 1492R (5/-GGYTACCTTGTTAGGACTT -3/) ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ PCR นำชิ้นส่วนที่ได้จากการเพิ่มส่งวิเคราะห์ลำดับเบสที่ First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ Gen Bank โดยใช้โปรแกรม Blast และ ClustalW (version 2.1)

ผลและวิจารณ์

1. การแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน

ผลการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ และโคลนจากแหล่งต่างๆจำนวน 60 ตัวอย่างในจังหวัดนครปฐม สามารถคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง กลุ่มไม่สะสมกำมะถันได้จำนวน 8 ไอโซเลท คือ GM1, GM2-1, GM2-2, GM4, GM5-1, GM5-2, GM6 และ GMA โดยอาหารที่มีความสามารถในการคัดแยกได้ดีที่สุดจากการเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียคืออาหาร GM (ตารางที่ 1) เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงต้องการวิตามินต่างๆ มากมายในการเจริญ ได้แก่ ไบโอติน (biotin), กลูตาเมต (glutamate), ไนอิซิน (niacin),ไธอะมีน-ไดคลอไรด์ (thiamine-dichloride), กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (ρ-aminobenzoic acid), ไพริดอกโซเลียมไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxolium hydrochloride), แคลเซียมแพนโธทีเนต (Ca-panthotenate), วิตามิน บีสิบสอง (B12) เป็นต้น (Imhoff, 1992) และการให้แสงไฟที่ความเข้มแสง 3,570 ลักซ์ พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญได้ดีกว่าการให้แสงจากธรรมชาติ เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถเจริญได้ดีเมื่อมีการให้แสงไฟที่ 1,000 นาโนเมตร หรือมากกว่า (Sasikala *et al.*, 1993) จึงทำการเลี้ยงเชื้อทุกไอโซเลทที่แยกได้ในอาหาร GM และให้แสงไฟที่ความเข้มแสง 3,570 ลักซ์ ต่อไป แบคทีเรียที่เจริญเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารที่ใช้และสภาพการเลี้ยง ทำให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มสะสมกำมะถัน ซึ่งเจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศแต่มีแสง กับแบคทีเรียกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน ซึ่งเจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศ แต่มีแสง หรือ ในสภาพที่มีอากาศ มีหรือไม่มีแสง โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ (chemoheterotroph)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกระตุ้นการเจริญของรากถั่วเขียวและรากข้าว

การทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นการเจริญของรากถั่วเขียว โดยใช้เซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่ผ่านการแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออก และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เอาเซลล์แบคทีเรียออก พบว่าส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เอาเซลล์แบคทีเรียออก มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของรากถั่วเขียวได้น้อยมาก อาจเนื่องมาจากสารกระตุ้นการเจริญของพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียผลิตออกมามีปริมาณน้อย ทำให้กระตุ้นการเจริญของรากได้น้อย ในขณะที่ตัวเซลล์ที่ผ่านการแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออก บางไอโซเลทสามารถกระตุ้นการเจริญและความยาวของรากได้ เนื่องมาจากการอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรีย กับพืชจะมีการส่งสัญญาณระหว่างกัน (Compant *et al.*, 2009) กระตุ้นให้แบคทีเรียมีการผลิตสารกระตุ้นการเจริญของพืชเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ตัวเซลล์ที่ผ่านการแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของรากมากขึ้น ในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็ต้องการอาหาร สำหรับการเจริญเติบโตของตัวเอง ทำให้ผลจากการแช่ต้นถั่วเขียวในเซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถกระตุ้นการเจริญและเพิ่มความยาวของรากได้ดีที่สุด โดยแบคทีเรียเจริญเติบโตไปพร้อมกับผลิตสารกระตุ้นการเจริญของพืช เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย IAA ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำประปา และอาหาร GM (ตารางที่ 2) การวิเคราะห์ผล

ทางสถิติของสารละลายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบไอโซเลทที่มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของรากดีที่สุด พบว่า GM2-1, GM2-2, GM4, GM5-2 สามารถกระตุ้นการเจริญและความยาวรากได้ดี ส่วนเชื้อ GM1สามารถกระตุ้นการเจริญของรากได้รองลงมา เชื้อ GM6 และ GMA สามารถกระตุ้นความยาวของรากได้ ซึ่งทุกไอโซเลทมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.1$) (ตารางที่ 3)

คัดเลือกไอโซเลทที่ให้ผลการกระตุ้นการเจริญของรากดีที่สุดคือ ไอโซเลท GM2-1 ซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญของรากเฉลี่ย 40.20 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 24.12 มิลลิเมตร นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญของต้นข้าว พบว่า ไอโซเลท GM2-1 สามารถกระตุ้นการเจริญของรากข้าวได้ดี รวมทั้งขนาดของรากที่งอกมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลของสารละลาย IAA ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและน้ำประปา (ตารางที่ 4) ซึ่ง Kobayashi (2000)รายงานว่า การนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไปใช้ในการกระตุ้นการเจริญของต้นข้าวจะทำให้ต้นข้าวมีการแตกของรากมากขึ้น ส่งผลให้ต้นข้าวมีผลผลิตเพิ่มขึ้น

3. การวัดการเจริญของแบคทีเรีย

การวัดการเจริญของเชื้อในอาหาร พบว่าไอโซเลท GM1, GM2-1, GM2-2, GM5-2, GM6 และ GMA เจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ภายใน 66 ชั่วโมง โดยมีระยะ log phase อยู่ในช่วง 24 – 42 ชั่วโมง ส่วนไอโซเลท GM4 เจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ภายใน 60 ชั่วโมง และมีระยะ log phase อยู่ในช่วง 24 – 36 ชั่วโมง (ไม่แสดงผล)

4. การทดสอบการผลิตออกซิน

เลี้ยงเชื้อไอโซเลท GM2-1ในอาหาร NA และ GPAM ที่มีและไม่มี tryptophan เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของ IAA ความเข้มข้น 0.03 ถึง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มี tryptophan ไอโซเลท GM2-1 ในอาหาร GPAM สามารถผลิต IAA ได้มากกว่าอาหาร NA ถึง 197 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเติม tryptophan 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ไอโซเลท GM2-1 สามารถผลิต IAAได้มากขึ้นในอาหารทั้งสองชนิด โดยผลิต IAA สูงสุดได้ 650 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงในอาหาร NA ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 582 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงว่าแบคทีเรียไอโซเลท GM2-1 สามารถผลิต IAA ได้และอาหารที่กระตุ้นให้แบคทีเรียผลิต IAAมากที่สุดคือ อาหาร NA ที่เติม tryptophan 100 ไมโครกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) สอดคล้องกับการทดลองของ Shima (2011) พบว่าเมื่อเพิ่ม tryptophan ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะสามารถผลิต IAA ได้มากขึ้นเกือบ 5 เท่า ทั้งนี้เนื่องจาก tryptophan เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ IAA ในอาหารที่ไม่ได้เติม tryptophan มีการผลิต IAA ได้เนื่องจากในอาหารมี tryptophane อยู่ในองค์ประกอบ เช่น peptone

5. การแยกและวิเคราะห์ออกซินด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

แยกสารประกอบออกซิน ที่แบคทีเรียไอโซเลท GM2-1 ผลิตให้บริสุทธิ์และนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เทียบกับสารละลาย IAA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารที่สกัดได้เป็น IAA ซึ่งมีค่า R*f* = 0.6875 ส่วนอาหาร GPAM ที่เติม tryptophan เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีสารประกอบของออกซินอยู่ และมีจุดสีเหลือง (A)และม่วง (B) บนแผ่น TLC (ภาพที่ 3) ซึ่งคาดว่าไม่ใช่ tryptophan เนื่องจาก tryptophan ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายนี้ ทำให้ไม่ถูกพาไปตามสารละลายบน TLC สารสีเหลืองและสีม่วงที่พบอาจเป็นออกซินอีกประเภท คือ indole-acetaldehyde (Rf = 0.79) และ tryptophol (*Rf* =0.58) Chung และคณะ (2003) ได้วิเคราะห์ IAA โดยใช้ TLC ก็พบแถบสีเหลืองของ indole-acetaldehyde และแถบสีม่วงของ tryptophol เช่นกัน ซึ่ง indole-acetaldehyde และ tryptophol เป็นสารระหว่างปฏิกิริยา (intermediate) ในการสังเคราะห์ IAA

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันที่คัดแยกได้จากจังหวัดนครปฐมและเปรียบเทียบการเจริญในอาหาร Basal Medium (BM), Glutamate-Malate Medium (GM) และ G5 Medium (G5)

ตัวอย่าง		ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ					
		BM		GM		G5	
ไอโซเลท	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	การ	สี	การ	สี	การ	สี
GM1	บ่อเลี้ยงปลาที่มีเศษใบไม้ อ.สาม	-	ใส	+++	แดงเข้ม	+	เหลือง
GM2-1	คอกวัว2 อ.ดอนยายหอม	-	ใส	+++	แดงเข้ม	+	เหลือง
GM2-2	คอกวัว2 อ.ดอนยายหอม	-	ใส	+++	แดงเข้ม	+	เหลือง
GM4	คอกวัว1 อ.ดอนยายหอม	+	ส้ม	+++	แดงเข้ม	+	เหลือง
GM5-1	น้ำเสียโรงงาน อ.สามพราน	+	เหลือง	+++	แดงเข้ม	-	เหลือง
GM5-2	น้ำเสียโรงงาน อ.สามพราน	+	เหลือง	+++	แดงเข้ม	-	เหลือง
GM6	ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ชีวภาพ	-	ใส	++	แดงอ่อน	+	เหลือง
GM A	บ่อสวนสุขภาพ ม.เกษตรศาสตร์	-	ใส	+++	แดงเข้ม	+	เหลือง

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่มีการเจริญ, + หมายถึง มีการเจริญเล็กน้อย, ++ หมายถึง มีการเจริญปานกลาง, +++ หมายถึง มีการเจริญมาก

ตารางที่ 2 ผลการกระตุ้นการเจริญและความยาวรากถั่วเขียวโดยแบคทีเรีย

กรรมวิธี	จำนวนรากเฉลี่ย[a]			ความยาวรากเฉลี่ย (มม.)[b]		
	อาหาร GM ที่เอาเซลล์แบคทีเรียออก	เซลล์แบคทีเรียที่เอาอาหาร GM ออก	เซลล์แบคทีเรียในอาหาร GM	อาหาร GM ที่เอาเซลล์แบคทีเรียออก	เซลล์แบคทีเรียที่เอาอาหาร GM ออก	เซลล์แบคทีเรียในอาหาร GM
IAA 50 µg/ml	13.87 ± 0.83	13.87 ± 0.83	13.87 ± 0.83	4.32 ± 0.52	4.32 ± 0.52	4.32 ± 0.52
Tap Water	8.00 ± 0.93	8.00 ± 0.93	8.00 ± 0.93	5.51 ± 0.38	5.51 ± 0.38	5.51 ± 0.38
GM	0	0	0	0	0	0
GM1	0.60 ± 0.89	0	18.60 ±1.34	0.19 ± 0.39	0	4.86 ± 0.75
GM2-1	0	3.40 ± 0.89	40.20 ± 1.64	0	7.37 ± 0.58	24.12 ± 1.01
GM2-2	0	11.80 ± 1.92	25.80 ±0.84	0	4.24 ± 0.61	18.34 ± 1.03
GM4	0	0	35.00 ± 1.58	0	0	13.53 ± 1.22
GM5-1	0	0	13.00 ± 1.58	0	0	1.91 ± 1.00
GM5-2	0	14.40 ± 1.34	27.20 ± 1.30	0	6.72 ± 0.80	6.93 ± 0.74
GM6	3.40 ± 1.14	7.80 ± 1.79	11.40 ± 1.14	3.94 ± 0.57	4.37 ± 0.68	6.55 ± 1.19
GMA	5.20 ± 1.30	5.40 ±0.89	7.40 ± 0.89	4.44 ± 1.14	4.50 ± 1.06	6.37 ± 1.55

หมายเหตุ: [a, b] คือ ค่าเฉลี่ยจำนวนรากจากการทดลอง 5 ซ้ำ

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติจากผลของเซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการกระตุ้นการเจริญและความยาวของรากถั่วเขียว

กรรมวิธี	จำนวนรากเฉลี่ย[a]	ความยาวรากเฉลี่ย (มม.)[b]
IAA 50 µg/ml	13.87[abc]	4.32 [a]
Tap Water	8.00 [ab]	5.51 [ab]
GM	0[a]	0[a]
GM1	18.60[bcd]	4.94[ab]
GM2-1	40.20[e]	24.12[d]
GM2-2	25.80[cde]	18.34[cd]
GM4	35.00[de]	13.53[bc]
GM5-1	13.00[abc]	1.91[a]
GM5-2	27.20[cde]	6.92[ab]
GM6	11.40[abc]	6.55[ab]
GMA	7.40[ab]	6.37[ab]

หมายเหตุ: วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ one-way Anova ทำการทดสอบแบบ Duncan กำหนดค่า P-Values ที่ $p < 0.1$

[a, b] คือ ค่าเฉลี่ยจำนวนรากจากการทดลอง 5 ซ้ำ, ตัวอักษรบนตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

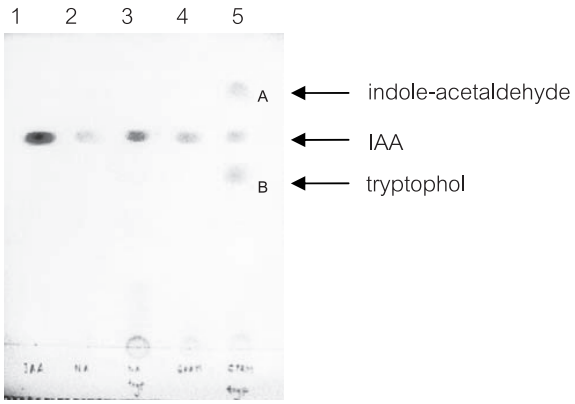
ตารางที่ 4 ผลการกระตุ้นการเจริญและความยาวรากข้าวโดยแบคทีเรีย

ไอโซเลท	จำนวนรากเฉลี่ย[a] (ราก)	ความยาวรากเฉลี่ย[b] (ซม.)
Tap water	18	6.6
IAA 50	23	7.24
GM2-1	31	7.36

หมายเหตุ: [a, b] คือ ค่าเฉลี่ยจำนวนรากจากการทดลอง 5 ซ้ำ

ตารางที่ 5 ผลของอาหารต่อการผลิตออกซินของแบคทีเรียไอโซเลท GM2-1

ชนิดอาหาร	ปริมาณออกซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	NA	GPAM
- Tryptophan	78	275
+Tryptophan	650	500



ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ IAA ของไอโซเลท GM2-1 ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB และอาหาร GPAM ที่ไม่เติม tryptophan (lane 2 และ 4 ตามลำดับ) และเติม tryptophan (lane 3 และ 5 ตามลำดับ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับสารละลาย IAA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (lane 1) ค่า R*f* = 0.6875

6. การจัดจำแนกแบคทีเรีย

คัดเลือกเชื้อที่มีผลต่อการกระตุ้นการเกิดรากและความยาวรากคือ ไอโซเลท GM1, GM2-1, GM2-2, GM4, GM5-2, GM6 และ GMA มาจัดจำแนก โดยตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ไอโซเลท GM1, GM2-2, GM4 และ GMA มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ไอโซเลท GM2-1 มีลักษณะเป็นรูปไข่ (coccobacilli) ไอโซเลท GM5-2 และ GM6 มีลักษณะเป็นท่อน และพบว่าทุกไอโซเลทเป็น Gram negative ลักษณะโคโลนี กลม นูน ผิวเรียบ ขนาดเล็ก (ตารางที่ 6)

การทดสอบทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทเป็นแกรมลบ มีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรตให้กลายเป็นไนไตรท์ โดยไอโซเลทส่วนใหญ่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ catalase และ urease สามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้น้ำตาลได้หลายชนิด และเกิดการสร้างแก๊สในบางชนิดของน้ำตาล เมื่อเฟอร์เมนต์น้ำตาล glucose จะเกิดการผลิตกรด มีความสามารถในการเปลี่ยน tryptone ให้เป็น สารประกอบ Indole และบางไอโซเลทมีการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ตารางที่ 7) เมื่อนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ มาเพิ่มปริมาณบริเวณ 16S rDNA ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved) ของแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') และ 1492R (5'-GGYTACCTTGTTAGGACTT-3') พบว่า สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ16S rDNA ได้ และให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,400 bp ขนาดของแถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลทไม่มีความแตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบส บริเวณ 16S rDNA ที่ได้จากตัวอย่างแบคทีเรียกับข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้ โปรมแกรม Blast และ ClustalW (version 2.1) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท GM1, GM2-2 และ GMA มีลำดับเบสคล้ายกับ *Rhodopseudomonas* sp., ไอโซเลท GM4 มีลำดับเบสคล้ายกับ *Rhodopseudomonas palustris,* ไอโซเลท GM2-1 มีลำดับเบสคล้ายกับ *Thauera* sp., ไอโซเลท GM5-2 และ GM6 มีลำดับเบสคล้ายกับ *Enterobacter* sp. (ตารางที่ 8) จากหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology เล่ม 9 ได้จำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง กลุ่มไม่สะสมกำมะถันไว้ใน กลุ่มที่ 10 (anoxygenic phototrophic bacteria) กลุ่มย่อย (subgroup) ที่ 3 (purple non-sulfur bacteria)มี 6 สกุล ดังนี้ 1. *Rhodospirillum*, 2. *Rhodopila,* 3. *Rhodobacter,* 4. *Rhodopseudomonas,* 5. *Rhodomicrobium* และ 6. *Rhodocyclus.* ดังนั้น

Enterobacter sp. จึงไม่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน แต่เนื่องจาก *Enterobacter* sp. มีคุณสมบัติหลายๆอย่างคล้ายกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน เช่น สามารถในการสร้างแคโรทีนอยด์สีแดง ทนต่อสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และสามารถผลิต IAA ได้ จึงถูกคัดแยกมาใช้ในการทดลองด้วย

สรุป

ในการทดลองนี้สามารถแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถันจากโคลนและน้ำได้จำนวน 8 ไอโซเลท โดยอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการแยกและเลี้ยงเชื้อคือ Glutamate-Malate Medium

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการกระตุ้นการเจริญของราก พบว่าแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลท สามารถกระตุ้นการเจริญของรากได้ เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA กับฐานข้อมูลพบว่า ไอโซเลท GM1, GM2-2 และ GMA มีลำดับเบสคล้ายกับ *Rhodopseudomonas* sp. ไอโซเลท GM4 มีลำดับเบสคล้ายกับ *Rhodopseudomonas palustris* ไอโซเลท GM2-1 มีลำดับเบสคล้ายกับ *Thauera* sp. ไอโซเลท GM5-2 และ GM6 มีลำดับเบสคล้ายกับ *Enterobacter* sp. ไอโซเลทที่สามารถกระตุ้นการเจริญของรากได้ดีที่สุดคือ GM 2-1 โดยกระตุ้นการเจริญของรากถั่วเขียวเฉลี่ยต่อต้นได้ 26.33 ราก และกระตุ้นความยาวรากถั่วเขียวเฉลี่ยต่อต้นได้ 19.80 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย IAA ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการเจริญของรากข้าวได้ดีอีกด้วย โดยความสามารถในการกระตุ้นรากอาจเนื่องมาจากความสามารถในการผลิตออกซินของแบคทีเรีย ซึ่งพบว่า ไอโซเลท GM2-1 สามารถผลิตออกซินได้ถึง 650 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร NA ที่เติม tryptophan 100 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยระยะการเจริญของเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 60-72 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร GM และให้ความเข้มแสงที่ 3,750 ลักซ์

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลทที่กระตุ้นการเจริญของรากเมื่อเลี้ยงในอาหาร GM เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่ความเข้มแสง 3,750 ลักซ์ ใน anaerobic box

ไอโซเลท	ชนิด	รูปร่าง	ลักษณะโคโลนี	สี
GM1	Gram negative	ท่อนสั้น	กลมนูน ผิวเรียบ ขนาดเล็ก	แดงเข้ม
GM2-1	Gram negative	รูปไข่	กลมนูน ผิวเรียบ ขนาดเล็ก	แดงเข้ม
GM2-2	Gram negative	ท่อนสั้น	กลมนูน ผิวเรียบ ขนาดเล็ก	แดงเข้ม
GM4	Gram negative	ท่อนสั้น	กลมนูน ผิวเรียบ ขนาดเล็ก	แดงเข้ม
GM5-2	Gram negative	ท่อน	กลมนูน ผิวเรียบ ขนาดเล็ก	แดงเข้ม
GM6	Gram negative	ท่อน	กลมนูน ผิวเรียบ ขนาดเล็ก	แดงอ่อน
GMA	Gram negative	ท่อนสั้น	กลมนูน ผิวเรียบ ขนาดเล็ก	แดงอ่อน

ตารางที่ 7 การทดสอบทางชีวเคมีของไอโซเลทที่มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของราก

การทดสอบทางชีวเคมี	GM1	GM2-1	GM2-2	GM4	GM5-2	GM6	GMA
Catalase test	+	+	+	+	-	-	+
Citrate test	+	+	+	-	-	-	+
MR test	+	+	+	-	-	+	-
Negative bacteria teat	+	+	+	+	+	+	+
Indole test	+	+	+	-	+	+	-
Nitrate test	+	+	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfide test	-	-	-	+	+	+	-
Urease test	-	+	+	-	-	-	-
Carbohydrate fermentation test							
Sucrose	+/G	+	+	-	+	+/G	+
Lactose	+	+	+	-	-	+	+
Maltose	+/G	+	+	+	+/G	+	+
Glucose	+	+/G	+	-	+/G	+/G	+

หมายเหตุ: + คือ มีการเจริญในอาหาร, - คือ ไม่มีการเจริญในอาหาร, G คือ มีการผลิตแก๊ส

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ16S rDNA ของแบคทีเรียที่แยกได้กับแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank

ไอโซเลท	รหัสเชื้อ	ชื่อเชื้อ	% ความเหมือน
GMA	FM210028	*Rhodopseudomonas* sp.	99%
GM1	AM922327	*Rhodopseudomonas* sp.	99%
GM2-1	EU850616	*Thauera* sp.	98%
GM2-2	AB498814	*Rhodopseudomonas* sp.	99%
GM4	GQ503896	*Rhodopseudomonas*	99%
GM5-2	EU719662	*Enterobacter* sp.	99%
GM6	AM421984	*Enterobacter* sp.	96%

คำขอบคุณ

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้รับการเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่จาก Dr. Atsuo Kimura, Professor of Molecular Enzymology, Research, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan

เอกสารอ้างอิง

Carr, N.G. 1969. Growth of phototrophic bacteria and blue-green algae. Method in Microbiology. Vol.3B. Academic Press, London. pp. 53-77.

Chung, K.R., T. Shilts, U. Erturk, L.W. Timmer and P.P. Ueng. 2003. Indole derivatives produced by the fungus Colletotrichum acutatum causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of cutrus. FEMS Microbiology Lett. 226: 23-30.

Compant, S., Clement C. and Sessitsch. 2009. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants. Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology & Bichemistry. 42: 669-678.

David R.B and R.W. Castenholz. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer. New York. 2298 p.

Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Environ. Microbial. 61: 793–796.

Gordon, S.A. and R.P Weber. 1951. Colorimetric estimation of Idolacetic acid. Plant Physiol. 26: 192-195.

Imhoff, J.F. 1992. Taxonomy phylogeny and general ecology of anoxygenic phototrophic baeteria. Photosynthetic Prokaryotes. Vol.6. Plnum Press. Now York and London. pp. 53-92.

Kobayashi, M., M. Kobayashi and H. Nakanishi. 1971. Construction of purification plant for polluted water using photosynthetic bacteria. J. Ferment. Technol. 49: 817-825.

Kohlmiler, E.F. and H. Gest. 1951. A comparative study fermentations of organic acids by *Rhodospirillum rubrum*. Journal of Bacteriology. 61:269-282.

Lugtenberg, B. and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Review of Microbiology. 63: 541-556.

Maki, Y., O. Kazutoshi and S. Akira. 2004. A Model for syntrophic cooperations in microbial mats on pristine earth: structure-function relationship of sulfur-oxidation in sulfur-turf microbial mat vegetating in hot spring effluents. Viva Origino No. 32 Vol.pp. 96-108

Patten, C.L. and B.R. Glick. 2002. The role of bacterial indoleacetic acid in the develop-ment of the host plant system. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3795–3801.

Pfennig, N. and H.G. Truper. 1992. The Family Chromatiaceae. The Procaryotes. Springer-Verlag. New York. pp. 3200-3221.

Sasikala, C. and C.V. Ramara. 1995. Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria I and II. Advances Applied Microbiology. Academic Press. San Diego. Vol. 4. pp 173-227.

Van Loon, L.C. and P.A.H.M. Bakker. 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. PGPR. Biocontrol and Biofertilization. Springer. The Netherlands. pp. 39-66.