การคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ และ *Bacillus* sp. เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงฟางข้าว

Selection of Free Living Aerobic Nitrogen Fixing Bacteria and *Bacillus* sp. to Use as Inoculums for Nitrogen and Phosphorus Fertilizer in Straw Medium

สัลวา ตอปี

Salwa Torpee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศและ *Bacillus* sp. เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงฟางข้าว

ผู้เขียน นางสาวสัลวา ตอปี

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

.....กรรมการ

(ดร.อำไพทิพย์ สุขหอม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ และ *Bacillus* sp. เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงฟางข้าว

ผู้เขียน นางสาวสัลวา ตอปี

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

จากตัวอย่างดินและน้ำบริเวณรากข้าวจำนวน 260 ตัวอย่างนำมาแยกแบคทีเรียที่ตรึงแก๊สไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ และ *Bacillus* spp. ที่ละลายฟอสเฟต แยกกลุ่มแรกได้ 252 ไอโซเลท และแยกกลุ่มหลัง ได้ 196 ไอโซเลท และคัดเลือกได้ไอโซเลท A29 ที่สามารถปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออนได้สูง และผลิตฮอร์โมนพืช Indole -3- acetic acid (IAA) ด้วย ขณะที่ *Bacillus* คัดเลือกได้ไอโซเลท B36 ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้สูง และเมื่อนำไปเทียบเคียงโดยยีน 16s rRNA พบว่าเป็น *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cenocepacia* A29 ในอาหารปราศจากไนโตรเจนคือ ใช้กล้าเชื้อ 5% pH เริ่มต้นของอาหาร 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่า 200 รอบ/นาที ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.447 ต่อชั่วโมง ปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออน 269.40 มิลลิกรัม/ลิตร และผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้ ส่วน *B. cereus* B36 ในอาหาร National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP) มีสภาวะที่เหมาะสม คือ ปริมาณกล้าเชื้อ 5% pH เริ่มต้นของอาหาร 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่า 150 รอบ/นาที มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.908 ต่อชั่วโมง ละลายฟอสเฟตได้ 10.04 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนผลของการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (*B. cenocepacia* A29 2.5% และ *B. cereus* B36 5%) ในอาหาร NBRIP สูตรดัดแปลง เป็นเวลา 54 ชั่วโมง พบว่า ไม่มีการยับยั้งซึ่งกันและกัน แต่ปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออนเพียง 6.10 มิลลิกรัม/ลิตร และไม่พบฟอสเฟต ขณะที่ในชุดควบคุมที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว มีการละลายฟอสเฟต 32.99 มิลลิกรัม/ลิตร และเชื้อผสมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Pyricularia grisea* ได้ 49.65% และ 34.62% ตามลำดับ

การเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยว/เชื้อผสม (อัตราส่วนเหมือนเดิม) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า *B. cenocepacia* A29 ในชุดเชื้อผสม มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 3 log CFU/ml ทั้งใน 2 สภาวะของการเลี้ยง (สภาวะ A29

และสภาวะ B36) ซึ่งมากกว่าชุดเชื้อเดี่ยว (2.26 log CFU/ml) ขณะที่ *B. cereus* B36 ในชุดเชื้อผสม ทั้ง 2 สภาวะ มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้น 2.70 log CFU/ml (สภาวะ A29) และ 2.45 log CFU/ml (สภาวะ B36) ขณะที่ชุดเชื้อเดี่ยว B36 เพิ่ม 2.67 log CFU/ml สำหรับการละลายฟอสเฟต พบว่า ชุดปราศจากเชื้อและชุดการทดสอบที่เหลือมีการละลายฟอสเฟตไม่แตกต่างกัน (41.35 ± 2.57 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่า ชุดควบคุมทางลบมีการปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออน 42.02 - 56.67 มิลลิกรัม/ลิตร ขณะที่ชุดเชื้อเดี่ยว A29 และชุดเชื้อผสม มีปริมาณสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 (90.84 – 111.80 มิลลิกรัม/ลิตร) และการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 โดยพบว่า ชุดปราศจากเชื้อยับยั้งได้ (30.97%) ส่วนชุดเชื้อเดี่ยว A29 ยับยั้งได้ 50.83% และชุดเชื้อผสม เมื่อเลี้ยงใน 2 สภาวะให้ค่ายับยั้งไม่ต่างกันคือ 41.88% ± 3.00 ขณะที่ในชุดเชื้อเดี่ยว B36 ยับยั้งได้ (32.20%) ส่วนผลการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* พบว่า ชุดปราศจากเชื้อมีการยับยั้ง 18.31% ส่วนชุดทดสอบอื่นๆ มีการยับยั้งอยู่ในช่วง 18.90 – 40.39%

ลบ: ดูตลบ:

น้ำเลี้ยงฟางข้าวในสภาวะที่ไม่ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยว/ผสม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า *B. cenocepacia* A29 ในชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ A29 (เชื้อเพิ่มขึ้น 1.91 log CFU/ml) และสภาวะ B36 (เพิ่มขึ้น 2.83 log CFU/ml) สูงกว่าชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ (1.32 log CFU/ml) ส่วน *B. cereus* B36 ในชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ เมื่อเพาะเลี้ยงสภาวะ A29 (เพิ่มขึ้น 2.93 log CFU/ml) และสภาวะ B36 (เพิ่มขึ้น 2.18 log CFU/ml) มีการเจริญต่ำกว่าชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ (3.17 log CFU/ml) สำหรับการละลายฟอสเฟตพบว่า ตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ชุดควบคุมธรรมชาติมีการละลายฟอสเฟตไม่แตกต่างกันมากนัก (42.78 – 43.77 มิลลิกรัม/ลิตร) ขณะที่ชุดทดสอบอื่นๆ มีการละลายฟอสเฟตอยู่ในช่วง 53.79 - 57.00 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่า ทุกชุดทดสอบมีปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุมธรรมชาติ โดยมีปริมาณสูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 (49.17 – 51.95 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนผลของการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* พบว่ายับยั้งได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 โดยชุดควบคุมธรรมชาติยับยั้งได้ 32.91% ขณะที่ชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ และชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ ยับยั้งได้ 38.88 - 53.53% ยกเว้นชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีการยับยั้งสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 (36.57%) ส่วนการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* พบว่า ยับยั้งสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 โดยชุดควบคุมธรรมชาติยับยั้งได้ 23.15% ส่วนชุดที่เหลืออยู่ในช่วง 27.06 – 37.33% จากผลการทดลองนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้

Thesis Title	Selection of Free Living Aerobic Nitrogen Fixing Bacteria and *Bacillus* sp. to Use as Inoculums for Nitrogen and Phosphorus Fertilizer in Straw Medium
Author	Miss Salwa Torpee
Major program	Microbiology
Academic year	2009

ABSTRACT

A total of 260 rhizospheric water and soil samples were collected from paddy fields to isolate and select of nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizing bacteria (*Bacillus* spp.). 252 isolates of nitrogen fixing bacteria and 196 isolates of *Bacilus* spp. were isolated. An isolate A29 was selected based on its ability to release high ammonium ion and produced one of plant growth hormones, indole acetic acid (IAA) while an isolate B36 was selected because its high ability to dissolve phosphate. Both isolates were identified using 16S rRNA gene as *Burkholderia cenocepacia* A29 and *Bacillus cereus* B36. The optimum growth conditions for *B. cenocepacia* A29 in nitrogen free medium; inoculum size, initial pH medium, incubating temperature and shaking speed were 5%, 5.5, 30ºC and 200 rpm and its μ_{max} was 0.447 h^{-1}. Under optimal growth condition, over 48 hr of incubation, the bacterium released ammonium ion 269.40 mg/L and produced IAA. Whilst optimal growth conditions in NBRIP medium for *B. cereus* B36 was found as follows; 5% inoculums size, initial pH 6.5, 30ºC and 150 rpm and its μ_{max} was 0.908 h^{-1}. The bacterium dissolved only 10.04 mg/L of phosphate after 48 hr incubation. No growth inhibition was found after co-culture (*B. cenocepacia* A29 2.5% and *B. cereus* B36 5%) in modified NBRIP medium over 54 h; however, ammonium ion was detected only 6.10 mg/L. No detection of soluble phosphate was found in co-culture broth but soluble phosphate (32.99 mg/L) was detected in pure culture of *B. cereus* B36. Besides, co-culture inhibited growth of *Rhizoctonia solani* (49.65%) and *Pyricularia grisea* (34.62%).

Cultivation either single cultures (A29 or B36) or mixed cultures (the ratio as before) in sterile straw medium for 4 weeks indicated that a number of

B. cenocepacia A29 in a set of mixed culture increased about 3 log CFU/ml under both optimal growth conditions (A29 and B36) and it was higher than that found in a set of pure culture (2.26 log CFU/ml). In contrast, a number of *B. cereus* B36 in a set of mixed cultures under both optimal growth conditions increased only 2.70 log CFU/ml (A29 condition) and 2.45 log CFU/ml (B36 condition) while in a set of pure culture increased 2.67 log CFU/ml. No significant difference was found for soluble phosphate (41.35 ± 2.57 mg/L) in an abiotic control set and all sets of inoculations. Releasing of ammonium ion in the abiotic control set was 42.02 - 56.67 mg/L, whereas in sets of pure culture A29 and mixed cultures were highest at 3 weeks incubation (90.84 – 111.80 mg/L). Two week- incubation gave the best result to inhibit *R. solani* as follows: 30.97% in the abiotic control set, 50.83% in a pure culture A29, 32.20% in a pure culture of B36 and 41.88% ± 3.00% in mixed cultures under both optimal growth conditions. The inhibition of *P. grisea* by the abiotic control set was 18.31% and inoculated sets were in a range of 18.90 – 40.39%.

Inoculations either single culture and mixed cultures into non sterile straw medium for 4 weeks revealed that a number of *B. cenocepacia* A29 in a set of mixed cultures increased 1.91 log CFU/ml under the A29 condition and 2.83 log CFU/ml under the B36 condition which were higher than that a single culture of A29 (1.32 log CFU/ml). On the other hand, a number of *B. cereus* B36 in a set of mixed cultures increased 2.93 log CFU/ml (A29 condition) and 2.18 log CFU/ml (B36 condition) which were lower than that in a single culture of B36 (3.17 log CFU/ml). No significant change for soluble phosphate (42.78 – 43.77 mg/L) during 4 weeks of incubation in a native control (indigenous microbes) while in all sets of inoculations had soluble phosphate 53.79 - 57.00 mg/L. Amount of ammonium releasing in all treatment sets and the native control was not much different but the highest was found at 1 week- incubation (49.17 – 51.95 mg/L). The inhibitory effect of all sets against *R. solani* was highest at 1 week-incubation as 32.91% in the native control and 38.88 - 53.53% in the sets of single culture A29 and mixed cultures. However, the set of single culture B36 gave the best inhibition at 2 week incubation (36.57%). After 2 weeks of incubation, all sets showed the highest inhibition against growth of *P. grisea* as following; 23.15% in the native control and 27.06 – 37.33% in the sets of inoculations. According to the results in this study, it indicates that both isolates had the potential to use as biofertilizers.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ดวงพร คันธโชติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ. วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. วรรณา ชูฤทธิ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. อำไพทิพย์ สุขหอม กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ (ทุนผู้ช่วยสอน) และราชกรีฑาสโมสรที่ให้ทุนสนับสนุนในระหว่างการศึกษา

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายที่สุดวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะสำเร็จไม่ได้ ถ้าขาดกำลังใจและการสนับสนุนจากคุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ และน้อง จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

สัลวา ตอปี

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ลักษณะคำย่อและตัวย่อ	(17)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	35
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	36
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	36
อุปกรณ์	36
วิธีดำเนินการ	37
3. ผลการทดลอง	49
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	99
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	112
เอกสารอ้างอิง	115
ภาคผนวก	130
ภาคผนวก ก	131
ภาคผนวก ข	134
ภาคผนวก ค	138
ประวัติผู้เขียน	165

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 ฟอสฟอรัสในสารละลายดิน (soil solution) 12

1.2 สารประกอบอินทรีย์และเอนไซม์ต่างๆที่รากพืชปลดปล่อยออกมา 15

1.3 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ 17

1.4 การละลายฟอสฟอรัสในรูปแคลเซียมมอนอไฮโดรเจนฟอสเฟต และแคลเซียมออร์โทฟอสเฟต และอะลูมินัมฟอสเฟตในอาหารเหลวโดยเชื้อ *Penicillium radicum* 18

1.5 ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในแต่ละปี 20

1.6 ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในปี พ. ศ 2543 21

3.1 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศที่แยกได้จากนาข้าวบริเวณต่างๆ ของภาคใต้ 47

3.2 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากนาข้าวบริเวณต่างๆ ของภาคใต้ 48

3.3 การเจริญของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศที่แยกได้จากนาข้าวในภาคใต้ 49

3.4 จำนวนไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตปริมาณแอมโมเนียได้โดยวิธี Nessler ' s reagent 50

3.5 การเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากนาข้าวในภาคใต้ 52

3.6 จำนวนไอโซเลทที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ degree of hydrolysis ในการละลายฟอสเฟตอยู่ในช่วงต่างๆ 52

3.7 ผลของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศซึ่งเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE 58

3.8 ผลของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ซึ่งเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB 59

รายการรูป

รูปที่ **หน้า**

1.1 อาการใบจุดช้ำน้ำและรูปตา 28
1.2 ลักษณะของโรคกาบใบแห้ง 29
1.3 อาการใบจุดสีน้ำตาลที่ใบ 29
1.4 อาการใบขีดสีน้ำตาล 30
1.5 อาการของโรคกาบใบเน่า 31
1.6 อาการของโรคถอดฝักดาบ 32
1.7 อาการของโรคเมล็ดด่าง 33
3.1 ลักษณะการเกิดสีของการทดสอบการผลิตแอมโมเนีย 52
3.2 ไอโซเลทต่างๆที่สามารถผลิตปริมาณแอมโมเนียมอิออนของเชื้อที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ 52
3.3 ลัษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) และ Gibberellin ของเชื้อที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ 53
3.4 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP-BPB ที่มีการเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองของ *Bacillus* spp 54
3.5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) เชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Pyricularia grisea* ของ *Bacillus* spp. 55
3.6 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของ *Bacillus* spp. เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 56
3.7 ผลของปริมาณกล้าเชื้อต่อการเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 ในอาหาร N_2-free medium 61
3.8 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร N_2-free medium โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน 62
3.9 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาโดย *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน 62
3.10 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ที่มีกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน 63

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

3.11 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 ในอาหาร N_2-free medium ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารต่างกัน 64

3.12 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร N_2-free medium โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 ที่มี pH เริ่มต้นต่างกัน 64

3.13 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาโดย *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อใช้ pH เริ่มต้นต่างกัน 65

3.14 ลักณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ที่มี pH เริ่มต้นต่างๆ ต่างกัน 65

3.15 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 ในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 ที่อุณหภูมิต่างกัน 66

3.16 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน 67

3.17 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาโดย *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเลี้ยงในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 67

3.18 ลัษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ที่มีอุณหภูมิในการบ่มต่างกัน 68

3.19 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* สายพันธุ์ A29 ในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 ที่ความเร็วรอบต่างกัน 69

3.20 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบต่างกัน 69

3.21 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาโดย *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ โดยเลี้ยงในอาหาร N_2-free medium 70

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.22	ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ที่มีความเร็วรอบในการบ่มต่างกัน	70
3.23	การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 การเปลี่ยนแปลงของ pH และปริมาณแอมโมเนียมอิออน เมื่อเลี้ยงในอาหาร N_2-free medium ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	71
3.24	ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ในการทดสอบยืนยันสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* A29	72
3.25	การเจริญของ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRIP ที่มีกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน	73
3.26	การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร NBRIP โดยเชื้อ *Bacillus cereus* B36 เมื่อใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	73
3.27	ปริมาณการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRIP ที่มีกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน	74
3.28	การเจริญของ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRIP ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารต่างกัน	75
3.29	การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร NBRIP เมื่อมีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน โดยเชื้อ *Bacillus cereus* B36	75
3.30	ปริมาณการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRIP ที่มี pH เริ่มต้นต่างกัน	76
3.31	การเจริญของ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRIP ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 ที่มีอุณหภูมิในการบ่มต่างกัน	77
3.32	การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร NBRIP ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน โดยเชื้อ *Bacillus cereus* B36	77

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

3.33 ปริมาณการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Bacillus cereus* B36 ใน อาหาร NBRIP ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน 78

3.34 การเจริญของ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRIP ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 ที่มีความเร็วรอบต่างกัน 79

3.35 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร NBRIP ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบต่างกัน โดยเชื้อ *Bacillus cereus* B36 79

3.36 ปริมาณการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Bacillus cereus* B36 ใน อาหาร NBRIP ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบต่างกัน 80

3.37 การเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* B36 การเปลี่ยนแปลง ของ pH และการละลายฟอสเฟต เมื่อเลี้ยงในอาหาร NBRIP ภายใต้ สภาวะที่เหมาะสม 81

3.38 การเจริญของแบคทีเรีย *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันและเลี้ยงเดี่ยวในอาหาร NBRIP สูตรดัดแปลง 82

3.39 โคโลนีที่ต่างกันของ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRIP 82

3.40 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP สูตรดัดแปลง หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันและเลี้ยงเดี่ยวของเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 ที่เวลาต่างกัน 83

3.41 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยโดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน และเลี้ยงเดี่ยวในอาหาร NBRIP สูตรดัดแปลง 84

3.42 การละลายฟอสเฟตโดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันและเลี้ยงเดี่ยวในอาหาร NBRIP สูตรดัดแปลง 84

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.43	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia sol*ani และ *Pyricularia grisea* โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันและเลี้ยงเดี่ยวในอาหาร NBRIP สูตรดัดแปลง	85
3.44	เปอร์เซ็นต์การเจริญของแบคทีเรีย *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	85
3.45	การเจริญของแบคทีเรีย *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ทำให้ปราศจากเชื้อ	87
3.46	การเปลี่ยนแปลงของ pH ในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	87
3.47	ค่า EC ในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	88
3.48	การละลายฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	89
3.49	การปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออนในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	90
3.50	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	91
3.51	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	92
3.52	การเจริญของแบคทีเรีย *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ	93

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.53	การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	94
3.54	ค่า EC ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	95
3.55	การละลายฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	96
3.56	ปริมาณแอมโมเนียมอิออนในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	96
3.57	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	97
3.58	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36	98
1ข	กราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส โดยใช้ KH_2PO_4 เป็นสารละลายมาตรฐาน	132
2ข	กราฟมาตรฐานของโปรตีน โดยใช้ Bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน	133
1ค	ผลของ 20NE API kit ซึ่งทดสอบโดยใช้เชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29	152
2ค	ผลของ 20NE API kit ซึ่งทดสอบโดยใช้เชื้อ *Burkholderia cepacia* TISTR 1869	152
3ค	ผลของ 50CHB API kit ซึ่งทดสอบโดยใช้เชื้อ *Bacillus cereus* B36	164

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4ค ผลของ 50CHB API kit ซึ่งทดสอบโดยใช้เชื้อ *Bacillus cereus* TISTR 687 164

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

pH	=	hydrogen ion concentration
CFU/ ml	=	colony forming unit/ milliliter
EC	=	electrical conductivity
mS/cm	=	megasecond/centimeter
rpm	=	round per minute
IAA	=	indole-3-acetic acid

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันได้มีการรณรงค์ให้เกษตรกรทำการเกษตรแบบเกษตรอินทรีย์ ซึ่งเกษตรอินทรีย์เป็นระบบการผลิตที่คำนึงถึงสภาพแวดล้อม รักษาสมดุลของธรรมชาติและความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเน้นการใช้อินทรียวัตถุ เช่น ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยพืชสด และปุ๋ยชีวภาพ ในการปรับปรุงบำรุงดินให้มีความอุดมสมบูรณ์ สามารถต้านทานโรคและแมลงได้ (กรมพัฒนาที่ดิน กองสาราณียกร, 2551) เนื่องจากที่ผ่านมามีการใช้ทรัพยากรดินโดยไม่คำนึงถึงผลเสียของสารเคมีและปุ๋ยเคมีสังเคราะห์ จึงก่อให้เกิดความไม่สมดุลในแร่ธาตุ และกายภาพของดินทำให้ จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดินนั้นสูญหาย ซึ่งธาตุอาหารหลักที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของพืชมี 3 ธาตุ คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม (วิเชียร, 2548) เมื่อพืชขาดธาตุเหล่านี้ จะส่งผลให้พืชเจริญได้ไม่ดี จึงต้องมีการแก้ไขโดยการใส่ปุ๋ย แต่การใส่ปุ๋ยทำให้เกษตรกรสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากพอสมควร โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเกษตรกรใช้ปุ๋ยเคมี นอกจากมีต้นทุนสูงแล้วยังทำให้สารอื่นๆ เช่นโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับปุ๋ยโดยเฉพาะปุ๋ยฟอสฟอรัสมาตกค้างอยู่ในดิน ส่งผลให้เมื่อเวลาผ่านไปทำให้ดินเสื่อมสภาพได้และเกิดการสะสมในห่วงโซ่อาหารก่อให้เกิดอันตรายกับมนุษย์

ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตประเภทผู้ผลิตขั้นต้น ซึ่งมักขาด แต่สามารถใช้ปุ๋ยชีวภาพคือจุลินทรีย์บางชนิดแทนปุ๋ยเคมีได้ เช่น ธาตุไนโตรเจนได้มาจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยจุลินทรีย์ดิน ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มี 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีภาวะอยู่ร่วมกันกับพืชบางชนิด (Symbiotic nitrogen fixation) เช่น *Rhizobium* ที่อาศัยอยู่กับรากพืชตระกูลถั่ว และจุลินทรีย์ที่อยู่อย่างอิสระในดิน (Non-symbiotic nitrogen fixation) ได้แก่ *Azotobacter* และ *Clostridium* เป็นต้น (ดวงพร, 2545) แต่ในการวิจัยนี้เลือกใช้จุลินทรีย์พวก Nitrogen fixing bacteria ในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปแอมโมเนียมเนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีอยู่ในดินโดยทั่วไป และเจริญได้ดีเมื่อมีแหล่งคาร์บอนเพียงพอ และที่น่าสนใจ คือ จากการศึกษาของ Ahmad และคณะ (2005) พบว่า *Azotobacter* sp. สามารถผลิต Indole Acetic Acid (IAA) ได้ ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่สังเคราะห์ได้จากกรดอะมิโน ชื่อ ทริพโทเฟน (Tryptophan) ถึงแม้จะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ได้มีการเติมของกรดอะมิโนทริพโทเฟน ก็ตาม แต่การเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณของทริพโทเฟนเพิ่มขึ้นนั้น จะเป็นการส่งเสริมให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ผลิต IAA ได้ในปริมาณที่มากขึ้น ดังนั้นการใช้แบคทีเรียดังกล่าวนอกจากจะเป็นเชื้อที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนแล้วยังให้ฮอร์โมนพืชด้วย

ส่วนธาตุฟอสฟอรัสในธรรมชาติมักพบอยู่ในรูปของสารประกอบฟอสเฟตหรือที่เรียกว่า หินฟอสเฟต (Phosphate Rock) (Goldstein, 1986; Chen และคณะ, 2006) ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชมากและมักพบว่าปริมาณของฟอสฟอรัสในดินมักจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการเติมให้กับดิน เนื่องจากในดินมีฟอสฟอรัสปริมาณไม่น้อยแต่อยู่ในรูปที่ไม่สามารถเป็นประโยชน์ต่อพืชได้ ซึ่งมีสาเหตุมาจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ค่า pH สูงหรือต่ำเกินไปจึงถูกตรึงไว้ในดินไม่สามารถเป็นประโยชน์ได้ ซึ่งโดยทั่วไปเมื่อใส่ปุ๋ยฟอสเฟตที่ละลายได้ดีลงไปในดินพบว่าจะถูกตรึงมากกว่า 70% (ยงยุทธและคณะ, 2546) เช่น ถ้าเป็นดินกรดจะถูกตรึงในรูปของอลูมินัมฟอสเฟตเป็นส่วนใหญ่ แต่ถ้าเป็นดินด่างจะถูกตรึงในรูปของแคลเซียมฟอสเฟตเป็นหลัก (มุกดา, 2544; ธงชัย, 2546; Foth และ Ellis, 1997)

กรณีที่ดินมีสภาวะเป็นดินกรด เกษตรกรจะแก้ไขโดยการใช้ปูนในการปรับค่า pH ของดิน ในขณะที่เกษตรกรที่มีปัญหาในเรื่องดินด่าง จะแก้ไขโดยการชะล้างด้วยน้ำ อาจจะใช้น้ำชลประทานหรือน้ำฝนระบายน้ำออก ต่อมาจึงขังน้ำและระบายออกอีกครั้ง หรืออีกวิธีหนึ่งคือ การใช้สารเคมีทำปฏิกิริยา เช่น กำมะถันผง หรือยิปซัม กรณีหลังจะมีปัญหาในด้านการเพิ่มเกลือในดิน และอาจทำให้เกิดปัญหาขาดโพแทสเซียมได้ อีกทั้งยังใช้ต้นทุนสูง (มุกดา, 2544) กล่าวได้ว่าการแก้ไขดินเป็นกรดนั้นง่ายต่อการปฏิบัติมากกว่าการแก้ไขดินที่เป็นด่างซึ่งยุ่งยากและซับซ้อน และจากการศึกษาค้นคว้าพบว่ามี จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. มีความสามารถละลายหินฟอสเฟตได้ (Chen และคณะ, 2006) ซึ่งจะสามารถช่วยเกษตรกรที่มีปัญหาเรื่องดินด่าง นอกจากนั้นยังสามารถเพิ่มปริมาณปุ๋ยฟอสฟอรัสในดิน และสามารถนำไปใช้ในระยะยาวได้โดยไม่ต้องคำนึงถึงผลเสียจากการตกค้างของโลหะหนัก นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติควบคุมโรคพืชต่างๆได้ ซึ่งสามารถผลิตสารพวกเมตาบอไลท์บางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการนำมาใช้กระตุ้นการเกิดความต้านทานโรคของพืชต่อเชื้อสาเหตุ (Stenzel และคณะ, 1985; วิจิตรา และดวงพร, 2538; วิจิตรา และดวงพร, 2543) เช่น โรคที่เกิดในข้าว

ข้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อวิถีชีวิตของประชาชนคนไทยและเศรษฐกิจของประเทศ นอกจากข้าวจะเป็นอาหารหลักของคนไทยยังเป็นสินค้าเกษตรที่นำรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท อย่างไรก็ตามปัจจุบันประเทศเพื่อนบ้านกำลังจะเป็นคู่แข่งที่สำคัญ ดังนั้นการที่ประเทศไทยจะยังคงครองความเป็นผู้ค้าข้าวรายใหญ่ของโลกได้นั้น จำเป็นจะต้องผลิตข้าวที่มีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของผู้ซื้อ และจากการวิจัยของคณะวิจัยโครงการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตข้าวหอมมะลิในระดับเกษตรกรของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่า โรคที่มีการระบาดเกิดขึ้นเป็นประจำในข้าวนั้น ส่วนใหญ่เกษตรกรไม่มีการป้องกันและควบคุมเมื่อมีการระบาดเกิดขึ้น (สำราญ, 2546) และสำหรับชาวนาในภาคใต้จะปลูกข้าวเจ้าในฤดูนาปีกันเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งโรคข้าวที่มักจะระบาดทำความเสียหายใน

พื้นที่การปลูกข้าวในภาคใต้ ได้แก่ โรคไหม้ โรคกาบใบแห้ง โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคใบขีดสีน้ำตาล (http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_assort02.html :12-06-2007) แต่โรคที่ระบาดมากที่สุด คือ โรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และโรคใบจุดสีน้ำตาล ซึ่งโรคไหม้ระบาดทำลายข้าวเฉี้ยงพัทลุง สังข์หยดและข้าวดอกมะลิ 105 (http://www.ptl.ricethailand. org/data/disease.htm :12-06-2007)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาอันเนื่องมาจากการใช้สารเคมี (Rhodes, 1993) แต่มีข้อควรคำนึง คือ สารที่ได้จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต้องไม่เป็นอันตรายหรือเป็นพิษแก่พืชเป้าหมาย (Cook, 1993) กล่าวคือ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะต้องมีคุณสมบัติในการบุกรุก และปล่อยสารยับยั้งเข้าไปในเซลล์ของพืช (Wilson และคณะ, 1989) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. มีคุณสมบัติเหล่านี้อยู่ดังได้กล่าวมาแล้ว จึงได้รับความสนใจในงานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มากมาย เช่น การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์กลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในข้าวได้ (วิจิตรา และดวงพร, 2538) การใช้เชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น พบว่า เชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ จำนวน 61 ไอโซเลต และเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 73 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pythium aphanidermatum , Colletotrichum ampelinum* และเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ได้ (พรพรรณ, 2550)

การนำน้ำหมักชีวภาพมาใช้ในเกษตรอินทรีย์ เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยให้เกษตรกรลดต้นทุนในการทำเกษตร เกิดความปลอดภัยทั้งต่อผู้ผลิตและผู้บริโภคเป็นการทำเกษตรกรรมแบบยั่งยืน ซึ่งปัจจุบันมีการใช้น้ำหมักชีวภาพในทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อมกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การนำมาใช้ประโยชน์ในเกษตรอินทรีย์ เพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ย ยากำจัดศัตรูพืช ฮอร์โมนบำรุงพืช ฯลฯ รวมถึงการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม โดยเข้าไปช่วยในการย่อยสลายสิ่งปฏิกูล ลดความเน่าเสียกลิ่นเหม็นในระบบบำบัดน้ำเสีย และการกำจัดขยะเป็นต้น น้ำหมักชีวภาพจากพืช อาจมีชื่อเรียกต่าง ๆ กันไป เช่น น้ำจุลินทรีย์ หรือน้ำเอนไซม์จากผลไม้ (enzyme ionic plasma) และจุลินทรีย์ EM (Effective Microorganisms) กรณีที่ใช้ EM ในการหมัก (ดวงพร และคณะ, 2548) ซึ่งการทำน้ำหมักชีวภาพสามารถทำการหมักได้จากผัก ผลไม้ สัตว์ เศษอาหาร และพืช โดยเฉพาะพืชพวกวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ซึ่งโดยทั่วไปเกษตรกรจะใช้วิธีเผาฟางข้าวทิ้งในแปลงนา ด้วยความเข้าใจว่าการเผาฟางข้าวจะเป็นการตัดวงจรของโรคและแมลง และเพื่อความสะดวกในการทำนาฤดูต่อไป ดังนั้นการใช้ฟางข้าวมาทำเป็นน้ำหมักชีวภาพ นอกจากช่วยให้เกษตรกรลดค่าใช้จ่ายในการทำการเกษตรแล้ว ยังช่วยกำจัดวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อง่ายในการทำนาฤดูต่อไป รวมถึงลดภาวะโลกร้อนจากการเผาทิ้งฟางข้าว

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ และ *Bacillus* sp. เพื่อใช้เพิ่มปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงฟางข้าว รวมทั้งเป็นแหล่งฮอร์โมนพืชและการควบคุมเชื้อโรคในข้าว โดยเฉพาะโรคไหม้และขอบใบแห้ง

1.2 ตรวจเอกสาร

1.2.1 ความหมายของเกษตรอินทรีย์

ปัจจุบันได้มีการใช้น้ำหมักชีวภาพทางการเกษตรกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเกษตรกรหันมาทำการเกษตร แบบระบบเกษตรอินทรีย์ (Organic farming) โดยระบบเกษตรอินทรีย์ หมายถึง ระบบการจัดการการผลิตด้านการเกษตรแบบองค์รวมที่เกื้อหนุนต่อระบบนิเวศ รวมถึงความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเน้นการใช้วัสดุธรรมชาติ หลีกเลี่ยงการใช้วัตถุดิบจากการสังเคราะห์ และไม่ใช้พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ที่มาจากเทคนิคการดัดแปลงพันธุกรรม (Genetic modification) หรือพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) มีการจัดการกับผลิตภัณฑ์โดยเน้นการแปรรูปด้วยความระมัดระวัง เพื่อรักษาสภาพการเป็นเกษตรอินทรีย์และคุณภาพที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ในทุกขั้นตอน (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2546)

1.2.2 ปุ๋ยชีวภาพ

ปุ๋ยชีวภาพ (Biofertilizer) หมายถึง ปุ๋ยหรือวัสดุที่มีเชื้อจุลินทรีย์เป็นตัวดำเนินกิจกรรม โดยการย่อยสลายเศษวัสดุเหลือใช้จากส่วนต่างๆของพืชหรือสัตว์ ทำให้พืชได้รับธาตุอาหารที่ต้องการ ช่วยปรับปรุงดินทางชีวภาพ ทางกายภาพ และทางชีวเคมี และให้หมายความรวมถึงหัวเชื้อจุลินทรีย์ (ปริญญา, 2549)

การใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์

เนื่องจากในน้ำสกัดชีวภาพ หรือน้ำหมักชีวภาพมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ซึ่งได้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพ พบว่ามีจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศประมาณ 1.1×10^5 CFU / ml และจุลินทรีย์ที่สร้างกรดมีปริมาณ 2.5×10^7 CFU/ml ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* และกลุ่ม Lactic acid bacteria เมื่อตรวจสอบพบว่าเป็น *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. ส่วนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศพบว่าเป็นแบคทีเรีย *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. และ yeast จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศจะเป็นพวก

สร้างกรด คือ Lactic acid bacteria และพวกสร้างกลิ่นเหม็น H_2S ซึ่งตรวจพบว่าเป็นพวกแกรมลบท่อนสั้น (สุริยา และคณะ, 2544)

นอกจากนี้ได้มีการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำสกัดชีวภาพสูตรต่างๆ พบจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เป็นจำนวนมากได้แก่ กลุ่มย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่ รา แบคทีเรีย และแอกติโนมัยซิส นอกจากนี้ยังพบ ยีสต์ , *Azotobacter* และ พบว่าทุกตัวอย่างของน้ำสกัดชีวภาพมีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 3.1 - 4.0 (สุพจน์, 2544)

ดังนั้นการใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมัก ด้วยน้ำหมักชีวภาพจึงเป็นวิธีที่มีความเหมาะสม เพื่อเร่งกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้กลายเป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้เร็วขึ้น

1.2.3 ความสำคัญของธาตุไนโตรเจนที่มีต่อพืช

ธาตุไนโตรเจน (N) เป็นธาตุอาหารที่มีบทบาทในการเป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์ไนโตรเจนของเซลล์พืช ได้แก่ เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิค นิวคลีโอไทด์ โคเอนไซม์ต่างๆ และสารอื่นๆ ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) พืชมักจะดูดรับไนโตรเจนจากดินในสภาพของไนเตรท (NO_3^-) เป็นส่วนใหญ่ อาจพบได้บ้างในสภาพที่เป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) (http://www.sc.chula.ac.th/botany/eClass /2305101/nutrition.pdf : 14-08-2007) พืชที่ขาดธาตุไนโตรเจน ลำต้นและรากมีลักษณะแคระแกร็น ใบเล็กเหลืองซีด ร่วงง่าย แตกกิ่งก้านน้อย หากพืชขาดมากๆ พืชจะยิ่งแสดงอาการเหลืองซีดไปทั้งต้น และอาจทำให้ตายได้

1.2.4 จุลินทรีย์ที่ตรึงธาตุไนโตรเจน

จุลินทรีย์ในธรรมชาติบางชนิดสามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนที่มีมากมายในอากาศแต่พืชไม่สามารถใช้ได้ ให้กลายเป็นแอมโมเนียมที่พืชสามารถใช้ได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจน แอมโมเนียมที่เกิดขึ้นเป็นไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย จุลินทรีย์อาจให้ไนโตรเจนที่ตรึงได้แก่พืชที่มันอาศัยอยู่ได้โดยตรง หรือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนหรือสารอินทรีย์อื่น ๆ ในเซลล์จุลินทรีย์ก่อน จากนั้นเมื่อจุลินทรีย์ตายไนโตรเจนที่เก็บไว้จึงจะถูกปลดปล่อยออกสู่ดินหรือสภาพแวดล้อมในรูปของแอมโมเนียมที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในภายหลัง ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมากจากดิน แต่ในดินโดยทั่วไปมีไนโตรเจนไม่เพียงพอแก่ความต้องการของพืช จุลินทรีย์เหล่านี้จึงมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งที่จะ ช่วยเพิ่มไนโตรเจน ปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน จุลินทรีย์เหล่านี้แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ

1.2.4.1) จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ (Free-living nitrogen fixing microorganisms) โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยอยู่ร่วมกับพืช ได้แก่ *Azotobacter Azospirillum* และ *Burkholderia* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการตรึงไนโตรเจน แบคทีเรีย *Clostridium pasteurianum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการตรึงไนโตรเจน และ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือ Cyanobacteria เช่น *Anabaena และ Nostoc* เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้นอกจากสามารถตรึงไนโตรเจนได้แล้ว ยังสามารถสังเคราะห์แสงได้อีกด้วย (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

1.2.4.2) จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยต้องอาศัยอยู่ร่วมกับพืช (Symbiotic nitrogen fixing microorganisms) เช่น *Rhizobium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สามารถ ทำให้พืชตระกูลถั่วหลายๆ ชนิด ทั้งพืชล้มลุกและไม้ยืนต้น เช่น ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วเหลือง แค กระถินณรงค์ และก้ามปูเกิดปมราก ไรโซเบียมเข้าไปอาศัยแล้วได้รับสารอาหาร และ แหล่งพลังงานจากต้นถั่ว ขณะเดียวกันก็ส่งไนโตรเจนที่ตรึงได้ให้แก่ต้นพืช เชื้อแอคทิโนมัยซีทที่ชื่อแฟรงเคีย (*Frankia*) สามารถทำให้พืชบางชนิดเกิดปมและตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับไรโซเบียม แต่จะเกิดปมกับพืช พวก ต้นไม้ เช่น สนทะเล สนประดิพัทธ์ ขณะที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพวก *Anabaena* หากเข้าไปอาศัยอยู่ในโพรงใบของแหนแดงจะตรึงไนโตรเจนได้ดีกว่าที่อยู่อย่างอิสระในธรรมชาติ (ดวงพร, 2545)

1.2.5 การตรึงแก๊สไนโตรเจน

การตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการที่แปรสภาพไนโตรเจนจากรูปที่พืชใช้ประโยชน์ไม่ได้เป็นรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ เนื่องจากในอากาศมีแก๊สไนโตรเจนอยู่ประมาณ 78% โดยปริมาตร แต่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ต้องผ่านกระบวนการแปรสภาพให้เป็นรูปอื่น เช่น อนินทรีย์ไนโตรเจนโดยกระบวนการตรึงไนโตรเจนก่อน แล้วจึงสลายตัวปลดปล่อยเป็น อนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมไอออน หรือไนเตรตไอออนที่เป็นประโยชน์ต่อไป การตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์นำแก๊สไนโตรเจนจากอากาศมาสร้างเป็นอินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ของจุลินทรีย์ (มุกดา, 2544; ดวงพร, 2545) เป็นกระบวนการที่ต้องมีเอนไซม์ หรือจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้องจึงจะเกิดขึ้นได้ ซึ่งการตรึงแก๊สจากบรรยากาศเป็นบทบาทของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) ประกอบด้วยไนโตรจีเนส และไนโตรจีเนสรีดักเตส ในระบบนี้อิเล็กตรอนถูกถ่ายทอดผ่าน Ferredoxin หรือ Flavodoxin มาที่ไนโตรจีเนส รีดักเตส และไปที่ไนโตรจีเนส ซึ่งอิเล็กตรอนถูกใช้รีดิวซ์แก๊สไนโตรเจนและไฮโดรเจนไอออนไปเป็นแก๊สแอมโมเนียและไฮโดรเจน โดยบริเวณว่องไว (Active site) ของไนโตรจีเนสที่มีการรีดิวส์แก๊สไนโตรเจนมีโมลิบดีนัมและเหล็กเป็น

โคเฟกเตอร์ (ดวงพร, 2545) แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปอีกเป็นแอมโมเนียมอิออน (NH_4^+) ส่วนหนึ่งที่เหลือใช้ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้เมื่อเซลล์ตายแล้วส่วนของอินทรีย์ไนโตรเจนถูกย่อยสลายเกิด NH_4^+ ซึ่งเป็นรูปที่มีประจุบวกจึงสามารถถูกดูดซับอยู่ในดินเพราะดินมีประจุลบ และพืชสามารถนำไปใช้ได้ (http://csu.sut.ac.th/doc/rhizobium.pdf : 14-08-2007)

1.2.6 แบคทีเรีย Azotobacteraceae

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์ขนาดใหญ่ ปลายทู่ เป็นรูปท่อน รูปไข่ หรือทรงกลม มีลักษณะการเคลื่อนที่และการเรียงตัวของแฟลกเจลลาแตกต่างกัน บางชนิดไม่เคลื่อนที่ เป็นแซบโพรไฟต์ที่พบในดิน น้ำ รอบๆรากพืช ตรึงแก๊สไนโตรเจน ในสภาพที่มีอากาศเนื่องจากต้องการอากาศสำหรับการเจริญ มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารอินทรีย์ เป็นจุลินทรีย์พวก Nitrogen Fixing Bacteria ซึ่งสามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนได้อย่างอิสระและมีประสิทธิภาพสูง และมีอัตราการหายใจสูง เพื่อใช้แก๊สออกซิเจนให้หมดไปโดยเร็วที่ผิวเซลล์ ทำให้สภาพภายในเซลล์เป็นสภาพไร้อากาศ วิธีนี้เป็นการป้องกันเอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพล็กซ์ (nitrogenase complex) ซึ่งไวต่อออกซิเจน ไม่ให้ถูกยับยั้งภายใต้สภาพที่มีอากาศ (Krieg และคณะ, 1984; ดวงพร, 2545)

มีงานวิจัยจำนวนมากที่มุ่งศึกษาการใช้จุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ เช่น *Azotobacter* spp. เป็นเชื้อควบคุมตะกอนปฏิกูล (Martensson และคณะ, 1996) นอกจากนี้ Chen และคณะ (2005) อ้างถึง Moulin และคณะ (2001) พบว่า แบคทีเรีย *Burkholderia* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม proteobacterium ใน β - subclass ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดปม และตรึงไนโตรเจนในถั่ว

Yasmin และคณะ (2004) ได้ทดสอบเชื้อ *Bacillus* sp. z 3-4 และ *Azospirillum* sp. z – 31 พบว่าสามารถเพิ่มชีวมวลของรากและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในข้าวได้

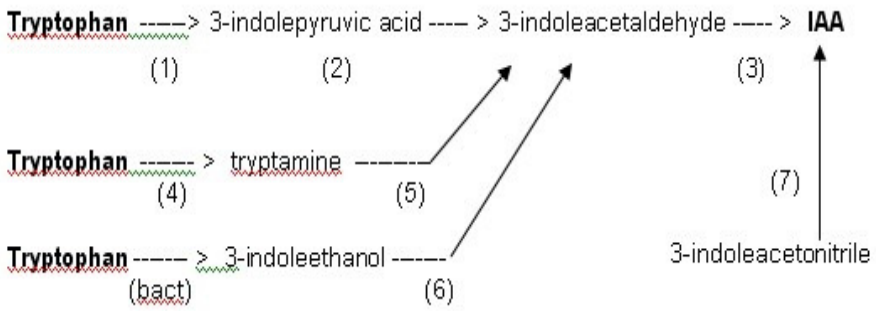
Shingh และคณะ (2006) พบว่า แบคทีเรีย *Burkholderia* เป็นแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมให้ต้นข้าวเจริญเติบโตดีขึ้น โดยเป็นแหล่งไนโตรเจนแก่ต้นข้าว โดยได้ทดสอบแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* สายพันธ์ RRE – 3 และ RRE – 5 ซึ่งแยกได้จากธรรมชาติ พบว่าสามารถเจริญบนรากข้าว โดยเมล็ดข้าวได้ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อมาก่อน

1.2.7 Indole Acetic Acid (IAA)

เป็นฮอร์โมนที่พืชสร้างจากกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ ที่บริเวณยอดอ่อน แล้วแพร่จากยอดอ่อนไปยังเซลล์อื่น ๆ ที่อยู่ด้านล่าง โดยจะไปกระตุ้นเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อที่มีการยืดตัวให้เจริญ ขยายขนาดขึ้น ทำให้พืชเติบโตสูงขึ้น การทำงานของ IAA ขึ้นอยู่กับสิ่งเร้า เช่น แสง อุณหภูมิ แรงโน้มถ่วงของโลก สิ่งสัมผัสและอื่นๆ (http://www.sripatum.ac.th/online/preeya /F.htm : 15-08-2007)

ในปี ค.ศ. 1934 ได้พบว่า ออกซินมีลักษณะทางเคมีเป็นสาร Indole-3-acetic acid หรือ เรียกย่อๆ ว่า IAA ซึ่งในปัจจุบันเชื่อว่าเป็นออกซินส่วนใหญ่ที่พบในพืชและในสภาพธรรมชาติ อยู่ในรูปอนุพันธุ์ของ Indole ทั้งสิ้น โดยที่ IAA เป็นสารที่สำคัญที่สุด นอกจากนั้นยังพบในรูปของ Indole-3-acetaldehyde หรือ IAAld Indole-3-Pyruvic acid หรือ IPyA และ Indole-3-acetonitrile หรือ IAN ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนเป็น IAA ได้

การสังเคราะห์ IAA นั้น มีกรดอะมิโน L-Tryptophan เป็นสารตั้งต้น (Precursor) L-Tryptophan เป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างของ Indole อยู่ ซึ่งมีแนวทางในการสังเคราะห์ IAA ดังนี้ :



(1) = transamination
(2) = decarboxylation
(3) = aldehyde dehydrogenase
(4) = decarboxylation
(5) = deamination
(6) = indole ethanol oxidase
(7) = nitrilase

ในแบคทีเรีย (bact) จะเปลี่ยน tryptophan ไปเป็น 3-indole ethanol แล้วจึงเปลี่ยนสารนี้เป็น IAA (http://mylesson.swu.ac.th/bi456/Plant%20hormone/lesson2.html : 15-08-2007)

1.2.7.1 การตอบสนองของพืชต่อ IAA

ก) การตอบสนองในระดับเซลล์ IAA ทำให้เกิดการขยายตัวของเซลล์ (Cell enlargement) เช่น ทำให้เกิดการขยายตัวของใบ ทำให้ผลเจริญเติบโต และทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ในบางกรณี เช่น กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของแคมเบียม (Cambium) และกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพ เช่น กระตุ้นให้เกิดท่อน้ำและท่ออาหาร กระตุ้นให้เกิดรากจากการปักชำพืช แล้วยังกระตุ้นให้เกิดแคลลัส (Callus) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่การตอบสนองในระดับเซลล์ที่เกิดเสมอคือ การขยายตัวของเซลล์

ข) การตอบสนองของอวัยวะหรือพืชทั้งต้น (http://www.scribd.com/doc/14008603/ : 20-04-2009)

1. เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของพืชต่อแสง (Phototropism)
2. การที่ตายอดข่มไม่ให้ตาข้างเจริญเติบโต (Apical Dominance)
3. การติดผล
4. ป้องกันการร่วงของผลโดย IAA จะยับยั้งไม่ให้เกิด Abcission layer ขึ้นมา
5. ป้องกันการร่วงของใบ
6. ในบางกรณี IAA สามารถทำให้สัดส่วนของดอกตัวเมีย และตัวผู้เปลี่ยนไป โดย IAA จะกระตุ้นให้มีดอกตัวเมียมากขึ้น

การรักษาระดับปริมาณ IAA ภายในเนื้อเยื่อพืชถูกควบคุมโดยระบบการสร้างและการทำลายพร้อม ๆ กันไป ถ้าเป็นเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตจะมีการสร้างมากกว่าการทำลาย และในทางตรงกันข้าม ในเนื้อเยื่อที่มีอายุมากขึ้น จะมีการทำลายมากกว่าการสร้าง และได้มีการศึกษาผลของการผลิต IAA จากกรดอะมิโน Tryptophan ของ *Azotobacter* และ *Pseudomonas fluorescens* พบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Azotobacter* สามารถผลิต IAA ได้ในปริมาณ 2.68 -10.80 mg/ml ในสภาวะที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติม Tryptophan ในขณะที่เลี้ยงในอาหารที่เติม Tryptophan มีปริมาณ IAA 7.3 – 32.8 mg/ml ส่วนแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติม Tryptophan สามารถผลิต IAA ได้ในปริมาณ 5.34 - 22.4 mg/ml ในขณะที่เลี้ยงในอาหารที่เติม Tryptophan มีปริมาณ IAA 23.4 – 53.2 mg/ml (Ahmad และคณะ, 2005) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Azotobacter* sp. และ *Pseudomonas fluorescens* มีการสังเคราะห์ภายในเซลล์ ได้กรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโนที่ได้เปลี่ยนไปเป็น IAA จากการศึกษาบ่งชี้ให้เห็นว่า ถึงแม้จะไม่มีการเติมกรดอะมิโน Tryptophan ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียกลุ่ม *Azotobacter* sp.และ *Pseudomonas fluorescens* ก็สามารถผลิต IAA ออกมาได้

Madira และคณะ (2009) ได้ทดสอบการสังเคราะห์ IAA ในสภาวะที่ขาด Nitrogen และ Carbon โดยแบคทีเรีย *Azospirillum brasitense* SM พบว่า สามารถผลิต IAA ได้ในสภาวะที่ขาด Nitrogen ได้สูงกว่าในสภาวะที่ขาด Carbon

Pal และคณะ (2001) พบว่า *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ EM85 สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้ 3.84 μg/ml และสามารถตรึงไนโตรเจน 6.76 nmoles C_2H_4/h/tube

จากงานวิจัยต่าง ๆ แสดงว่า การใช้แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระหรือแบคทีเรียอื่นๆ ในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้รับความสนใจสูง เนื่องจากยังมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ในการสร้างฮอร์โมนพืช ดังนั้นจึงนิยมใช้เพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักให้มีคุณสมบัติที่ดีมากขึ้น

1.2.8 การละลายฟอสเฟต

1.2.8.1 ความสำคัญของฟอสฟอรัสต่อพืช

ธาตุฟอสฟอรัส (P) มีบทบาทต่อการสะสมพลังงานและความแข็งแรงของโครงสร้าง เป็นองค์ประกอบของ กรดนิวคลีอิก เยื่อหุ้มเซลล์ และเป็นองค์ประกอบสำคัญของสารพลังงานสูง เช่น ATP (adenosine triphosphate) ฟอสฟอรัสอาจเข้าสู่พืชในสภาพของไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($H_2PO_4^-$) หรือมอนอไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPO_4^{2-}) ขึ้นอยู่กับระดับความเป็นกรด-ด่างของดิน (http://www.sc.chula.ac.th/botany/eClass/2305101/nutriton.pdf : 14-08-2007)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตของพืชเป็นอย่างมาก เมื่ออยู่ในเซลล์พืช จะช่วยควบคุมระดับความเป็นกรดด่าง (pH) ภายในพืช ขณะเดียวกันก็เป็นวัตถุดิบในกระบวนการสร้างสารต่างๆ โดยเฉพาะสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดพลังงานในพืช เนื่องจากฟอสฟอรัสช่วยสร้างพันธะที่แข็งแกร่งเพื่อเชื่อมโมเลกุลขนาดใหญ่แต่ละหน่วยเข้าด้วยกัน (C-P-C) ทำให้โมเลกุลนั้นมีความซับซ้อนและมั่นคง และฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบของ ATP และโคเอนไซม์ (coenzyme) หลายชนิด นอกจากนี้ฟอสฟอรัสสามารถทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ได้หลายลักษณะ (ยงยุทธ, 2546) ได้แก่

ก) ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl phosphate) ของโซ่คาร์บอนได้สารประกอบฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester) เช่น

- น้ำตาลฟอสเฟต (sugar phosphate) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง
- นิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA)

- ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่ออื่นๆ

ข) เชื่อมโยงพันธะกันระหว่างอนุมูลฟอสเฟตด้วยพันธะไพโรฟอสเฟตพลังงานสูงใน ATP

ค) สร้างพันธะเคมีที่แข็งแกร่งเพื่อเชื่อมโยงโมเลกุลขนาดใหญ่แต่ละหน่วยเข้าด้วยกัน (C-P-C) เพื่อทำให้โมเลกุลนั้นมีความซับซ้อนและมั่นคง

1.2.8.2 ฟอสฟอรัสในดิน

ฟอสฟอรัสในดินโดยธรรมชาติ ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของอินทรีย์ฟอสฟอรัส (organic phosphorus) (ตารางที่ 1.1) โดยเฉพาะดินเขตร้อนอาจมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Folin และ Ellis, 1997) ซึ่งเป็นแหล่งที่จะค่อยๆ ปลดปล่อยฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์ออกมาให้กับพืชโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน (Rodriguez และ Fraga, 1999) ปริมาณของฟอสฟอรัสที่ปลดปล่อยจะขึ้นอยู่กับเนื้อดิน ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน และสภาพการใช้ประโยชน์ของพื้นที่นั้นๆ ซึ่งฟอสฟอรัสในรูปอนินทรีย์ในสารละลายดินจะเปลี่ยนไปตามความเป็นกรดด่างของดิน (pH) ซึ่งฟอสฟอรัสในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ จะอยู่ในรูปแอนไอออนของออร์โทฟอสเฟต (orthophosphate) โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 รูป คือ ที่ pH 5.5 – 6.8 อยู่ในรูปไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($H_2PO_4^-$) และหากค่า pH ของดินเพิ่มเป็น 6.8 – 7.2 อยู่ในรูปของมอนอไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPO_4^{2-}) (Anderson, 1980)

ในดินโดยธรรมชาติ ฟอสฟอรัสรูปที่เป็นประโยชน์ในสารละลายดินมีน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน โดยฟอสฟอรัสในดินส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปอินทรีย์ฟอสฟอรัส ได้แก่ อินโนซิทอลฟอสเฟต (inositol phosphate) ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) กรดนิวคลิอิก (nucleic acid) และฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester) (Dalal, 1978) ส่วนฟอสฟอรัสในรูป อนินทรีย์ฟอสฟอรัส ส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพ pH ของดิน หากในดินมีค่า pH ต่ำ จะมีเหล็กและอะลูมีนัมในสารละลายดินสูง อนินทรีย์ฟอสฟอรัสส่วนใหญ่จึงอยู่ในรูปอะลูมินัมฟอสเฟต และไอรอนฟอสเฟต เช่น ในดินกรดหรือดินกรดจัด แต่ในดินมีค่า pH สูงจะมีแคลเซียมละลายออกมาในสารละลายดินมาก อนินทรีย์ฟอสฟอรัสส่วนใหญ่จึงอยู่ในรูปแคลเซียมฟอสเฟต เช่น ในดินเนื้อปูน (calcareous soil) เป็นต้น และฟอสฟอรัสบางส่วนถูกตรึงอยู่ในแร่ดินเหนียว เช่น เคโอลิไนต์ (kaolinite) มอนโมริลโลไนต์ (monmorillonite) และอิลไลต์ (illite)

ตารางที่ 1.1 ฟอสฟอรัสในสารละลายดิน (soil solution)

ชนิดดิน	อนินทรีย์ฟอสฟอรัส (มก./กก.)	อินทรีย์ฟอสฟอรัส	
		มก./กก.	% ของฟอสฟอรัสทั้งหมด
ทราย	0.02	0.28	93
ร่วนปนทราย	0.12	0.57	83
ร่วนปนทรายแป้ง	0.12	0.44	79

ที่มา : Dalal (1978)

1.2.8.3 ปัจจัยที่ควบคุมความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน

ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัส (phosphorus availability) ในดินถูกควบคุมโดยปัจจัยต่างๆ ภายในดิน ดังนี้

ก) ความเป็นกรดด่างของดิน

ความเป็นกรดด่างของดินมีผลต่อปริมาณแคตไอออนบางชนิดในดิน เช่น เหล็ก อะลูมินัม แมงกานีส แคลเซียม และแมกนีเซียมในดิน โดยในดินที่มีความเป็นกรดด่างต่ำ จะมีแคตไอออนของเหล็ก อะลูมินัม และแมงกานีสอยู่มาก หากดินมี pH สูง จะมีแคตไอออนของแคลเซียม และแมกนีเซียมไอออนละลายออกมามาก ซึ่งฟอสฟอรัสในรูปออร์โทฟอสเฟตสามารถตกตะกอนกับแคตไอออนดังกล่าว และอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสลดลง (Hemwall, 1957; van Uexkul, 1998) ดังสมการที่ 1 2 และ 3

ดินกรด $Al^{+3} + H_2PO_4^- + H_2O \leftrightarrow Al(OH)_2H_2PO_4 + 2H$ … (1)

$Fe^{+3} + H_2PO_4^- + H_2O \leftrightarrow Fe(OH)_2H_2PO_4 + 2H$ … (2)

ดินด่าง $3Ca^{+2} + 2\,H_2PO_4^- \leftrightarrow Ca_3(PO_4)_2 + 2H$ … (3)

ข) ปริมาณของเหล็กและอะลูมินัมออกไซด์

ปริมาณเหล็กและอะลูมินัมออกไซด์ในดิน มีผลต่อความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน เนื่องจาก ผิวของออกไซด์ของเหล็กและอะลูมินัมที่มีประจุบวกมีแรงดูดซับออร์โทฟอสเฟต สามารถเกิดพันธะทางเคมี ซึ่งในช่วงแรกฟอสฟอรัสในรูปนี้จะเป็นแหล่งสำรองที่พืชสามารถดูดใช้ได้ (labile pool) แต่เมื่อเกิดพันธะแข็งแรง ทำให้ละลายยาก พืชก็ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (non labile pool) (มนูญ, 2549)

ค) ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน

อินทรียวัตถุนอกจากเป็นแหล่งที่ให้ฟอสฟอรัสแก่พืชแล้ว ยังช่วยลดปฏิกิริยาของเหล็กและอะลูมินัมในดินที่เกิดกับออร์โทฟอสเฟตแอนไอออน โดยอินทรียวัตถุมีหมู่คาร์บอกไซลิก (carboxylic group) และหมู่ฟีโนลิก (phenolic group) ซึ่งเป็นแหล่งประจุลบที่สามารถดูดซับแคตไอออนดังกล่าวไว้ และมีหมู่เอมีน (amine group) ที่สามารถดูดซับออร์โทฟอสเฟตแอนไอออนไม่ให้ถูกชะล้างไปจากหน้าดิน เป็นการดูดซับอย่างหลวมๆ และพืชสามารถดูดไปใช้ประโยชน์ได้

นอกจากนี้ ในอินทรียวัตถุมีฟอสฟอรัสรูปอินทรีย์ เมื่อเกิดการย่อยสลายจะทำให้มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงขึ้น และในการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุอาจมีกรดอินทรีย์ถูกปลดปล่อยออกมา กรดอินทรีย์ทำหน้าที่เป็นคีเลต (chelate) โดยกรดอินทรีย์เป็นแอนไอออนที่จะจับกับเหล็ก และอะลูมีนัม ป้องกันการตกตะกอนกับฟอสฟอรัส ทำให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น (Dakora และ Phillips, 2002; Whitelaw และคณะ, 1999)

ง) ชนิดของแร่ดินเหนียว

แร่ดินเหนียวบางชนิด ได้แก่ เคโอลไนต์ มอนโมริลโลไนต์ และอิลไลต์ สามารถตรึงฟอสฟอรัสได้ แร่ดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับไอออนฟอสเฟตโดยกระบวนการเกิดปฏิกิริยาที่ผิว (surface reaction) ซึ่งไอออนฟอสเฟตจะแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่อยู่รอบๆผิวของแร่ดินเหนียวซิลิเกต (silicate clay mineral) จากนั้นไอออนฟอสเฟตดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับอะตอมของอะลูมินัมหรือของเหล็กที่อยู่ในโครงสร้างของแร่ซิลิเกต ทำให้ไอออนฟอสเฟตกลายเป็นองค์ประกอบของแร่ดินเหนียว (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541)

1.2.8.4 ปัญหาการขาดฟอสฟอรัส

ประเทศไทยตั้งอยู่ในพื้นที่ที่มีลักษณะแบบร้อนชื้น มีฝนตกชุก ดินมีอินทรีย์วัตถุต่ำ อีกทั้งมีการผุพังสลายตัวอย่างรวดเร็ว ดินมีการพัฒนามาเป็นระยะเวลายาวนาน ทำให้ดินมีฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์ต่ำ ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์จึงตกตะกอนกับแคตไอออน อีกทั้งแร่ที่เป็นวัตถุต้นกำเนิดดินที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบน้อยมาก และในดินโดยทั่วไปฟอสฟอรัสส่วนใหญ่อยู่ในรูปอินทรีย์ฟอสฟอรัส ดังนั้นฟอสฟอรัสส่วนใหญ่จึงได้มาจากอินทรียวัตถุ สำหรับในดินโดยทั่วไปในประเทศไทยมีอินทรีย์วัตถุค่อนข้างต่ำ ทำให้ฟอสฟอรัสทั้งหมดโดยรวมในดินมีค่อนข้างน้อย โดยจำเป็น (2547) ได้กำหนดระดับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสในดินโดยใช้วิธีเบรย์ทู (Bray II method) โดยในดินที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์ต่ำกว่า 8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ถือว่ามีฟอสฟอรัสต่ำ จำเป็นต้องใส่เพิ่มลงไป

พืชโดยทั่วไปต้องการฟอสฟอรัส 0.3-0.5 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักแห้ง เพื่อให้การเจริญเติบโตในระยะวัฒนภาค (vegetative stage) เป็นไปตามปกติ หากพืชขาดฟอสฟอรัสจะมีการกระจายคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ไปยังส่วนรากมากขึ้น ทำให้รากสามารถเจริญเติบโตต่อไป ในขณะที่ส่วนเหนือดินหยุดการเจริญเติบโตไปแล้ว พฤติกรรมนี้เป็นการรักษาสภาพให้รากมีความสามารถในการหาธาตุอาหารที่ขาดแคลนเพิ่มเติม (Smith และคณะ, 1990) โดยพืชที่ขาดฟอสฟอรัสมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ 2 ประการ คือ 1) ใบขยายขนาดช้า ทำให้ใบมีขนาดเล็ก และ 2) จำนวนใบน้อย (ยงยุทธ, 2546) สาเหตุที่แผ่นใบมีการขยายขนาดช้า เพราะเซลล์ชั้นผิวไม่ค่อยขยายตัว เนื่องจาก 1) เซลล์ชั้นผิวมีฟอสฟอรัสต่ำ และ 2) สภาพนำน้ำของราก (root hydrolic conductivity) ลดลง อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการขยายขนาดของใบลดลงอย่างมาก แต่ปริมาณโปรตีนและคลอโรฟิลล์ต่อหน่วยพื้นที่ใบลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากขนาดใบลดลงมากกว่าการลดลงของคลอโรฟิลล์ จึงทำให้พืชที่ขาดฟอสฟอรัสในระยะแรกมีสีเขียวเข้ม แต่เมื่อพิจารณาอัตราการสังเคราะห์แสงต่อหน่วยคลอโรฟิลล์ พบว่ามีค่าลดลง ในขณะที่การขาดฟอสฟอรัสของพืช จะมีผลกระทบต่อการเจริญพันธุ์อย่างมาก เช่น ออกดอกช้า จำนวนดอก ผล และเมล็ดลดน้อยลง ใบเสื่อมสภาพตามอายุและร่วงเร็วกว่าปกติ (Barry และ Miller, 1989)

1.2.8.5 บทบาทของจุลินทรีย์ต่อความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัส

จุลินทรีย์ดินบางชนิด สามารถช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินให้แก่พืชได้ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะอาศัยบริเวณรากพืช ซึ่งรากพืชจะปลดปล่อยสารประกอบบางชนิดออกมา และเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน (ตารางที่ 1.2) จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะผลิตสารต่างๆเพื่อช่วยละลายฟอสฟอรัสได้ (Rodriguez และ Fraga, 1999) เช่น กรดอินทรีย์ หรือเอนไซม์บางชนิด (มนูญ, 2549) ซึ่งแต่ละชนิดสามารถเจริญและทำงานได้ดีในสภาพแวดล้อมดินที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดอาหาร และสมบัติของดินในบริเวณนั้นๆ

ตารางที่ 1.2 สารประกอบอินทรีย์และเอนไซม์ต่างๆที่รากพืชปลดปล่อยออกมา

Amino acids	**Organic acids**	**Sugars**	**Vitamins**	**Purines/ Nucleo-sides**	**Enzymes**	**Inorga-nic ion and gaseous mole-cules**
α-alanine	citric	Glucose	biotin	adenine	Acid/alkaline Phosphatase	HCO_3^-
β-alanine	oxalic	Fructose	thiamine	guanine	Invertase	OH^-
Asparagines	malic	Galactose	niacin	cytidine	Amylase	CO_2
Aspatate	fumalic	Maltose	Pantothenates	uridine	protease	H_2
Cystein	Ssuccinic	Ribose				
Cystine	acetic	Xylose				
Glutamate	butyric	rhamnose				
Glycine	valeric	arabinose				
Isoleucine	glycolic	raffinose				
Leucine	piscidic	de soxyribose				
Lysine	formic	oligosaccharide				
Methionine	acoitic					
Serine	lactic					
Threonine	pyruvic					
Praline	glutaric					
Valine	malonic					
Tryptophan	aldonic					
Ornithine	erythronic					
Histidine	tetronic					
Arginine						
Homoserine						

Amino acids	Organic acids	Sugars	Vitamins	Purines/ Nucleo-sides	Enzymes	Inorga-nic ion and gaseous mole-cules
Phenylalanine						
γ-Aminobutyric acid						
α- Aminoadipic acid						

หมายเหตุ พืชที่ใช้ศึกษาได้แก่ ดันแฟลกซ์ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต แตงกวา มะเขือเทศ พริกชี้ฟ้า กะหล่ำปลี ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ต้นสน turnip chickpea lupin alfalfa slash และ rape

ที่มา : Dakora และ Phillips (2002)

1.2.8.6 การเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสโดยกรดอินทรีย์

จุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ เช่น กรดกลูโคนิก (gluconic acid) และ กรดคีโตกลูโคนิก (2-Ketogluconic acid) เป็นต้น (ตารางที่ 1.3) กรดอินทรีย์จะช่วยปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาจากอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ เนื่องจากกรดอินทรีย์ส่วนที่เป็นแอนไอออน จะไปจับกับแคตไอออน เช่น อะลูมินัม เหล็ก และแคลเซียม เป็นต้น ทำให้แคตไอออนเหล่านี้ไม่ตกตะกอนกับฟอสเฟตไอออน (Dakara และ Phillips, 2002) และโดยส่วนใหญ่แล้ว จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์กรดอินทรีย์ออกมาได้ (Feince และคณะ, 2000; Vazguez และคณะ, 2000; Reyes และคณะ, 1999; Rodriguez และ Fraga, 1999; Gyaneshwar และคณะ, 2002; Toro และคณะ, 1997) ซึ่งกรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาส่วนใหญ่จะเป็นกรดกลูโคนิก

Reddy และคณะ (2002) ได้ทดลองการละลายหินฟอสเฟตชนิดต่างๆในอาหารเหลว โดยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นเชื้อรา 5 ชนิด คือ *Aspergillus tubingensis* 3 สายพันธุ์ (AT1 AT2 และ AT3) และ *Aspergillus niger* 2 สายพันธุ์ (AN1 และ AN2) ใช้ละลายหินฟอสเฟต 5 ชนิด ซึ่งเป็นหินฟอสเฟตแบบไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) ซึ่งเป็นหินฟอสเฟตที่ละลายได้ค่อนข้างยาก พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ AT1 สามารถละลายหินฟอสเฟตทุกชนิดได้ดี เนื่องจากเชื้อราผลิตกรดอินทรีย์ออกมา

ตารางที่ 1.3 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์	สายพันธุ์
Gluconic acid	*Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola, Pseudomonas cepacia, Burkholderia cepacia*
2-Ketogluconic acid	*Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti, Bacillus firmus*

ที่มา : Rodriguez และคณะ (1999)

Whitlaw และคณะ (1999) ได้นำเชื้อรา *Penicillium radicum* ไปทดสอบการละลายฟอสฟอรัสในอาหารเหลว ซึ่งมีแหล่งฟอสฟอรัสในรูปแคลเซียมฟอสเฟต 2 ชนิด คือ แคลเซียมมอนอไฮโดรเจนฟอสเฟต ($CaHPO_4$) และแคลเซียมออร์โทฟอสเฟต ($Ca_3(PO_4)_2$) และอะลูมินัมฟอสเฟต ($AlPO_4$) และในอาหารแต่ละสูตรใช้ไนตรเจน 2 รูป คือ แอมโมเนียม (NH_4^+) และไนเทรต (NO_3^-) พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถผลิต กรดกลูโคนิก และสามารถละลายฟอสฟอรัสออกมาได้ โดยเฉพาะในสูตรอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม เชื้อราสามารถละลายฟอสฟอรัสได้ดีกว่าอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของไนเทรต (ตารางที่ 1.4) ทั้งนี้เนื่องจาก จุลินทรีย์สามารถดูดแอมโมเนียม และนำไปใช้ในกระบวนการแมทาบอลิซึม (metabolism) ได้ทันที หากจุลินทรีย์ใช้ไนโตรเจนในรูปของไนเทรตจะต้องมีกระบวนการรีดิวซ์ (reduction) ไนเทรตมาเป็นแอมโมเนียมก่อน จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการแมทาบอลิซึมต่อไป ซึ่ง Whitlaw และคณะ (1999) ได้ทำการทดลองต่อไป โดยใช้กรดกลูโคนิกแทนจุลินทีย์ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสฟอรัส 3 รูปเช่นเดียวกับข้างต้น และใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับความเป็นกรดด่างขณะที่เลี้ยงเชื้อ พบว่ามีฟอสฟอรัสละลายออกมาใกล้เคียงกับที่เชื้อละลายออกมา

Pal และคณะ (2001) ได้ศึกษาแบคทีเรีย *Bacillus* sp. MRF ทดสอบการละลายฟอสเฟต พบว่าในการละลายฟอสเฟต *Bacillus* sp. MRF สามารถผลิตกรดอินทรีย์ คือ Gluconic acid Citric acid Tartaric acid และ α-ketobutyric acid

ตารางที่ 1.4 การละลายฟอสฟอรัสในรูปแคลเซียมมอนอไฮโดรเจนฟอสเฟต และแคลเซียมออร์โทฟอสเฟต และอะลูมินัมฟอสเฟตในอาหารเหลวโดยเชื้อ *Penicillium radicum*

แหล่งฟอสฟอรัส	แหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมของฟอสฟอรัสต่อลิตร)	ความเป็นกรดด่าง	กรดที่ไทเทรตได้ (มิลลิโมลของไฮโดรเจนต่อลิตร)
$CaHPO_4$	NH_4^+	6	475	3.4	29
$CaHPO_4$	NO_3^-	5	176	4.6	12
$Ca_3(PO_4)_2$	NH_4^+	14	360	4.1	23
$Ca_3(PO_4)_2$	NO_3^-	31	213	4.5	20
Colloid $AlPO_4$	NH_4^+	14	207	2.7	24
Colloid $AlPO_4$	NO_3^-	31	46	4.1	6

ที่มา : ดัดแปลงจาก Whitelaw และคณะ (1999)

1.2.8.7 การใช้จุลินทรีย์ช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสกับพืช

Freitas และคณะ (1997) ได้ทดลองปลูกคาโนลา โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้หินฟอสเฟต ปุ๋ยทริปเปิลซุปเปอร์ฟอสเฟต และการใช้เชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเทสค่อนข้างสูงจำนวน 6 ชนิด คือ *Bacillus magaterium , B. sphaericus , B. brevis-1, B. polymyxa , B. thuringiensis* และ *Xanthomonas maltophillia* โดยเอนไซม์ฟอสฟาเทสจะเปลี่ยนฟอสเฟตที่อยู่ในรูปไม่ละลาย คือ หินฟอสเฟต ให้อยู่ในรูปที่ละลาย ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ได้ง่าย จากผลการทดลอง พบว่า มีแนวโน้มของการสะสมฟอสฟอรัสในเมล็ด น้ำหนักฝัก และน้ำหนักเมล็ดคาโนลาในชุดทดสอบที่ใช้จุลินทรีย์สูงกว่าในชุดควบคุม และชุดทดสอบที่ใช้หินฟอสเฟต แต่น้อยกว่าชุดทดสอบที่ใช้ปุ๋ยทริปเปิลซุปเปอร์ฟอสเฟต

Sundara และคณะ (2002) ศึกษาอิทธิพลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต เพื่อเปลี่ยนฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายในดิน พบว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (*Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*) สามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟต และฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน นอกจากนี้ Sundara และคณะ (2002) ได้ทดสอบการใช้ *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ร่วมกับปุ๋ยฟอสฟอรัส พบว่าการใช้เชื้อดังกล่าว ช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส 25%

Shibata และ Yano (2003) ได้ทดสอบการใช้เชื้อราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) โดยเลี้ยงร่วมกับถั่วลิสง (peanut) ถั่วเขียว (pigeon pea) และถั่วเหลือง (soybeen)

เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ใช้เชื้อ พบว่า ชุดทดสอบที่มีการใช้เชื้อรา พืชทดสอบมีการเจริญเติบโตและสามารถดูดฟอสฟอรัสได้ดีกว่าชุดทดสอบที่ไม่ใช้เชื้อรา นอกจากนี้ได้มีการทดลองใช้ไมคอร์ไรซาร่วมกับถั่วลิสง และถั่วเขียว โดยใส่ฟอสฟอรัสในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ 3 รูป คือ แคลเซียมฟีเทต ไอรอนฟอสเฟต และอะลูมินัมฟอสเฟต พบว่า ชุดทดสอบที่ใช้เชื้อรา ต้นพืชมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าชุดทดสอบที่ไม่ใช้เชื้อรา ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าเชื้อรามีความสามารถในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสได้

การศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการละลาย tricalcium phosphate ของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตจากดินบริเวณเขตร้อน พบว่ามี 10 สายพันธุ์ที่เป็น *Bacillus* spp. จากทั้งหมด 36 สายพันธุ์ (Chen และคณะ, 2006) และการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตในบริเวณรอบคาบสมุทรอินเดีย พบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. (Souza และคณะ, 2000)

จากที่ได้กล่าวมา แสดงว่าการใช้จุลินทรีย์เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของฟอสฟอรัส สามารถช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสให้แก่ดินและพืชได้ และช่วยป้องกันไม่ให้ฟอสฟอรัสไปตกตะกอนกับธาตุประจุบวกอื่นๆ ดังนั้นการศึกษาถึงจุลินทรีย์เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของฟอสฟอรัส จึงเป็นแนวทางเลือกหนึ่ง ที่จะช่วยลดการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสซึ่งมีราคาแพงได้

1.2.9 การยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว

1.2.9.1 การใช้สารเคมี

นับตั้งแต่ประเทศไทยดำเนินการพัฒนาระบบเกษตรกรรมตามแนวทางการปฏิวัติเขียวในปี พ.ศ 2504 สารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้ถูกทำให้เป็นปัจจัยการผลิตที่สำคัญของการเกษตรโดยดูได้จากปริมาณการนำเข้าที่เพิ่มขึ้นจาก 476 ตันหรือคิดเป็นมูลค่า 2.02 ล้านบาทในปี พ.ศ 2492 เพิ่มขึ้นเป็น 52,739 ตันหรือคิดเป็นมูลค่า 7,294 ล้านบาทในปี พ.ศ 2543 กล่าวคือ ปริมาณการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเพียง 50 ปี ในส่วนของธุรกิจเคมีเกษตร พบว่ามูลค่าของธุรกิจเคมีเกษตรในปี 2540 มีสูงถึง 8,500 ล้านบาท ประกอบด้วยสารกำจัดแมลง 3,064 สารป้องกันกำจัดโรคพืช 1,027 สารกำจัดวัชพืช 4,214 ล้านบาท และสารชนิดอื่นๆ จำนวน 197 ล้านบาท โดยที่สารกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่ที่ใช้อยู่ในประเทศไทยต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และมีหลายชนิดที่เป็นสารเคมีอันตรายที่ถูกระงับการใช้แล้วในประเทศ

ในส่วนของเกษตรกร พบว่าเกษตรกรปลูกพืชเพื่อตอบสนองการค้าและการตลาดมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ยาปราบวัชพืชที่มีการใช้

เพิ่มสูงขึ้นกว่าหนึ่งเท่าตัว และเกษตรกรส่วนใหญ่มีพฤติกรรมการฉีดยา โดยละเลยหรือขาดความเข้าใจต่อพิษภัยของการใช้ยานั้นๆ ตลอดจนละเลยและไม่ทราบข้อมูลถึงพิษภัยต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมที่มาจากการใช้สารเคมี

จากสถานการณ์การใช้และการไม่สามารถบังคับใช้กฎหมายและนโยบายควบคุมการใช้สารเคมีได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลกระทบต่างๆตามมามากมาย ทั้งต่อเกษตรกรผู้ใช้สารเคมี ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ซึ่งปัญหาการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชในผลผลิตทางการเกษตรเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อทั้งผู้บริโภคภายในประเทศและการส่งออก

นับตั้งแต่ได้มีการนำสารกำจัดศัตรูพืชเข้ามาใช้ในประเทศไทยตามแนวทางการปฏิวัติเขียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งตั้งแต่หลังจากที่ได้มีการดำเนินงานตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2504 โดยปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี ดังแสดงในตาราง 1.5

ตารางที่ 1.5 ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในแต่ละปี

ปี พ.ศ	ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชที่มีการนำเข้า (ตัน)	มูลค่าการนำเข้า (ล้านบาท)
2509	9,906	208
2514	5,992	130
2519	N/A	515
2524	N/A	N/A
2529	17,837 (12,777)*	1,779
2534	(25,482)*	2,811
2539	(25,542)*	4,924
2540	(27,127)*	6,398
2541	(23,230)*	6,401
2542	(33,969)*	7,281
2543	52,739 (31,454)*	7,294

ที่มา : กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเษตร, 2543 (บุญแต่ง พิมพงาน, 2547)

()* คือ ตัวอย่างในวงเล็บ คือ ปริมาณสารสำคัญที่มีการนำเข้าในปีนั้น

N/A คือ ไม่สามารถหาข้อมูลในปีนั้นได้

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลเฉพาะในปี พ.ศ. 2543 ประเทศไทยมีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชประเภทต่างๆดังตารางที่ 1.6

ตารางที่ 1.6 : ปริมาณการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในปี พ. ศ 2543

ประเภทสารเคมี	จำนวน (ประเภท)	ปริมาณ (ตัน)	ปริมาณสารสำคัญ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
1. สารกำจัดแมลง	60	12,533	6,875	2,001
2. สารกำจัดโรคพืช	66	7,393	4,931	1,120
3.สารกำจัดวัชพืช	60	29,715	17,507	3,841
4. สารชีวินทรีย์กำจัดศัตรูพืช	3	44	0.05	13
5. สารกำจัดหนู	2	142	72	14
6. สารกำจัดไร	11	274	104	72
7. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช	12	1162	748	114
8. สารกำจัดหอยและหอยทาก	3	226	33	33
9. สารรมควันพิษ	4	570	535	63
10. สารกำจัดไส้เดือนฝอย	2	21	3	2
11. สารอื่นๆ	1	658	645	22
รวม	**224**	**52,738**	**31,453.05**	**7,295**

ที่มา : กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร , 2543 (บุญแต่ง พิมพงาน, 2547)

1.2.9.2 ผลกระทบจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (บุญแต่ง พิมพงาน, 2547**)**

ปัญหาจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชไม่ได้มีผลเกิดขึ้นเฉพาะพื้นที่ที่มีการใช้สารเคมีเท่านั้น แต่สามารถกระจายและตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นบริเวณกว้างโดยการสะสม และการฟุ้งกระจายไปตามแหล่งต่างๆ และเกิดการตกค้างขึ้น

ก) การตกค้างในดิน

การแพร่กระจายของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในดินนั้นเกิดขึ้นจากการที่เกษตรกรมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชทั้งก่อนปลูก ขณะพืชเจริญเติบโต และก่อนการดำเนินการเก็บเกี่ยวซึ่งดินจะเป็นแหล่งที่รองรับสารเหล่านี้โดยตรง และจากการตกค้างสะสมของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในดินจะมีผลต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในดิน เช่น จุลินทรีย์ ไส้เดือน แมลงบางชนิด ซึ่งเมื่อสิ่งมีชีวิตเหล่านี้รับสารเคมีเข้าไปในปริมาณที่มากก็จะเป็นอันตราย ทำให้ปริมาณของจุลินทรีย์ผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินลดลง ทำให้ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ ไม่เหมาะแก่การเพาะปลูกต่อไป

ข) แหล่งน้ำ

การแพร่กระจายของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำ และการปนเปื้อนในแหล่งน้ำเกิดจากหลายสาเหตุด้วยกัน คือ

ก) การฉีดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำโดยตรงเพื่อกำจัดยุง และวัชพืชน้ำ

ข) การกัดชะดินของฝนและน้ำไหลบ่าหน้าดินผ่านพื้นที่ที่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชก่อนลงสู่แหล่งน้ำ

ค) การระบายน้ำจากบ้านเรือน โรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำ

ง) การทิ้งหรือล้างภาชนะที่บรรจุสารเคมีกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตรลงสู่แหล่งน้ำ

ค) อาหาร

การตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในอาหาร พืชสามารถรับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้ทั้งทางตรง คือ การฉีดพ่นและอาจจากการดูดซึมสารมาจากดินหรือน้ำ ซึ่งปริมาณการตกค้างมากน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

ก) ชนิดของสารที่ใช้ เช่น สารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน จะมีระยะเวลาในการสลายตัวนานทำให้พบปริมาณการตกค้างมากในผลิตผลทางการเกษตร และรวมไปถึงระยะเวลาปลอดภัยในการเก็บเกี่ยวอีกด้วย

ข) การเคลื่อนที่ของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจากการซึมผ่านรากหรือใบอ่อน ซึ่งวิธีการฉีดพ่นและสูตรของสารเคมีจะมีผลต่อปริมาณสารตกค้างในพืช

ง) สัตว์ป่า และสัตว์เลี้ยง

การฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช จะทำให้สัตว์ป่าและสัตว์เลี้ยงที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงได้รับอันตรายได้ พบว่าการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้ก่อผลกระทบต่อสัตว์ป่า เช่น นก

บางชนิดจะมีเปลือกไข่ที่เปราะบางกว่าเดิมและไข่แตกก่อนที่จะฟักเป็นตัว เนื่องจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการย่อยแคลเซียมทำให้ไข่แดงของนกแตกง่าย

จ) ห่วงโซ่อาหาร (Food chain)

จากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชของเกษตรกรซึ่งส่วนมากจะไม่ละลายน้ำทำให้เกิดการแพร่กระจายและไปสะสมในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตต่างๆในห่วงโซ่อาหาร เช่น แพลงตอน ซึ่งจะมีการถ่ายทอดกันไปในห่วงโซ่อาหาร โดยการกินต่อกันเป็นทอดๆของสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดการสะสมตัวของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชขึ้น และเมื่อได้รับกรสะสมมากจนถึงที่สุด สิ่งมีชีวิตไม่สามารถทนได้ ก็จะทำให้สิ่งมีชีวิตตายไปและทำให้เกิดการขาดความสมดุลของธรรมชาติในห่วงโซ่อาหารขึ้น ทำให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์ซึ่งอยู่บนสุดของห่วงโซ่อาหาร และยังเป็นโทษต่อมนุษย์ผู้บริโภคอีกด้วย

1.2.9.3 การใช้จุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

การควบคุมโรคด้วยชีววิธีคือ การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถลดจำนวนเชื้อก่อโรคหรือแอคติวิตี้ของเชื้อก่อโรค ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) การนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้ามาควบคุมโรคพืชเกิดขึ้นในราวปี ค.ศ 1965 งานวิจัยในการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เข้ามาควบคุมโรคพืชจึงเริ่มได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่องและแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน ทั้งนี้เพื่อจะมุ่งไปสู่การควบคุมโรคพืชแบบวิธีผสมผสาน โดยมีวัตถุประสงค์หลักในเรื่องการเพิ่มผลผลิต และปลอดภัยต่อผู้เกี่ยวข้องตลอดจนความยั่งยืนของระบบนิเวศ (วิจิตรา และดวงพร, 2538; วิจิตรา และดวงพร, 2543)

Pal และคณะ (2001) อ้างถึง Pal (1995) ได้ศึกษาแบคทีเรีย fluorescent *Pseudomonas* sp. EM 85 *Bacillus* sp. MR-11 และ *Bacillus* sp. MRF ซึ่งแยกจากบริเวณรากข้าวโพดมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium moniliforme* *Fusarium graminearum* และ *Mackophomina phasiolina* ซึ่งก่อโรคในข้าวโพด และ *Rhizoctonia solani* ก่อโรคในฝ้าย

Babiba และคณะ (2009) ได้ทดสอบจุลินทรีย์กลุ่ม Phosphate solubilizing bacteria ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas plecoglosicida* และ *Pseudomonas mosselii* พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืชได้ เช่น *Rhizoctonia solani* และ *Magnaporthe grisea*

1.2.9.4 กลไกการควบคุมโรคโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ก) กระบวนการ antibiosis

ใช้ผลผลิตซึ่งได้จากกระบวนการเมตาบอลิสมจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเข้าไปยับยั้งหรือทำลายสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง

- การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics)

สารปฏิชีวนะซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ผลิตโดยจุลินทรีย์มีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระดับความเข้มข้นต่ำ (Fravel, 1988) บทบาทของสารปฏิชีวนะต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เพื่อนำมาผลิตในอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

- การสร้างสารระเหย (volatile substances)

มีรายงานการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องทางด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีพบว่าสารระเหยบางชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา (Howell และคณะ, 1988) รายงานการควบคุมเชื้อ *Pythium ultimum, Rhizoctonia solani* และ *Verticillium dahelae* จากสารระเหยแอมโมเนียซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* นอกจากนั้น akyl pyrones ก็เป็นสารระเหยชนิดหนึ่งซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราหลายชนิดโดยเฉพาะ *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค damping-off ของผักกาดหอม (Cladon และคณะ, 1987) ไฮโดรเจนไซยาไนด์จาก *Pseudomonas fluorescens* ควบคุมเชื้อ *Thielaciopsis basciola* ซึ่งเป็นสาเหตุก่อโรครากเน่าของต้นยาสูบ (Schippers และคณะ, 1990)

ข) กระบวนการแก่งแย่งอาหาร (nutrient competition)

แหล่งคาร์บอนซึ่งได้รับจากคาร์โบไฮเดรทและกลูโคสเป็นสารอาหารหลักที่มีจำกัดเป็นเหตุให้จุลินทรีย์เกิดการแข่งขันซึ่งกันและกันในการนำสารอาหารนี้มาใช้ จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้เร็วและมีกระบวนการที่มีประสิทธิภาพซึ่งสามารถที่จะนำเอาสารอาหารซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดมาใช้ได้ย่อมมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์อื่น (Gilbert และคณะ, 1990) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีกลไกหลักในการควบคุมโรคพืชแบบแข่งขันที่สำคัญ เช่น *Fusarium oxysporum* (Lemanceau และคณะ, 1993) ตัวอย่างเช่น *F. oxysporum* F047bio ใช้ควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* WES 816 ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าของมะเขือเทศ

ค) Siderophores

Siderophores เป็นผลิตภัณฑ์แบบ secondary metabolite ที่จุลินทรีย์ทั้งเชื้อแบคทีเรียหรือราผลิตออกมาเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กหรือมีในปริมาณต่ำมาก ปกติแล้วจุลินทรีย์พวก aerobe และ facultative anaerobe สามารถผลิต Siderophores ได้แทบทั้งสิ้น Siderophores มีโครงสร้างหลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ปัจจุบันสามารถทราบลักษณะโครงสร้างทางเคมีแล้วไม่น้อยกว่า 200 โครงสร้าง จำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. ไฮดรอกซาเมต (hydroxamate) หรือ ไธโอไฮดรอกซาเมต (thiohydroxamate)
2. คาเทโคเลต (catecholate) หรือ ฟีโนเลต (phenolate)
3. คาร์บอกซิเลต (carboxylate)

ความสัมพันธ์ระหว่าง Siderophores กับธาตุเหล็ก

ในสภาวะที่มีออกซิเจนและมีค่า pH เป็นกลาง ธาตุเหล็กมีความสามารถในการละลายต่ำมาก คือ มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10^{-17} M เนื่องจากสามารถรวมตัวกับไฮดรอกไซด์ ซิลิเกต และฟอสเฟต เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้น้อยมาก สภาวะเช่นนี้จุลินทรีย์จะผลิต Siderophores ออกมานอกเซลล์ ทำให้เกิดการละลาย การเข้าจับและการลำเลียงธาตุเหล็กจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป (http://chemsci.kku.ac.th/chalerm/research.htm: 11-12-2007)

ง) กระบวนการปรสิต (parasitism)

พบในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย โดยเฉพาะการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรค ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อรา เอนไซม์ตัวหลักที่สำคัญที่ทำหน้าที่นี้คือเอนไซม์ chitinase และ β - 1, 3 glucanase ซึ่งจะย่อยสลาย chitin และ β - 1, 3 – glucan อันเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในโครงสร้างของผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราชั้นสูง (Tweddell และคณะ, 1992) และผนังเซลล์ของ sclerotium (Benyagoub และ Jabaji-Hare, 1992) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มักจะสร้าง chitinase และ β - 1, 3 – glucanase ในอาหารที่มีสภาพค่อนข้างเป็นกรด (Elad และคณะ, 1982)

1.2.10 แบคทีเรีย *Bacillus* spp.

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง มีขนาด 0.5 x 10 ไมโครเมตร สร้าง endospore ที่ทนความร้อนได้ดี ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย catalase ให้ผลบวก สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เจริญได้ใน

อาหารหลายชนิด แม้แต่ในอาหารที่มีสารอาหารเพียงเล็กน้อยก็สามารถเจริญได้ ลักษณะโคโลนีที่เห็น มีลักษณะกลม หรือบางครั้งไม่แน่นอน ทึบแสง มีสีครีม น้ำตาล บางชนิดมีสีแดง ส้ม ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร (Sneath และคณะ, 1986)

เชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. ยังเป็นพวก antagonistic bacteria ที่สามารถควบคุมเชื้อโรคในพืชได้ เช่น การควบคุมเชื้อ *Rhizoctonia solani* ในมะเขือเทศโดยชีววิธี ซึ่งเชื้อที่ทำการคัดเลือกได้ คือ *B. subtilis* และ *B. lentimorbus* ทั้งสองไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solani* ในมะเขือเทศได้ (Montealegre และคณะ, 2003)

Kunopagon และคณะ (2005) ได้ศึกษาการยับยั้งการเติบโตของเชื้อก่อโรคเหี่ยวในปทุมมาโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ผลจากการเทียบเคียงชนิดเชื้อพบว่ามี 3 ไอโซเลทที่เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อการควบคุมโรคราเขียวของเห็ด พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคราเขียวที่เกิดจากเชื้อ *Trichoderma* sp. คือ *Bacillus* sp. (พรศิลป์, 2546) และการควบคุมเชื้อ *Fusarium graminearum* ในข้าวสาลีโดยชีววิธีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Nouroziam, 2006)

1.2.10.1 การนำ *Bacillus* spp. มาใช้ควบคุมโรคพืช *Bacillus* spp. เหมาะที่จะเป็นจุลินทรีย์ต่อต้านเนื่องจาก

- สามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคได้โดยตรง โดยการสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิดในเวลาเดียวกันและสามารถแก่งแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน (Sinclair และคณะ, 1989)
- เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่โดยปกติมักอาศัยอยู่ตามส่วนต่างๆของพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืช
- มีความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แปรเปลี่ยนโดยการสร้างสปอร์และสามารถทนทานต่อสภาพอากาศร้อนชื้นได้ดี
- *Bacillus* sp. บางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารพวกเมตาบอไลท์บางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการนำมาใช้กระตุ้นให้เกิดความต้านทานโรคของพืชต่อเชื้อสาเหตุ (Stenzel และคณะ, 1985)
- สามารถควบคุมเชื้อโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *X. campestris* pv. *viganeradiatac* (Thind และคณะ), *Uromyces phaseoli* (Baker และคณะ 1985), *Verticillium dahliae* (Hall และคณะ 1986), *R. solani, Curvularia palliscens, Drechslera maydis, Macrophonima phaseoli, Colletotricum gloeosporioides* f .sp *manihotis* (Omifo และ

Ikotum, 1987) *Sclerotinia sclerotiorum, Monilinia fructicola* (Pusey และคณะ 1986) และ *Puccinia pelargoniizonalis* (Rytter และคณะ 1989)

Bacillus sp. เหมาะที่จะเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เนื่องจากมีผู้นำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด ตัวอย่างเช่น ควบคุมเชื้อ *U. phaseoli* (Baker, 1985) *P. pelargoniizonalis* (Rytter, 1989) *V. dahliae* (Hall และคณะ 1986), *R. solani* (Tschem, 1987) *F. oxysporum f.sp.radicis –lycopersici* และ *Pseudomonas solanacearum* (Phae และคณะ, 1992) *M. fructicola* (Pusey และ Wilson, 1984) *Sclerotium cepivorum* (Utkhede, และ Rahe, 1983) และ *Eutypa lata* (Ferreira และคณะ 1991)

นอกจากนี้เชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต เช่น อิทธิพลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Phosphorus Solubilizing Bacteria : PSB) ที่มีผลต่อความเป็นประโยชน์ของฟอสเฟตในดิน Rodriguez *et al* (1999) พบว่า ส่วนใหญ่ *Bacillus* สามารถละลายฟอสเฟตได้และส่งเสริมปริมาณการใช้ฟอสฟอรัสของพืชในปริมาณที่เพิ่มขึ้น Sandra และคณะ, (2002) พบว่า *Bacillus megaterium* var. *posphaticum* สามารถเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสในดิน ต้นอ้อย และอัตราการผลิตน้ำตาล และการใช้ฟอสฟอรัสของพืช ทำให้ลำต้นและน้ำหนักของต้นอ้อยเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อัตราการผลิตน้ำตาลเพิ่มขึ้นด้วย

1.2.11 เชื้อราที่ก่อโรคในข้าว

ประชากรโลกมีความต้องการข้าว ซึ่งความต้องการบริโภคของชาวโลกประมาณ 417.7 ล้านตัน ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกข้าวมากที่สุดในโลก ด้วยสัดส่วนการส่งออก ร้อยละ 36 รองลงมาคือ เวียดนาม ร้อยละ 20 อินเดีย ร้อยละ 18 สหรัฐอเมริกา ร้อยละ 14 ปากีสถาน ร้อยละ 12 ตามลำดับ (http://th.wikipedia.org/wiki : 16-08-2007) ปัจจุบันโรคข้าวที่ระบาดทำลายต้นข้าวจนเสียหายนั้น เกิดจากเชื้อโรคหลายชนิด เช่น เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อไวรัสหรือไมโคพลาสมา และไส้เดือนฝอย ในที่นี้จะขอกล่าวถึงโรคที่เกิดจากเชื้อราเพราะเป็นปัญหาใหญ่กับข้าวและพบการแพร่ระบาดมากในภาคใต้ เนื่องจากมีสภาพร้อนชื้น (http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_005/ricexx2-05_assort02.html :12-06-2007) ได้แก่

1.2.11.1 โรคไหม้ (Rice Blast)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

การแพร่ระบาด พบมากในนาน้ำฝน ซึ่งสปอร์ของเชื้อราจะแพร่กระจายไปได้โดยปลิวไปกับลม ฉะนั้นโรคไหม้จึงแพร่กระจายไปโดยลม (air-borne) เมื่อสปอร์ของเชื้อราตกลงบนส่วนต่างๆ ของต้นข้าวที่มีความชื้นสูง สปอร์ก็จะงอกเป็นเส้นใยเข้าทำลายต้นข้าว

ระยะที่ก่อโรค ได้แก่ :

ระยะกล้า ใบมีแผล จุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา มีสีเทาอยู่ตรงกลางแผล ความกว้างของแผลประมาณ 2-5 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร แผลสามารถขยายลุกลามและกระจายทั่วบริเวณใบ ถ้าโรครุนแรงกล้าข้าวจะแห้งฟุบตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้ (รูปที่ 1.1)

ระยะแตกกอ อาการพบได้ที่ใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของลำต้น ขนาดแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลลุกลามติดต่อกันได้ที่บริเวณข้อต่อ ใบจะมีลักษณะแผลช้ำสีน้ำตาลดำ และมักหลุดจากกาบใบเสมอ

ระยะคอรวง (ระยะออกรวง) ถ้าข้าวเพิ่งจะเริ่มให้รวง เมื่อถูกเชื้อราเข้าทำลายเมล็ดจะลีบหมด แต่ถ้าเป็นโรคตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยว จะปรากฏรอยแผลช้ำสีน้ำตาลที่บริเวณคอรวง ทำให้เปราะหักง่าย รวงข้าวร่วงหล่นเสียหายมาก

รูปที่ 1.1 อาการใบจุดช้ำน้ำและรูปตา
ที่มา http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_assort02.html

1.2.11.2 โรคกาบใบแห้ง (Sheath blight)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

การแพร่ระบาด เชื้อราสามารถสร้างสปอร์ อยู่ได้นานในตอซังหรือวัชพืชในนา ตามดินนา และมีชีวิตข้ามฤดูหมุนเวียนทำลายข้าวได้ตลอดฤดูกาลทำนา

ระยะและอาการที่ก่อโรค

เริ่มพบโรคในระยะแตกกอจนถึงระยะใกล้เก็บเกี่ยว ยิ่งต้นข้าวมีการแตกกอมากเท่าใด ต้นข้าวก็จะเบียดเสียดกันมากขึ้น โรคก็จะเป็นรุนแรง ลักษณะแผลสีเขียวปนเทา ขนาดประมาณ 1-4 x 2-10 มิลลิเมตร ปรากฏตามกาบใบตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำ แผลจะลุกลามขยายใหญ่ขึ้นจนมีขนาดไม่จำกัดและลุกลามขยายขึ้นถึงใบข้าว (รูปที่ 1.2) ถ้าเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอ แผลสามารถลุกลามถึงใบธงและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้ง ผลผลิตจะลดลงอย่างมากมาย

รูปที่ 1.2 ลักษณะของโรคกาบใบแห้ง

ที่มา http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_assort02.html

1.2.11.3 โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown spot)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Helminthosporium oryzae*

การแพร่ระบาด สปอร์ของเชื้อรานี้ปลิวไปกับลม และเมื่อตกลงบนดอกข้าวหรือเมล็ดข้าวที่ยังไม่แก่ สปอร์ก็จะงอกเข้าทำลายเมล็ดข้าว ทำให้เมล็ดข้าวเป็นด่างดำ นอกจากนี้เชื้อราก็ยังสามารถเข้าทำลายแป้งของเมล็ดด้วย ดังนั้น เมล็ดที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายจะมีคุณภาพไม่ดี น้ำหนักเบา เอาไปสีจะหักมาก เชื้อราจะติดอยู่กับเมล็ดข้าวจนถึงเวลาตกกล้า เมื่อเอาเมล็ดที่มีเชื้อราไปตกกล้า เชื้อราที่ติดมาก็จะเจริญเติบโตและขยายพันธุ์เข้าทำลายต้นกล้า

ระยะและอาการที่ก่อโรค

แผลที่ใบข้าว พบมากในระยะแตกกอมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาล รูปกลมหรือรูปไข่ ขอบนอกสุดของแผลมีสีเหลือง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1 มิลลิเมตร แผลที่มีการพัฒนาเต็มที่ขนาดประมาณ 1-2 x 4-10 มิลลิเมตร บางครั้งพบแผลไม่เป็นวงกลมหรือรูปไข่ แต่จะเป็นรอยเปื้อนคล้ายสนิมกระจัดกระจายทั่วไปบนใบข้าว (รูปที่ 1.3)

รูปที่ 1.3 อาการใบจุดสีน้ำตาลที่ใบ

ที่มา http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_assort02.html

1.2.11.4 โรคใบขีดสีน้ำตาล (narrow brown spot)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Cercospora oryzae*

การแพร่ระบาด สปอร์ของเชื้อรา ปลิวไปกับลม และยังสามารถติดไปกับเมล็ด

ระยะและอาการที่ก่อโรค มักพบในระยะข้าวแตกกอ ลักษณะแผลที่ใบมีสีน้ำตาลเป็นขีด ๆ ขนานไปกับเส้นใบข้าว แผลไม่กว้างตรงกลางเล็กและไม่มีรอยช้ำที่แผล ต่อมาแผลจะขยายมาติดกัน แผลจะมีมากตามใบล่างและปลายใบ ใบที่เป็นโรคจะแห้งตายจากปลายใบก่อน ต้นข้าวที่เป็นโรครุนแรงจะมีแผลสีน้ำตาลที่ข้อต่อใบได้เช่นกัน เชื้อนี้สามารถเข้าทำลายคอรวง ทำให้คอรวงเน่าและหักพับได้ (รูปที่ 1.4)

รูปที่ 1.4 อาการใบขีดสีน้ำตาล

ที่มา http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_assort02.html

1.2.11.5 โรคกาบใบเน่า (Sheath Rot)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Sarocladium oryzae*

การแพร่ระบาด เชื้อรานี้ติดอยู่บนเมล็ดได้นาน นอกจากนี้ พบว่า “ไรขาว” ซึ่งอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงต้นข้าวในบริเวณกาบใบด้านใน สามารถเป็นพาหะช่วยทำให้โรคแพร่ระบาดได้รุนแรงและกว้างขวางยิ่งขึ้น

ระยะและอาการที่ก่อโรค ข้าวแสดงอาการในระยะตั้งท้องโดยเกิดแผลสีน้ำตาลดำบนกาบห่อรวง ขนาดแผลประมาณ 2-7 x 4-18 มิลลิเมตร ตรงกลางแผลมีกลุ่มเส้นใยสีขาวอมชมพู แผลนี้จะขยายติดต่อกันทำให้บริเวณกาบหุ้มรวงมีสีน้ำตาลดำและรวงข้าวส่วนใหญ่โผล่ไม่พ้นกาบหุ้มรวง หรือโผล่ได้บางส่วน ทำให้เมล็ดลีบและมีสีดำ (รูปที่ 1.5)

รูปที่ 1.5 อาการของโรคกาบใบเน่า

ที่มา http://ricethailand.go.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_newDisease007.htm

1.2.11.6 โรคถอดฝักดาบ (Bakanae)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Fusarium fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*)

การแพร่ระบาด เชื้อราจะติดไปกับเมล็ด สามารถมีชีวิตในซากต้นข้าวและในดินได้เป็นเวลาหลายเดือน พบว่าหญ้าชันกาดเป็นพืชอาศัยของโรค

ระยะและอาการที่ก่อโรค พบโรคในระยะกล้า ต้นกล้าจะแห้งตายหลังจากปลูกได้ไม่เกิน 7 วัน แต่มักพบกับข้าวอายุเกิน 15 วัน เริ่มแตกกอ ข้าวเป็นโรคจะต้นผอมสูงเด่นกว่ากล้าข้าวโดยทั่ว ๆ ไป ต้นข้าวผอมมีสีเขียวอ่อนซีดมักย่างปล้อง ซึ่งเป็นระยะต่อเนื่องกับการแตกกอ ระยะนี้จะมีการเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของปล้องอย่างรวดเร็ว และบางกรณีข้าวจะไม่ย่างปล้อง (รูปที่ 1.6) แต่รากจะเน่าช้ำเวลาถอนมักจะขาดตรงบริเวณโคนต้น ถ้าเป็นรุนแรงกล้าข้าวจะตาย หากไม่รุนแรงอาการจะแสดงหลังจากย้ายไปปักดำได้ 15-45 วัน โดยที่ต้นเป็นโรคจะสูงกว่าข้าวปกติ ใบมีสีเขียวซีด เกิดรากแขนงที่ข้อลำต้นตรงระดับน้ำ บางครั้งพบกลุ่มเส้นใยสีชมพูตรงบริเวณข้อที่ย่างปล้องขึ้นมา ต้นข้าวที่เป็นโรคมักจะตายและมีน้อยมากที่อยู่รอดจนถึงออกรวง

รูปที่ 1.6 อาการของโรคถอดฝักดาบ

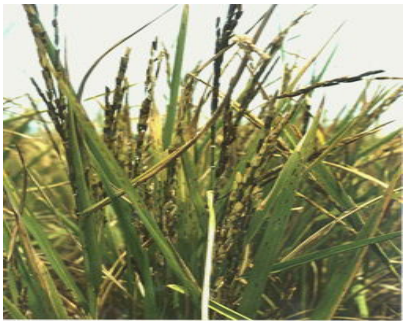
ที่มา http://seedcenter17.doae.go.th/farmer/pest/rice_xx2-05_newDisease008.html

1.2.11.6 โรคเมล็ดด่าง (Dirty Panicle Disease)

สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Curvularia lunata* (Wakk) Boed. , *Cercospora oryzae* I.Miyake *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan. , *Fusarium semitectum* Berk & Rav.*Trichoconis padwickii* Ganguly , *Sarocladium oryzae*

ระยะและอาการที่ก่อโรค ในระยะออกรวง พบแผลเป็นจุดสีน้ำตาลหรือดำที่เมล็ดบนรวงข้าว บางส่วนก็มีลายสีน้ำตาลดำ และบางพวกมีสีเทาปนชมพู ทั้งนี้เพราะมีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายและทำให้เกิดอาการต่างกันไป การเข้าทำลายของเชื้อรามักจะเกิดในช่วงดอกข้าวเริ่มโผล่จากกาบหุ้มรวงจนถึงระยะเมล็ดข้าวเริ่มเป็นน้ำนม และอาการเมล็ดด่าง จะปรากฏเด่นชัดในระยะใกล้เก็บเกี่ยว (รูปที่ 1.7)

การแพร่ระบาด เชื้อราสามารถแพร่กระจายไปกับลม ติดไปกับเมล็ด และอาจสามารถแพร่กระจายในยุ้งฉางได้



รูปที่ 1.7 อาการของโรคเมล็ดด่าง
ที่มา http://ricethailand.go.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_newDisease007.html

1.2.13 น้ำหมักชีวภาพ

ความต้องการผลผลิตจากการเกษตรที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเร่งผลผลิตด้วยการใช้ปุ๋ยเคมี และยาฆ่าแมลง และการเพาะปลูกซ้ำๆกันบ่อยครั้ง สารเคมีจึงมีบทบาทในสังคมเกษตรกรรมของไทยอย่างแพร่หลาย ในระยะแรกที่มีการนำมาใช้ได้ช่วยทำลายศัตรูพืช และกำจัดวัชพืชได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว ทำให้ได้รับความนิยมมากขึ้นเรื่อยๆ แต่ผลเสียที่ตามมาคือ สารเคมีเหล่านี้ตกค้างอยู่ในระบบนิเวศ ทั้งในอากาศ ดิน น้ำ และในอาหารที่บริโภค ก่อให้เกิดอันตรายต่อคน และทรัพยากรธรรมชาติเป็นอย่างมาก อีกทั้งปัญหาเรื่องสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชราคาแพงและผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น เช่น การดื้อยาของแมลง สภาพดินเสื่อมโทรม ทำให้ชาวบ้านค้นหาทางเลือกใหม่ หลังจากมีการแพร่ขยายแนวคิดเรื่องเกษตรอินทรีย์ที่ให้ความสำคัญสูงสุดต่อดิน เนื่องจากดินเป็นรากฐานของทุกสิ่ง มีความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ ธาตุอาหารพืชที่ได้จากสมดุลของดิน แนวคิดเรื่องเกษตรกรรมจุลินทรีย์ที่ให้ความสำคัญกับการใช้จุลินทรีย์ในการทำการเกษตรให้มีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันน้ำหมักชีวภาพได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งน้ำหมักชีวภาพมีชื่อเรียกหลากหลาย เช่น น้ำสกัดชีวภาพ น้ำเอนไซม์ น้ำจุลินทรีย์ น้ำหมักพืช โดยได้จากการหมักพืช ผัก ผลไม้ สมุนไพร กับสารให้ความหวาน เช่น น้ำตาล น้ำผึ้ง ซึ่งนิยมนำมาใช้เพื่อการเกษตรและสิ่งแวดล้อม หรือแม้แต่ด้านปศุสัตว์ เช่น ส่งเสริมสุขภาพสัตว์ กระตุ้นการเจริญของพืช ทำความสะอาดบริเวณเลี้ยงสัตว์ ดังนั้นการใช้น้ำหมักชีวภาพในชุมชน จึงเป็นการลดการใช้สารเคมี นอกจากการลดต้นทุนการผลิตแล้ว ยังได้ผลผลิตในการบริโภคที่ปลอดภัยจากสารเคมี และเป็นการรักษาระบบนิเวศให้ดีขึ้นด้วย พืชและดินมีคุณภาพดีขึ้น เนื่องจากในน้ำหมักชีวภาพมี จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่ได้จากการหมัก ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีและต่อเนื่อง ใช้ได้ทั้งการฉีดพ่นให้พืชหรือราดลงดิน (กาญจนา, 2551) เป็นการรักษาอินทรียวัตถุในดิน และเมื่อปฏิบัติอย่างต่อเนื่องจะก่อให้เกิดความสมดุลในระบบนิเวศ

1.2.13.1 การใช้น้ำหมักชีวภาพ

เฉลียว และอุทัย (2549) ศึกษาการใช้น้ำหมักชีวภาพในนาข้าว พบว่า นอกจากการทำปุ๋ยหมักอินทรีย์ไว้ใช้กับแปลงนาอินทรีย์แล้ว มีเกษตรกรบางรายที่ทำนาดำฉีดพ่นน้ำหมักชีวภาพในแปลงนาก่อนไถดะ และ/หรือ ใส่น้ำหมักในภาชนะที่เจาะรูและนำไปห้อยที่รถไถ เพื่อปล่อยให้น้ำหมักหยดลงในแปลงนาระหว่างการไถดะ ซึ่งช่วยประหยัดแรงงานในการใช้น้ำหมักชีวภาพอีกด้วย นอกจากนี้ เกษตรกรบางรายใช้น้ำหมักชีวภาพสูตรฮอร์โมนบำรุงต้นข้าว โดยฉีดพ่น 2 ครั้ง สังเกตพบว่า การใช้น้ำหมักชีวภาพที่ทำจากสัตว์ในปริมาณที่เข้มข้น อัตราส่วน 1 ต่อ 20 ทำให้ต้นข้าวมีอาการใบไหม้ ใบเหี่ยว แต่ไม่ทำให้ต้นข้าวตาย ในขณะที่การใช้น้ำหมักชีวภาพจากพืชไม่พบลักษณะดังกล่าว

สุวพันธ์ (2548) อ้างใน มานัส และประสิทธิ์ (2549) ได้อธิบายถึงน้ำหมักชีวภาพว่า เมื่อมองในด้านธาตุอาหารพืช ถือว่าเป็นปุ๋ยอินทรีย์น้ำชนิดหนึ่ง ได้จากการหมักชิ้นส่วนของพืช และ / หรือ ของสัตว์ มักจะมีฮอร์โมนพืชหรือสารป้องกันหรือยับยั้งการเกิดโรคบางชนิด

มานัส และประสิทธิ์ (2549) พบว่า เกษตรกรผู้ปลูกข้าวอินทรีย์เกือบทั้งหมดในพื้นที่ที่ศึกษาของจังหวัดสุรินทร์ นิยมใช้น้ำหมักชีวภาพป้องกันและกำจัดโรค แมลง และสัตว์ศัตรูข้าว น้ำหมักชีวภาพนี้ทำจากสมุนไพรพื้นบ้าน ผลไม้รสหวาน และพืชสีเขียว ได้แก่ สะเดา บอระเพ็ด ข่า ตะไคร้ สาบเสือ สบู่ดำ ผักโขม ผักบุ้ง หน่อกล้วย ฟักทอง สับปะรด กระเพราป่า มะม่วง กล้วยน้ำว้า กระถิน เศษผัก เป็นต้น

Kantachote และคณะ (2009) ได้ทดสอบความเป็นพิษของน้ำหมักลูกยอป่า (*Morinda coreia* Ham) ต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี (*Lycopersicon esculentum* Mill) พบว่า เมื่อทำการเจือจางน้ำหมักลูกยอป่า 64 เท่า สามารถผ่านเกณฑ์กำหนดปุ๋ยที่ปราศจากความเป็นพิษต่อพืช และเมื่อเจือจางน้ำหมัก 256 เท่า มีดัชนีการงอกสูงสุดถึง 157% นอกจากนี้ยังมีธาตุอาหารพืช ได้แก่ ไนโตรเจน 633 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัส 1210 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแทสเซียม 4356 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียม 633 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม 536 มิลลิกรัมต่อลิตร โบรอน 50.60 มิลิลกรัมต่อลิตร สังกะสี 1.69 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมงกานีส 6.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำหมักลูกยอป่ามีศักยภาพในการใช้เป็นปุ๋ยน้ำได้

1.2.13.2 ฟางข้าว

ภายหลังจากเกษตรกรเก็บเกี่ยวข้าวแล้ว สิ่งที่เหลือใช้และไม่ต้องการ คือ ฟางข้าว แม้ว่าการจัดการกับฟางข้าวเหลือใช้จะมีหลายวิธี เช่น นำไปเลี้ยงสัตว์ ใช้คลุมหน้าดินเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น หรือ ใช้ในการเพาะเห็ด หากแต่เกษตรกรในพื้นที่นาปรังส่วนใหญ่

มักใช้วิธีการเผาฟางข้าว เนื่องจากเป็นวิธีเตรียมพื้นที่สำหรับการทำนาครั้งต่อไปที่เร็วที่สุด อย่างไรก็ดี แม้เกษตรกรจะทราบว่าการเผาฟางข้าวก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ และภาวะโลกร้อน แต่เกษตรกรเองก็ไม่มีศักยภาพที่จะลงทุนเพิ่มเพื่อการกำจัดฟางข้าว ดังนั้นหากสามารถเพิ่มการใช้ประโยชน์ของฟางข้าวได้ จึงน่าจะเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรหยุดเผาฟางข้าว ดังนั้นฟางข้าวจึงเป็นวัสดุเหลือใช้อย่างหนึ่ง ที่สามารถนำมาทำเป็นน้ำเลี้ยงเพื่อเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นปุ๋ยชีวภาพ

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

3.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและสร้างฮอร์โมนออกซินได้สูง

3.2 คัดเลือก *Bacillus* sp. ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตและยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าวได้สูง

3.3 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในน้ำเลี้ยงฟางข้าว

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1.1 Potato Dextrose Agar (PDA, Difco)

2.1.2 Nutrient Broth (NB, Difco)

2.1.3 Nutrient Agar (NA, Difco)

2.1.4 N_2-Free medium (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

2.1.□ Malt Extract Agar (MEA, Difco)

2.1.6 Pikovskaya 's medium (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

2.1.7 National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP, วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

2.1.8 □hrome Azurol S Agar medium (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

2.1.9 Nessler 's reagent (Fluka)

2.1.10 Ethyl acetate (LAB-S□AN)

2.1.11 Methanol (LAB-S□AN)

2.1.12 3-indole acetic acid (Fluka)

2.1.13 Gibberellic acid (Fluka)

2.1.14 Zeatin (Fluka)

2.1.1□ แผ่น TL□chromatography (ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร) (Merck)

2.1.16 H□l (LAB-S□AN)

2.1.17 Isopropyl alcohol (□ARLO ERBA)

2.1.18 Ammonium hydroxide

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 เครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน (Rotary evaporator, Buchi)

2.2.2 vernier caliper (0-1□0 มิลลิเมตร)

2.2.3 cork borer

2.2.4 ตู้บ่มเชื้อรา อุณหภูมิ 2□องศาเซลซียส (LOW TEMPERATURE IN□UBATOR ,SHEL-LAB)

2.2.□ ตู้บ่มเชื้อแบคทีเรีย อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Incubator, Gallenkamp)

2.2.6 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow carbinet, Microflow)

2.2.7 ตู้อบไอร้อน (Hot air oven, Venticell)

2.2.8 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave, Tomy)

2.2.9 เครื่องเขย่า (Incubator Shaker, GALLENKAMP)

2.2.10 เครื่องหมุนเหวี่ยง (entrifuge, Harrier 18/80)

2.2.11 เครื่องหมุนเหวี่ยง (entrifuge, Sorvall Rc 0)

2.2.12 Visible photometer (SP -300, OPTIMA)

2.2.13 เตาแม่เหล็ก (stirring heating plate)

2.2.14 เครื่องชั่ง (Balance, Metller Toledo)

2.2.1 Vortex mixer (Scientifc)

2.2.16 Micropipette (Eppendorf Research)

2.2.17 Water bath (Julabo, Eco Temp Tw 20)

2.2.18 เครื่องวัด ion (Seven multi, Metller Toledo)

2.2.19 เครื่องวัด pH (Seven multi, Metller Toledo)

2.2.20 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)

2.3 วิธีดำเนินการ

2.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากดินและน้ำในนาข้าว

2.3.1.1 การเก็บตัวอย่างดินและน้ำ ทำการเก็บตัวอย่างดิน จากบริเวณนาข้าวทั้งหมด 6 บริเวณ คือ 1) ต.เมาะมาวี อ. ยะรัง จ. ปัตตานี (20 ตัวอย่าง) 2) ต. ท่าข้าม อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา (80 ตัวอย่าง) 3) ต. กำแพงเพชร อ. รัตภูมิ จ. สงขลา (40 ตัวอย่าง) 4) อ. บางแก้ว จ. พัทลุง (40 ตัวอย่าง)) ต. ท่าแค อ. เมือง จ. พัทลุง (40 ตัวอย่าง) 6) ต. นาหมอบุญ อ. จุฬาภรณ์ จ. นครศรีธรรมราช (40 ตัวอย่าง) โดยใช้พลั่วสนามขุดลงไปลึก 0 – 10 เซนติเมตร เนื่องจากเป็นบริเวณที่รากพืชปรากฏอยู่ โดยเก็บทั้งตัวอย่างดิน และน้ำ แล้วนำมาแยกแบคทีเรีย

2.3.1.1 การแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ

แยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ จากตัวอย่างดินและน้ำจากนาข้าว โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร N_2-Free medium (Burk, 1934) ด้วยวิธี spread plate ในส่วนที่เป็นตัวอย่างน้ำ และในส่วนที่เป็นตัวอย่างดิน ใช้ loop แตะตัวอย่างดิน แล้วไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวาง 7 จุด ต่อ 1 plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีที่ขึ้น ซึ่งมีลักษณะมัน เยิ้ม ใส หรือขุ่น มีสีหรือไม่มีสีก็ได้ ทั้งขนาดเล็กและใหญ่ จากนั้นนำโคโลนีที่ได้ ไปทำให้เชื้อบริสุทธ์ โดยวิธีขีดเป็นฟันปลา

(streak) บนอาหาร N_2-Free medium แล้วบ่มในสภาวะเดียวกับข้างต้น จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ นำไปย้อมสีแกรม และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเชื้อที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศมีลักษณะติดสีแกรมลบ รูปท่อน รูปไข่ หรือทรงกลม

2.3.1.1 การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

แยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินและน้ำจากนาข้าว โดยเติมดิน 1 loopful หรือน้ำ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Pikovskaya 's medium แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยที่ระดับน้ำใน water bath ต้องอยู่เหนือระดับอาหารเหลวในหลอด เมื่อครบกำหนดเวลารีบนำหลอดออกจาก water bath และทำให้เย็นทันที ด้วยน้ำเย็น แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาขีดเป็นฟันปลา (streak) บนอาหาร Pikovskaya 's medium แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 -72 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีที่มีวงใสรอบๆ โคโลนี มาย้อมสีแกรมและเอนโดสปอร์ ซึ่งเชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. มีลักษณะติดสี แกรมบวก รูปแท่ง สร้าง endospore ที่ทนความร้อนได้ดี

2.3.2 การคัดเลือกเชื้อเป้าหมาย

2.3.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ

ขั้นที่ 1 ทดสอบการเจริญ

นำแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ตามตารางที่ 3.1 มาเลี้ยงในอาหาร N_2-Free medium ปริมาณ □มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16 x 1□0 มิลลิเมตร จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาเขย่าที่ 1□0 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบไอโซเลทละ 3 ซ้ำ วัดการเจริญของเชื้อโดยนำมาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Optical Density (OD) 660 nm) ใช้อาหาร N_2-Free medium เป็นหลอดควบคุม โดยปรับค่า OD 660 nm เท่ากับ 0 แล้วนำเชื้อที่ให้ค่า OD 660 nm สูงไปทดสอบขั้นต่อไป

ขั้นที่ 2 การหาปริมาณแอมโมเนียม

นำอาหารเหลวที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นที่ 1 มาหมุนเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 1□นาที เพื่อเอาส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) มาทดสอบ โดยมีชุดควบคุม คือ อาหารเหลว N_2-Free medium ที่ไม่มีเชื้ออยู่ โดยดูดน้ำเลี้ยงเชื้อมา 1 มิลลิลิตร แล้วหยด Nessler's reagent 2-3 หยด ผสมให้เข้ากัน ดูสีที่เกิดขึ้น ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 1) สีเหลืองอ่อน แสดงว่ามีปริมาณแอมโมเนียมน้อย 2) สีเหลืองเข้ม แสดงว่ามีปริมาณแอมโมเนียมปาน

กลาง 3) สีน้ำตาล แสดงว่ามีปริมาณแอมโมเนียมมาก และนำกลุ่มผลการทดสอบที่มีแอมโมเนียมมากไปวัดปริมาณของแอมโมเนียมอิออน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร N_2-Free medium ที่บรรจุในฟลาสก์รูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 2□0 มิลลิลิตร มีอาหารปริมาตร □0 มิลลิลิตร จากนั้นนำฟลาสก์รูปชมพู่ไปเขย่าที่ 1□0 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 1□นาที วัดปริมาณแอมโมเนียมอิออนในส่วนใส โดยใช้เครื่องวัดอิออนของ METTLER TOLEDO รุ่น SevenMulti เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นอาหาร N_2-Free medium ที่ไม่มีเชื้ออยู่ โดยทำการทดสอบไอโซเลทละ 3 ซ้ำ จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่มีปริมาณของแอมโมเนียมอิออนสูงสุดไปศึกษาต่อ

ขั้นที่ 3 ทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA), Gibberellin, □ytokinin (Zeatin) ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TL□) (ดัดแปลงจาก Ahmad *et al*., 200□) โดยนำอาหารที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นที่ 2 มาทดสอบดังนี้

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นที่ 2 ใช้ฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด □00 มิลลิลิตร เติมอาหาร N_2-Free medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวิธีเขย่าด้วยความเร็ว 1□0 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อครบเวลานำเชื้อมาปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้มาปรับค่า pH ให้เป็น 2.□ ด้วย 7 N H□L จากนั้นสกัดด้วย ethyl acetate ปริมาตร 1□มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร แล้วระเหยให้แห้งในเครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ละลายด้วย 80% methanol 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี TL□ (ดัดแปลงจาก Ahmad *et al*., 200□) โดยนำแผ่น TL□ ที่เคลือบด้วย silica gel หยดสารตัวอย่างที่ต้องการแยกสาร แล้วนำมาวางในถังแก้วที่มีตัวทำละลายผสม ซึ่งตัวทำละลายผสมชะสารจากข้างล่างขึ้นข้างบน ในขณะทำการทดลองปิดฝาถังแก้วเพื่อให้บรรยากาศภายในถังแก้วอิ่มตัวด้วยตัวทำละลายผสม คือ isopropanol : ammonium : water = 10 : 1 : 1 ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร แล้วสังเกตแถบที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 2□4 นาโนเมตร โดยเทียบกับ สารมาตรฐาน คือ indole – 3 – acetic acid (IAA), Gibberellin (GA_3) และ □ytokinin (Zeatin) จากนั้นนำมาคำนวณค่า R_f จากสูตร:

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่ solute เคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่}}$$

2.3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

ขั้นที่ 1 ทดสอบการเจริญ

นำเชื้อที่แยกได้เพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร □มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16 x 1□0 มิลลิเมตร แล้วนำหลอดทดลองไปเขย่าที่ 1□0 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญเติบโตดีโดยเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นอาหาร Nutrient broth ที่ไม่มีเชื้ออยู่ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD 660 nm) และคัดเลือกเชื้อที่ให้ค่า OD 660 นาโนเมตร มากกว่า 0.□

ขั้นที่ 2 การละลายฟอสเฟต

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจาก ขั้นที่ 1 มาทดสอบการละลายฟอสเฟต โดยเตรียมกล้าเชื้อซึ่งเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 1□0 มิลลิเมตร แล้วเขย่าที่ 1□0 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับค่าการดูดกลืนแสง (OD 660 นาโนเมตร) เท่ากับ 0.□จากนั้น inoculate เชื้อ 100 ไมโครลิตร วางตรงกลาง plate ของอาหาร NBRIP (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาการเลี้ยง วัดวงใสที่เกิดขึ้น โดยวัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สีเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง เพราะการเกิดกรดทำให้สีของอาหารเปลี่ยน แล้วคำนวณค่า % degree of hydrolysis จากสูตร แล้วทำการคัดเลือกเชื้อที่มีค่า % degree of hydrolysis สูงสุดไปศึกษาต่อ

$$\% \text{ degree of hydrolysis} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}} \times 100$$

ขั้นที่ 3 การยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นที่ 2 มาทดสอบการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว คือ *Pyricularia grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคไหม้ (จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) และ *Rhizoctonia solani* ที่เป็นสาเหตุของโรคกาบใบแห้ง (จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์) ดังนี้

การทดสอบโดยวิธี Conventional streak method (ตามวิธี Fokkema, 1973; Agarry *et al*., 2005)

ปลูกเชื้อราขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร บริเวณกึ่งกลาง plate ของอาหาร Malt Extract Agar (MEA) แล้วขีดเชื้อ *Bacillus* sp. ให้มีความยาว 40 มิลลิเมตร โดยมี

ระยะห่างจากเชื้อรา 23 มิลลิเมตร โดยมีชุดควบคุมที่มีเชื้อราเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำไปบ่ม 2□องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววัด inhibition zone ระหว่างเชื้อรา และ *Bacillus* sp. ทุกวัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{(2r \times 100)}{2R}$$

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบที่ลบขนาดโคโลนีเมื่อเริ่มต้น

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุมที่ลบขนาดโคโลนีเมื่อเริ่มต้น

การทดสอบโดยใช้วิธีของ วิจิตราและดวงพร, 2538

นำเชื้อ *Bacillus* sp. 1 loopful เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2□0 มิลลิลิตร เขย่าที่ 1□0 rpm แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาในการเลี้ยงนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ □000 rpm 20 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้ทดสอบ คือ นำไปผสมกับอาหาร PDA 100 มิลลิลิตร โดยเติมส่วนใส 1% ในอาหารที่ปราศจากเชื้อ แล้วเท plate เมื่ออาหารแข็ง นำเชื้อรา inoculate ที่กลาง plate ซึ่งเชื้อราที่เตรียมไว้ คือ ทำการเลี้ยงเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะจากขอบโคโลนีของราที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 2□องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดรัศมีของเชื้อราทุกวัน โดยเทียบกับชุดควบคุม (PDA + 1 % Nutrient broth ที่ไม่มีเชื้อ) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{(2r \times 100)}{2R}$$

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบที่ลบขนาดโคโลนีเมื่อเริ่มต้น

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุมที่ลบขนาดโคโลนีเมื่อเริ่มต้น

2.3.3 การเทียบเคียงเชื้อเป้าหมาย

ในส่วนของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ ได้ตรวจสอบ □atalase test , Oxidase test และทดสอบการสร้าง cyst โดยการย้อมสีเพื่อดูการสร้าง cyst (ภาคผนวก ข) จากนั้นใช้ 20NE API kit (Biomerieux) ทดสอบ ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง Nutrient agar ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ปรับเชื้อให้มีความขุ่น 2 McFarland ในอาหาร API 20NE แล้วถ่ายเชื้อที่เตรียม 120 ไมโครลิตร ลงใน API 20NE strip โดยอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วอ่านผลหลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง โดยใช้ *Burkholderia cepacia* TISTR 1869 เป็นตัว

เปรียบเทียบ (reference strains) แล้วคำนวณ % identity โดยใช้โปรแกรม API web Stand Alone V. 7.0

ขณะที่ *Bacillus* sp. ย้อมสีดู endospore (ภาคผนวก ข) แล้วใช้ HB API kit (Biomerieux) ทดสอบ โดยใช้เชื้อ 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ API 0 HB โดยถ่ายเชื้อให้มีความขุ่น 2 McFarland ในอาหาร API 0 HB ถ่ายเชื้อที่เตรียม 120 ไมโครลิตร ลงใน API 0 HB strip โดยอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วอ่านผลหลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง โดยใช้ *Bacillus* cereus TISTR 687 เป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วคำนวณ % identity โดยใช้โปรแกรม API web Stand Alone V. 4.0

นอกจากนี้ได้ศึกษาลำดับเบส 16S rRNA gene โดยการเพิ่มปริมาณบริเวณ 16S rRNA gene โดยวิธี Polymerase hain Reaction (P R) แล้วนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม เปรียบเทียบกับที่มีอยู่ในฐานข้อมูลกลางของยีน เช่น GenBank (Genetic Sequence Database) ซึ่งได้ส่งเชื้อไปวิเคราะห์ที่โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VE TOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน โดยสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐาน (Sambrook และ Russell, 2001) จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เฉพาะส่วนที่ต้องการ (16S rRNA gene) ด้วยเทคนิค P R ซึ่งมีสภาวะที่ใช้ดังนี้ (1) อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส 1 นาที (2) อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส 30 วินาที , 0 องศาเซลเซียส 30 วินาที , 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ซึ่งขั้นตอนนี้ทำ 3 รอบ (3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ซึ่งในขั้นตอนการทำ P R ใช้ 27F foreward primer (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1389 reverse primer (GCGTCTAGATGGCCATGATCCGTCACAAGTCAAC) จากนั้นนำ P R product ที่ได้ไป sequence แล้วนำไปวิเคราะห์โดยเรียงลำดับเบส DNA ด้วยโปรแกรม BLASTn เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ของ National enter for Biotechnology Information (N BI)

2.3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเป้าหมาย

2.3.4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29

ก) การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *B. cenocepacia* A29 ที่ผ่านการคัดเลือก ในอาหาร N_2-Free medium agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ *B. cenocepacia* A29 3 loop ลงในอาหารเหลว N_2-Free medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่

ในฟลาสก์รูปชมพู ขนาด 2□0 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 1□0 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อทดลองขั้นต่อไป

ข) ปริมาณเชื้อที่เหมาะสม

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ เลี้ยงในอาหารเหลว N_2-Free medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2□0 มิลลิลิตร แล้วแปรผันกล้าเชื้อเริ่มต้น โดยใส่ flask ละ 2 มิลลิลิตร (2%) 3 มิลลิลิตร (3%) 4 มิลลิลิตร (4%) □มิลลิลิตร (□%) และ 10 มิลลิลิตร (10%) ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็ว 1□0 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวัดการเจริญจากการหาปริมาณโปรตีน (วิธี Lowry method แสดงในภาคผนวก ข) ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม (ในการวัดการเจริญใช้วิธีหาปริมาณโปรตีน เนื่องจากเชื้อมีการสร้างเมือก พวก exopolysaccharide (Luigi และคณะ, 2004))

ค) pH เริ่มต้นของอาหาร

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ เลี้ยงในอาหารเหลว N_2-Free medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2□0 มิลลิลิตร โดยแปรผัน pH ในอาหารเริ่มต้นเป็น □.0 □.□ 6.0 6.□ 7.0 7.□และ 8.0 ตามลำดับ และใส่กล้าเชื้อปริมาณ □% แล้วเขย่าที่ 1□0 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวัดการเจริญจากการหาปริมาณโปรตีนทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อหาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ง) อุณหภูมิ

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ เลี้ยงในอาหารเหลว N_2-Free medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2□0 มิลลิลิตรโดยใช้ pH เริ่มต้น □.□ใส่กล้าเชื้อปริมาณ □% และแปรผันอุณหภูมิที่บ่มเป็น 30 3□ 40 และ 4□องศาเซลเซียส ตามลำดับ แล้วเขย่าที่ 1□0 รอบ/นาที โดยวัดการเจริญจากการหาปริมาณโปรตีนทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

จ) ความเร็วรอบของการเขย่า

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ เลี้ยงในอาหารเหลว N_2-Free medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2□0 มิลลิลิตร โดยใช้ pH เริ่มต้น □.□ ใส่กล้าเชื้อปริมาณ □% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 100 1□0 200 และ 2□0 รอบ/นาที ตามลำดับ โดยวัดการเจริญจากการหาปริมาณโปรตีนทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อหาความเร็วรอบที่เหมาะสม

ในแต่ละการทดลองนอกจากวัดการเจริญแล้ว ยังวัดค่า pH ด้วยและในกรณีการหาปริมาณแอมโมเนียมอิออน และตรวจสอบการมีหรือไม่มีของฮอร์โมนพืช IAA ทำเฉพาะเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และเมื่อเชื้อมีการเจริญสูงสุดเท่านั้น (เข้าสู่ stationary phase) โดยในแต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3.4.2 การทดสอบในสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Burkholderia cenocepacia* A29

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว N_2 – free medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 2 0 มิลลิลิตร โดยใส่เชื้อ 3 loopful เขย่าที่ 1 0 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบ ซึ่งใช้กล้าเชื้อ % pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ .. เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วตรวจวิเคราะห์พารามิเตอร์ดังนี้ คือ viable cell count (ใช้วิธี spread plate) , pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการเลี้ยง , อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) สำหรับปริมาณแอมโมเนียมอิออน และการผลิตฮอร์โมนพืช IAA วิเคราะห์เฉพาะที่เวลาเริ่มต้นและสุดท้าย

2.3.4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus cereus* B36

ก) การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *B. cereous* B36 ที่ผ่านการคัดเลือก ในอาหาร NBRIP บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 3 loopful ลงใน NBRIP ที่เป็นอาหารเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2 0 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 1 0 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อทดลองขั้นต่อไป

ก) ปริมาณเชื้อที่เหมาะสม

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ เลี้ยงในอาหารเหลว NBRIP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2 0 มิลลิลิตร แล้วแปรผันกล้าเชื้อเริ่มต้น โดยใส่ฟลาสก์ละ 2 มิลลิลิตร (2%) 3 มิลลิลิตร (3%) 4 มิลลิลิตร (4%) , มิลลิลิตร (%) และ 10 มิลลิลิตร (10%) ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็ว 1 0 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวัดการเจริญจากการหาปริมาณโปรตีนทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม (ในการวัดการเจริญใช้วิธีหาปริมาณโปรตีน เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีตะกอนของ tricalcium phosphate)

ข) pH เริ่มต้นของอาหาร

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ เลี้ยงในอาหารเหลว NBRIP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2□0 มิลลิลิตร โดยแปรผัน pH ในอาหารเป็น □.□ 6.0 6.□7.0 7.□ และ 8.0 ตามลำดับ และใส่กล้าเชื้อปริมาณ □% แล้วเขย่าที่ 1□0 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวัดการเจริญจากการหาปริมาณโปรตีนทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อหาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ค) อุณหภูมิ

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ เลี้ยงในอาหารเหลว NBRIP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2□0 มิลลิลิตร โดยใช้ pH เริ่มต้น 6.□ใส่กล้าเชื้อปริมาณ □% และแปรผันอุณหภูมิที่บ่มเป็น 30 3□ 40 และ 4□องศาเซลเซียส ตามลำดับ แล้วเขย่าที่ 1□0 รอบ/นาที โดยวัดการเจริญจากการหาปริมาณโปรตีนทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ง) ความเร็วรอบของการเขย่า

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ เลี้ยงในอาหารเหลว NBRIP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 2□0 มิลลิลิตร โดยใช้ pH เริ่มต้น 6.□ ใส่กล้าเชื้อปริมาณ □% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 100 1□0 200 และ 2□0 รอบ/นาที ตามลำดับ โดยวัดการเจริญจากการหาปริมาณโปรตีนทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อหาความเร็วรอบที่เหมาะสม

ในแต่ละการทดลองนอกจากวัดการเจริญแล้ว ยังวัดค่า pH ทดสอบการละลายฟอสเฟตโดยศึกษาในเชิงปริมาณ (จำเป็น, 2□47 : แสดงในภาคผนวก ข) และทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ซึ่งการละลายฟอสเฟตและการยับยั้งเชื้อราวิเคราะห์เมื่อเวลาเริ่มต้นและเชื้อมีการเจริญสูงสุด (stationary phase) เท่านั้น และแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

2.3.4.4 การทดสอบในสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* B36

นำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว NBRIP medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 2□0 มิลลิลิตร โดยใส่เชื้อ 3 loopful เขย่าที่ความเร็วรอบ 1□0 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบ ซึ่งใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น □% pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.□ เขย่าที่ความเร็วรอบ 1□0 รอบ/นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วตรวจวิเคราะห์พารามิเตอร์ดังนี้ คือ viable cell count (ใช้วิธี spread plate), pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการ

เลี้ยง อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด และสำหรับปริมาณการละลายฟอสเฟตทำเฉพาะที่เวลาเริ่มต้นและสุดท้าย

2.3.5 ศึกษาการผลิต Siderophores ของ *Bacillus cereus* B36 และ *Burkholderia cenocepacia* A29 (Schwyn และ Neilands, 1987: Ahmad *et al*., 2006)

ในการศึกษา siderophores เพื่อต้องการทราบว่า *B. cereus* B36 และ *B. cenocepacia* A29 มีความสามารถในการแข่งขันหรือไม่ เนื่องจากถ้ามีการผลิต siderophores แสดงว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติในการจับกับธาตุเหล็กได้ดี ส่งผลให้มีการเจริญได้ดีกว่าเชื้ออื่นๆ ซึ่งทดสอบได้โดยการแบ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ □hrome azurol S agar medium (Schwyn และ Neilands, 1987) ออกเป็น 4 ส่วน เท่าๆกัน จากนั้นหยดเชื้อ *B. cereus* B36 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth แล้วนำไปเขย่าที่ 1□0 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ *B. cenocepacia* A29 ในอาหาร N_2-free medium ซึ่งเขย่าที่ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหยดบริเวณละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่ขึ้น ถ้ามีสีเหลือง-ส้มรอบๆโคโลนี แสดงว่ามีการผลิต Siderophores

2.3.6 การเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

นำเชื้อ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 เชื้อละ 3 loopful เลี้ยงใน N_2-free medium และ NBRIP ตามลำดับ แล้วนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมาเพาะเลี้ยงร่วมกัน โดยใช้กล้าเชื้อ *B. cenocepacia* A29 2.□% และ *B. cereus* B36 □% (เนื่องจากได้มีการทดลองแล้วพบว่า ที่กล้าเชื้อเริ่มต้นของ *B. cenocepacia* A29 □% เมื่อผสมกับ *B. cereus* B36 □% ปรากฏว่า *B. cenocepacia* A29 มีผลไปยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* B36) ในอาหาร NBRIP (ซึ่งเปลี่ยนจาก $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 0.1 g/L เป็น yeast extract 0.0□g/L) เรียกว่าอาหาร NBRIP สูตรดัดแปลง แล้วนำไปเขย่าที่ 1□0 rpm 30 องศาเซลเซียส โดยวัดการเจริญทุกๆ 6 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมมี 2 ชุด คือ เติมเชื้อ *B. cereus* B36 อย่างเดียว □% และ *B. cenocepacia* A29 อย่างเดียว 2.□% แล้วตรวจนับจำนวน *B. cereus* B36 และ *B. cenocepacia* A29 ในชุดควบคุมและชุดทดสอบด้วยวิธี viable cell count โดยใช้ spread plate ความเจือจางละ 2 ซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP สูตรดัดแปลง เพราะเชื้อมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจึงสามารถแยกได้ แล้วหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งซึ่งกันและกันโดยใช้สูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\square\text{FU/ml ในชุดควบคุม}) - (\square\text{FU/ml ในชุดทดสอบ})}{(\square\text{FU/ml ในชุดควบคุม})} \times 100$$

2.3.8 การทดลองในน้ำเลี้ยงฟางข้าว

2.3.8.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงฟางข้าว

เตรียมน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยตัดฟางข้าวยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วหมักเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และใช้สูตรดังนี้

ฟางข้าว	2□	กรัม
หัวเชื้อ	□0	มิลลิลิตร
น้ำประปา	□00	มิลลิลิตร

2.3.8.2 เตรียมน้ำเลี้ยงจากฟางข้าว โดยแบ่งเป็น 8 ชุดการทดลอง

ชุดที่ 1. นำน้ำเลี้ยงฟางข้าวทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1□นาที ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย เป็นชุดควบคุมทางลบ (abiotic control)

ชุดที่ 2. นำน้ำเลี้ยงฟางข้าวทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1□นาที แล้วใส่เชื้อ *B. cenocepacia* A29 □% ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม เป็นชุดทดสอบเชื้อบริสุทธิ์ A29 (ชุดควบคุมทางบวก A29 หรือชุดเชื้อเดี่ยว A29)

ชุดที่ 3. นำน้ำเลี้ยงฟางข้าวทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1□นาที แล้วใส่เชื้อ *B. cereus* B36 □% ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม เป็นชุดทดสอบเชื้อบริสุทธิ์ B36 (ชุดควบคุมทางบวก B36 หรือชุดเชื้อเดี่ยว B36)

ชุดที่ 4. นำน้ำเลี้ยงฟางข้าวทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1□นาที แล้วใส่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม โดยใส่เชื้อ *B. cenocepacia* A29 2.□% และ *B. cereus* B36 □% ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละกลุ่ม เป็นชุดทดสอบเชื้อผสม (การเพาะเลี้ยงร่วมกัน)

ชุดที่ □ นำน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย เป็นชุดควบคุมธรรมชาติ (native control)

ชุดที่ 6. นำน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วใส่เชื้อ *B. cenocepacia* A29 □% ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม เป็นชุดทดสอบ เรียกว่า A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ

ชุดที่ 7. นำน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วใส่เชื้อ *B. cereus* B36 □% ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม เป็นชุดทดสอบเรียกว่า B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ

ชุดที่ 8. นำน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วใส่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม โดยใส่เชื้อ *B. cenocepacia* A29 2.□% และ *B. cereus* B36 □% ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละกลุ่ม (คือ สภาวะ A29 และสภาวะ B36) เป็นชุดทดสอบ เรียกว่า เชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ

โดยทุกชุดการทดลองใช้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด □00 มิลลิลิตร และมีการเขย่าตามสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละไอโซเลท

2.3.8.3 วัดพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้ เมื่อเริ่มต้นการทดลอง , สัปดาห์ที่ 1 , 2 , 3 และ 4

- การเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิด โดยใช้วิธี spread plate บนอาหาร N_2 – Free medium ในกรณีที่หาการเจริญของ *Burkholderia cepacia* A29 และ NBRIP ในกรณีที่หาการเจริญของ *Bacillus cereus* B36 และกรณีที่อาหารน้ำเลี้ยงฟางข้าวไม่มีการฆ่าเชื้อนับแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร Plate count Agar (P□A)
- การตรึงไนโตรเจน โดยวัดปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อย
- การละลายหินฟอสเฟต โดยศึกษาในเชิงปริมาณ (จำเป็น, 2□47)
- การยับยั้งเชื้อรา ที่ก่อโรคในข้าว โดยใช้วิธีเชิงปริมาณ (วิจิตราและดวงพร, 2□38)
- วัดค่า pH หลังการเลี้ยง โดยใช้ pH meter
- วัดค่า E□(Electrical □onductivity) หลังการเลี้ยง โดยใช้ E□meter

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากดินและน้ำในนาข้าว

3.1.1 การแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ

จากการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและน้ำบริเวณรากข้าว พบว่า สามารถแยกเชื้อเป้าหมายได้ทั้งหมด 252 ไอโซเลท ซึ่งสามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง N_2-free medium ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ ที่แยกได้จากนาข้าวบริเวณต่างๆของภาคใต้

บริเวณ (จำนวนตัวอย่างดินและน้ำ)	จำนวนไอโซเลท	% ที่แยกเชื้อได้	ไอโซเลท
ต.เมาะมาวี อ. ยะรัง จ. ปัตตานี (20)	12	60	A1-A2 , A4-A13 ,
ต. ท่าข้าม อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา (80)	126	157.5	A3 , A14-A107 , A112-A128 , A138-A151
ต. กำแพงเพชร อ. รัตภูมิ จ. สงขลา (40)	11	27.5	A108-A109 , A129-A137
อ. บางแก้ว จ. พัทลุง (40)	40	100	A152-A155 , A157-A161 , A163-A164 , A172-A173 , A176-A202
ต. ท่าแค อ. เมือง จ. พัทลุง (40)	27	67.5	A156 , A162 , A230-A252
ต. นาหมอบุญ อ. จุฬาภรณ์ จ. นครศรีธรรมราช (40)	36	90	A165-A171 , A174-A175 , A203-A229
รวม (260 ตัวอย่าง)	252	96.92	

3.1.2 การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

จากผลการทดลองในการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและน้ำบริเวณรากข้าว พบว่าสามารถแยกเชื้อที่เจริญได้บนอาหารแข็งสูตร ikovskaya ที่มีฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ได้ทั้งหมด 196 ไอโซเลท และสามารถจำแนกได้ตามบริเวณที่เก็บตัวอย่าง ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากนาข้าวบริเวณต่างๆ ของภาคใต้

บริเวณ (จำนวนตัวอย่างดินและน้ำ)	จำนวนไอโซเลท	% ที่แยกเชื้อได้	ไอโซเลท
ต.เมาะมาวี อ. ยะรัง จ. ปัตตานี (20)	8	40	B5 , B21 , B24 . B28-B29 , B32 , B34 , B37
ต. ท่าข้าม อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา (80)	60	75	B1-B4 , B5-B20 , B22-B23 , B25-B27 , B30-B31 , B33 , B35-B36 ,B39 , B41-B42 B44 , B47-B55 , B57 , B59 , B61-B63 , B66-B70 ,B72-B74 , B76-B80
ต. กำแพงเพชร อ. รัตภูมิ จ. สงขลา (40)	74	185	B38 , B40 , B43-B46 , B56 , B60 , B64-B65 , B71 , B75 , B81-B86,B90-B104 , B106-B126 , B129-B134 , B136-B144 , B146 , B148-B153
อ. บางแก้ว จ. พัทลุง (40)	12	30	B154-B156 , B158 , B165 , B168-B174
ต. ท่าแค อ. เมือง จ. พัทลุง (40)	24	60	B167 , B175-B196
ต. นาหมอบุญ อ. จุฬาภรณ์ จ. นครศรีธรรมราช (40)	18	45	B58 , B87-B89 , B105 , B127-B128 , B135 , B145 , B147 , B157 , B159-B164 , B166
รวม (260 ตัวอย่าง)	196	75.38	

3.2 การคัดเลือกเชื้อเป้าหมาย

3.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ

ขั้นที่ 1 การเจริญของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ ที่แยกได้ทั้งหมด 252 ไอโซเลทที่เลี้ยงในอาหาร N_2-free medium เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (ค่า OD 660 นาโนเมตร) พบว่า ที่ค่า OD 660 นาโนเมตร มากกว่า 0.2 มีจำนวนเชื้อทั้งหมด 21 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.3) แต่เนื่องจากในกรณีแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศบางไอโซเลทมีการสร้างเมือก ดังนั้นวิธีการวัดการเจริญด้วยการวัดค่า OD 660 นาโนเมตร อาจให้ผลที่คาดเคลื่อนจากความเป็นจริง ดังนั้นจึงใช้การคัดเลือกในขั้นที่ 2 ประกอบในการพิจารณาการคัดเลือก เพื่อทดสอบการคัดเลือกในขั้นที่ 3 ต่อไป

ตารางที่ 3.3 : การเจริญของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศที่แยกได้จากนาข้าวในภาคใต้

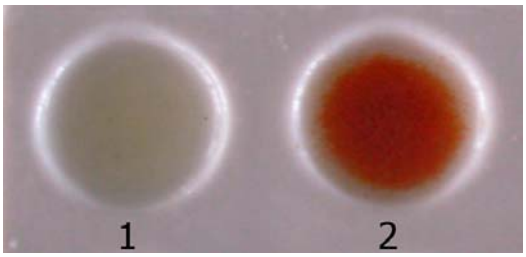
OD 660 นาโนเมตร	จำนวนไอโซเลท
น้อยกว่า 0.05	113
0.05 - 0.10	66
> 0.10 - 0.15	34
> 0.15 - 0.20	18
> 0.20	21

ขั้นที่ 2 ความสามารถในการผลิตแอมโมเนียและปริมาณของแอมโมเนียมอิออน

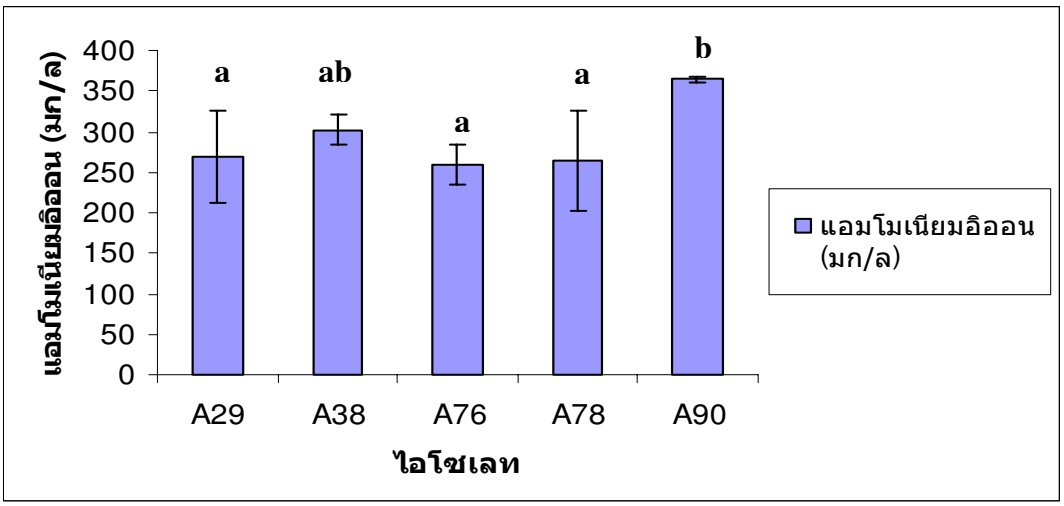
จากการศึกษาความสามารถในการผลิตแอมโมเนียม โดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงจากขั้นที่ 1 มาทดสอบการผลิตแอมโมเนีย พบว่า มี 79 ไอโซเลท ที่สามารถปลดปล่อยแอมโมเนียได้ในปริมาณที่สูง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำตาล (ตารางที่ 3.4 และ รูปที่ 3.1) จากนั้นนำไอโซเลททั้ง 79 ไอโซเลท ไปทดสอบหาปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่า มี 5 ไอโซเลทที่ สามารถผลิตแอมโมเนียมอิออนได้ในปริมาณที่มากกว่า 200 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3.2) คือ ไอโซเลท A29 , A38 , A76 , A78 และ A90 ซึ่งไอโซเลท A90 สามารถปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนได้ในปริมาณสูงสุด คือ 365 มิลลิกรัม/ลิตร รองลงมา คือ ไอโซเลท A38 และ A29 สามารถปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออน คือ 302 และ 269 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3.4 จำนวนไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตปริมาณแอมโมเนียมอิออนได้โดยวิธี Nessler 's reagent

สีที่เกิดจากปฏิกิริยาการมีแอมโมเนีย	จำนวนไอโซเลท
สีเหลืองอ่อน	139
สีเหลืองเข้ม	34
สีน้ำตาล	79



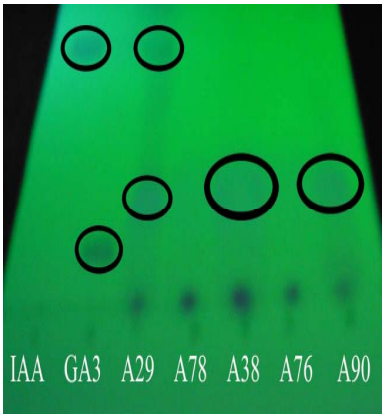
รูปที่ 3.1 ลักษณะการเกิดสีของการทดสอบการผลิตแอมโมเนีย โดยการหยด Nessler 's reagent ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (1) ชุดควบคุม (2) ลักษณะของเชื้อที่ให้สีน้ำตาล



รูปที่ 3.2 แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศไอโซเลทต่างๆ ที่สามารถปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนได้มากกว่า 200 มิลลิกรัม/ลิตร
ตัวอักษรที่ต่างกันบนแต่ละแท่งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ขั้นที่ 3 ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin)

จากการศึกษาการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) Gibberellin และ Cytokinin ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้ Zeatin ในการทดสอบ Cytokinin โดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยง ซึ่งได้แก่ไอโซเลท A29 , A38 , A76 , A79 และ A90 โดยเลี้ยงในอาหาร N_2-free medium เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีเพียงไอโซเลท A29 สามารถสร้างฮอร์โมน Indole-3-acetic acid (IAA) ได้ (รูปที่ 3.3) ส่วนฮอร์โมนพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ไม่พบในทุกไอโซเลท ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ A29 ไปศึกษาต่อ เพราะสร้างทั้ง IAA และปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออนออกสู่อาหารสูง



รูปที่ 3.3 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) และ Gibberellin ของแบคทีเรียไอโซเลท A29, A38, A76, A78 และ A90

3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

ขั้นที่ 1 การเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่แยกได้ทั้งหมด 196 ไอโซเลทที่เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการวัดการเจริญเติบโต ด้วยวิธีการวัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า ที่ค่า OD 660 นาโนเมตร มากกว่า 0.5 มีจำนวนเชื้อทั้งหมด 100 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.5) จึงนำไอโซเลททั้ง 100 ไอโซเลท ไปทดสอบขั้นที่ 2 ต่อไป

ตารางที่ 3.5 การเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากนาข้าวในภาคใต้

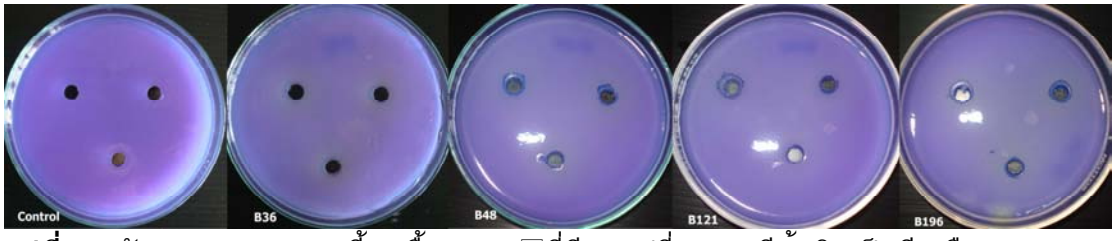
จำนวนไอโซเลท	OD 660 นาโนเมตร
96	น้อยกว่า 0.5
100	มากกว่า 0.5

ขั้นที่ 2 ความสามารถในการละลายฟอสเฟต

จากการศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยการนำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นที่ 1 จำนวน 100 ไอโซเลท มาทดสอบการละลายฟอสเฟต ซึ่งสามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง NBRI พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ degree of hydrolysis มากกว่า 200 และมี 20 ไอโซเลท พบว่าไม่มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟต (ตารางที่ 3.6) ซึ่งไอโซเลทที่มีค่า เปอร์เซ็นต์ degree of hydrolysis มากกว่า 200 คือ B36 (206.6%), B48 (201.34%) , B121 (201.67%) และ B196 (213.47%) นอกจากนี้ จากผลการทดลอง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง (รูปที่ 3.4) ซึ่งเกิดจากความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจึงเปลี่ยนสีของ Bromophenol blue

ตารางที่ 3.6 จำนวนไอโซเลทที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ degree of hydrolysis ในการละลายฟอสเฟตอยู่ในช่วงต่างๆ

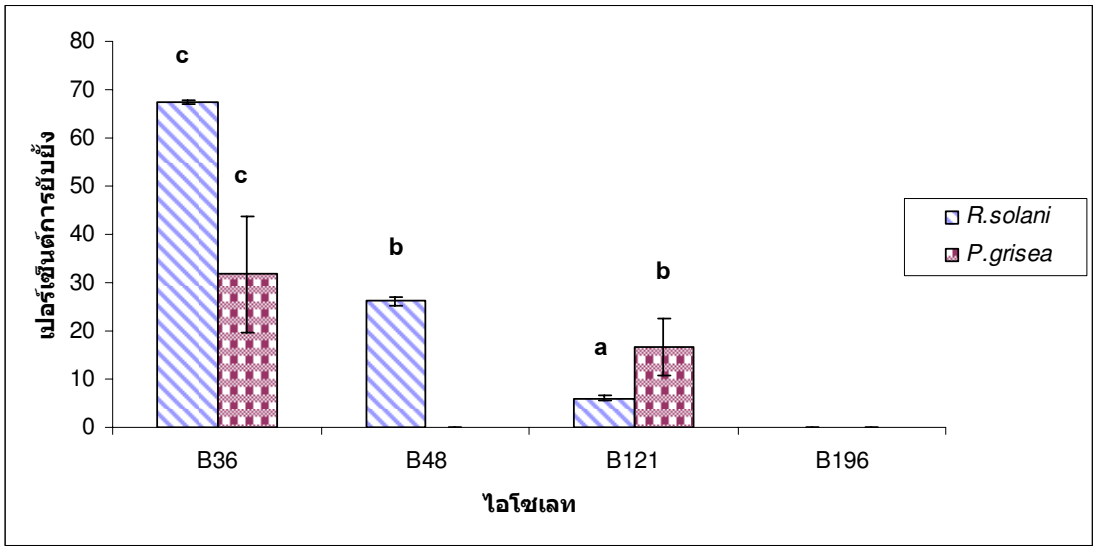
จำนวนไอโซเลท	% degree of hydrolysis
20	0 (ไม่มีการละลายฟอสเฟต)
45	100 - 150
31	150 - 200
4	มากกว่า 200



รูปที่ 3.4 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRI ที่มีการเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองของ *Bacillus* spp.

ขั้นที่ 3 การยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว

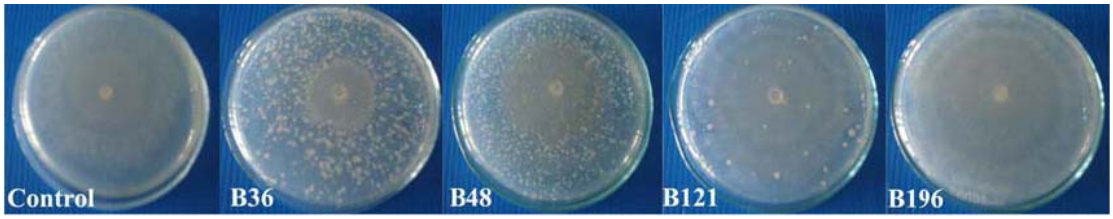
จากการศึกษาการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว โดยการนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของทั้ง 4 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นที่ 2 คือ ไอโซเลท B36 , B48 , B121 และ B196 ซึ่งผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ในอาหาร Nutrient broth มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อโรคข้าว พบว่า การทดสอบในเชิงปริมาณ ไอโซเลทที่มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ได้ดีที่สุด คือ B36 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) คือ 67.35 และ 31.68 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.5 และ 3.6 ส่วนการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Conventional streak method ไม่ได้ผลในการทดลองครั้งนี้ ดังนั้นจากผลการทดลองจึงคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* sp. B36 ซึ่งให้ค่าการละลายฟอสเฟตสูง (206.6%) และมีความสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าวได้ดีที่สุดไปศึกษาต่อ



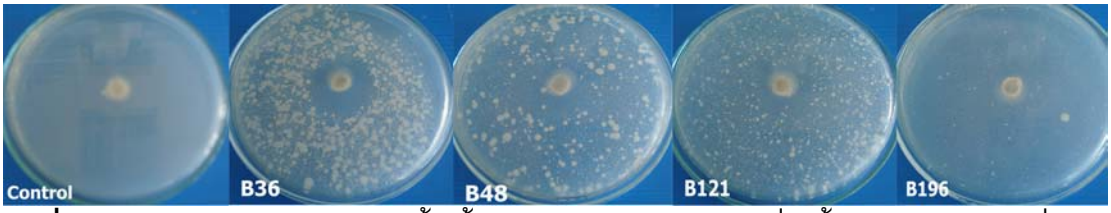
รูปที่ 3.5 : เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) เชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Pyricularia grisea* ของ *Bacillus* spp.

ตัวอักษรที่ต่างกันบนแต่ละแท่งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

A



B



รูปที่ 3.6 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของ *Bacillus* spp. เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (A) การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (B) การยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea*

3.3 การเทียบเคียงเชื้อเป้าหมาย

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำจากนาข้าว โดยผ่านการคัดเลือกจากขั้นที่ 1, 2 และ 3 พบว่า แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศที่ผ่านการคัดเลือก คือ ไอโซเลท A29 ซึ่งย้อมสีแกรมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น เรียงตัวเดี่ยวๆ และเมื่อทดสอบการสร้าง oxidase และ catalase ให้ผลเป็นบวก แต่ไม่มีการสร้าง cyst นอกจากนี้เมื่อนำไปเทียบเคียงลำดับเบสโดยยีนส์ 16S rRNA พบว่าอยู่ในสกุล *Burkholderia cenocepacia* strain ZYB002 มีค่า % similarity เท่ากับ 100% ซึ่งตรงกับ Accession number คือ EU684748 (ภาคผนวก ค) จากนั้นนำไปทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ A□ 20NE เพื่อยืนยันผลการเทียบเคียงเชื้อ โดยใช้ *Burkholderia cepacia* TISTR 1869 เป็นตัวเปรียบเทียบ (reference strain) ซึ่งผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.7 และจากผลการทดลองพบว่ามีความเหมือน *Burkholderia cepacia* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 99.8 (ตารางที่ 3.7 และรูปที่ 1ค) ขณะที่ *Burkholderia cepacia* TISTR 1869 มีความเหมือน 99.9% (ตารางที่ 3.7 และรูปที่ 2ค) แต่ในการเทียบเคียงแบคทีเรียกลุ่ม Azotobacteraceae ไอโซเลท A29 สามารถสรุปได้ว่าไอโซเลท A29 เป็น *Burkholderia cenocepacia* เนื่องจากในการทดสอบยีนส์ 16srRNA มีความเหมือน 100% ซึ่งแบคทีเรีย *Burkholderia cenocepacia* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในสิ่งแวดล้อม และอาจก่อโรคในพืช ขณะที่ *Burkholderia cepacia* สามารถก่อโรคในมนุษย์

ในส่วนของ *Bacillus* sp. ที่ผ่านการคัดเลือก คือ ไอโซเลท B36 ซึ่งย้อมสีแกรมติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน เรียงตัวเป็นคู่ หรือสาย และสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) อยู่ตรง

กลางเซลล์ เมื่อนำไปเทียบเคียงลำดับเบส พบว่าอยู่ในสกุล *Bacillus cereus* strain LQ84 มีค่า % similarity เท่ากับ 99% ซึ่งตรงกับ Accession number คือ EF472264 (ภาคผนวก ค) และนำไปทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ A 50 CHB โดยใช้ *Bacillus cereus* TISTR 687 เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.8 และรูปที่ 2ค พบว่าไอโซเลท B36 มีความเหมือน *Bacillus cereus* 1 (non haemolytic) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 99.5 (ตารางที่ 3.8 และรูปที่ 3ค) ขณะที่ *Bacillus cereus* TISTR 687 มีความเหมือน 99.9% (ตารางที่ 3.8 และรูปที่ 4ค)

ตารางที่ 3.7 ผลของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ ซึ่งเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง โดยใช้ชุดทดสอบ API 20NE

Active ingredients	**A29**	***Burkholderia cepacia* TISTR 1869**
Potassium nitrate	-	-
L-tryptophane	-	-
D-glucose (fermentation)	-	-
L-arginine	**+**	**-**
Urea	**+**	**-**
Esculin ferric citrate	+	+
Gelatin (bovine origin)	**-**	**+**
4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	+	+
D-glucose (assimilation)	+	+
L-arabinose	+	+
D-mannose	+	+
D-mannitol	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	+
D-maltose	**-**	**+**
Potassium gluconate	+	+
Capric acid	+	+
Adipic acid	+	+
Malic acid	+	+
Trisodium citrate	+	+
Phenylacetic acid	+	+
Oxidase test	+	+
% Identity	99.8	99.9

ตารางที่ 3.8 ผลของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ซึ่งเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง โดยใช้ชุดทดสอบ A 50 CHB

Active ingredients	B36	*Bacillus cereus* TISTR 687
Glycerol	+	+
Erythritol	**+**	**-**
D-Arabinose	**-**	**+**
L- Arabinose	**-**	**+**
D-Ribose	+	+
D-Xylose	-	-
L-Xylose	-	-
D-Adonitol	-	-
Methyl-BD-Xylopyranoside	-	-
D-Galactose	-	-
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Mannose	+	+
L-Sorbose	-	-
L-Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
D-Mannitol	-	-
D-Sorbitol	-	-
Methyl-αD-Mannopyranoside	-	-
Methyl-αD- Glucopyranoside	-	-
N-AcetylGlucosamine	+	+
Amygdalin	-	-
Arbutin	+	+
Esculin ferric citrate	+	+
Salicin	+	+

D-Celiobiose	+	+
D-Maliose	+	+
Active ingredients	**B36**	***Bacillus cereus* TISTR 687**
D-Lactose (bovine origin)	-	-
D-Melibiose	-	-
D-Saccharose (sucrose)	-	-
D-Trehalose	+	+
Inulin	-	-
D-Melezitose	-	-
D-Rafinose	-	-
Amidon (starch)	+	+
Glycogen	+	+
Xylitol	-	-
Gentiobiose	-	-
D-Turanose	-	-
D-Lyxose	-	-
D-Tagatose	-	-
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
□otassium Gluconate	+	+
□otassium 2-keto gluconate	-	-
□otassium 5-keto gluconate	-	-
% Identity	99.5	99.9

3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเป้าหมาย

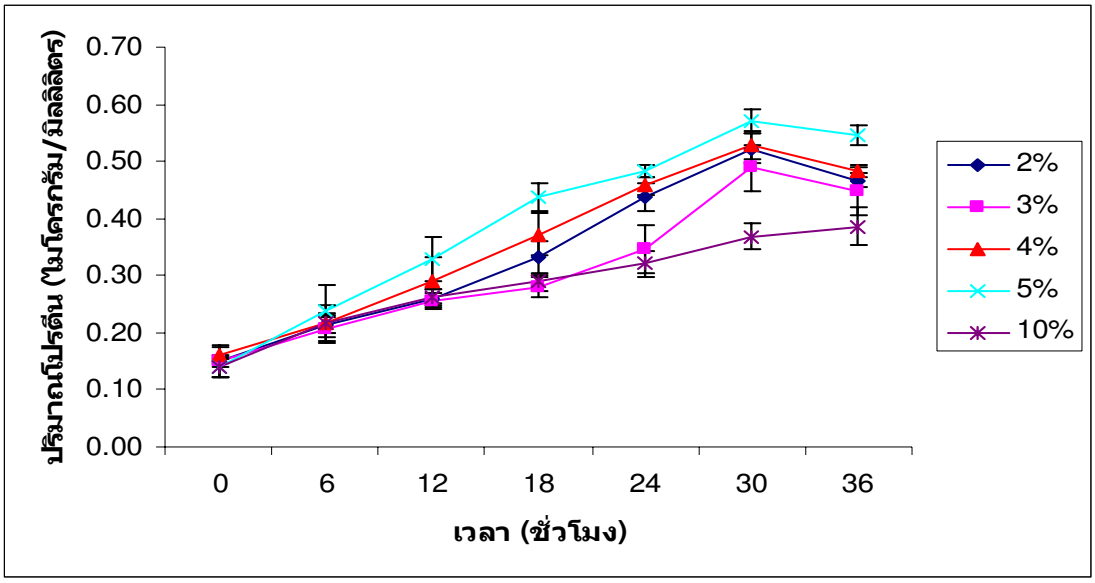
3.4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29

ก) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

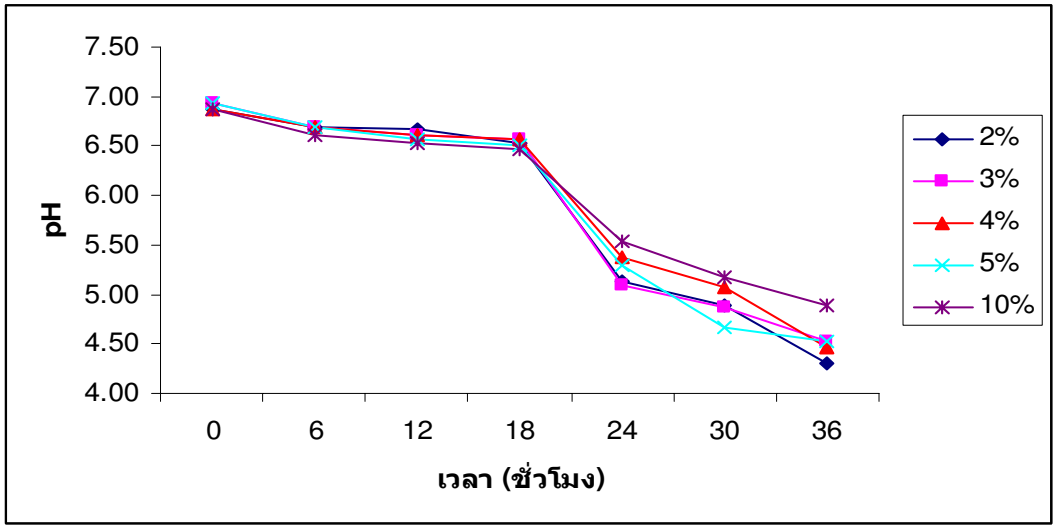
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในอาหาร N_2-free medium ที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 โดยการหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งได้แปรผันกล้าเชื้อเป็น 2%, 3%, 4%, 5%

และ 10% โดยวัดการเจริญในรูปปริมาณโปรตีน แล้วนำไปเขย่าที่ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ให้การเจริญสูงสุด คือ 5% (รูปที่ 3.7) รองลงมา คือ 4% และ 3% ตามลำดับ และค่า pH ของอาหารลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.8) โดยลดลงจาก pH 6.87 - 6.93 เป็น 4.67 – 5.17 ซึ่งลดลงอยู่ในช่วง 1.70 – 2.27 หน่วย โดยช่วงที่ลดลงอย่างมาก คือ ช่วงการเลี้ยง 18 – 24 ชั่วโมง

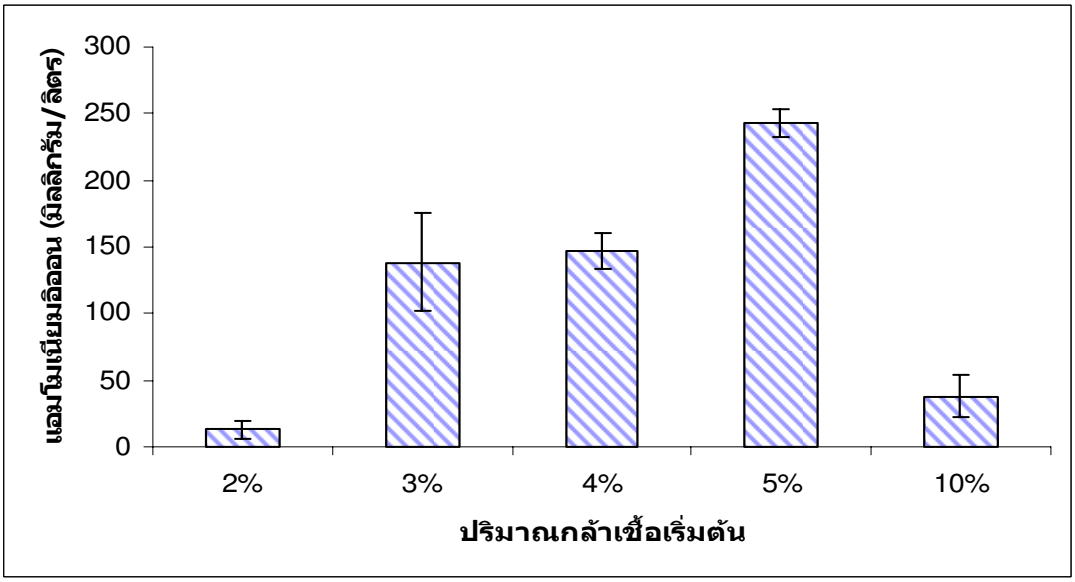
ส่วนปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่าที่กล้าเชื้อเริ่มต้น 5% ให้ปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุด คือ 242.85 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3.9) รองลงมา คือ 4% มีปริมาณแอมโมเนียมอิออนเท่ากับ 146.90 มิลลิกรัม/ลิตร และ 3% มีปริมาณแอมโมเนียมอิออนเท่ากับ 138 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจากผลการทดลองจึงเลือกใช้กล้าเชื้อ 5% เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบขั้นต่อไป และจากรูปที่ 3.10 พบว่าที่กล้าเชื้อ 2% 3% และ 5% สามารถผลิตฮอร์โมน IAA และ gibberellic acid ได้ แต่ไม่พบฮอร์โมน Cytokinin (Zeatin) ส่วนกล้าเชื้อ 4% พบเฉพาะฮอร์โมน IAA แต่กล้าเชื้อ 10% ไม่พบฮอร์โมนพืชทั้ง 3 ชนิด



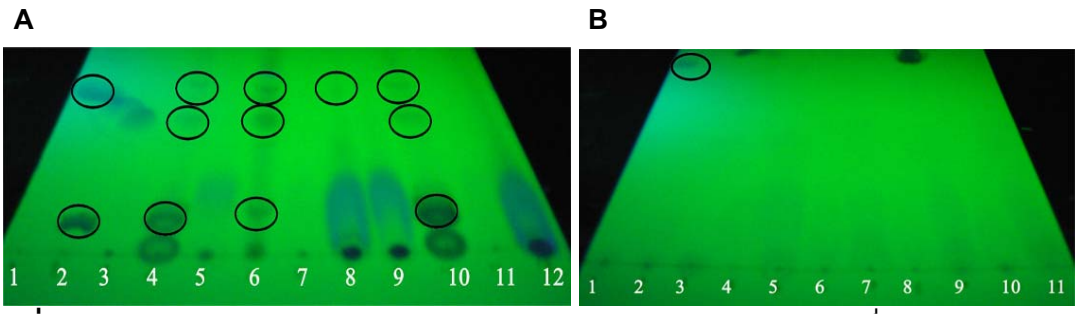
รูปที่ 3.7 ผลของปริมาณกล้าเชื้อต่อการเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 ในอาหาร N_2-free medium



รูปที่ 3.8 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร N_2-free medium โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 3.9 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาโดย *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน โดยเลี้ยงในอาหาร N_2-free medium เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



รูปที่ 3.10 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) , Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ที่มีกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน

(A) Lane 1 = IAA (standard) , Lane 2 = ฮอร์โมน GA_3 (standard) , Lane 3 = 2% inoculum size ที่ 0 h , Lane 4 = 2% inoculum size ที่ 36 h , Lane 5 = 3% inoculum size ที่ 0 h , Lane 6 = 3% inoculum size ที่ 36 h , Lane 7 = 4% inoculum size ที่ 0 h , Lane 8 = 4% inoculum size ที่ 36 h , Lane 9 = 5% inoculum size ที่ 0 h , Lane10 = 5% inoculum size ที่ 36 h , Lane11 = 10% inoculum size ที่ 0 h , Lane12 = 10% inoculum size ที่ 36 h

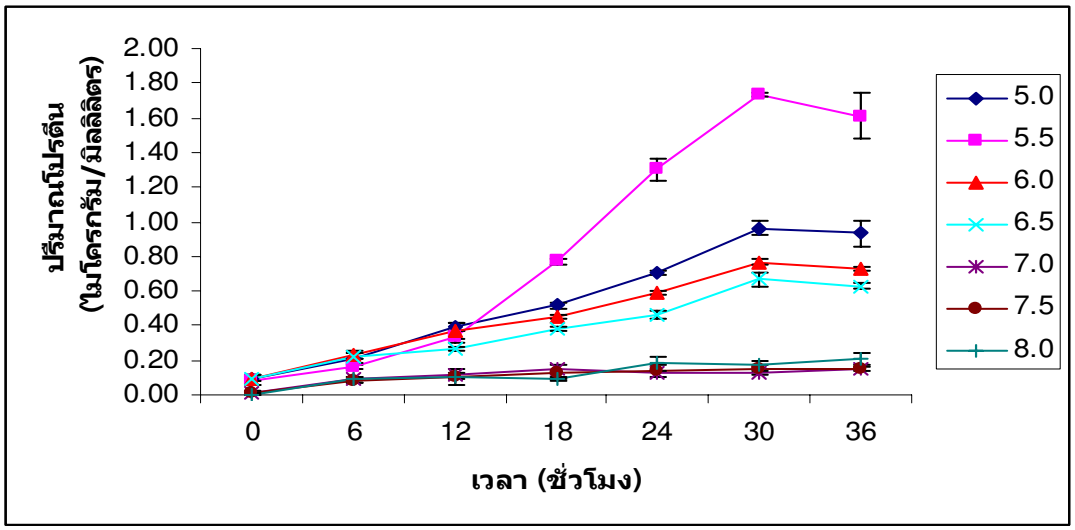
(B) Lane 1 = zeatin (standard) , Lane 2 = 2% inoculum size ที่ 0 h , Lane 3 = 2% inoculum size ที่ 36 h , Lane 4 = 3% inoculum size ที่ 0 h , Lane 5 = 3% inoculum size ที่ 36 h , Lane 6 = 4% inoculum size ที่ 0 h , Lane 7 = 4% inoculum size ที่ 36 h , Lane 8 = 5% inoculum size ที่ 36 h , Lane 9 = 5% inoculum size ที่ 36 h , Lane10=10% inoculum size ที่ 0 h , Lane11=10% inoculum size ที่ 36 h

ข) pH เริ่มต้นของอาหาร

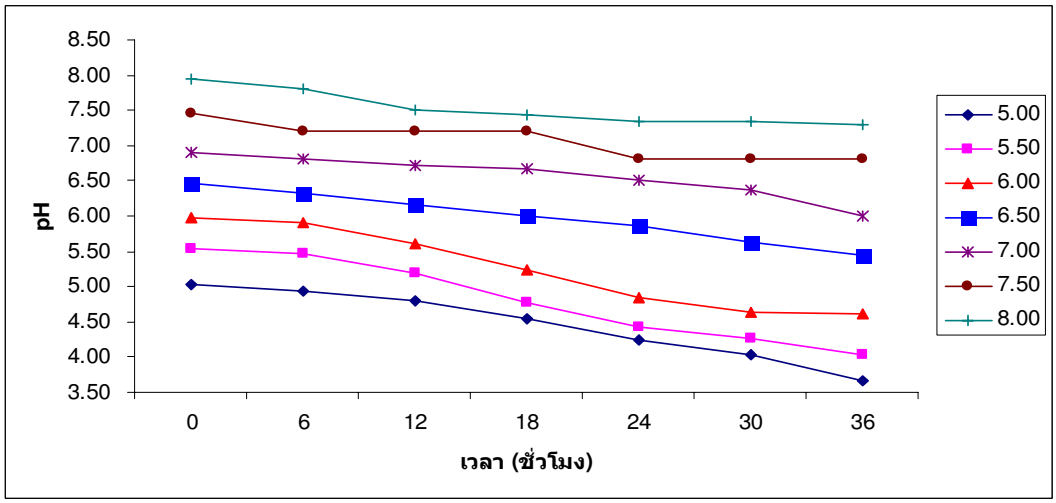
เมื่อได้กล้าเชื้อที่เหมาะสม คือ 5% ได้ทำการศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม ซึ่งได้แปรผัน pH เริ่มต้นของอาหาร N_2-free medium เป็น 5 , 5,5 , 6.0 , 6.5 , 7.0 และ 8.0 จากผลการทดลองพบว่า ที่ pH 5.5 มีการเจริญสูงสุด (รูปที่ 3.11) รองลงมา คือ pH 5.0 และ 6.0 ตามลำดับ และค่า pH ของอาหารลดลง เมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.12) โดยลดลงจาก pH ของอาหารเริ่มต้นมาอยู่ในช่วง 3.93 – 7.30 ซึ่งลดลงอยู่ในช่วง 0.63 – 1.53 หน่วย

ส่วนปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่าที่ pH 5.5 มีปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุด รองลงมา คือ pH 5.0 ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมอิออน คือ 248.55 และ 143.11 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย ดังรูปที่ 3.13 จึงใช้ pH เริ่มต้นของอาหาร คือ pH 5.5 เพื่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมขั้นต่อไป และจากรูปที่ 3.14 พบว่าที่ pH 5.5 และ 6.5 สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA

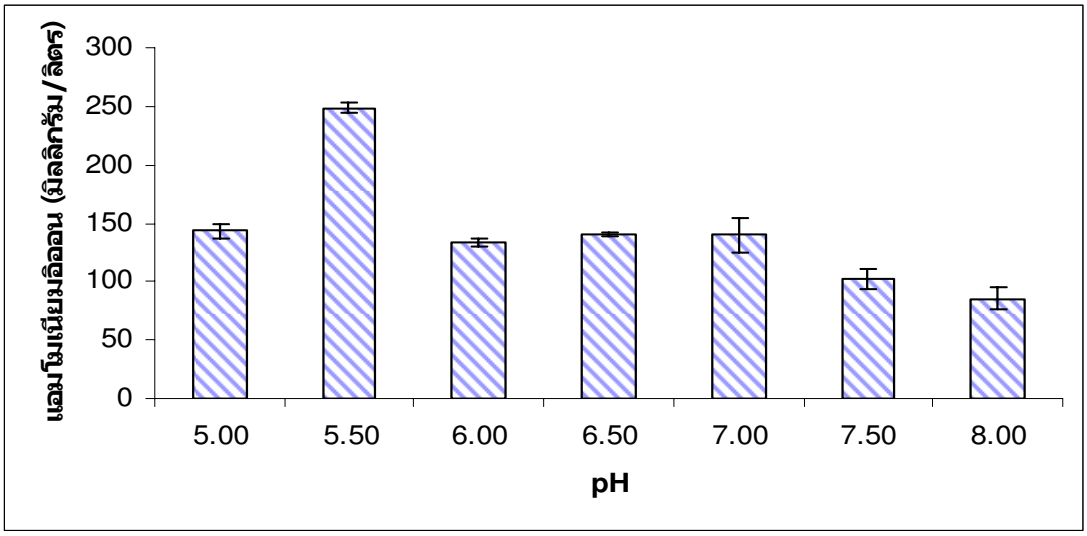
และ gibberellic acid ได้ แต่ไม่พบฮอร์โมนพืช Cytokinin (Zeatin) ส่วนที่ pH 7.5 และ 8.0 พบเฉพาะฮอร์โมนพืช IAA และที่ pH 6.0 พบเฉพาะฮอร์โมนพืช gibberellic acid นอกจากนี้ที่ pH 5.0 ไม่พบฮอร์โมนพืชทั้ง 3 ชนิด



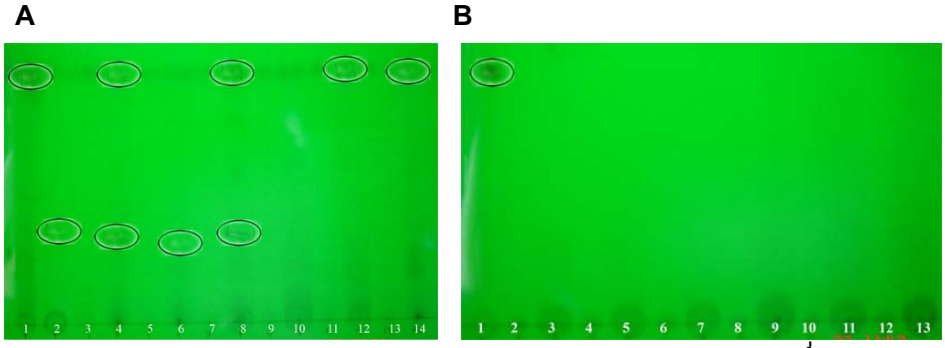
รูปที่ 3.11 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 ในอาหาร N_2-free medium ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารต่างกัน



รูปที่ 3.12 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร N_2-free medium โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 ที่มี pH เริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 3.13 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาโดย *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อใช้ pH เริ่มต้นต่างกัน โดยเลี้ยงในอาหาร N_2-free medium เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



รูปที่ 3.14 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) , Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ที่มี pH เริ่มต้นต่างๆ ต่างกัน

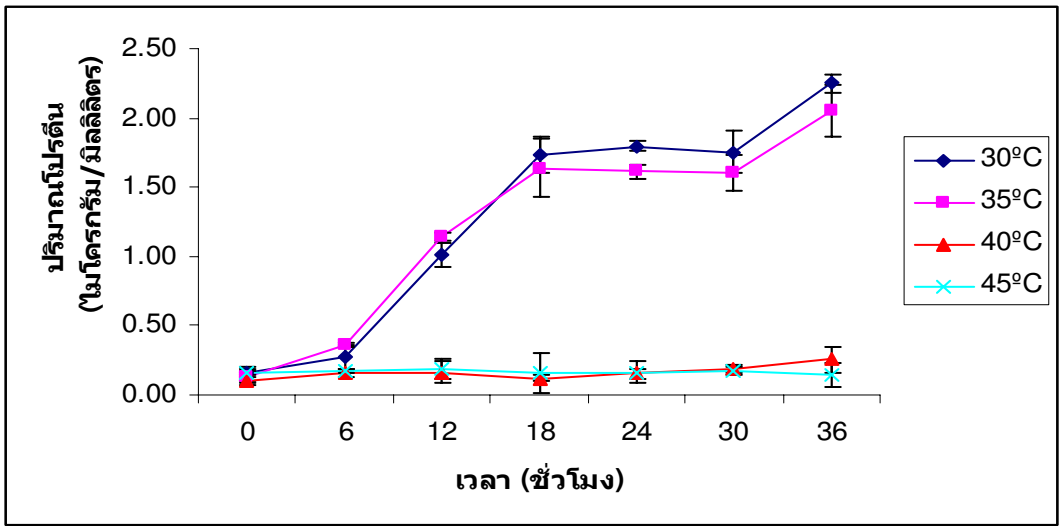
(A) Lane 1 = IAA (standard) , Lane 2 = GA_3 (standard) , Lane 3 = pH 5.5 ที่ 0 h , Lane 4 = pH 5.5 ที่ 36 h , Lane 5 = pH 6.0 ที่ 0 h , Lane 6 = pH 6.0 ที่ 36 h , Lane 7 = pH 6.5 ที่ 0 h , Lane 8 = pH 6.5 ที่ 36 h , Lane 9 = pH 7.0 ที่ 0 h , Lane10 = pH 7.0 ที่ 36 h , Lane 11 = pH 7.5 ที่ 0 h , Lane 12 = pH 7.5 ที่ 36 h , Lane 13 = pH 8.0 ที่ 0 h และ Lane 14 = pH 8.0 ที่ 36 h

(B) Lane 1 = zeatin (standard) , Lane 2 = pH 5.5 ที่ 0 h , Lane 3 = pH 5.5 ที่ 36 h , Lane 4 = pH 6.0 ที่ 0 h , Lane 5 = pH 6.0 ที่ 36 h , Lane 6 = pH 6.5 ที่ 0 h , Lane 7 = pH 6.5 ที่ 36 h , Lane 8 = pH 7.0 ที่ 0 h และ Lane 9 = pH 7.0 ที่ 36 h , Lane 10 = pH 7.5 ที่ 0 h , Lane 11 = pH 7.5 ที่ 36 h Lane 12 = pH 8.0 ที่ 0 h , Lane 13 = pH 8.0 ที่ 36 h

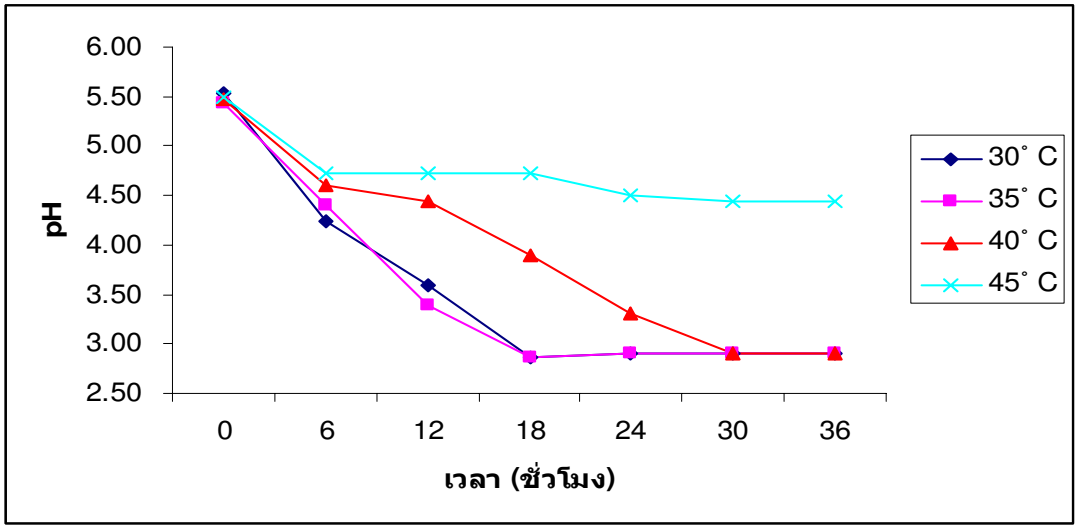
ค) อุณหภูมิ

จากผลการทดลองในการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยแปรผันอุณหภูมิ คือ 30 องศาเซลเซียส 35 องศาเซลเซียส 40 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญสูงสุด (รูปที่ 3.15) รองลงมา คือ 35 องศาเซลเซียส ค่า pH ของอาหารลดลง เมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.16) โดยลดลงจาก pH ของอาหารเริ่มต้น คือ 5.43 – 5.53 เป็น 2.8 – 4.33 ซึ่งลดลงอยู่ในช่วง 1.17 – 2.63 หน่วย

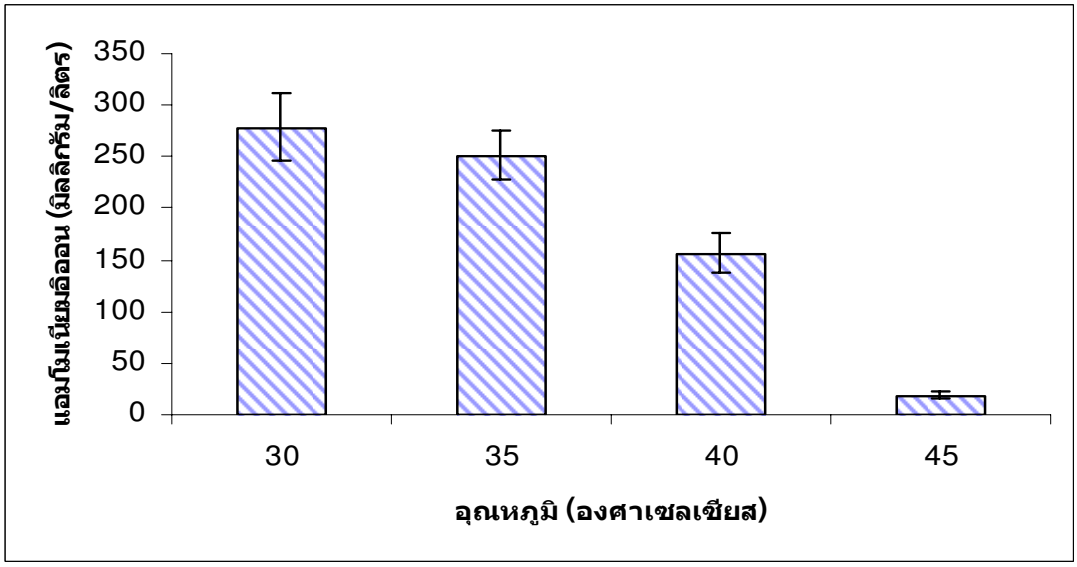
ส่วนปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณแอมโมเนียมอิออน คือ 278.25 มิลลิกรัม/ลิตร รองลงมา คือ 35 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมอิออน คือ 251.04 และ 156.51 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.17 จากผลการทดลองจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป และจากรูปที่ 3.18 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้ แต่ไม่พบฮอร์โมน gibberellic acid และ Cytokinin (Zeatin) ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส ไม่พบฮอร์โมนพืชทั้ง 3 ชนิด



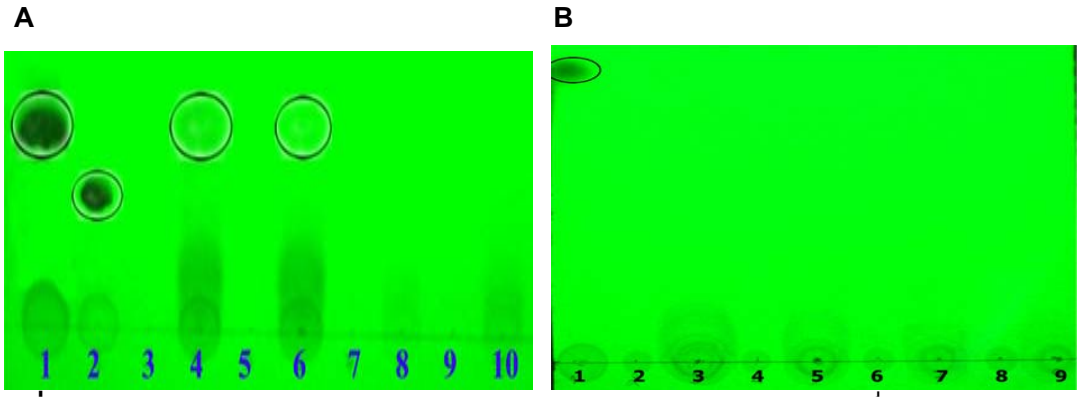
รูปที่ 3.15 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* สายพันธุ์ A29 ในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 ที่อุณหภูมิต่างกัน



รูปที่ 3.16 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน



รูปที่ 3.17 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาโดย *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเลี้ยงในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



รูปที่ 3.18 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) , Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ที่มีอุณหภูมิในการบ่มต่างกัน

(A) Lane 1 = IAA (standard) , Lane 2 = GA_3 (standard) , Lane 3 = 30 $^{\circ}$C ที่ 0 h , Lane 4 = 30 $^{\circ}$C ที่ 36 h , Lane 5 = 35 $^{\circ}$C ที่ 0 h , Lane 6 = 35 $^{\circ}$C ที่ 36 h , Lane 7 = 40 $^{\circ}$C ที่ 0 h , Lane 8 = 40 $^{\circ}$C ที่ 36 h , Lane 9 = 45 $^{\circ}$C ที่ 0 h และ Lane10 = 45 $^{\circ}$C ที่ 36 h

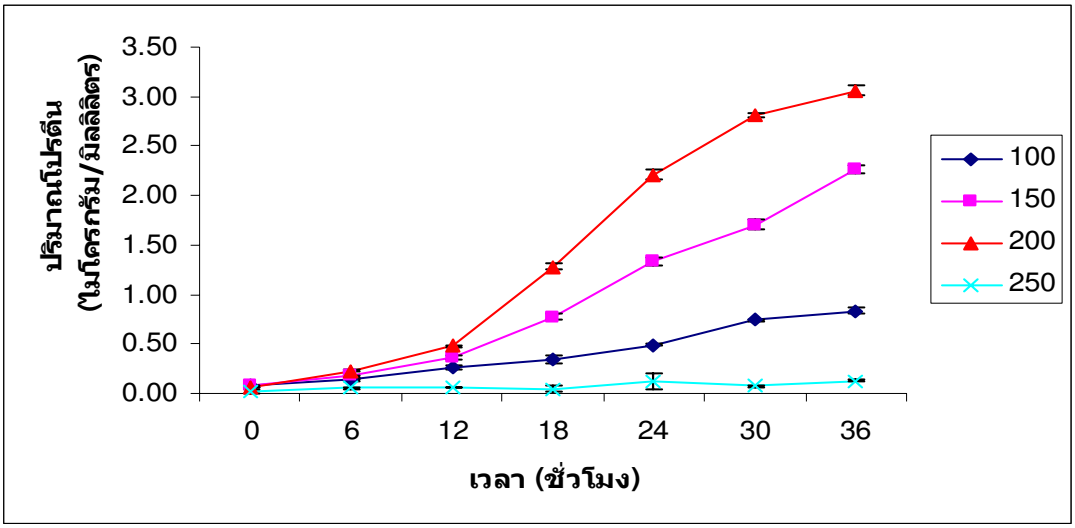
(B) Lane 1 = zeatin (standard) , Lane 2 = 30 $^{\circ}$C ที่ 0 h , Lane 3 = 30 $^{\circ}$C ที่ 36 h , Lane 4 = 35 $^{\circ}$C ที่ 0 h , Lane 5 = 35 $^{\circ}$C ที่ 36 h , Lane 6 = 40 $^{\circ}$C ที่ 0 h , Lane 7 = 40 $^{\circ}$C ที่ 36 h , Lane 8 = 45 $^{\circ}$C ที่ 0 h และ Lane 9 = 45 $^{\circ}$C ที่ 36 h

ง) ความเร็วรอบของการเขย่า

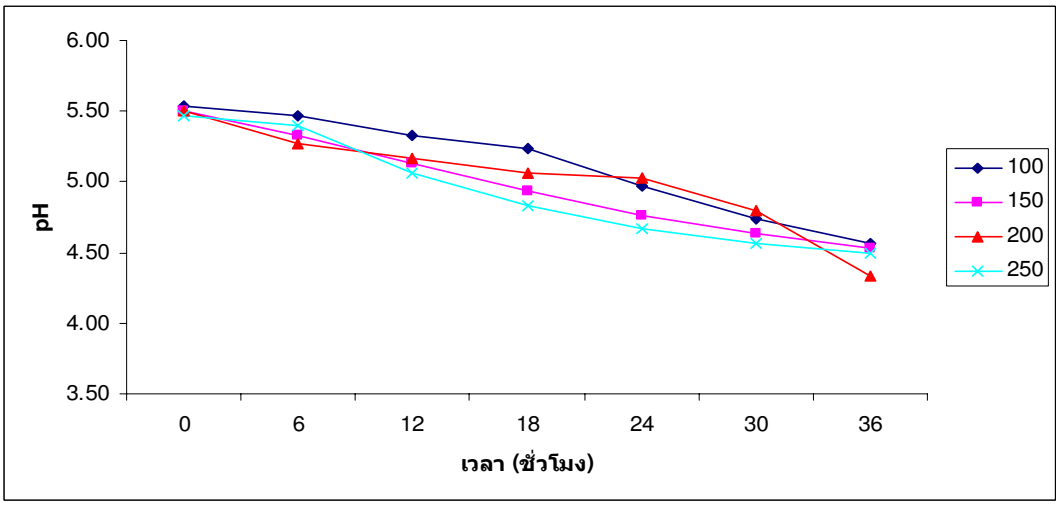
จากการศึกษาผลของความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งแปรผันความเร็วรอบ คือ 100 150 200 และ 250 รอบ/นาที พบว่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที มีการเจริญสูงสุด (รูปที่ 3.19) รองลงมา คือ ที่ความเร็วรอบ 150 และ 100 รอบต่อนาที ตามลำดับ นอกจากนี้จากรูปที่ 3.20 ค่า pH ของอาหารลดลง เมื่อเวลาผ่านไป โดยลดลงจาก pH ของอาหารเริ่มต้น คือ 5.53 – 5. 50 เป็น 4.33 – 4.57 ซึ่งลดลงอยู่ในช่วง 0.97 – 1.17 หน่วย

ส่วนปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที มีปริมาณแอมโมเนียมอิออน คือ 281.41 มิลลิกรัม/ลิตร รองลงมา คือ ที่ความเร็วรอบ 150 และ 100 รอบ/นาที ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมอิออน คือ 211.67 และ 108.00 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.21 ดังนั้นในผลการทดลองนี้ จึงเลือกใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป และจากรูปที่ 3.22 พบว่าที่ความเร็วรอบต่างๆ คือ 100 150 200 และ 250

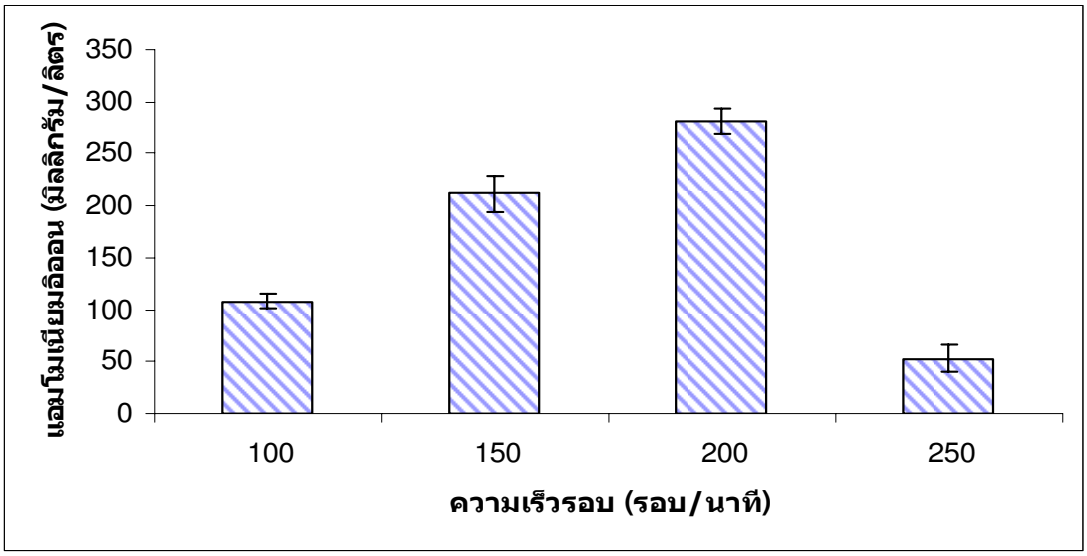
รอบต่อนาที สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้ แต่ไม่พบฮอร์โมนพืช gibberellic acid และ Cytokinin (Zeatin)



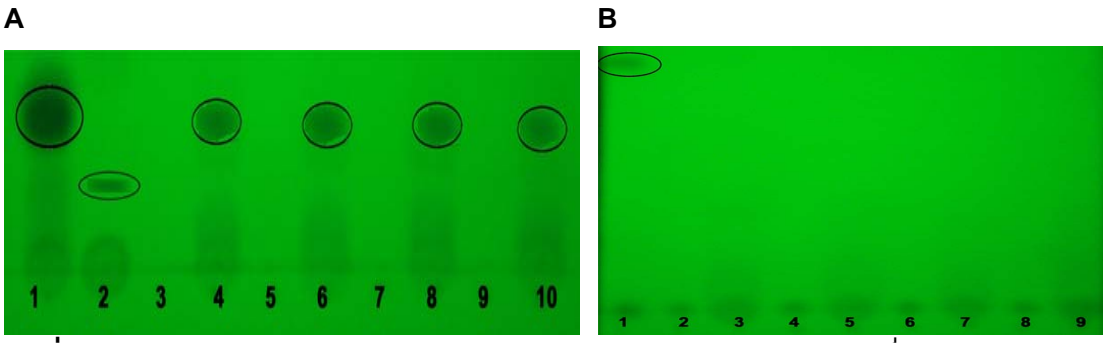
รูปที่ 3.19 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 ในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 ที่ความเร็วรอบต่างกัน



รูปที่ 3.20 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร N_2-free medium ซึ่งมี pH เริ่มต้น 5.5 โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบต่างกัน



รูปที่ 3.21 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาโดย *Burkholderia cenocepacia* A29 เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ โดยเลี้ยงในอาหาร N_2-free medium เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



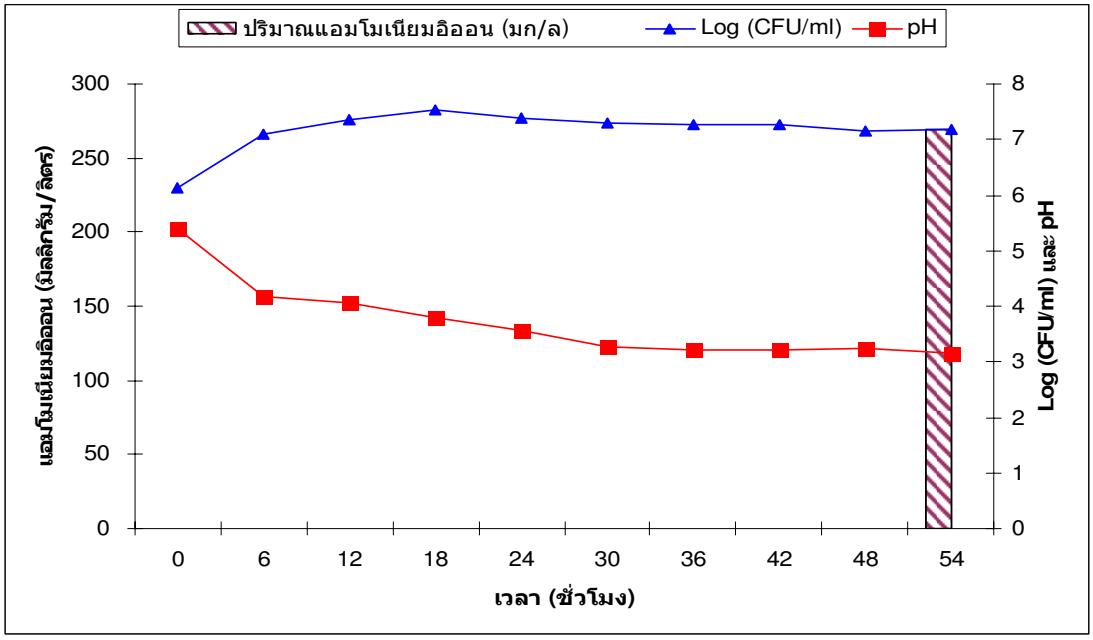
รูปที่ 3.22 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) , Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ที่มีความเร็วรอบในการบ่มต่างกัน

(A) Lane 1 = IAA (standard) , Lane 2 = GA_3 (standard) , Lane 3 = 100 rpm ที่ 0 h , Lane 4 = 100 rpm ที่ 36 h , Lane 5 = 150 rpm ที่ 0 h , Lane 6 = 150 rpm ที่ 36 h , Lane 7 = 200 rpm ที่ 0 h , Lane 8 = 200 rpm ที่ 36 h , Lane 9 = 250 rpm ที่ 0 h และ Lane10 = 250 rpm ที่ 36 h

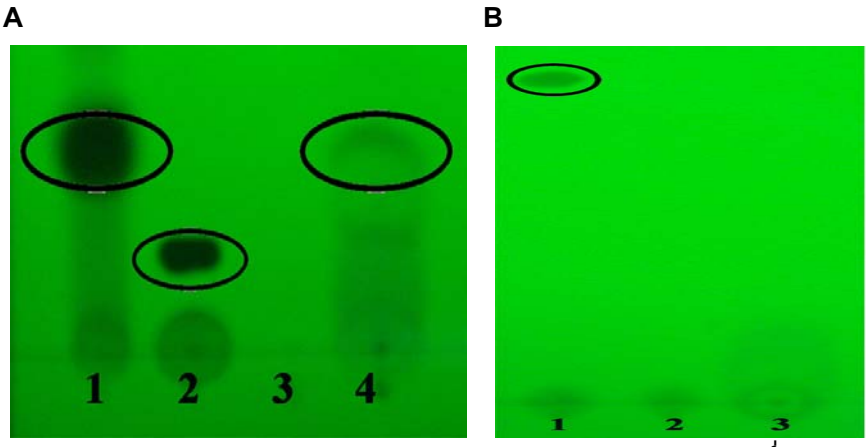
(B) Lane 1 = zeatin (standard) , Lane 2 = 100 rpm ที่ 0 h , Lane 3 = 100 rpm ที่ 36 h , Lane 4 = 150 rpm ที่ 0 h , Lane 5 = 150 rpm ที่ 36 h , Lane 6 = 200 rpm ที่ 0 h , Lane 7 = 200 rpm ที่ 36 h , Lane 8 = 250 rpm ที่ 0 h และ Lane 9 = 250 rpm ที่ 36 h

จ. การทดสอบในสภาวะที่เหมาะสมของ *Burkholderia cenocepacia* A29

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cenocepacia* A29 ดังนั้น เพื่อการยืนยันผลการทดลองที่ได้ จึงทำการทดสอบอีกครั้ง โดยนำสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ผ่านมา คือ กล้าเชื้อ 5% , pH ของอาหาร 5.5 , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และบ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที และอาหารที่ใช้ คือ N_2-free medium พบว่า แบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือ 0.447 และมีค่า Generation time เท่ากับ 93 นาที ส่วนค่า pH ของอาหารลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งลดลงจาก pH 5.4 เป็น 3.17 โดยลดลง 2.23 หน่วย ส่วนผลการทดสอบปริมาณของแอมโมเนียมอิออน พบว่า มีปริมาณของแอมโมเนียมอิออน คือ 269.4 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3.23) นอกจากนี้การทดสอบการสร้างฮอร์โมน Indole acetic acid (IAA) พบว่า มีการสร้างฮอร์โมน IAA ส่วน Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ไม่มีการสร้างฮอร์โมนดังกล่าว ดังรูปที่ 3.24



รูปที่ 3.23 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 การเปลี่ยนแปลงของ pH และปริมาณแอมโมเนียมอิออน เมื่อเลี้ยงในอาหาร N_2-free medium ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (กล้าเชื้อ 5% , pH ของอาหาร 5.5 , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และบ่มที่ความเร็วรอบ 200 rpm)



รูปที่ 3.24 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3-acetic acid (IAA) , Gibberellin และ Cytokinin (Zeatin) ในการทดสอบยืนยันสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ ของแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* A29

(A) Lane 1 = IAA (standard) , Lane 2 = GA_3 (standard) , Lane 3 = อาหารเลี้ยงเชื้อ pH 5.5 , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 200 rpm ที่ 0 h , Lane 4 = อาหารเลี้ยงเชื้อ pH 5.5 , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 200 rpm ที่ 54 h

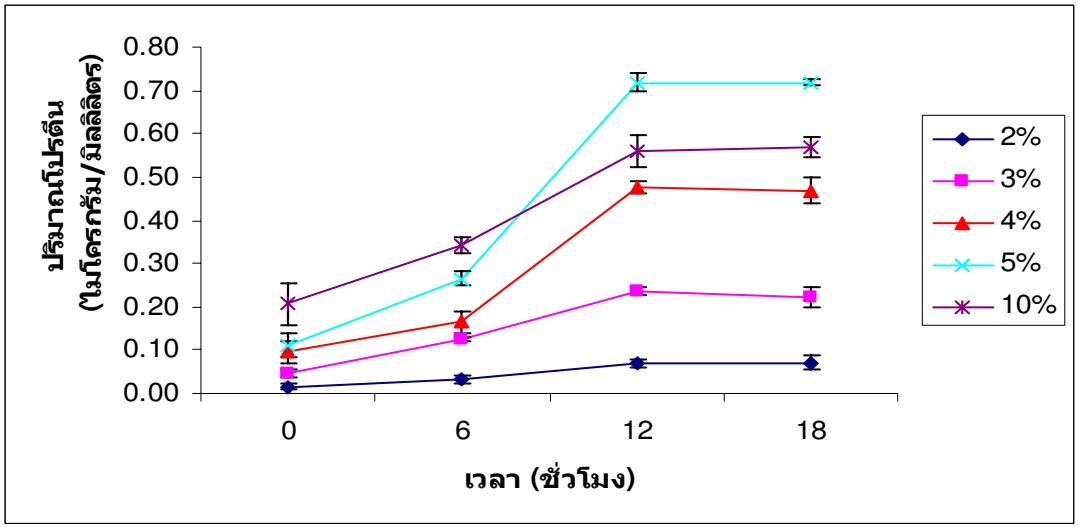
(B) Lane 1 = Zeatin (standard) , Lane 2 = อาหารเลี้ยงเชื้อ pH 5.5 , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 200 rpm ที่ 0 h , Lane 3 = อาหารเลี้ยงเชื้อ pH 5.5 , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 200 rpm ที่ 54 h

3.4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus cereus* B36

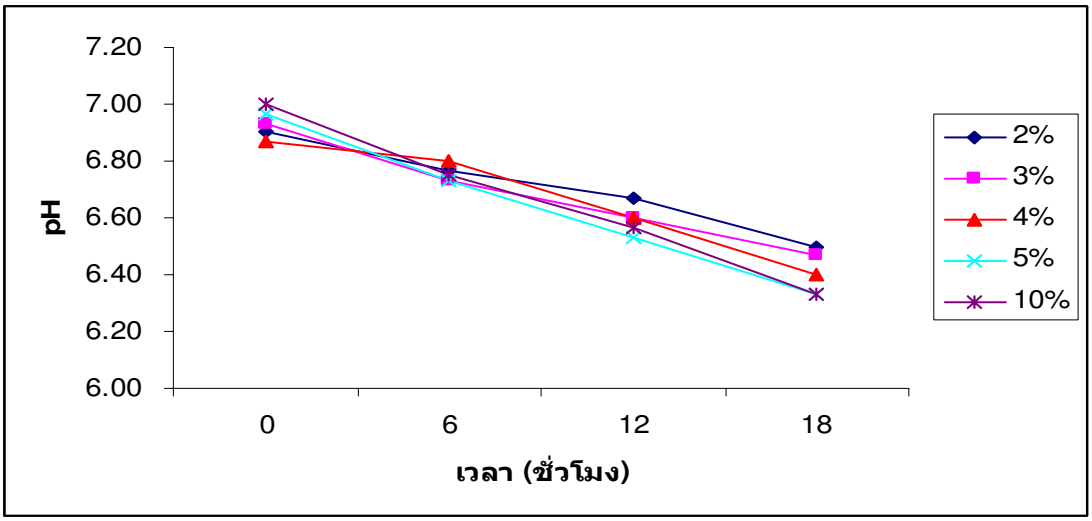
ก) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cereus* B36 ในอาหาร NBRI□ ที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม และวัดการเจริญของเชื้อในรูปโปรตีน ซึ่งได้แปรผันกล้าเชื้อเป็น 2% 3% 4% 5% และ 10% จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มีการเจริญสูงสุด คือ 5% (รูปที่ 3.25) รองลงมา คือ 4% และ 3% ตามลำดับ และค่า pH ของอาหารลดลงในทุกชุดการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.26) โดยเฉพาะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% พบว่า ลดลงจาก pH 6.97 เป็น 5.57 ซึ่งลดลงจาก pH เริ่มต้นเป็น 1.40 หน่วย และลดลงมากกว่าในชุดการทดลองที่มีกล้าเชื้อเริ่มต้น 2% 3% 4% และ 10% ส่วนผลการทดสอบการละลายฟอสเฟต พบว่าที่กล้าเชื้อเริ่มต้น 5% มีการละลายฟอสเฟตสูงสุด คือ 7.03 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3.27) รองลงมา คือ 4% มีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ คือ 6.12 มิลลิกรัม/ลิตร และ 3% มีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ คือ 3.52 มิลลิกรัม/

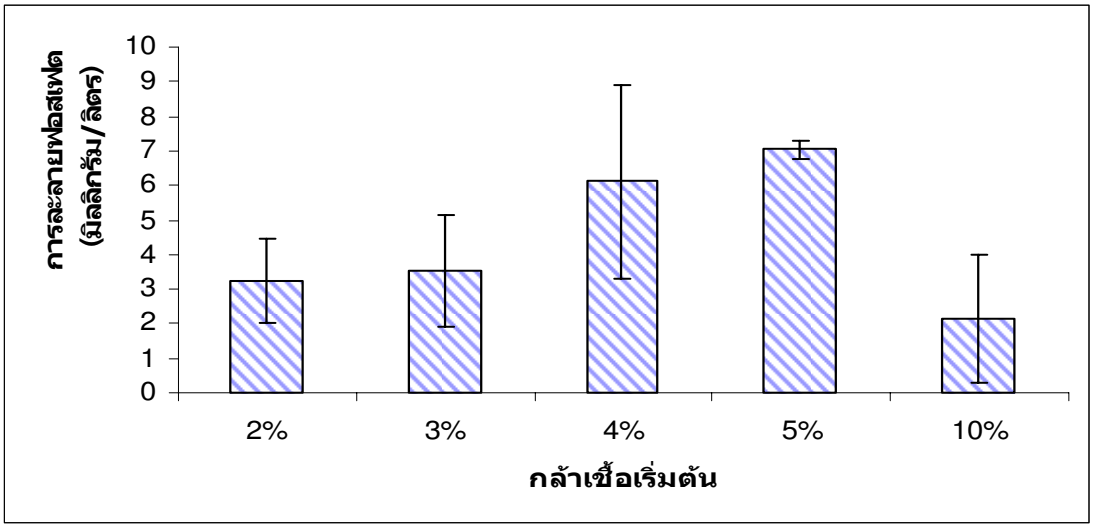
ลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้กล้าเชื้อ 5% เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบขั้นต่อไป ส่วนการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* พบว่า ไม่มีการยับยั้งเชื้อราดังกล่าว



รูปที่ 3.25 การเจริญของ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRI□ที่มีกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน



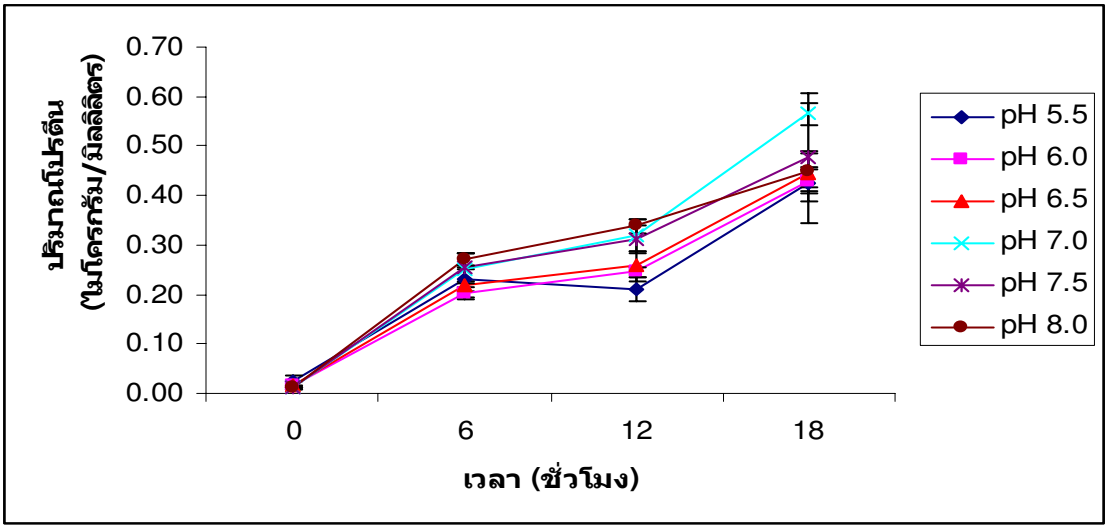
รูปที่ 3.26 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร NBRI□โดยเชื้อ *Bacillus cereus* B36 เมื่อใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นต่างๆ



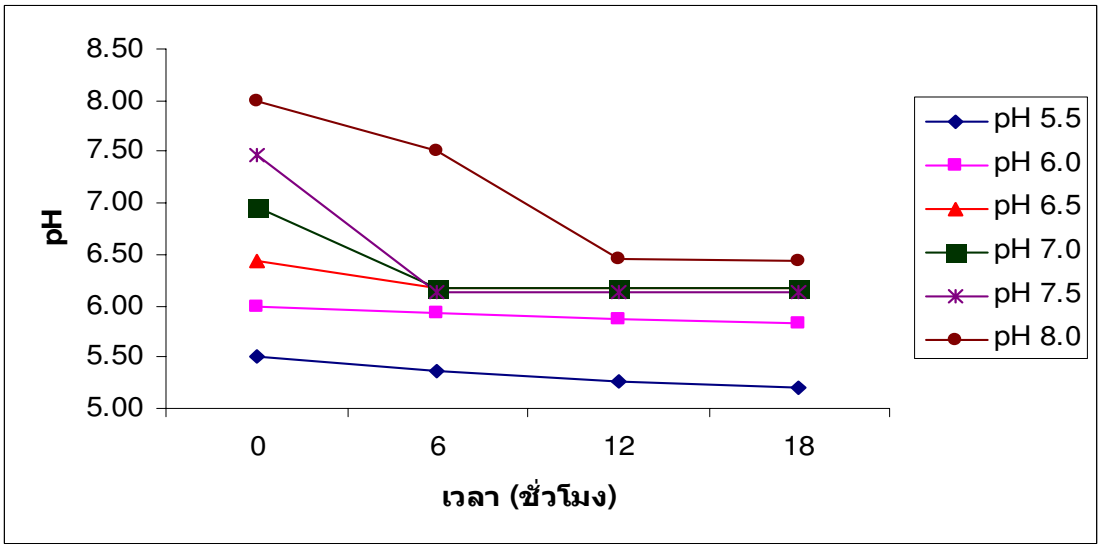
รูปที่ 3.27 ปริมาณการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRI ที่มีกล้าเชื้อเริ่มต้นต่างกัน

ข) pH เริ่มต้นของอาหาร

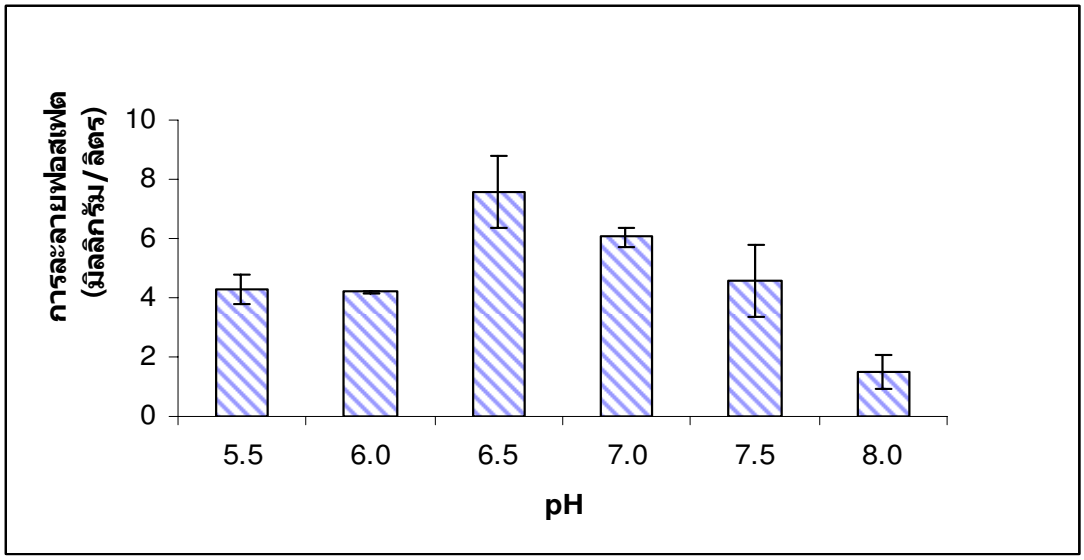
จากผลการทดลองในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cereus* B36 ในอาหาร NBRI โดยการหา pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม ซึ่งได้แปรผัน เป็น pH 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 พบว่า pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม ซึ่งมีการเจริญสูงสุด คือ ที่ pH 6.5 (รูปที่ 3.28) นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่า ค่า pH ของอาหารในทุกชุดการทดลองมีค่าลดลง เมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.29) โดยเฉพาะที่ pH 6.5 ลดลงมากกว่าในชุดการทดลองอื่นๆ โดยลดลงจาก pH 6.43 เป็น 6.17 ซึ่งลดลงจาก pH เริ่มต้นเป็น 0.27 หน่วย ส่วนผลการทดสอบการละลายฟอสเฟต พบว่าที่ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 มีการละลายฟอสเฟตสูงสุด คือ 7.57 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3.30) รองลงมา คือ pH 7.0 มีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ คือ 6.04 มิลลิกรัม/ลิตร และ pH 7.5 มีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ คือ 4.58 มิลลิกรัม/ลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไปส่วนการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* พบว่า ไม่มีการยับยั้งเชื้อราดังกล่าว



รูปที่ 3.28 การเจริญของ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRI□ ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารต่างกัน



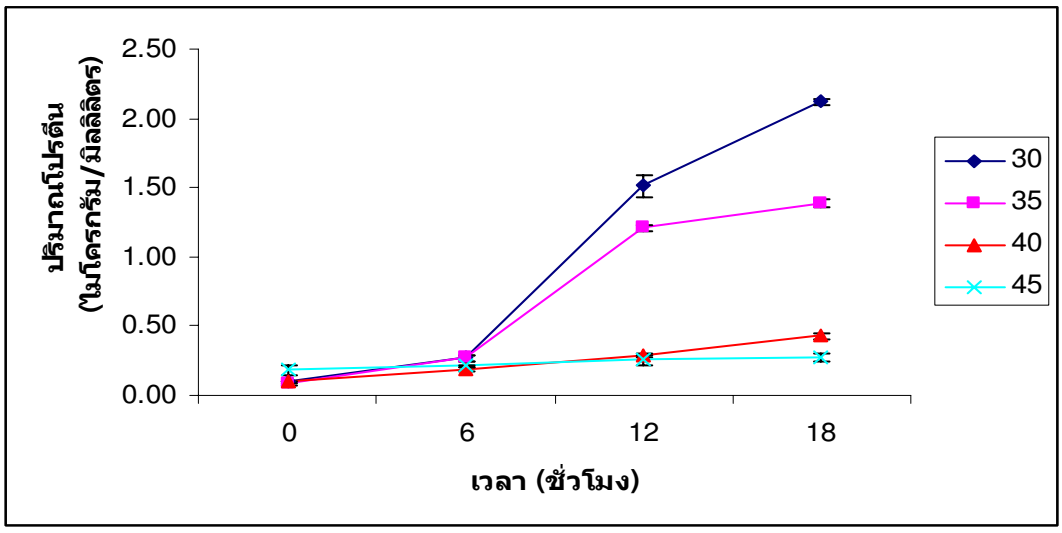
รูปที่ 3.29 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร NBRI□ เมื่อมีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน โดยเชื้อ *Bacillus cereus* B36



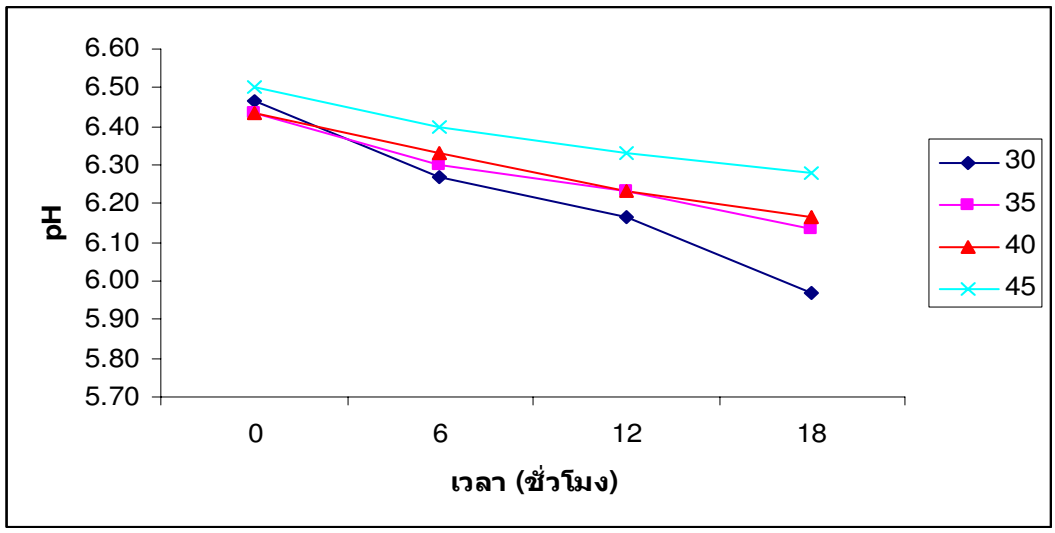
รูปที่ 3.30 ปริมาณการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRI ที่มี pH เริ่มต้นต่างกัน

ค) อุณหภูมิ

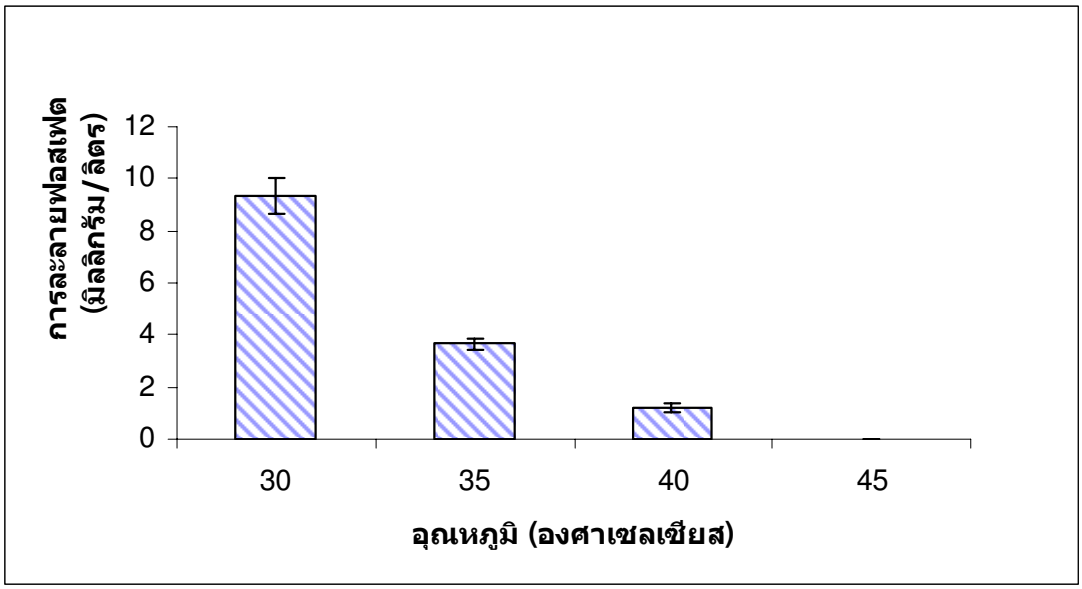
ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cereus* B36 ในอาหาร NBRI โดยการหาอุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสม ซึ่งได้แปรผันเป็น 30 องศาเซลเซียส 35 องศาเซลเซียส 40 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสมซึ่งมีการเจริญสูงสุด คือ 30 องศาเซลเซียส ดังแสดงใน รูปที่ 3.31 รองลงมา คือ 35 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และค่า pH ของอาหารลดลงในทุกชุดการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.32) โดยเฉพาะที่อุณหภูมิในการบ่ม 30 องศาเซลเซียส พบว่า ลดลงจาก pH 6.47 เป็น 5.53 ซึ่งลดลงจาก pH เริ่มต้นเป็น 0.93 หน่วย และลดลงมากกว่าในชุดการทดลองที่มีอุณหภูมิในการบ่มอื่นๆ ส่วนผลการทดสอบการละลายฟอสเฟต พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการละลายฟอสเฟตสูงสุด คือ 9.37 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3.33) รองลงมา คือ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ คือ 3.68 มิลลิกรัม/ลิตร และ 40 องศาเซลเซียส มีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ คือ 1.17 มิลลิกรัม/ลิตร ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสม คือ 30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการบ่มในการทดสอบขั้นต่อไป ส่วนการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* พบว่า ไม่มีการยับยั้งเชื้อราดังกล่าว



รูปที่ 3.31 การเจริญของ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRI□ ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 ที่มีอุณหภูมิในการบ่มต่างกัน



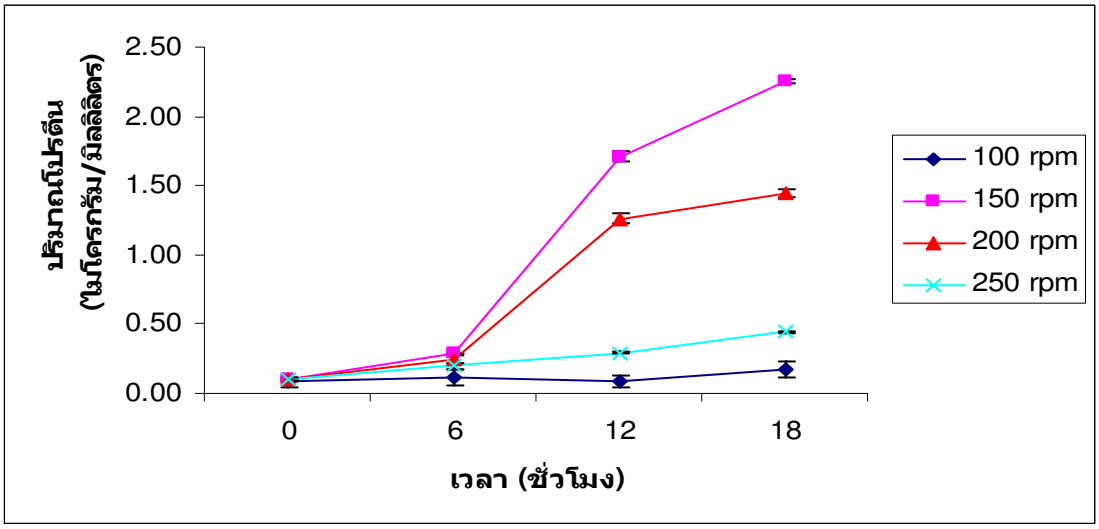
รูปที่ 3.32 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร NBRI□ ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน โดยเชื้อ *Bacillus cereus* B36



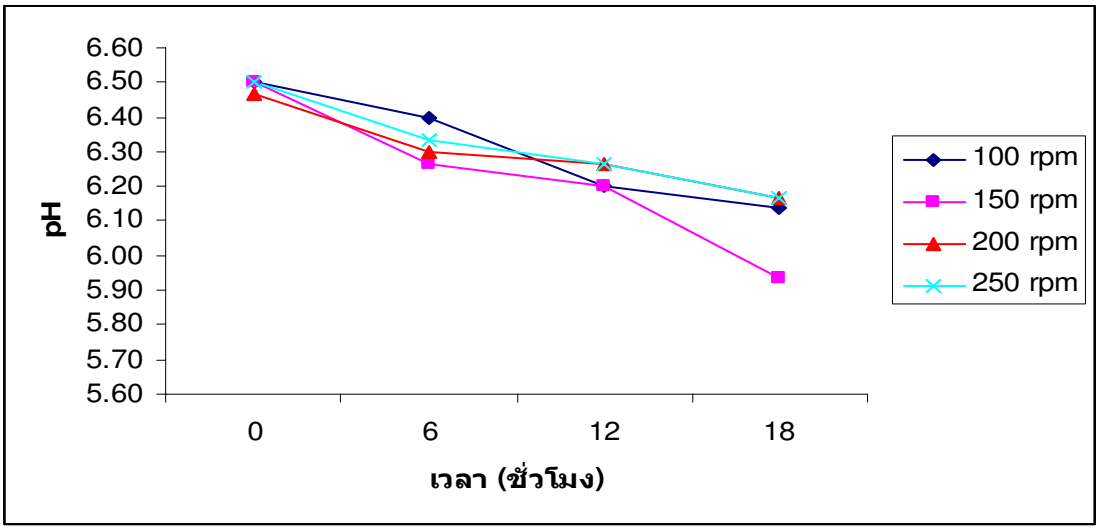
รูปที่ 3.33 ปริมาณการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRI□ ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน

ง) ความเร็วรอบของการเขย่า

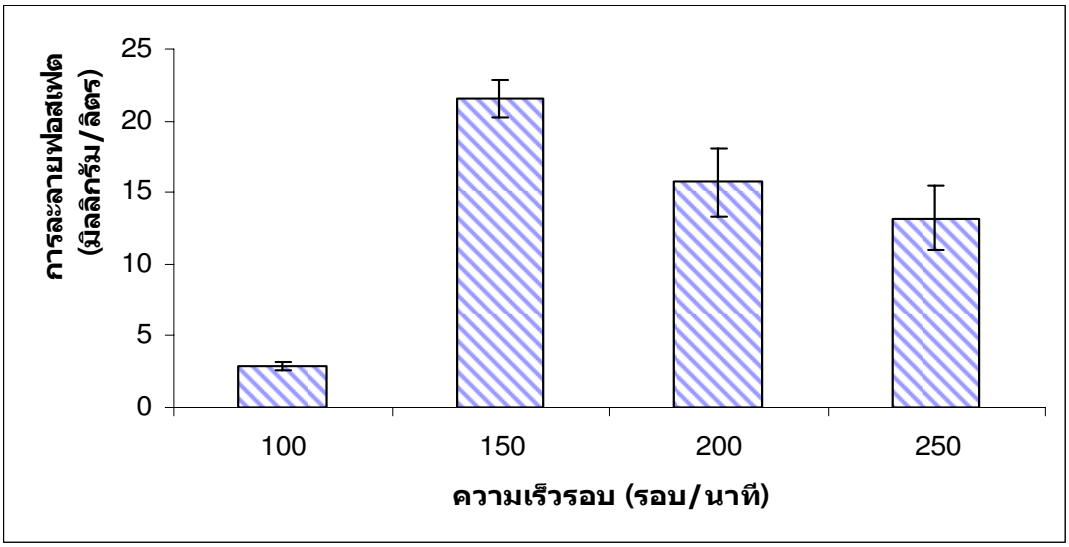
จากผลการทดลองในการศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cereus* B36 ในอาหาร NBRI□ ซึ่งได้แปรผันความเร็วรอบเป็น 100 150 200 และ 250 รอบ/นาที พบว่า ความเร็วรอบที่เหมาะสม ที่มีการเจริญสูงสุด คือ 150 (รูปที่ 3.34) รองลงมาคือที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่า ค่า pH ของอาหารในทุกชุดการทดลองมีค่าลดลง เมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.35) โดยเฉพาะที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ลดลงมากกว่าในชุดการทดลองอื่นๆ โดยลดลงจาก pH 6.50 เป็น 5.53 ซึ่งลดลงจาก pH เริ่มต้นเป็น 0.97 หน่วย ส่วนผลการทดสอบการละลายฟอสเฟต พบว่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที มีการละลายฟอสเฟตสูงสุด คือ 21.54 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3.36) รองลงมา คือ ที่ความเร็วรอบ 200 rpm มีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ คือ 15.70 มิลลิกรัม/ลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่ความเร็วรอบ 150 rpm เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป ส่วนการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* พบว่า ไม่มีการยับยั้งเชื้อราดังกล่าว



รูปที่ 3.34 การเจริญของ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRI ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 ที่มีความเร็วรอบต่างกัน



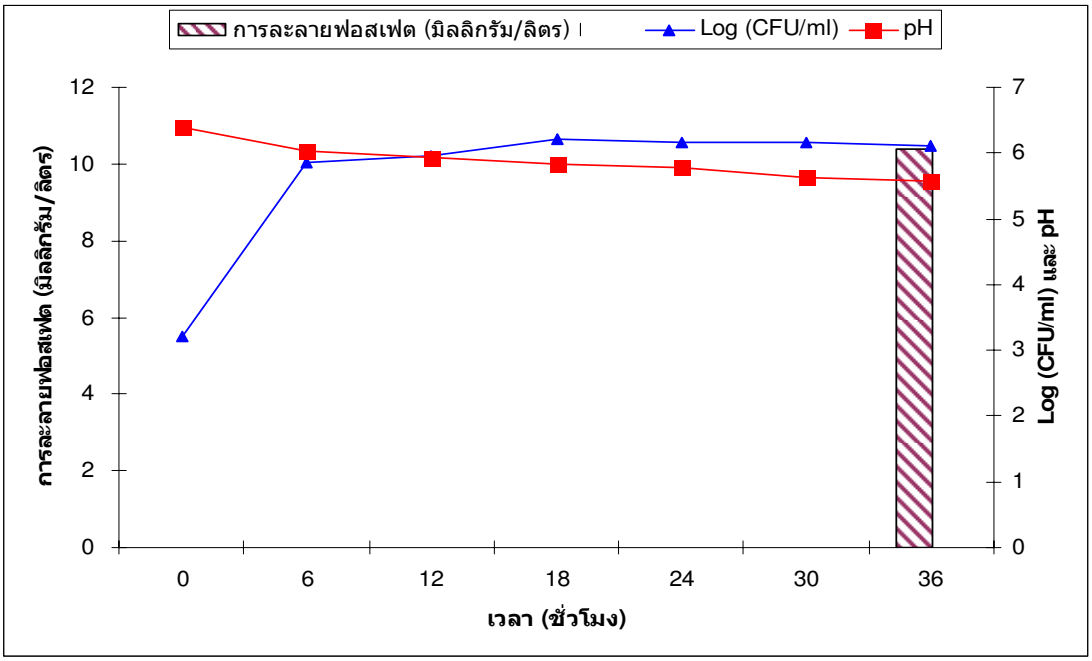
รูปที่ 3.35 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหาร NBRI ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบต่างกัน โดยเชื้อ *Bacillus cereus* B36



รูปที่ 3.36 ปริมาณการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRI ซึ่งมี pH เริ่มต้น 6.5 เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบต่างกัน

จ. การทดสอบในสภาวะที่เหมาะสมของ *Bacillus cereus* B36

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cereus* B36 ดังนั้นเพื่อการยืนยันผลการทดลองที่ได้ จึงทำการทดสอบอีกครั้ง โดยนำสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ผ่านมา คือ กล้าเชื้อ 5% , pH ของอาหาร 6.5 , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และบ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ในอาหาร NBRI พบว่า มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือ 0.908 และมีค่า Generation time เท่ากับ 46 นาที ส่วนค่า pH ของอาหารลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งลดลงจาก pH 6.40 เป็น 5.57 โดยลดลงจาก pH เริ่มต้นเป็น 0.83 หน่วย ส่วนผลการทดสอบการละลายฟอสเฟต พบว่ามีการละลายฟอสเฟต คือ 10.40 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3.37)



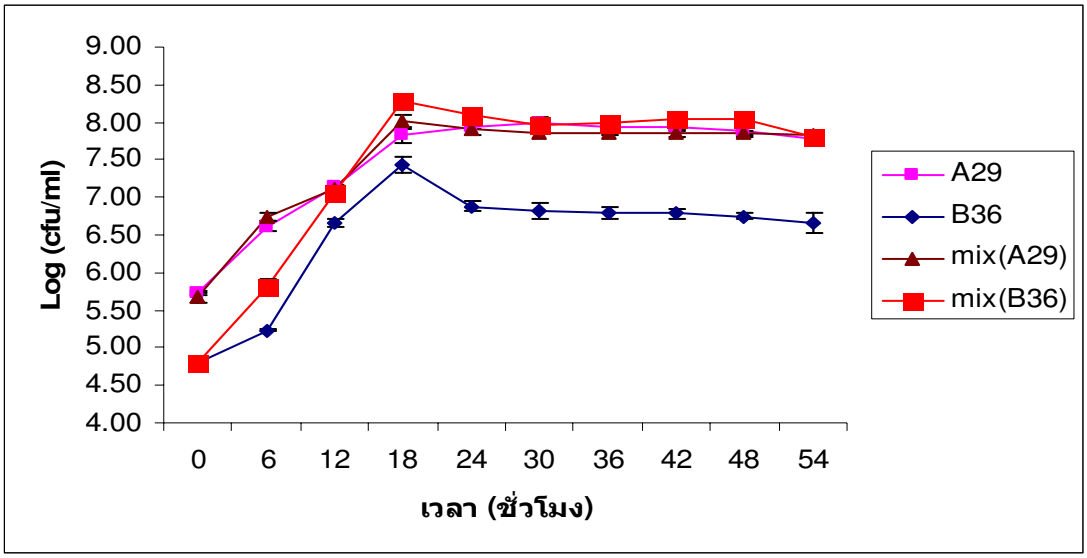
รูปที่ 3.37 การเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* B36 การเปลี่ยนแปลงของ pH และการละลายฟอสเฟต เมื่อเลี้ยงในอาหาร NBRI ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (กล้าเชื้อ 5% , pH ของอาหาร 6.5 , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และบ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที)

3.5 ผลการผลิต Siderophores ใน *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

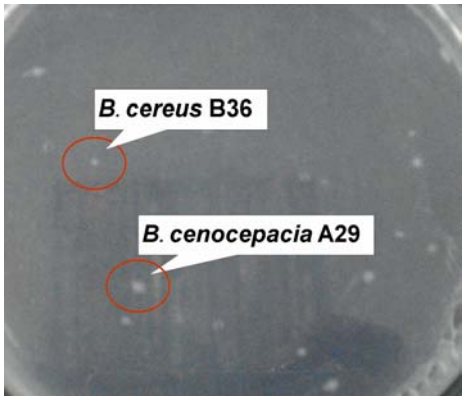
จากผลการทดสอบการผลิต Siderophores ของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีการสร้าง Siderophores เนื่องจากโคโลนีไม่เปลี่ยนสีของอาหาร CAS agar เป็นสีส้ม

3.6 การเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

จากผลการเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหาร NBRI ที่มีการดัดแปลง NBRI ซึ่งใช้ yeast extract 0.05 g/L แทน $(NH_4)_2SO_4$ โดยใช้กล้าเชื้อ 2.5 % ของ *B. cenocepacia* A29 และ 5% ของ *B. cereus* B36 ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาแล้ว (บทที่ 2) พบว่า ในชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน *B. cereus* B36 มีการเจริญได้ดีกว่าชุดควบคุม ซึ่งมีเพียง *B. cereus* B36 อย่างเดียว ส่วน *B. cepacia* A29 พบว่ามีการเจริญใกล้เคียงกัน ทั้งในชุดที่เพาะเลี้ยงร่วมกันและชุดควบคุมที่มีเพียง *B. cepacia* A29 อย่างเดียว (รูปที่ 3.38) และจากผลการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ออกจากกันได้ เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีโคโลนีที่ต่างกัน (รูปที่ 3.39)

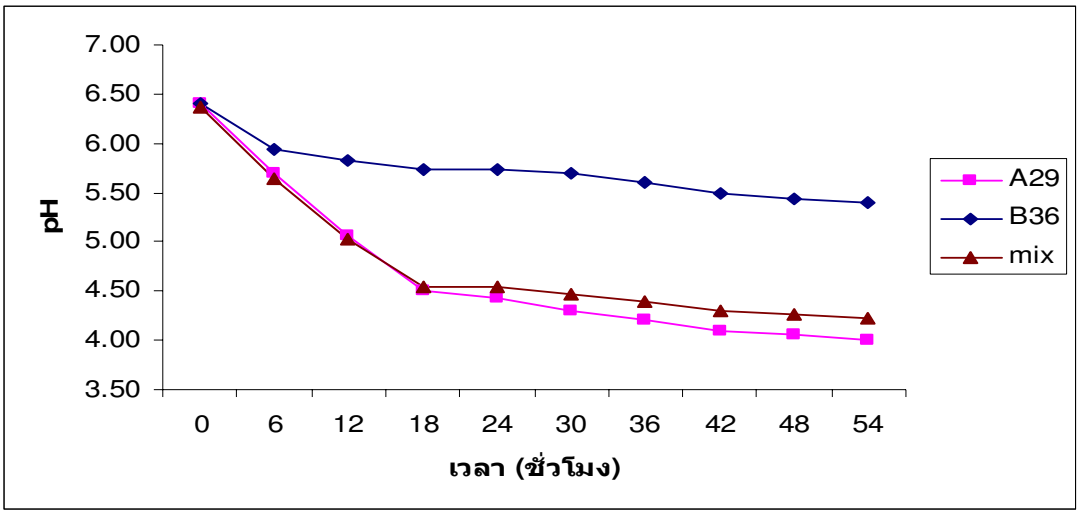


รูปที่ 3.38 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันและเลี้ยงเดี่ยวในอาหาร NBRI สูตรดัดแปลง

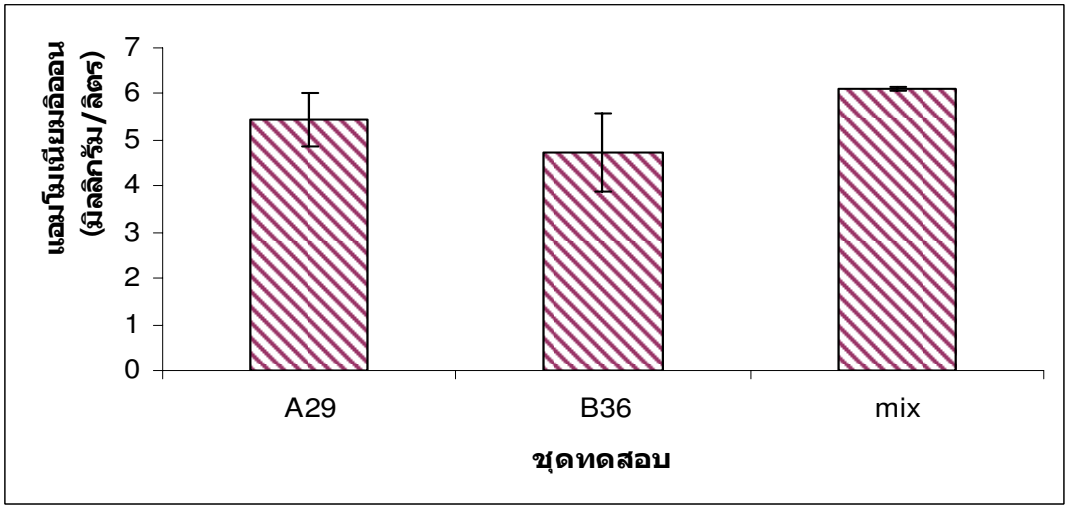


รูปที่ 3.39 โคโลนีที่ต่างกันของ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 ในอาหาร NBRI

นอกจากนี้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการเลี้ยง พบว่า ในชุดเพาะเลี้ยงร่วมกันมีค่าลดลง ซึ่งไปในทางเดียวกับในชุดควบคุมที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 3.40) ส่วนปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่า ในชุดเพาะเลี้ยงร่วมกันมีปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุดเพียง 6.10 มิลลิกรัม/ลิตร รองลงมา คือ ในชุดควบคุมที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว (5.43 มิลลิกรัม/ลิตร) และในชุดควบคุมที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว (4.72 มิลลิกรัม/ลิตร) (รูปที่ 3.41)

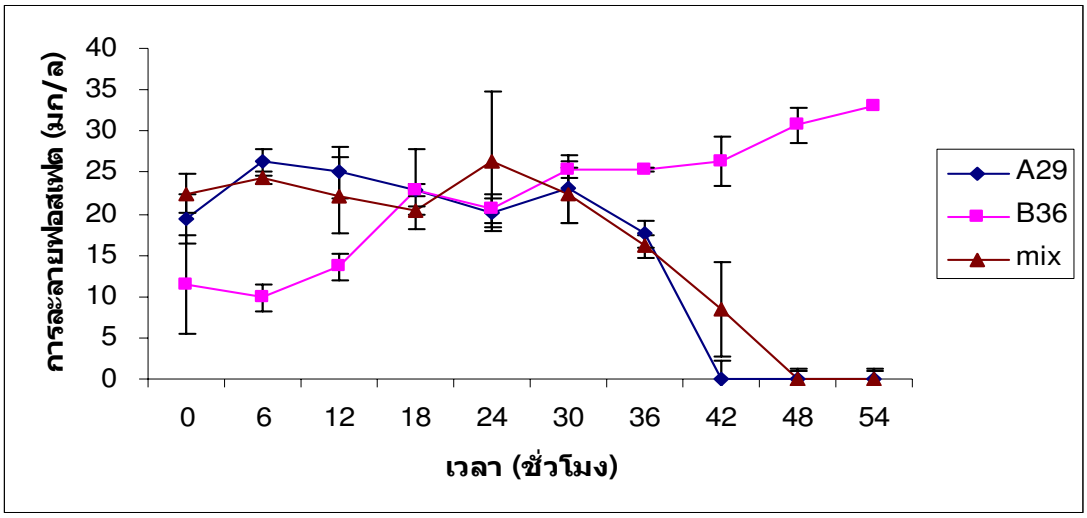


รูปที่ 3.40 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRI สูตรดัดแปลง หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันและเลี้ยงเดี่ยวของเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 ที่เวลาต่างกัน



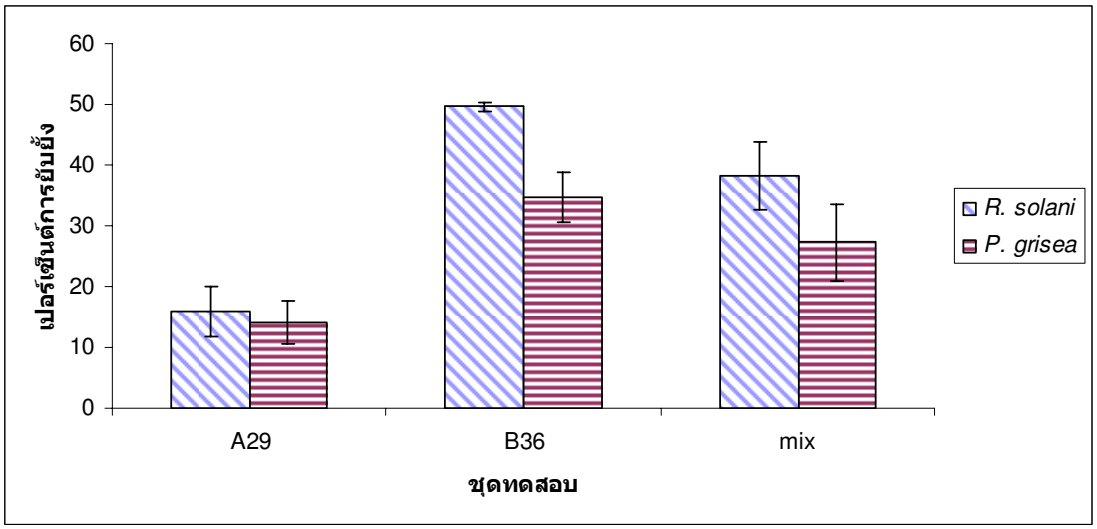
รูปที่ 3.41 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยโดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันและเลี้ยงเดี่ยวในอาหาร NBRI สูตรดัดแปลง เป็นเวลา 54 ชั่วโมง

และในส่วนของการละลายฟอสเฟต พบว่า ในชุดเพาะเลี้ยงร่วมกันมีการละลายฟอสเฟตไปในทางเดียวกับชุดควบคุมที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว และการละลายฟอสเฟตลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (ในชุดเพาะเลี้ยงร่วมกันลดลงจาก 19.38 – 0 มิลลิกรัม/ลิตร และชุดควบคุมที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียวลดลงจาก 22.44 – 0 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่ในชุดควบคุมที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว พบว่า การละลายฟอสเฟตมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป (เพิ่มขึ้นจาก 11.43-32.99 มิลลิกรัม/ลิตร) (รูปที่ 3.42)

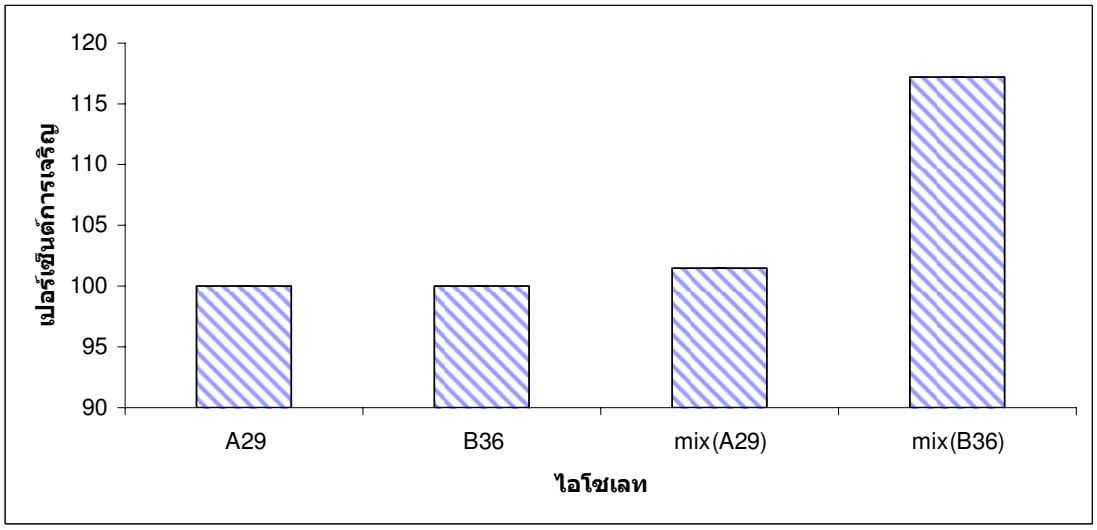


รูปที่ 3.42 การละลายฟอสเฟตโดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันและเลี้ยงเดี่ยวในอาหาร NBRI สูตรดัดแปลง เป็นเวลา 54 ชั่วโมง

สำหรับผลการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* พบว่า ชุดควบคุมที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว มีการยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้สูงสุด (49.65% สำหรับ *R. solani* และ 34.62% สำหรับ *P. grisea*) รองลงมา คือ ชุดเพาะเลี้ยงร่วมกัน (38.22% สำหรับ *R. solani* และ 27.23% สำหรับ *P. grisea*) และชุดควบคุมที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว (15.80% สำหรับ *R. solani* และ 14.08% สำหรับ *P. grisea*) ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.43 นอกจากนี้เมื่อนำผลของการเจริญที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน และเลี้ยงเดี่ยวเป็นเวลา 54 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งพบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทไม่มีการยับยั้งซึ่งกันและกัน กรณีที่ใช้กล้าเชื้อ *B. cenocepacia* A29 2.5% และ *B. cereus* B36 5% (รูปที่ 3.44) ดังนั้นจึงสามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทร่วมกันได้ เพื่อทำการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 3.43 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia sol*ani และ *Pyricularia grisea* โดยเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันและเลี้ยงเดี่ยวในอาหาร NBRI สูตรดัดแปลง เป็นเวลา 54 ชั่วโมง

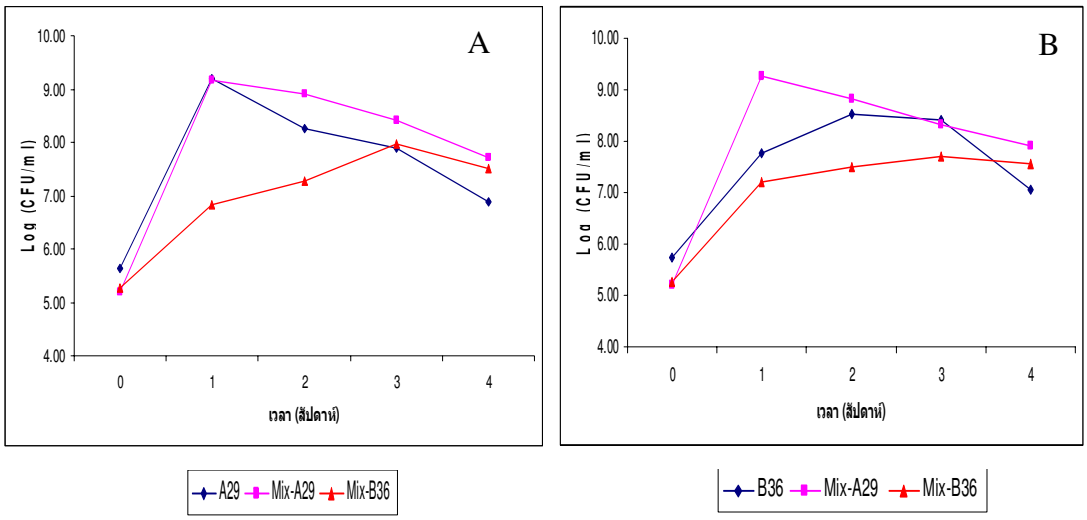


รูปที่ 3.44 เปอร์เซ็นต์การเจริญของแบคทีเรีย *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 54 ชั่วโมง

3.7 ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในน้ำเลี้ยงฟางข้าว

3.7.1 ในสภาวะที่ทำให้ปราศจากเชื้อและมีการเติมเชื้อเดี่ยว/ผสม

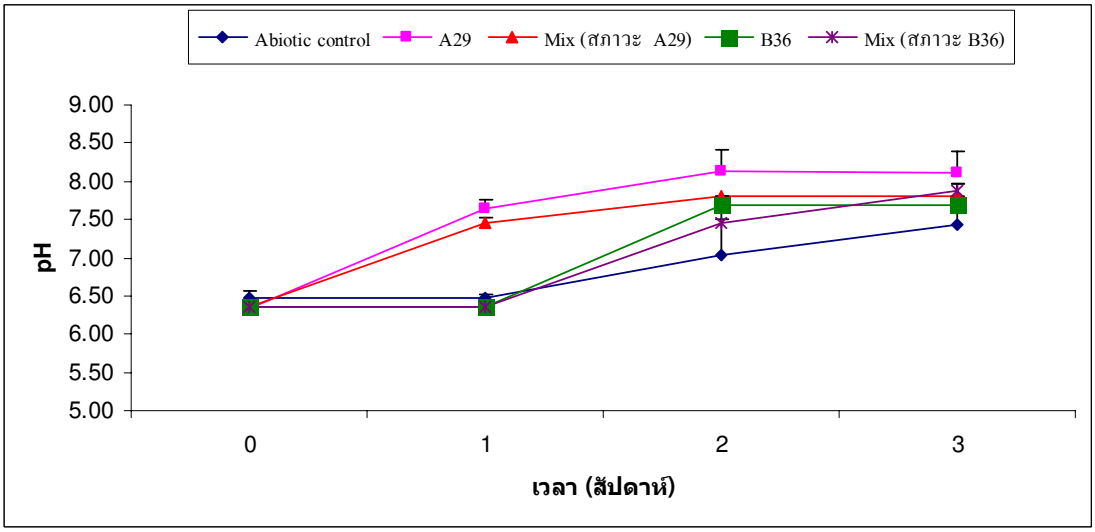
จากผลการทดลองในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ทำให้ปราศจากเชื้อและมีการเติมเชื้อ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 ทั้งในสภาพเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม (2.5% ของ A29 และ 5% ของ B36) สำหรับเชื้อผสมมีการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะ คือ สภาวะที่เหมาะสมต่อ *B. cenocepacia* A29 (สภาวะ A29) และสภาวะที่เหมาะสมต่อ *B. cereus* B36 (สภาวะ B36) โดยมีการเก็บเชื้อทุกๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยการวัดการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด พบว่า ในชุดควบคุมทางลบ ตรวจไม่พบเชื้อ และสำหรับชุดเชื้อผสมเมื่อเวลาเริ่มต้นถึงสัปดาห์ที่ 3 กรณีของ *B. cenocepacia* A29 เมื่อเลี้ยงทั้ง 2 สภาวะ คือ สภาวะของ *B. cenocepacia* A29 (5.19- 8.42 log CFU/ml เชื้อเพิ่มขึ้น 3.23 log CFU/ml) และสภาวะของ *B. cereus* B36 (5.20 - 8.33 log CFU/ml เชื้อเพิ่มขึ้น 3.13 log CFU/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดเชื้อเดี่ยว A29 (5.63- 7.89 log CFU/ml) เชื้อเพิ่มขึ้น 2.26 log CFU/ml ซึ่งเชื้อมีการเจริญต่ำกว่า (รูปที่ 3.45 A) ขณะที่ *B. cereus* B36 ในชุดเชื้อผสม เมื่อเลี้ยงทั้ง 2 สภาวะ คือ สภาวะของ A29 (5.28 - 7.98 log CFU/ml เชื้อเพิ่มขึ้น 2.70 log CFU/ml) และสภาวะของ *B. cereus* B36 (5.27 - 7.72 log CFU/ml) เชื้อเพิ่มขึ้น 2.45 log CFU/ml ขณะที่ชุดเชื้อเดี่ยว B36 เชื้อเพิ่มขึ้น 2.67 log CFU/ml (5.75-8.42 log CFU/ml) ดังรูปที่ 3.45 B และจากการวัดค่า pH ของน้ำเลี้ยงฟางข้าวเมื่อเวลาผ่านไป พบว่า ในทุกชุดการทดสอบมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และมีค่า pH สูงกว่า (6.33 - 8.13) ในชุดควบคุมทางลบ (6.48 - 7.53) ซึ่งไม่ใส่เชื้อลงไป (โดยชุดควบคุมทางลบใช้ค่าเฉลี่ยของการเพาะเลี้ยงของทั้ง 2 สภาวะ เนื่องจาก พบว่า ทั้ง 2 สภาวะมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ) (รูปที่ 3.46) ส่วนผลการทดลองในการวัดค่า EC พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 ทุกชุดการทดสอบมีค่า EC สูงสุด (4.11 - 5.77 mS/cm) เมื่อเทียบกับเวลาอื่นๆ ยกเว้นในชุดเชื้อเดี่ยว A29 ซึ่งมี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว พบว่ามีค่า EC สูงในสัปดาห์ที่ 4 (9.75 mS/cm) ขณะที่ชุดควบคุมทางลบมีค่าระหว่าง 4.44 - 4.51 เมื่อเวลาเริ่มต้นถึงสัปดาห์ที่ 4 ของการเลี้ยง (รูปที่ 3.47)



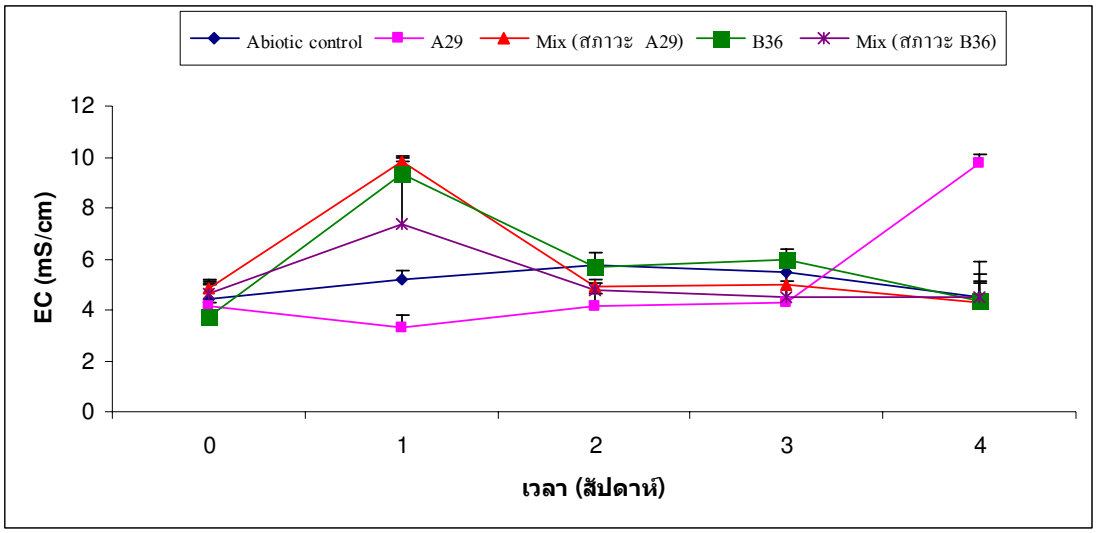
รูปที่ 3.45 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36 ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ทำให้ปราศจากเชื้อ

(A) เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *Burkholderia cenocepacia* A29 คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที

(B) เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *Bacillus cereus* B36 คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที

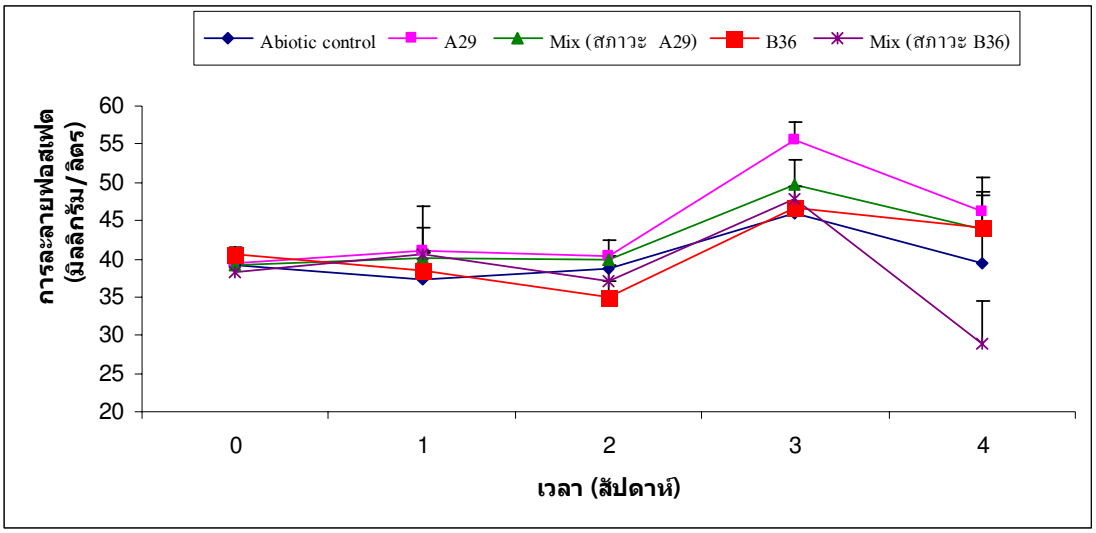


รูปที่ 3.46 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36



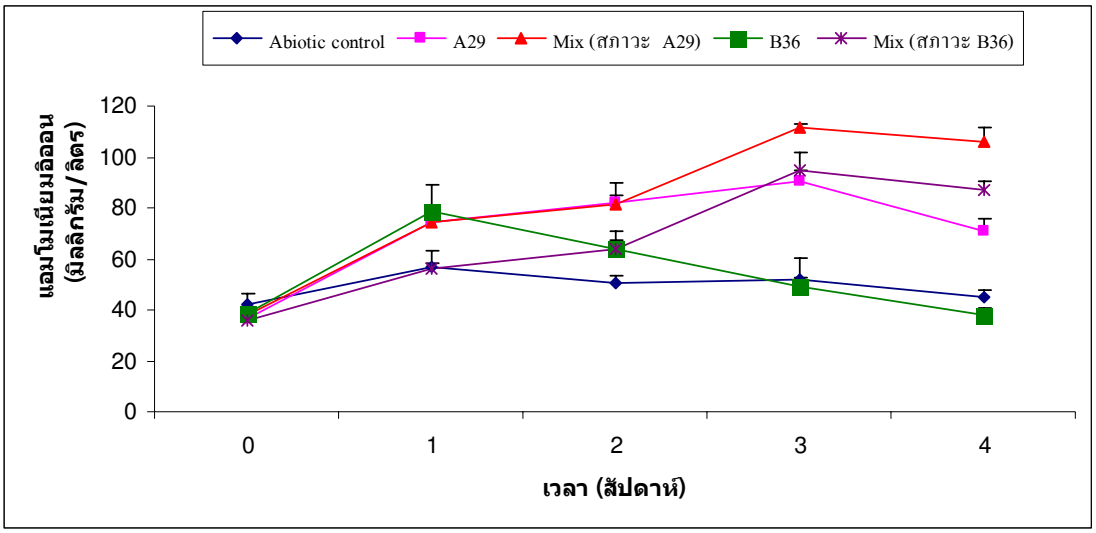
รูปที่ 3.47 ค่า EC ในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

ในการทดสอบการละลายฟอสเฟตพบว่า ชุดควบคุมทางลบมีการละลายฟอสเฟตเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน ในขณะที่ตรวจไม่พบเชื้อ โดยมีการละลายฟอสเฟตเมื่อเวลาเริ่มต้น 39.18 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 มีการละลายฟอสเฟตใกล้เคียงกับเมื่อเวลาเริ่มต้น (37.43 – 38.80 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ) และมีการละลายฟอสเฟตสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 (46.06 มิลลิกรัม/ลิตร) การละลายฟอสเฟตลดลงในสัปดาห์ที่ 4 (39.49 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนชุดทดสอบอื่นๆ (ชุดเชื้อเดี่ยว A29 ชุดเชื้อเดี่ยว B36 และชุดเชื้อผสม) การละลายฟอสเฟตมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุมทางลบ และมีการละลายฟอสเฟตสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 (46.75 – 55.47 มิลลิกรัม/ลิตร) และมีค่าสูงกว่าในชุดควบคุมทางลบ (46.06 มิลลิกรัม/ลิตร) โดยเฉพาะในชุดเชื้อเดี่ยว A29 ซึ่งมี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว พบว่า มีการละลายฟอสเฟตสูงสุด (55.47 มิลลิกรัม/ลิตร) และสูงกว่าในชุดที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว (46.75 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนในชุดเชื้อผสม พบว่า เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 มีการละลายฟอสเฟตสูงกว่า (49.66 มิลลิกรัม/ลิตร) เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cereus* B36 (47.82 มิลลิกรัม/ลิตร) (รูปที่ 3.48)



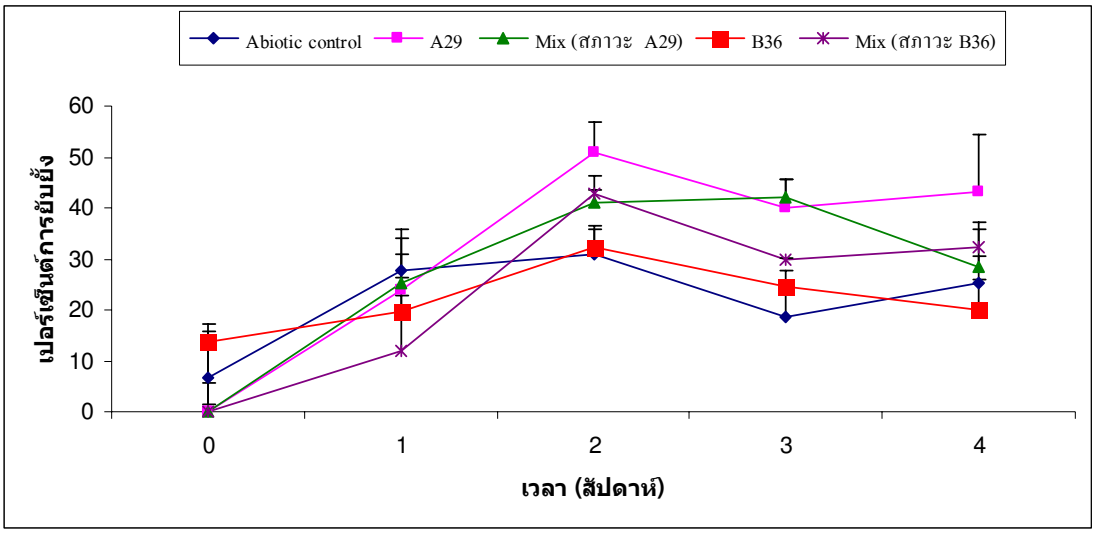
รูปที่ 3.48 การละลายฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

ในการวัดปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่า ชุดควบคุมทางลบมีการปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออน เมื่อเวลาเริ่มต้น 42.02 มิลลิกรัม/ลิตร และเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 (56.67 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป จนถึงสัปดาห์ที่ 4 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนลดลง (50.21 – 45.17 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนชุดทดสอบอื่นๆ (ชุดเชื้อเดี่ยว A29 และชุดเชื้อผสม) มีปริมาณแอมโมเนียมอิออนเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และมีปริมาณสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 (90.84 – 111.80 มิลลิกรัม/ลิตร) ยกเว้นในชุดเชื้อเดี่ยว B36 มีการปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 (78.42 มิลลิกรัม/ลิตร) และลดลงในสัปดาห์ที่ 2-4 (64.17 – 38.14 มิลลิกรัม/ลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่า ชุดเชื้อผสม เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 มีปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุด (111.8 มิลลิกรัม/ลิตร) ซึ่งสูงกว่าในชุดเชื้อผสม เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cereous* B36 (94.44 มิลลิกรัม/ลิตร) และชุดเชื้อเดี่ยว A29 ซึ่งมี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว (90.84 มิลลิกรัม/ลิตร) (รูปที่ 3.49)



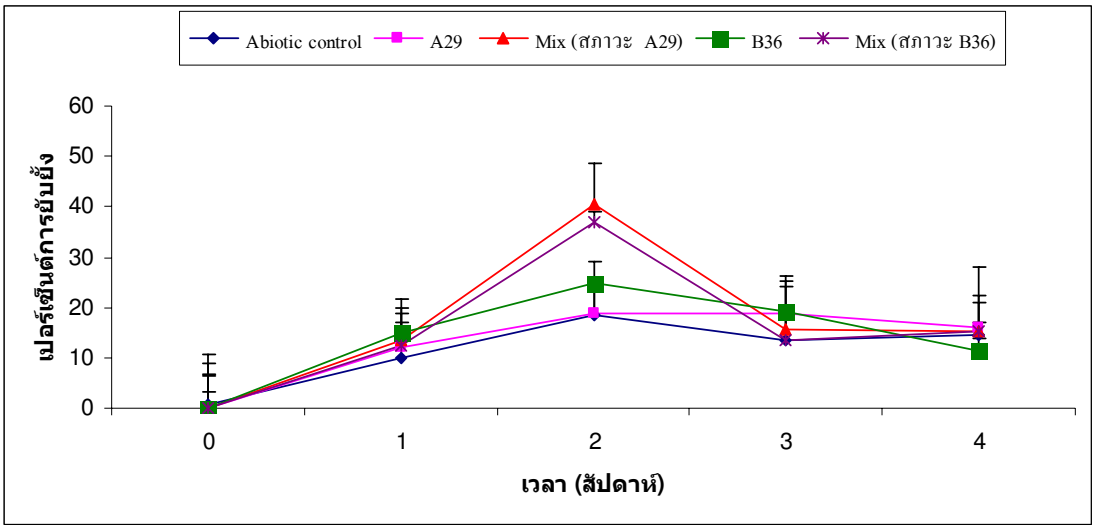
รูปที่ 3.49 : การปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออนในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

ผลการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* (รูปที่ 3.50) พบว่า เมื่อเวลาเริ่มต้น ชุดควบคุมทางลบมีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* 6.60% และมีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 - 2 (27.64 – 30.97% ตามลำดับ) แต่การยับยั้งเชื้อรา *R. solani* มีแนวโน้มลดลงในสัปดาห์ที่ 3 – 4 (18.43 – 25.35 ตามลำดับ) ส่วนชุดเชื้อเดี่ยว A29 และชุดเชื้อผสม พบว่า เมื่อเวลาเริ่มต้นไม่มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* แต่มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 (11.80% สำหรับชุดเชื้อเดี่ยว A29 ส่วนชุดเชื้อผสมมีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* 23.90% และ 11.80 % เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 ตามลำดับ) และมีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 (50.83% สำหรับชุดเชื้อเดี่ยว A29 ส่วนชุดเชื้อผสมมีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* 41.13% และ 42.64% เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 ตามลำดับ) และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป โดยลดลง 43.08 - 40.04 % สำหรับชุดเชื้อเดี่ยว A29 ขณะที่เชื้อผสมมีการยับยั้ง 42.27 – 28.44% เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ 32.40 – 29.79% เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cereus* B36 ยกเว้นในชุดเชื้อเดี่ยว B36 มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* เมื่อเวลาเริ่มต้น 13.25% และเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปจนถึงสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งมีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* สูงสุด (32.20%)



รูปที่ 3.50 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

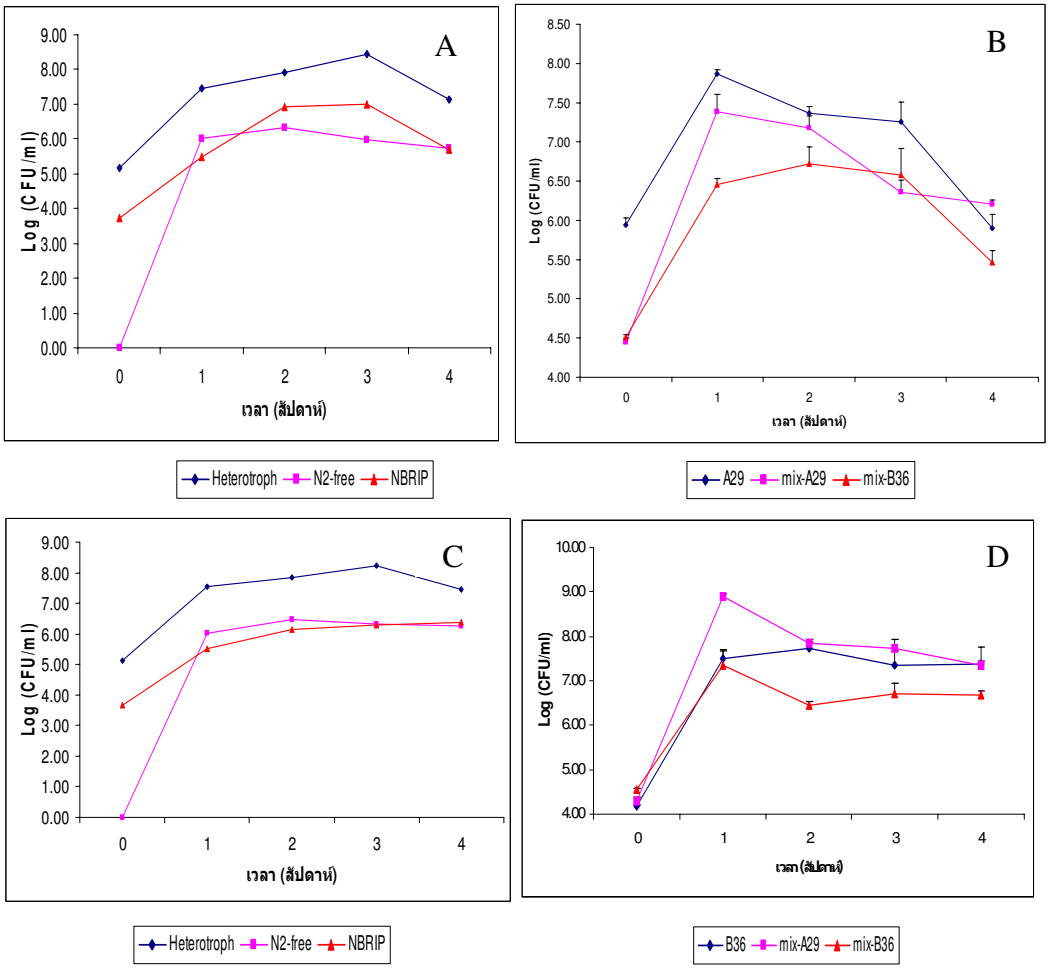
ส่วนผลการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* (รูปที่ 3.51) พบว่า ที่เวลาเริ่มต้น ชุดควบคุมทางลบมีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* 0.86% และมีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 – 2 (10.07 – 18.31% ตามลำดับ) และลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 3-4 (13.51 – 14.40% ตามลำดับ) ส่วนชุดทดสอบอื่นๆ (ชุดเชื้อเดี่ยว A29 ชุดเชื้อเดี่ยว B36 และชุดเชื้อผสม) ไม่มีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ที่เวลาเริ่มต้น และมีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ในสัปดาห์ที่ 1 จนถึงสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งมีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* สูงสุด (18.90 – 40.39%) และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (11.44 – 19.17%) นอกจากนี้ยังพบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 ชุดเชื้อผสมมีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* สูงสุด (40.39 และ 37.04% เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereous* B36 ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดอื่นๆ และเมื่อพิจารณาในชุดเชื้อเดี่ยว พบว่า ชุดเชื้อเดี่ยว B36 ซึ่งมีแบคทีเรีย *Bacillus cereous* B36 เพียงอย่างเดียว มีการยับยั้ง (24.80%) สูงกว่าชุดเชื้อเดี่ยว A29 (18.96%) ซึ่งมี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 3.51 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าว โดยเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

3.7.2 ในสภาวะที่มีเชื้อจากธรรมชาติ

จากผลการทดลองในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อและมีการเติมเชื้อเดี่ยว *B. cenocepacia* A29 หรือ *B. cereus* B36 และผสมในอัตราส่วน 2.5% และ 5% ตามลำดับ และเชื้อผสมเลี้ยงใน 2 สภาวะ (สภาวะ A29 และสภาวะ B36) โดยมีการเก็บเชื้อทุกๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วทำการวัดการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด พบว่า ในชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ เมื่อเวลาเริ่มต้นถึงสัปดาห์ที่ 3 *B. cenocepacia* A29 เมื่อเพาะเลี้ยงทั้ง 2 สภาวะ คือ สภาวะ A29 (4.45 - 6.36 log CFU/ml เชื้อเพิ่มขึ้น 1.91 log CFU/ml) และสภาวะ B36 เชื้อเพิ่มขึ้น 2.83 log CFU/ml (4.29 - 7.12 log CFU/ml) มีการเจริญของเชื้อดีกว่าชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ ซึ่งเพิ่มเพียง 1.32 log CFU/ml (5.94 - 7.26 log CFU/ml) ดังรูปที่ 52 B ส่วน *B. cereus* B36 ในชุดเชื้อผสม เมื่อเพาะเลี้ยงทั้ง 2 สภาวะ คือ สภาวะ A29 เชื้อเพิ่มขึ้น 2.93 log CFU/ml (4.45-7.38 log CFU/ml) และสภาวะ B36 เพิ่มขึ้น 2.18 log CFU/ml (4.54 - 6.72 log CFU/ml) มีการเจริญต่ำกว่าชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติเพิ่มขึ้น 3.17 log CFU/ml (4.19 - 7.36 log CFU/ml) ดังรูปที่ 52 D ส่วนแบคทีเรียพวก heterotroph พบว่ามีการเพิ่มขึ้น 3.28 log CFU/ml (5.17-8.45 log CFU/ml) และเพิ่มขึ้น 3.12 log CFU/ml (5.11-8.23 log CFU/ml) ภายใต้สภาวะ A29 และ B36 ตามลำดับ และในชุดควบคุมธรรมชาติ ซึ่งไม่เติม *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 ยังพบแบคทีเรียในวงศ์ Azotobacteraceae และ *Bacillus* sp. เนื่องจากสามารถเจริญบนอาหาร N_2-Free medium และ NBRI□ ได้ (รูปที่ 3.52 A และ C) แต่มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ และชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ (รูปที่ 3.52 B และ D)



รูปที่ 3.52 การเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ

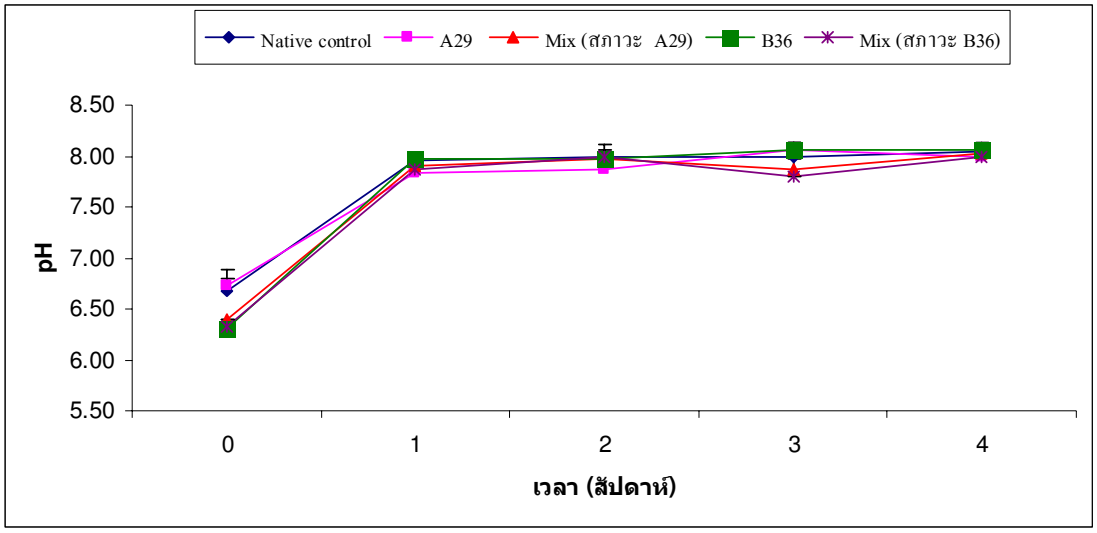
(A) ชุดควบคุมธรรมชาติ ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *Burkholderia cenocepacia* A29 คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที

(B) ชุดทดสอบทั้งเดี่ยวและผสม ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *Burkholderia cenocepacia* A29

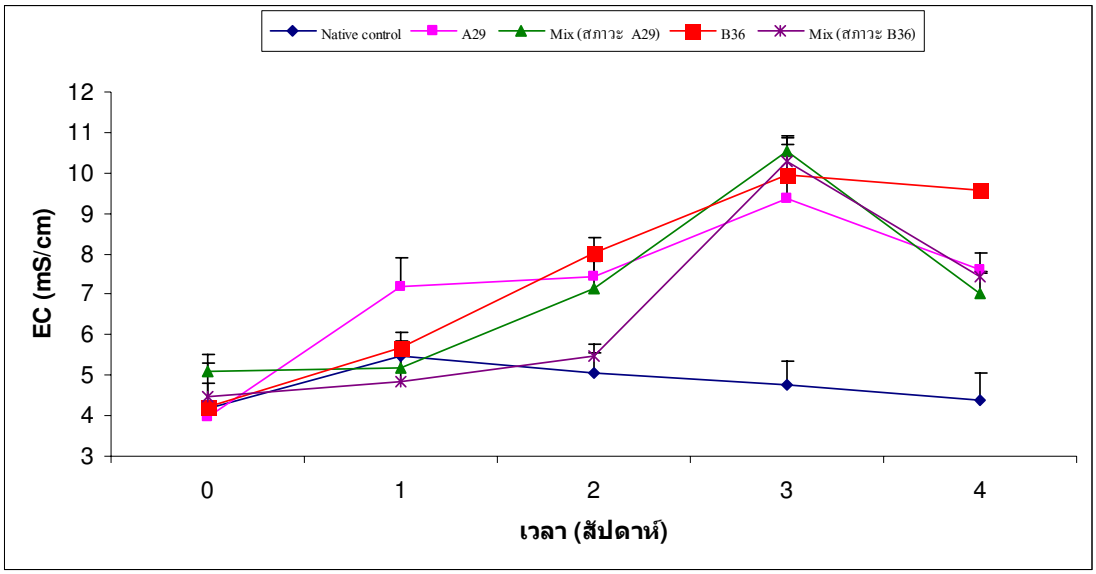
(C) ชุดควบคุมธรรมชาติ ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *Bacillus cereus* B36 คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที

(D) ชุดทดสอบทั้งเดี่ยวและผสม ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *Bacillus cereus* B36

จากการวัดค่า pH ของน้ำเลี้ยงฟางข้าวเมื่อเวลาผ่านไป พบว่า ในทุกชุดการทดสอบมีค่า pH ใกล้เคียงกับในชุดควบคุมธรรมชาติ ซึ่งไม่ได้ใส่ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 ลงไป นอกจากนี้ค่า pH ยังมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.51) ส่วนผลของการวัดค่า EC พบว่า ทุกชุดการทดสอบมีค่า EC สูงกว่าชุดควบคุมธรรมชาติ โดยชุดควบคุมธรรมชาติ มีค่า EC สูงสุด (4.96 ms/cm) ในสัปดาห์ที่ 1 และลดลงเมื่อเวลาผ่านไปจนถึงสัปดาห์ที่ 4 มีค่า EC 3.89 ms/cm นอกจากนี้ในทุกชุดการทดสอบมีค่า EC เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 (8.85 – 10.04 ms/cm) และลดลงในสัปดาห์ที่ 4 (6.53 – 9.09 ms/cm) โดยชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีค่า EC สูงสุด (10.04 ms/cm และ 9.77 ms/cm ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36) ดังรูปที่ 3.53



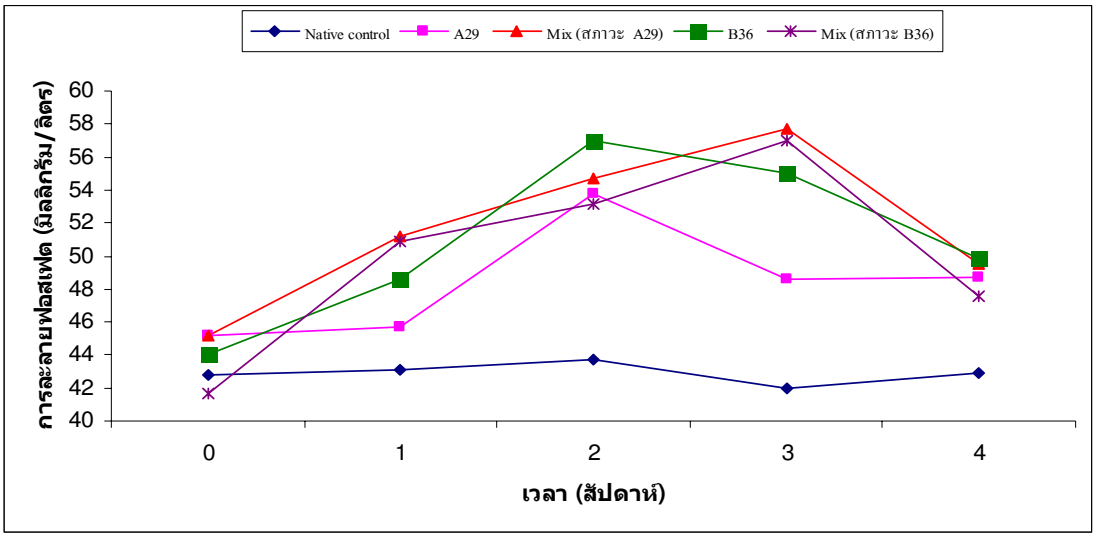
รูปที่ 3.53 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36



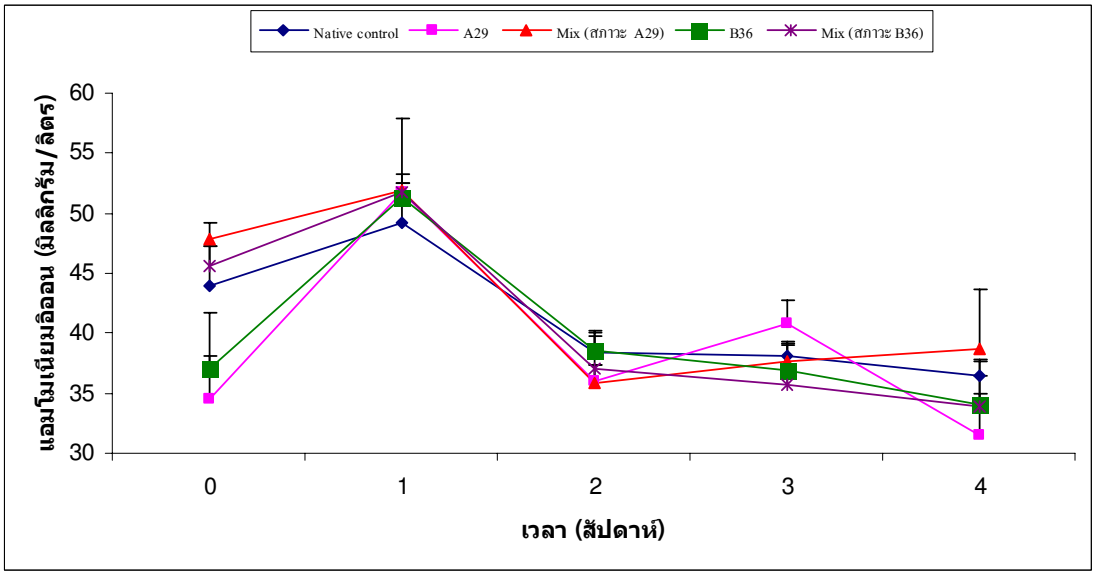
รูปที่ 3.54 ค่า EC ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

ในการทดสอบการละลายฟอสเฟตพบว่า ตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ชุดควบคุมธรรมชาติมีการละลายฟอสเฟตไม่แตกต่างกันมากนัก (42.78 – 43.77 มิลลิกรัม/ลิตร) ขณะที่ชุดทดสอบอื่นๆ (ชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ และ ชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ) มีการละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีการละลายฟอสเฟตสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 (57.00 มิลลิกรัม/ลิตร) และสูงกว่าในชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ (53.79 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนชุดเชื้อผสม พบว่า มีการละลายฟอสเฟตสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 (57.7 และ 57.00 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36) (รูปที่ 3.55)

ในการวัดปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่า ทุกชุดทดสอบมีปริมาณแอมโมเนียมอิออนใกล้เคียงกับชุดควบคุมธรรมชาติ โดยมีปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 (49.17 – 51.95 มิลลิกรัม/ลิตร) (รูปที่ 3.56)



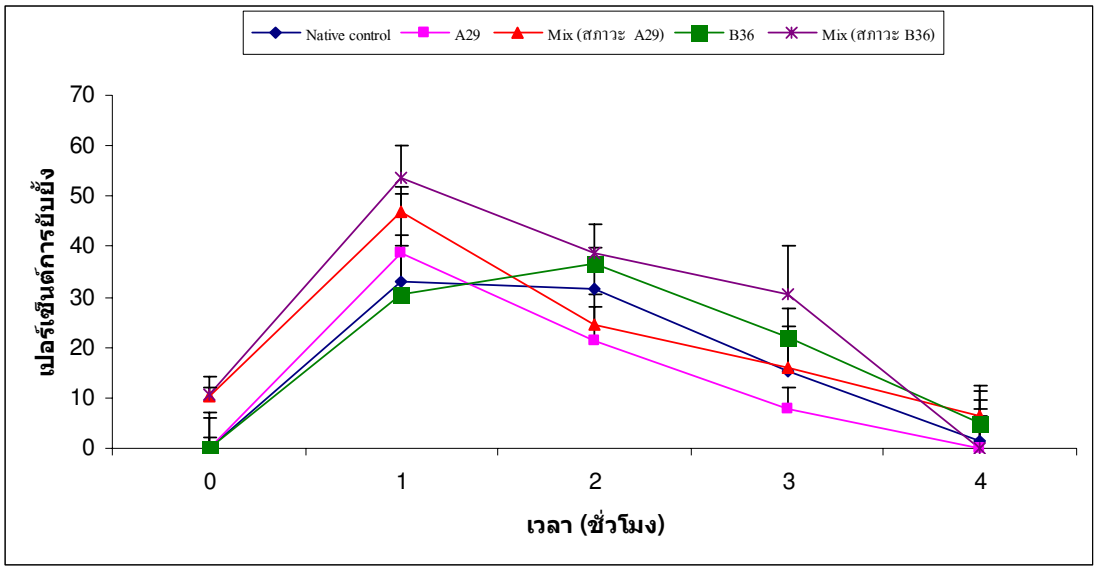
รูปที่ 3.55 การละลายฟอสเฟตในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36



รูปที่ 3.56 ปริมาณแอมโมเนียมอิออนในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

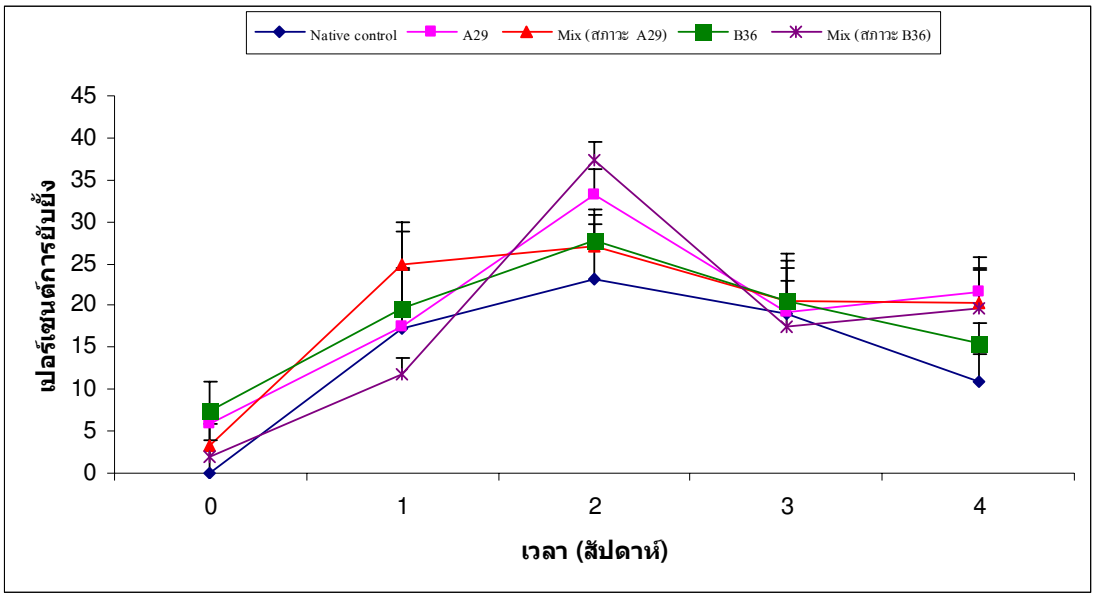
ส่วนผลการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* พบว่า ที่เวลาเริ่มต้น ชุดควบคุมธรรมชาติไม่มีการยับยังเชื้อรา *R. solani* แต่มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* สูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 (32.91%) และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป นอกจากนี้ยังพบว่า ชุดทดสอบอื่นๆ (ชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ และชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ) มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 (38.88 - 53.53%) ยกเว้นชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* สูงสุดในสัปดาห์ที่

2 (36.57%) ส่วนชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ พบว่า มีการยับยั้งสูงสุด (46.76 – 53.53% ภายใต้สภาวะ A29 และ B36) ซึ่งสูงกว่าในชุดทดสอบที่เติมเชื้อเดี่ยว (รูปที่ 3.57)



รูปที่ 3.57 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

ส่วนผลการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* พบว่า ในชุดควบคุมธรรมชาติที่เวลาเริ่มต้นไม่มีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* แต่มีการยับยั้งเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป จนถึงสัปดาห์ที่ 2 มีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* สูงสุด (23.15%) และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ส่วนชุดทดสอบอื่นๆ (ชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ และชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ) มีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* เพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 โดยในชุดที่มีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด (27.06 – 37.33%) ซึ่งชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* (33.20%) สูงกว่าในชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ (27.76%) ส่วนชุดเชื้อผสม พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ B36 มีการยับยั้ง (37.33%) สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่มีการเติมเชื้อเดี่ยวร่วมกับเชื้อธรรมชาติ (รูปที่ 3.58)



รูปที่ 3.58 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่ได้ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่าง *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินและน้ำในนาข้าว

4.1.1 การแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ

จากการแยกแบคทีเรียจากดินและน้ำในนาข้าว พบว่ามีแบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เนื่องจากสามารถเจริญบนอาหารแข็ง N_2-free medium ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน และแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญในบริเวณรอบรากพืชได้ เนื่องจากในบริเวณรอบรากพืชมีสารอินทรีย์ต่างๆ ที่พืชผลิตขึ้นมาหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ หรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ปลดปล่อยออกมา (Dakora and Phillips, 2002) และถ้าหากสิ่งแวดล้อมขาดแหล่งไนโตรเจน เชื้อเหล่านี้ก็สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สามารถแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศได้ 252 ไอโซเลท คิดเป็น 96.92% (ตารางที่ 3.1) จาก 260 ตัวอย่าง (ดินและน้ำ) ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าดินและน้ำในนาข้าวบริเวณภาคใต้มีแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ในปริมาณที่สูง โดยเฉพาะตัวอย่างจาก ต. ท่าข้าม อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา สามารถแยกเชื้อได้สูงสุด (157.5%) อาจเป็นเพราะว่าดินบริเวณนี้ขาดแหล่งไนโตรเจน จึงมีจำนวนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ในปริมาณที่สูง

4.1.2 การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

จากการแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถแยกได้ 196 ไอโซเลท คิดเป็น 75.38% (ตารางที่ 3.2) จาก 260 ตัวอย่าง (ดินและน้ำ) ซึ่งไอโซเลทที่แยกได้สามารถเปลี่ยนฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลาย (ในที่นี้คือ $Ca_3(PO_4)_2$) ให้อยู่ในรูปที่ละลาย เพื่อให้พืชสามารถนำไปใช้ได้ และจากผลการทดลองสามารถบ่งชี้ได้ว่า ดินและน้ำในนาข้าวบริเวณภาคใต้มีแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งมีความสามารถละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปไม่ละลายให้อยู่ในรูปที่ละลายได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง แต่มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียในวงศ์ Azotobacteraceae อาจเป็นเพราะว่าบริเวณที่เก็บตัวอย่างมีฟอสเฟตที่อยู่ในรูปไม่ละลายในรูปอื่นๆ นอกจาก $Ca_3(PO_4)_2$) อยู่ด้วย แต่ก็ได้มีรายงานต่างๆ ที่รายงานเกี่ยวกับการใช้ *Bacillus* spp. มาใช้ในการละลายฟอสเฟต ได้แก่ Trivedi และคณะ (2003) ได้ทดสอบแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* , *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas* พบว่า สามารถเพิ่มผลผลิตของข้าวทั้งในการทดสอบในกระถางและในแปลง นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ Yasmin และคณะ (2004)

ได้ทดสอบแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Z 3-4 และ *Azospilrillum* sp. Z-31 กับต้นข้าว พบว่าสามารถเพิ่มชีวมวล (biomas) ของราก รวมถึงปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมดในข้าวได้

4.2 การคัดเลือกเชื้อเป้าหมาย

4.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ

ผลจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศ พบว่า ไอโซเลท A29 สามารถปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนได้ในปริมาณที่สูง (268.47 มิลลิกรัม/ลิตร) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตฮอร์โมนพืช indole 3-acetic acid (IAA) ได้ ดังรูปที่ 3.3 ส่วน ไอโซเลท A90 และ A38 มีปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงกว่าไอโซเลท A29 คือมีปริมาณแอมโมเนียมอิออน 365 และ 307.93 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p > 0.5$ (รูปที่ 3.2) แต่ทั้งสองไอโซเลทไม่สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้ ดังนั้นการทดสอบในครั้งนี้ จึงได้คัดเลือกไอโซเลท A29 เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไปและจากผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Mandira และ Sheela (2009) พบว่า การเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum brasitense* SM ในสภาวะที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้การผลิต indole–3–acetic acid (IAA) ลดลง แต่เชื้อ *Azospirillum brasitense* SM ก็ยังสามารถผลิต IAA ได้อยู่ โดยในการผลิต IAA แบคทีเรียสามารถสังเคราะห์ IAA ได้จากกรดอะมิโน Tryptophan (Trp) เป็นซับเสตรท แล้วผ่าน indole -3-pyruvic acid (IPyA) pathway ซึ่งมีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ indole-3-pyruvate decarboxylase (IPDC) (Madira และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า แบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ RRE – 3R และ RRE-5 สามารถผลิต IAA ได้ (Shing และคณะ, 2006)

4.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

จากการศึกษา พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท B36 มีการเจริญได้ดี เนื่องจากมีค่า OD มากกว่า 0.5 คือ มีค่า OD เท่ากับ 0.684 และสามารถละลายฟอสเฟตได้ดี โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP มี Bromophenol blue อยู่ ซึ่งแบคทีเรียผลิตกรดออกมาแล้วเปลี่ยน Bromophenol blue เป็นสีเหลือง (รูปที่ 3.4) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Babita และคณะ (2009) ได้มีการทดลองการละลาย $Ca_3(PO_4)_2$ (tricalcium phosphate) พบว่า มีค่า pH ลดลง เนื่องจากมีการผลิตกรดอินทรีย์

นอกจากนี้ไอโซเลท B36 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ได้แก่ *R. solani* และ *P. grisea* (รูปที่ 3.5) ซึ่งผลการยับยั้ง *R. solani* (67.35%) มีการยับยั้ง

ได้ดีกว่าใน *P. grisea* (31.68%) ซึ่งอาจเป็นเพราะ *R. solani* มีความไวต่อสารที่สร้างโดยไอโซเลท B36 โดยวิจิตรา และคณะ (2545) พบว่า *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 , NSRS 89-26 และ B1 มีกลไกในการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* และ *R. oryzae* โดยการสร้างสารปฏิชีวนะ สร้างสารระเหย และมีการแก่งแย่งอาหาร

Shlomo และคณะ (1995) พบว่า *Bacillus cereus* 78 มีกลไกในการยับยั้งการเจริญของ *Rhizoctonia solani* , *Pythium ultimum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยใช้กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase นอกจากนี้เมื่อนำ *Bacillus* subtilis 72 *Bacillus cereus* 78 หรือ *Bacillus pumilus* 65 ใส่ไปในเมล็ดถั่วที่มีเชื้อ *Sclerotium rolfsii* พบว่า สามารถลดการเกิดโรคได้ 72% , 79% และ 26% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และได้มีรายงานในการยับยั้งเชื้อ *P. oryzae* โดยการผลิต Chinolytic enzyme ซึ่งจะไปย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 68.88% (Jaiganesh และคณะ, 2007)

4.3 การเทียบเคียงเชื้อเป้าหมาย

ผลจากการศึกษาการเทียบเคียงเชื้อเป้าหมาย พบว่า แบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ไอโซเลท A29 เป็น *Burkholderia cenocepacia* ซึ่งได้มีรายงานต่างๆ บ่งชี้ว่า *Burkholderia cenocepacia* มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้มีรายงานว่า *Burkholderia* มีกระบวนการที่ส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน การเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการต้านเชื้อก่อโรค และการผลิตฮอร์โมน (Estrada-de los Santos และคณะ, 2001; Roberts และคณะ, 2002; Compant และคณะ, 2005) ขณะที่ Selveraj และคณะ (2007) พบว่า แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ CBMB40 สามารถละลายฟอสเฟต และผลิต indole acetic acid (IAA) นอกจากนี้ Giovunni และคณะ (2009) พบว่า *Burkholderia* ที่แยกได้มีบทบาทสำคัญในการตรึงไนโตรเจนในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ หรือดินกรด

จากการศึกษาการเทียบเคียง *Bacillus* sp. ไอโซเลท B36 สามารถเทียบเคียงได้เป็น *Bacillus cereus* ทั้งในการเทียบเคียงทางชีวโมเลกุล และการใช้ API kit โดย *Bacillus cereus* สามารถพบได้ทั่วไปในดินและพืช เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก และมีการสร้างเอนโดสปอร์ (Brunel และคณะ, 1994; Martinez และคณะ, 2002) ซึ่งได้มีรายงานต่างๆ ที่นิยมใช้ *Bacillus cereus* มาใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น ได้มีการนำแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ใส่ในเมล็ดฝ้าย ซึ่งมีเชื้อ *R. solani* พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 51% (Shloma และคณะ, 1995) นอกจากนี้ Tao และคณะ (2008) ได้แยกแบคทีเรียกลุ่มละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization bacteria) พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่ม organic phosphate mineralizing bacteria (OPMB) ได้ 10 ไอโซเลท ซึ่งเทียบเคียงได้เป็น *Bacillus cereus* และ

Bacillus megaterium ส่วน Idris และคณะ (2009) ได้แยกแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting bacteria) ได้แก่ *Chryseomonas luteola* (KBS5-F), *Serratia marcesce*ns (KBS6-H) และ *Bacillus cereus* (KBE9-1) โดยมีการละลายฟอสเฟตที่สูง (มีวงใสรอบโคโลนี (clear zone) 8-10 มิลลิเมตร) เมื่อเลี้ยงในอาหาร Pikovskaya agar medium ซึ่งมี tricalcium phosphate อยู่

4.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเป้าหมาย

4.4.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Burkholderia cenocepacia* A29

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 พบว่า มีสภาวะที่เหมาะสม คือ กล้าเชื้อเริ่มต้น 5% มี pH เริ่มต้นของอาหาร เท่ากับ 5.5 อุณหภูมิที่ใช้บ่ม 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที จากผลการทดลอง พบว่า มีการลดลงของค่า pH ในทุกสภาวะที่ทำการทดสอบ อาจเกิดจาก *B. cenocepacia* A29 มีการผลิตฮอร์โมนพืช IAA ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Mandira และคณะ (2009) ได้ทดสอบกับ *Azospillium brasilense* ในการสังเคราะห์ indole-3- acetic acid โดยการแปรผันอุณหภูมิ (25-37 องศาเซลเซียส) และ pH (5.2-7.8) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 30 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการศึกษานี้ และ pH ที่เหมาะสม คือ 5.2 และ 6.2 (การศึกษานี้ คือ pH 5.5) นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของยีน (gene) ที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ Trp-transaminase และ indole -3- acetaldehyde dehydrogenase ใน pathway IPyA ทำหน้าที่ได้ดีในช่วง pH 5.5 - 8.0 และจากรายงานของ Oh และคณะ (2003) พบว่า การลดลงของค่า pH อาจเป็นเพราะการใช้กลูโคสของแบคทีเรีย โดยพบว่า *Citrobacter* sp. Y19 ทำให้ค่า pH ในอาหารลดลง โดยสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคสที่ลดลงไปด้วย ซึ่งในอาหาร N_2-free medium มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน โดยซูโครสเป็นน้ำตาล disaccharide เมื่อแบคทีเรียมีการนำไปใช้ก็จะได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กลง คือ กลูโคส และ ฟรุคโตส นอกจากนี้ฮอร์โมนพืช IAA ก็มีสภาวะความเป็นกรดขณะที่แอมโมเนียมอิออนก็อยู่ในรูปอิสระ ไม่มีการรวมตัวกับ anion อื่นๆ จึงไม่มีผลต่อความเป็นกรด-ด่าง

ส่วนการผลิตฮอร์โมนพืช Gibberellic acid ซึ่งบางครั้งมีการตรวจพบ แต่บางครั้งก็ตรวจไม่พบ อาจเนื่องมาจากกลไกในการผลิตฮอร์โมนพืช Gibberellic acid เกิดจากการใช้ Acetyl Co-A เป็น intermediate (การเกิด Acetyl Co-A เกิดจาก decarboxilation ของ puruvic acid) ในการผลิต mevalonic acid (MVA) เพื่อผลิตเป็นฮอร์โมนพืช Gibberellic acid ในขณะที่การผลิต indole-3-acetic acid (IAA) ต้องใช้ pyruvic acid ใน indole -3-pyruvic acid (IPyA) pathway ดังนั้นปริมาณของ pyruvic acid จึงต้องมีปริมาณที่มากพอ เพื่อนำไปใช้ในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid นอกจากนี้จากการรายงานของ Marco และ

คณะ (2004) ได้ทดสอบการผลิตฮอร์โมนพืช Gibberellic acid จากเซลล์ที่อยู่อย่างอิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง โดยเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย glucose (25.0 g/L), KH_2PO_4 (5.0 g/L), NH_4NO_3 (1.33 g/L), และ $MgSO_4$ (1.0 g/L) ซึ่งพบว่าในการผลิตฮอร์โมนพืช Gibberellic acid ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ง่ายต่อการนำไปใช้โดยแบคทีเรียมากกว่าซูโครส (ในการทดลองนี้ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน) ดังนั้นบางครั้งจึงมีการตรวจพบ อาจเป็นเพราะมีปริมาณของ pyruvic acid ที่มากพอที่เปลี่ยนเป็น Acetyl Co-A ที่เพียงพอในการนำไปผลิตฮอร์โมนพืช Gibberellic acid ดังกล่าวแล้ว

เมื่อพิจารณากล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่ากล้าเชื้อเริ่มต้น 5% มีการเจริญดีที่สุด ซึ่งสามารถปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนได้ในปริมาณสูงสุด นอกจากนี้ยังสามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้อีกด้วย การที่ใช้กล้าเชื้อมากกว่า 5% (10%) ให้ผลของการเจริญได้ไม่ดี อาจเนื่องจากสารอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรียไม่เพียงพอต่อจำนวนเชื้อที่ใส่ลงไป ซึ่งมีจำนวนมากเกินไป ส่งผลให้มีการปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมได้น้อยลง (รูปที่ 3.9) ส่วนผลของการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 150 200 และ 250 รอบ/นาที พบว่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที แบคทีเรียมีการเจริญได้ดีที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มตรึงไนโตรเจนจากอากาศต้องมีการหายใจอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันเอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพล็กส์ (Nitrogenase complex) เสียสภาพ เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกยับยั้งเมื่อถูกออกซิเจน (ดวงพร, 2545) แต่ถ้ามีการเขย่าที่มากเกินไป (250 รอบ/นาที) ก็อาจทำให้มีปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไป ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพล็กส์โดยออกซิเจน ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาจึงลดลง

จากการศึกษาการทดสอบยืนยันสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 พบว่า มีการปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออน (269.40 มิลลิกรัม/ลิตร) ขณะที่การทดลองก่อนหน้านี้ คือ การทดสอบการคัดเลือกเชื้อเป้าหมาย มีการปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออน 269 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะว่าการทดสอบสภาวะที่เหมาะสม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับการทดสอบก่อนหน้านี้ นั่นคือ ยังคงใช้อุณหภูมิในการบ่ม 30 องศาเซลเซียส แต่เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ขณะที่การทดสอบก่อนหน้านี้เขย่าที่ 150 รอบ/นาที ซึ่งจากผลการทดสอบการเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ (100 , 150 , 200 , 250 รอบ/นาที) พบว่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที มีการปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออน 211.67 มิลลิกรัม/ลิตร ขณะที่เมื่อเขย่าที่ 200 รอบ/นาที มีการปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออน 281.41 มิลลิกรัม/ลิตร จากผลการทดลองจึงพบว่า การเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 หรือ 200 รอบ/นาที มีการปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่า pH เริ่มต้น พบว่า เมื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสม มีค่า pH เริ่มต้นที่

เหมาะสม คือ pH 5.5 ขณะที่การทดลองก่อนหน้านี้ pH เริ่มต้น คือ 6.8 ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสม (pH 5.5) อาจเกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมนพืชดังกล่าวมาแล้ว

ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการเลี้ยงมีค่าลดลง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบในแต่ละสภาวะ นอกจากนี้ยังมีการสร้างฮอร์โมน indole -3-acetic acid (IAA) แต่ไม่มีการสร้างฮอร์โมน Gibberellic acid และ Cytokinin ในที่นี้ใช้ Zeatin เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 54 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Martens และ Frankenberger (1991) พบว่า indole -3-acetic acid (IAA) ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ดิน หลังจากการบ่มเป็นเวลา 1-3 วัน (การศึกษาครั้งนี้เลี้ยงเป็นระยะเวลา 54 ชั่วโมง ก็สามารถตรวจพบฮอร์โมนพืช IAA ได้เช่นเดียวกัน) ซึ่งผลิตได้ 1-13 µg/g ดิน และพบว่าความเข้มข้นของ IAA สูงที่สุด เมื่อบ่มหลังจาก 5 วัน และลดลงเมื่อบ่มเป็นเวลามากขึ้น

4.4.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus cereus* B36

จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. cereus* B36 ค่า pH ในอาหารหลังการเลี้ยงลดลงในทุกสภาวะที่ทำการทดสอบ ซึ่งมีรายงานว่า การลดลงของค่า pH อาจเกิดจาก จุลินทรีย์ผลิตกรดอินทรีย์ออกมา (Vassilev และคณะ, 2001; Whitelaw และคณะ, 1999) จากการที่แบคทีเรียมีการใช้กลูโคส โดยในอาหาร NBRIP ประกอบด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้มีรายงานว่า *Citrobacter* sp. Y19 ทำให้ค่า pH ในอาหารลดลง โดยสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคสที่ลดลงไปด้วย (Oh และคณะ, 2003) ในขณะที่ Illmer และ Schinner (1995) ได้รายงานว่า การลดลงของค่า pH อาจเกิดจากการแลกเปลี่ยนธาตุอาหารบริเวณผิวของเซลล์โดยกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทส (ATPase) ทำให้มีไฮโดรเจนในอาหารเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ยังไม่สามารถตอบได้ว่าเกิดจากสาเหตุใด จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

จากการศึกษาการทดสอบยืนยันสภาวะที่เหมาะสม พบว่า จุลินทรีย์สามารถนำฟอสฟอรัสในรูปอนินทรีย์ฟอสฟอรัสไปใช้ได้ อาจเป็นเพราะแบคทีเรียมีการผลิตกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตกรดอินทรีย์ออกมาเพื่อช่วยละลายอนินทรีย์ฟอสฟอรัสในดิน มีรายงานว่า กรดอินทรีย์สามารถที่จะไปลดความเป็นพิษของธาตุประจุบวกบางชนิด และป้องกันไม่ให้ธาตุประจุบวกเข้าไปตกตะกอนกับฟอสฟอรัสได้ เช่น อะลูมินัม เหล็ก แคลเซียม เป็นต้น โดยกรดอินทรีย์เหล่านี้จะเป็นคีเลต (chelate) กับธาตุประจุบวกดังกล่าว และทำให้อยู่ในรูปที่ใช้ได้ เพราะทำให้ธาตุเหล่านี้ไม่สามารถไปตกตะกอนกับฟอสฟอรัสได้ (Kpomblekou-A และ Tabatabai, 2003; Shahandeh และคณะ, 2003; Dakora และ Phillips, 2002; Rodriguez และ Fraga, 1999; Whitelaw และคณะ, 1999) และจากผลการทดลอง พบว่า

การละลายของฟอสเฟตมีปริมาณมากขึ้นตามค่า pH ที่ลดลง แสดงว่าสภาพของความเป็นกรดทำให้ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปไม่ละลายมาอยู่ในรูปที่ละลายได้ แม้ว่าการทดลองนี้ไม่สามารถระบุได้ว่า สภาพความเป็นกรดเกิดจากสาเหตุอะไรดังกล่าวมาแล้ว และในการทดลองครั้งนี้ พบว่า มีการละลายฟอสเฟต คือ 10.40 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่ Babita และคณะ (2009) ได้ทดสอบการละลายฟอสเฟตของ *Psuedomonas* สายพันธุ์ BFPB9 สามารถละลายฟอสเฟตได้ 33 มิลลิกรัม/ลิตร ขณะที่สายพันธุ์ FP12 สามารถละลายฟอสเฟตได้ 74 มิลลิกรัม/ลิตร และสายพันธุ์ FP13 สามารถละลายฟอสเฟตได้ 63 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ซึ่งเมื่อเทียบกับผลการทดลองในครั้งนี้มีการละลายฟอสเฟตที่น้อยกว่า อาจเป็นเพราะว่าในการทดลองครั้งนี้ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงที่น้อยกว่า (เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง) ส่งผลให้มีค่าการละลายฟอสเฟตที่น้อยกว่า แต่ถ้ามีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานกว่านี้ การละลายฟอสเฟตอาจมีปริมาณที่มากขึ้นก็เป็นได้

ส่วนในการยับยั้งเชื้อรา (*R. solani* และ *P. grisea*) พบว่า ไม่มีการยับยั้ง หรือถ้ามีการยับยั้ง ก็มีการยับยั้งได้น้อย อาจเป็นเพราะว่า เวลาที่ใช้ในการบ่มสิ้นสุดที่เวลาเข้าสู่ช่วง Stationary phase (ขณะที่การทดลองการคัดเลือกแบคทีเรียเป้าหมาย ให้ผลการยับยั้งได้ดี โดยมีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* 67.35% และยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* 31.68% ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง) และเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ขณะที่ในการทดลองนี้ใช้อาหาร NBRIP จากผลการทดลองนี้ อาจบ่งชี้ว่ากลไกในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืช เกิดจากการสร้างสารปฏิชีวนะ เพราะการสร้างสารปฏิชีวนะจะสร้างในช่วง Stationary phase (Nakano และคณะ, 1881; Chevanet และคณะ, 1985; Besson และคณะ, 1987) และจากการรายงานของ El-hamsharg และคณะ (2008) พบว่า *Bacillus subtilis* BsGh-18 และ *Bacillus cereus* Nv-29 สามารถยับยั้ง *Fusarium solani* ได้หลังจาก 72-168 ชั่วโมง ในขณะที่การทดลองครั้งนี้ใช้เวลาในการบ่ม 36 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงสำหรับทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

4.5 การผลิต Siderophores ใน *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

จากผลการศึกษาการผลิต Siderophores ทั้งใน *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีการสร้าง Siderophores ซึ่ง Siderophores จะทำหน้าที่จับกับธาตุเหล็ก (Fe^{+3}) เมื่อภายในเซลล์ขาดธาตุเหล็ก หรือเซลล์อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีธาตุเหล็กอย่างจำกัด ทำให้เซลล์มีธาตุเหล็กใช้สำหรับการเจริญ ส่งผลให้เป็นผู้แข่งขันที่ดี จากการรายงานที่ผ่านมา *B. cenocepacia* สามารถสร้าง Siderophores 4 ชนิด คือ ornibactin (Stephan และ

คณะ, 1993) pyochelin (Sokol, 1986) salicyclic acid (SA) (Visca และคณะ, 1993) และ cepbactin (Meyer และคณะ, 1989) แต่จากผลการทดลองพบว่า *B. cenoceepacia* A29 ไม่มีการสร้าง Siderophores อาจเป็นเพราะว่าในอาหาร N_2-free medium มี $FeSO_4$ เป็นองค์ประกอบ ทำให้ *B.cenocepacia* A29 ไม่ขาดธาตุเหล็ก ดังนั้นจึงไม่มีการสร้าง Siderophores และจากผลการทดลองอาจบ่งชี้ได้ว่า *B. cenocepacia* A29 ไม่เป็นแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) เนื่องจากไม่มี Siderophores ไปจับกับธาตุเหล็กของ host เนื่องจาก จากการรายงานของ Partricia และคณะ (1998) พบว่า *Burkholderia cepacia* มีการผลิต Siderophores คือ pyochilin และ salicyclic acid (SA) ซึ่ง *B. cepacia* ที่ได้ แยกได้จากผู้ป่วย Cystic fibrosis (CF) และจากการรายงานที่ผ่านมา พบว่า *B. cereus* สามารถผลิต catechol siderophore(s) (Ra-Yong และคณะ, 2005) แต่ก็มีการรายงานของ Sato และคณะ (1999) ที่พบว่า *Bacillus cereus* ไม่มีความสามารถในการผลิต siderophore ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร CAS agar พบว่า *B. cereus* B36 ไม่มีการสร้าง siderophore

4.6 การเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Burkholderia cenocepacia* A29 และ *Bacillus cereus* B36

เมื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงร่วมกัน โดยใช้ *B. cenocepacia* A29 5 % และ *B. cereus* B36 5 % พบว่า *B. cenocepacia* A29 มีการยับยั้ง *B. cereus* B36 (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ดังนั้นจึงมีการลดปริมาณกล้าเชื้อของ *B. cenocepacia* A29 เป็น 2.5 % ส่วนกล้าเชื้อของ *B. cereus* B36 ยังคงเท่าเดิม คือ 5 % ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการใช้กล้าเชื้อของ *B. cenocepacia* A29 2.5 % ไม่มีผลในการยับยั้ง *B. cereus* B36 แต่ยังสามารถส่งเสริมให้ *B. cereus* B36 เจริญได้ดีกว่าในชุดควบคุมที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว และ *B. cereus* B36 ก็ไม่มีผลในการยับยั้ง *B. cenocepacia* A29 เช่นเดียวกัน (รูปที่ 3.44) ในขณะที่ผลการทดลองของ El-hamskary และคณะ (2008) พบว่า *Bacillus cereus* สามารถผลิตสารเพื่อต้านแบคทีเรียตัวอื่นๆ แต่ไม่พบในการศึกษานี้

ปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่า ในชุดทดสอบที่มีแบคทีเรียผสมระหว่าง *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 มีปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุด (6.10 มิลลิกรัม/ลิตร) รองลงมา คือ ในชุดควบคุมที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว (5.43 มิลลิกรัม/ลิตร) และในชุดควบคุมที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว (4.72 มิลลิกรัม/ลิตร) ตามลำดับ แต่ปริมาณแอมโมเนียมอิออนในชุดทดสอบและชุดควบคุมก็ยังถือว่ามีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับการผลิตปริมาณแอมโมเนียมอิออนจากการทดลองที่ผ่านมา (> 200 มิลลิกรัม/ลิตร)

สาเหตุเป็นเพราะว่าในการทดลองนี้ใช้อาหาร NBRIP ซึ่งในส่วนประกอบของอาหารมี Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนอยู่แล้ว *B. cenocepacia* A29 จึงมีการตรึงไนโตรเจนจากอากาศน้อยลง ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยมีปริมาณน้อย และอาจเป็นเหตุผลที่ตรวจพบแอมโมเนียมอิออนในอาหารที่เลี้ยง *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว ซึ่งไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่มีการตรวจพบแอมโมเนียมอิออน เพราะมาจากการที่เซลล์เจริญแล้วปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออนออกมา (Ammonification)

ส่วนการละลายฟอสเฟตในชุดเพาะเลี้ยงร่วมกัน (ลดลงจาก 19.38 ที่เวลาเริ่มต้น – 0 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เวลา 54 ชั่วโมง) และชุดควบคุมที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว (ลดลงจาก 22.44 ที่เวลาเริ่มต้น – 0 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เวลา 54 ชั่วโมง) ซึ่งลดลงเมื่อเวลาผ่านไป แต่ในชุดควบคุมที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว พบว่า การละลายฟอสเฟตมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป (เพิ่มขึ้นจาก 11.43 ที่เวลาเริ่มต้น - 32.99 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เวลา 54 ชั่วโมง) (รูปที่ 3.42) จากผลการทดลองสามารถบ่งชี้ได้ว่า *B. cenocepacia* A29 มีการใช้ฟอสเฟตในรูปที่สามารถละลายได้ ซึ่งพิจารณาได้จากในชุดเพาะเลี้ยงร่วมกันและชุดควบคุมที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ชุดควบคุมที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียวมีค่าการละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และปริมาณที่ผลิตได้ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* BFPB9 ที่ละลายฟอสเฟตได้ 33 มิลลิกรัม/ลิตร (Babita และคณะ, 2009)

สำหรับการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 54 ชั่วโมง ในชุดเพาะเลี้ยงร่วมกัน มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* 38.22% และ 27.23% ตามลำดับ โดยการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นบทบาทของ *B. cereus* B36 เป็นหลัก เพราะในชุดควบคุมที่มี *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว (49.65% สำหรับ *R. solani* และ 34.62% สำหรับ *P. grisea*) มีการยับยั้งสูงกว่าในชุดควบคุมที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว (15.80% สำหรับ *R. solani* และ 14.08% สำหรับ *P. grisea* ดังรูปที่ 3.43) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในการคัดเลือกเชื้อเป้าหมาย เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย *B. cereus* B36 มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* เกิดขึ้น (67.35% และ 31.68% ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.5) แต่ในกรณีที่มีการยับยั้งต่ำกว่า เป็นเพราะในการทดสอบเพาะเลี้ยงร่วมกันใช้อาหาร NBRIP ขณะที่การทดลองคัดเลือกเชื้อเป้าหมายใช้อาหาร Nutrient Broth ซึ่งเป็นอาหารที่แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่า และอาจเกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหาร ส่งผลให้มีการยับยั้งสูงดังกล่าวมาแล้ว และในการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญไม่มีการยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ ดังนั้นจากผลการทดลองครั้งนี้จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่า *B. cereus* B36 สร้างสารในการยับยั้งเชื้อราในช่วง stationary phase (ทดสอบเพียง 18 และ 36 ชั่วโมง)

4.7 การทดลองในน้ำเลี้ยงฟางข้าว

4.7.1 ในสภาวะที่ทำให้ปราศจากเชื้อและมีการเติมเชื้อเดี่ยว/ผสม

จากการศึกษาในอาหารสังเคราะห์ โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่า มีการลดลงของค่า pH แต่เมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำเลี้ยงฟางข้าวกลับพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของค่า pH ซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่า pH อาจมาจากเมตาบอลิซึมที่เปลี่ยนไปที่มีสาเหตุจากแหล่งคาร์บอนไม่ใช่น้ำตาล แต่เป็นสารสกัดต่างๆ ที่ออกมาจากฟางข้าว (พิจารณาจากค่า EC ที่เพิ่มขึ้น ดูรูปที่ 3.47) ส่งผลให้ค่า pH ของน้ำเลี้ยงฟางข้าวมีค่าเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาค่า EC ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณแร่ธาตุและสารประกอบที่ละลายอยู่ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวพบว่ามีค่าเริ่มต้นอยู่ในช่วง 3.70-3.95 mS/cm และมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 (3.80-10.04 mS/cm ดูรูปที่ 3.47) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรียที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.45) จากนั้นค่า EC ก็ลดลงบ้าง แต่ก็ยังสูงกว่าเมื่อเริ่มต้น จากผลการทดลองนี้ สนับสนุนว่าแบคทีเรียเจริญได้เพราะได้สารอาหารจากสารสกัดที่ออกมาจากฟางข้าว และสามารถเกิดจากกระบวนการทางเคมี-กายภาพ (ดูผลจากชุดควบคุมทางลบ มีค่า EC 4.44 – 5.77 mS/cm ขณะที่ในเชื้อเดี่ยว A29 มีค่า EC 3.28 – 9.75 mS/cm และเชื้อเดียว B36 มีค่า EC 3.73 – 9.31 mS/cm) แต่ค่า EC ที่ได้มีค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Kantachote และคณะ (2009) พบว่า น้ำหมักลูกยอป่า มีค่า EC อยู่ระหว่าง 12.2 – 15.39 mS/cm ซึ่งเกิดจากการเจริญของแบคทีเรียแลคติก และ ค่า pH ที่ลดลงมีผลทำให้สารอาหารพืชจากลูกยอป่าอยู่ในรูปละลายได้มากขึ้น และเป็นเพราะลูกยอป่ามีความง่ายในการนำมาใช้มากกว่าเมื่อเทียบกับฟางข้าวที่มีองค์ประกอบหลักเป็น เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) และสภาวะที่เป็นด่างทำให้สารเหล่านี้ถูกสกัดออกมา โดยได้มีการรายงานของ Yanfeng และคณะ (2008) ได้ใช้ 6% NaOH ในการสกัดฟางข้าว เพื่อผลิตเป็นแก๊สชีวภาพ (Biogas) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณแก๊สชีวภาพ 27.3 – 64.5%

ส่วนการละลายฟอสเฟตก็ยังคงเกิดขึ้นอยู่ถึงแม้สภาวะเป็นด่าง ซึ่งอาจมีกลไกของเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น เอนไซม์ฟอสฟาเทส ได้มีรายงานว่า มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถปลดปล่อยเอนไซม์ฟอสฟาเทสได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus* sp. *Bacillus amyloliquefaciens Bacillus subtilis Enterobacter* sp. *Escherichia coli Klebsiela terrigena Pseudomonas* sp. *Megasphaera elsdenii Mitsuokella multiacidus Prevotella ruminicola Selenomonas ruminantium* และ *Treponema* sp. เป็นต้น (Vats และ Banerjee, 2004) จากผลการทดลอง พบว่า ชุดเชื้อเดียว A29 มีการละลายฟอสเฟตสูงสุด (55.47 มิลลิกรัม/ลิตร) ซึ่งสูงกว่าชุดเชื้อเดี่ยว B36 (46.75 มิลลิกรัม/ลิตร) อาจเป็นเพราะ *B. cenocepacia* A29 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อเอง มีคุณสมบัติในการละลาย

ฟอสเฟต แต่ไม่ได้มีการทดสอบก่อนหน้านี้ ส่งผลให้ชุดเชื้อผสม มีการละลายฟอสเฟตที่สูง (49.66 มิลลิกรัม/ลิตร) และเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cereus* B36 (47.82 มิลลิกรัม/ลิตร) โดยเกิดจากการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ซึ่งผลที่ได้นี้แตกต่างกับการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ อาจเป็นเพราะว่า ในอาหารสังเคราะห์มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินพอทำให้ฟอสเฟตถูกนำไปใช้ในการเจริญ ส่งผลให้เมื่อเวลาผ่านไป (48 ชั่วโมง) ไม่มีฟอสเฟตที่อยู่ในรูปละลาย (รูปที่ 3.42) ขณะที่ในน้ำเลี้ยงฟางข้าว พบว่า มีปริมาณของฟอสเฟตที่อยู่ในรูปละลายได้มากพอต่อการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด (ดูจากชุดควบคุมทางลบที่มีการละลายฟอสเฟตเกิดขึ้นน้อยมาก โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี-กายภาพ) เป็นเพราะว่ามีปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่จำกัด เมื่อเทียบกับอาหารสังเคราะห์

สำหรับการปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนในสัปดาห์ที่ 3 ของชุดทดสอบเชื้อผสมสูงกว่า (111.8 และ 94.44 มิลลิกรัม/ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 ตามลำดับ ดูรูปที่ 3.49) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทางลบ (50.21 มิลลิกรัม/ลิตร) จากผลการทดลองบ่งชี้ว่าในชุดควบคุมทางลบจากกระบวนทางเคมี-กายภาพ ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียมได้เช่นเดียวกัน หรือเป็นแอมโมเนียที่มากับน้ำที่ใช้ (ปริมาณไม่แตกต่างตลอดการทดลอง) เพราะตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อ (ปราศจากเชื้อ) แต่ในผลการทดลองของชุดทดสอบเชื้อผสมเกิดจาก *B. cenocepacia* A29 ที่เติมลงไป โดยดูได้จากชุดเชื้อเดี่ยว ซึ่งมี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว (มีการปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออน 90.84 มิลลิกรัม/ลิตร รูปที่ 3.49)

ส่วนผลของการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 ชุดที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด (50.83%) (รูปที่ 3.50) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้ มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืช นอกจากนี้ผลของการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 ทุกชุดการทดสอบมีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* สูงสุด (18.90 – 40.39%) ยกเว้นในชุดที่มี *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว พบว่ามีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ใกล้เคียงกับชุดควบคุมทางลบ (รูปที่ 3.51) แสดงว่าสารที่สร้างโดย *B. cenocepacia* A29 ไม่มีผลในการยับยั้ง *P. grisea* ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นในชุดควบคุมทางลบ อาจเกิดจากสารที่ละลายอยู่ในน้ำเลี้ยงฟางข้าวเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี-กายภาพ ดังกล่าวมาแล้ว

4.7.2 ในสภาวะที่มีเชื้อจากธรรมชาติ

จากการศึกษาผลของการเจริญของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 และค่า pH ในสภาวะที่มีเชื้อจากธรรมชาติ พบว่า ให้ผลไปในทิศทางเดียวกับในสภาวะทำให้

ปราศจากเชื้อ แต่ผลของค่า EC พบว่า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 3.54) อาจเป็นเพราะในการทดสอบครั้งนี้เป็นการทดสอบในสภาวะที่มีเชื้อจากธรรมชาติร่วมด้วย ซึ่งมีแบคทีเรียหลายชนิดเจริญร่วมกัน (ดูได้จากชุดควบคุมธรรมชาติ รูปที่ 3.52 A และ C) ส่งผลให้มีการย่อยสลายของฟางข้าวเพิ่มขึ้น โดยในชุดควบคุมธรรมชาติ พบว่า มีแบคทีเรียพวก heterotroph แบคทีเรียในวงศ์ Azotobacteraceae และ *Bacillus* sp. จากผลการทดลองนี้ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่ปลดปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงฟางข้าวมีปริมาณน้อยกว่า (36.47 - 49.17 มิลลิกรัม/ลิตร ดังรูปที่ 3.56) เมื่อเทียบกับการทดสอบในสภาวะทำให้ปราศจากเชื้อ (34.54 - 51.95 มิลลิกรัม/ลิตร รูปที่ 3.49) อาจเป็นเพราะมีการนำแอมโมเนียมอิออนไปใช้เพื่อการเจริญ โดยแบคทีเรียในธรรมชาติ และจากผลการทดลองพบว่า ในสภาวะที่มีเชื้อจากธรรมชาติ ในสัปดาห์ที่ 1 มีการปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุดในทุกชุดการทดลอง โดยเฉพาะในชุดควบคุมธรรมชาติ มีการตรวจพบปริมาณแอมโมเนียมอิออน เพราะมีการตรวจพบเชื้อที่ตรึงไนโตรเจน แต่พบเชื้อในปริมาณที่น้อย ขณะที่ชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีการปลดปล่อยแอมโมเนียมอิออนสูงที่สุด (51.95 และ 51.72 มิลลิกรัม/ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36) จากผลการทดลองจึงสามารถบ่งชี้ได้ว่า สามารถนำน้ำเลี้ยงฟางข้าวใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ในสัปดาห์ที่ 1 เพราะมีปริมาณเชื้อสูงสุด (รูปที่ 3.52 และ 3.56)

สำหรับผลของการละลายฟอสเฟต ผลที่ได้สอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งเจริญเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 ในขณะที่การรายงานของ Kim และคณะ (1998) พบว่า ในชุดควบคุม และชุดมีเชื้อ *Glomus etunieatum* แบคทีเรียละลายฟอสเฟต ในสภาวะที่มีเชื้อจากธรรมชาติ มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจาก 35 วัน แต่มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุดมีเชื้อ *Enterobacter agglomerans* อย่างเดียว และชุดที่มีเชื้อผสมระหว่าง *Enterobacter agglomerans* และ *Glomus etunieatum*) สำหรับการทดลองครั้งนี้แบคทีเรียใช้เวลาเพียง 7 วัน ในการเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น (รูปที่ 52) นอกจากนี้จากผลการทดลอง พบว่า ในชุดที่ A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ ซึ่งมีการเติมกล้าเชื้อ (4.97 CFU/ml) *B. cenocepacia* A29 เพียงอย่างเดียว และชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ ซึ่งผสมระหว่าง *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 มีการละลายฟอสเฟตสูงกว่าในชุดมีการเติม *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว (B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ ดังรูปที่ 3.55) อาจเป็นเพราะเชื้อจากธรรมชาติร่วมกับ *B. cenocepacia* A29 ซึ่งมีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตเช่นเดียวกัน (รูปที่ 3.48) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Selveraj และคณะ (2007) พบว่า *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ CBMB 40 สามารถละลายฟอสเฟต และผลิต IAA ได้ นอกจากนี้ที่เวลาสุดท้าย (สัปดาห์ที่ 4 ในการทดลองนี้) การละลายฟอสเฟตลดลง อาจเกิดจากผลของฟอสเฟตที่อยู่ในรูปละลาย ถูก

นำไปใช้เพื่อการเจริญของเชื้อ และได้มีรายงานว่าเมื่อใส่เชื้อ *Bacillus cereus* ในฝ้ายหลังจาก 72 วัน ยังคงพบ *B. cereus* ในรากและยอดของฝ้ายอยู่ นอกจากนี้ยังพบว่า *B. cereus* ไม่ทำความเสียหายให้กับส่วนอื่นๆ ทั้งความสูงและน้ำหนักสดของพืชเพิ่มขึ้น (Shlomo และคณะ, 1995) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สำหรับการศึกษานี้ เมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลานานกว่า 30 วัน อาจจะยังคงมีเชื้อ *B. cereus* อยู่

ส่วนผลของการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* พบว่า ชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด (46.76 และ 53.53% ในสัปดาห์ที่ 1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.57) และสามารถยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ได้ในสัปดาห์ที่ 2 (27.06 และ 37.33% ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 ตามลำดับ) (รูปที่ 3.58) แต่ผลการทดลองที่ได้พบว่า เกิดจาก *B. cenocepacia* A29 เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า (38.88% ในการยับยั้ง *R. solani* และ 33.20% ในการยับยั้ง *P. grisea*) เมื่อเทียบกับ *B. cereus* B36 (30.51% ในการยับยั้ง *R. solani* และ 27.76% ในการยับยั้ง *P. grisea*) ดังรูปที่ 3.54 และ 3.55 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในสภาวะทำให้ปราศจากเชื้อ (กรณีการยับยั้ง *R. solani*) โดยผลการทดลองที่ได้ก็เกิดจาก *B. cenocepacia* A29 เช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองสามารถบ่งชี้ได้ว่า *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 สามารถนำมาเลี้ยงในน้ำเลี้ยงฟางข้าวที่ไม่จำเป็นต้องทำให้ปราศจากเชื้อได้ เนื่องจากให้ผลของการปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออน (51.95 และ 51.72 มิลลิกรัม/ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereous* B36 ตามลำดับ รูปที่ 3.56) และการละลายฟอสเฟต (51.19 และ 50.87 มิลลิกรัม/ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereous* B36 ตามลำดับ รูปที่ 3.55) ในสัปดาห์ที่ 1 สูงกว่าในการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (ปริมาณแอมโมเนียมอิออน เท่ากับ 6.101 มิลลิกรัม/ลิตร และไม่มีการละลายฟอสเฟต ที่เวลาสุดท้าย (54 ชั่วโมง)) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพในการเกษตร (เป็นการมุ่งหวังที่ตัวเซลล์ที่จะไปตรึงแก๊สไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตหรือฟอสฟอรัส) และจากผลการทดลองที่ได้ พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะเดียวกันได้ ซึ่งใช้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เพราะธาตุอาหารพืช (แอมโมเนียมอิออนและฟอสเฟต) ไม่ต่างกัน และที่สำคัญคือ มีปริมาณ *B. cenocepacia* A29 (5.90 CFU/ml) และ *B. cereous* B36 สูง (7.39 CFU/ml ดังรูปที่ 3.49) ในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งเมื่อใช้ระยะเวลานานกว่า 30 วันอาจจะยังคงตรวจพบเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ได้อีก ทำให้เป็นผลดีต่อการนำไปใช้ โดยสามารถนำไปใช้ได้ในระยะเวลาที่นานขึ้นด้วยต้นทุนต่ำจากการเลี้ยงในน้ำเลี้ยงฟางข้าวโดยไม่ต้องทำให้ปราศจากเชื้อ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียในวงศ์ Azotobacteraceae พบว่า สามารถแยกเชื้อได้ 252 ไอโซเลท (96.92%) ส่วน *Bacillus* spp. สามารถแยกได้ 196 ไอโซเลท (75.38%) จากตัวอย่างทั้งหมด 260 ตัวอย่าง (ดินและน้ำ) จากนาข้าว

2. ผลการคัดเลือกเชื้อเป้าหมายของแบคทีเรียในวงศ์ Azotobacteraceae ได้ไอโซเลท A29 ที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารปราศจากแหล่งไนโตรเจน และปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนได้สูง (269 มิลลิกรัม/ลิตร) นอกจากนี้สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้ ส่วน *Bacillus* sp. ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดี คัดเลือกได้ไอโซเลท B36 และในอาหาร NB ยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ได้ 67.35 และ 31.68 % ตามลำดับ

3. ผลการเทียบเคียงแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก พบว่า ไอโซเลท A29 คือ *Burkholderia cenocepacia* ส่วน *Bacillus* sp. ไอโซเลท B36 คือ *Bacillus cereus*

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและปลดปล่อยแมโมเนียมของ *B. cenocepacia* A29 พบว่า ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสม คือ 5% pH เริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที สามารถปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนได้ 269.40 มิลลิกรัม/ลิตร และผลิตฮอร์โมนพืช indole -3-acetic acid (IAA) ส่วน *B. cereus* B36 พบว่า ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสม คือ 5% pH เริ่มต้น 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ซึ่งสามารถละลายฟอสเฟต 10.04 มิลลิกรัม/ลิตร

5. การเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด (*B. cenocepacia* A29 2.5% และ *B. cereus* B36 5%) ในอาหาร NBRIP สูตรดัดแปลง พบว่า ไม่มีการยับยั้งซึ่งกันและกัน และยังสามารถส่งเสริมการเจริญของ *B. cereus* B36 เจริญดีกว่า (117.21%) ชุดควบคุม ซึ่งมีแบคทีเรีย *B. cereus* B36 เพียงอย่างเดียว (100.00%) แต่ในชุดเชื้อผสมปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออนเพียง 6.10 มิลลิกรัม/ลิตร และมีการละลายฟอสเฟตลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (ลดลงจาก 19.38 – 0 มิลลิกรัม/ลิตร) และยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ได้ 38.22% และ 27.23% ตามลำดับ

6. การเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงฟางข้าว ในสภาวะที่ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยว/ผสม พบว่า ในชุดควบคุมทางลบตรวจไม่พบเชื้อ และ *B. cenocepacia* A29 ในชุดเชื้อผสม เมื่อเพาะเลี้ยงทั้ง 2 สภาวะ (สภาวะ A29 และ B36) มีปริมาณสูงกว่าการเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว ขณะที่ *B. cereus* B36 ในชุดเชื้อผสมมีการเจริญต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว

การละลายฟอสเฟตพบว่า ชุดควบคุมทางลบมีการละลายฟอสเฟตเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน (37.43 - 46.06 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนชุดทดสอบอื่นๆ การละลายฟอสเฟตมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุมทางลบ และพบว่าเชื้อเดี่ยว A29 มีการละลายฟอสเฟตสูงสุด (55.47 มิลลิกรัม/ลิตร) ในสัปดาห์ที่ 3

ปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่า ชุดควบคุมทางลบมีการปลดปล่อยปริมาณแอมโมเนียมอิออน (42.02 - 56.67 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนชุดทดสอบอื่นๆ (ชุดเชื้อเดี่ยว A29 และชุดเชื้อผสม) มีปริมาณแอมโมเนียมอิออนเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และมีปริมาณสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 (90.84 – 111.80 มิลลิกรัม/ลิตร) โดยพบว่า ชุดเชื้อผสม เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 มีปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุด (111.8 มิลลิกรัม/ลิตร)

การยับยั้งเชื้อรา *R. solani* พบว่า ชุดควบคุมทางลบมีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* (6.60 - 30.97%) สำหรับชุดเชื้อเดี่ยว A29 ในสัปดาห์ที่ 2 มีการยับยั้งเชื้อราสูงสุด (50.83%) ส่วนชุดเชื้อผสมมีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* 41.13% และ 42.64% เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของ *B. cenocepacia* A29 และ *B. cereus* B36 ตามลำดับ ขณะที่ในชุดเชื้อเดี่ยว B36 มีการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* สูงสุด (32.20%)

การยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* พบว่า ชุดควบคุมทางลบมีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* (0.86 - 18.31%) ส่วนชุดทดสอบอื่นๆ (ชุดเชื้อเดี่ยว A29 ชุดเชื้อเดี่ยว B36 และชุดเชื้อผสม) ไม่มีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ที่เวลาเริ่มต้น และมีการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 (18.90 – 40.39%)

7. การเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงฟางข้าว ในสภาวะที่ไม่ทำให้ปราศจากเชื้อ และมีการเติมเชื้อเดี่ยว/ผสม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ในชุดเชื้อผสมมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยวทั้ง 2 สภาวะ นอกจากนี้แบคทีเรียพวก heterotroph พบได้ในปริมาณสูง (5.17-8.45 CFU/ml และ 5.11-8.23 CFU/ml ภายใต้สภาวะ A29 และ B36 ตามลำดับ) และจากผลการทดลองพบว่า ในชุดควบคุมธรรมชาติ ซึ่งไม่เติมกล้าเชื้อ ยังพบแบคทีเรียในวงศ์ Azotobacteraceae และ *Bacillus* sp. แต่มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ และชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ

การละลายฟอสเฟตพบว่า ตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ชุดควบคุมธรรมชาติมีการละลายฟอสเฟตไม่แตกต่างกันมากนัก (42.78 – 43.77 มิลลิกรัม/ลิตร) ขณะที่ชุดทดสอบอื่นๆ (ชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ และ ชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ) มีการละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีการละลายฟอสเฟตสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 (57.00 มิลลิกรัม/ลิตร) และสูงกว่าในชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ (53.79 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนชุดเชื้อผสม พบว่า มีการละลายฟอสเฟตสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ทั้ง 2 สภาวะการเลี้ยง 57.00 และ 57.7 มิลลิกรัม/ลิตร

ปริมาณแอมโมเนียมอิออน พบว่า ทุกชุดทดสอบมีปริมาณแอมโมเนียมอิออนใกล้เคียงกับชุดควบคุมธรรมชาติ โดยมีปริมาณแอมโมเนียมอิออนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 (49.17 – 51.95 มิลลิกรัม/ลิตร)

การยับยั้งเชื้อรา *R. solani* พบว่า ที่เวลาเริ่มต้น ชุดควบคุมธรรมชาติไม่มีการยับยังเชื้อรา *R. solani* แต่มีการยับยั้งเชื้อราสูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 (32.91%) นอกจากนี้ยังพบว่าชุดทดสอบอื่นๆ (ชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ และชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ) ยับยั้งได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 (38.88 - 53.53%) ยกเว้นชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีการยับยั้งสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 (36.57%) ส่วนชุดเชื้อผสมร่วมกับเชื้อธรรมชาติ พบว่า มีการยับยั้งสูงสุด (46.76 – 53.53% ภายใต้สภาวะ A29 และ B36) ซึ่งสูงกว่าในชุดทดสอบที่เติมเชื้อเดี่ยว

การยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* พบว่า ทุกชุดมีการยับยั้งได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 โดยในชุดควบคุมธรรมชาติยับยั้งได้ 23.15% ขณะที่ชุด A29 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ มีการยับยั้ง 33.20% ซึ่งสูงกว่าในชุด B36 ร่วมกับเชื้อธรรมชาติ (27.76%) ส่วนชุดเชื้อผสม พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ B36 มีการยับยั้ง 37.33% และสภาวะ A29 มีการยับยั้ง 27.06%

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาการละลายฟอสเฟต ควรมีการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase) เพิ่มเติม และควรศึกษาในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น
2. ควรมีการศึกษาการละลายฟอสเฟต และการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Pyricularia grisea* ของ *Burkholderia cenocepacia* A29 ในอาหารสังเคราะห์ เพื่อยืนยันผลการทดสอบในน้ำเลี้ยงฟางข้าว
3. ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการนำน้ำเลี้ยงฟางข้าวไปใช้จริง เช่น อาจมีการนำไปใช้กับเมล็ดข้าวในระดับห้องทดลองว่าสามารถส่งเสริมการงอกดีหรือไม่ หรือมีความเป็นพิษต่อพืชหรือไม่

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา ขาวผ่อง. 2551. ลักษณะของน้ำหมักลูกยอป่า (*Morinda coreia* Ham) และผลการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี (*Lycopersicon esculentum* Mill). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กรมพัฒนาที่ดิน กองสาราณียกร. 2551. ปุ๋ยอินทรีย์. วารสารอนุรักษ์ดินและน้ำ 24(1): 40-47.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2541. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 8.

จำเป็น อ่อนทอง. 2547. คู่มือการวิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาธรณีศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ.สงขลา

ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์.กรุงเทพ ฯ : โอเดียนสโตร์. 216 หน้า.

ดวงพร คันธโชติ, วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ ณรงฤทธิ์ อัศวเรืองพิภพ. 2548. ลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไทย. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 27(3): 601-615.

ธงชัย มาลา. 2546. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุญแต่ง พิมพงาน. 2547. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การพัฒนากระบวนการเรียนรู้ และถ่ายทอดวิธีการปลูกผักปลอดจากสารพิษโดยกลุ่มเกษตรกรทำสวนบ้าดอนมูลพัฒนา ตำบลคูใต้ อำเภอเมือง จังหวัดน่าน.

ประเสริฐ จริยะเลอพงษ์. 2541. การเตรียมสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปริญญา ขยันการนารี. 2549. ผลของจุลินทรีย์ดินในการผลิตปุ๋ยน้ำชีวภาพ. วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ฉบับบัณฑิตศึกษา). 6 (ฉบับพิเศษ; 2549), 11-24.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 149 หน้า.

พรศิลป์ มณีฉาย. 2546. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อการควบคุมโรคราเขียว (*Tricoderma* spp.) ของเห็ด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4 ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.: กรุงเทพฯ.

มุกดา สุขสวัสดิ์. 2544. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. กรุงเทพฯโอเดียนสโตร์. 368 หน้า

มนูญ แซ่อ่อง. 2549. จุลินทรีย์บริเวณดินกรดจัดที่สามารถเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะทรัพยากรธรรมชาติ สาขาการจัดการทรัพยากรดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

ยงยุทธ โอสถสภา, ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, อรรถศิษฐ์ วงค์มณีโรจน์ และ ชัยสิทธิ์ ทองจู. 2546. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 1- 547.

วิจิตรา จุติดำรงพันธ์ และ ดวงพร คันธโชติ . 2538. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การศึกษาคุณสมบัติและกลไกการควบคุมโรคข้าวของ *Bacillus subtilis*. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิจิตรา ลีละศุภกุล และ ดวงพร คันธโชติ. 2543. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การพัฒนา Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ.

วิเชียร จาฏุพจน์. 2548. เอกสารประกอบการสอน เรื่อง ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุพจน์ ชัยวิมล. 2544. ปุ๋ยน้ำชีวภาพ เอกสารวิชาการกองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร

สุริยา สาสนรักกิจ, อัจฉรา ไชยองค์การ, เปรมสุดา สมาน, กนกอร จารุจารีต, วัชรินทร์ รัตนพันธ์, เดชา ศิลป์ศร และ ศิริพร วรดิถี. 2545. การผลิตปุ๋ยอินทรีย์และอาหารสัตว์จากขยะอินทรีย์ของชุมชน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

สำราญ สารุโณ. 2546. การผลิตพืชในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8. 64 หน้า

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2546. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เกษตรอินทรีย์เล่ม 1 การผลิต แปรรูป แสดงฉลากและจำหน่าย เกษตรอินทรีย์. กรุงเทพฯ. 38 หน้า.

Agarry, O. O. and Osho, B. I. 2005. *In-vitro* and In-vivo Inhibition of *Aspergillus fumigatus* by *Pseudomonas fluorescens* Used as a Microbial Antagonist. Pakistan Journal of Nutrition 4 (6) : 371-375.

Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. S. 2005. Indole Acetic Acid Prouction by the Indigenous Isolate of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan.Turk J Biol. 29: 29-34.

Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. S. 2006. Screening of Free-living Rhizospheric bacteria For their multiple plant growth promoting activities. Microbiology Research.

Anderson, G. 1980. Assessing organic phosphorus in soil. In the role of Phosphorus in Agriculture. (eds. Khasawneh, F.E. sample, E.C. and Kamprath, D.R.). pp 411-431. Madison. American Society of Agronomy.

Babiba, K.J., Mohandass, G.P., Jean, C., Gurusamy, R. and Natarajan S. 2009. Stimultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new

fluorescent *pseudomonas* strains, *pseudomonas aeruginosa* , *pseudomonas plecoglossicida* and *pseudomonas mosselii*. World J Microbiol Biotechnol 25: 573-581.

Baker, C.J., Stavely, J.R. and Mock, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Dis. 69: 770-772.

Barry, D.A.J. and Miller, M.H. 1989. Phosphorus nutrition requirement of maize seedlings for maximum yield. Agronomy Journal 81: 95-99.

Benyagoub, M. and Jabaji-Hare, S.H. 1992. Parasitism of hyphae and sclerotia of *Rhizoctonia solani* by *Stachybotrys elegans*. Phytopathology 82: 1119-1124.

Besson, F., Chevanet, C. and Michel, G. 1987. Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. Gen Microbiol. 133: 767-772.

Burk, D. 1934. Azotase and nitrogenase in *Azotobacter*. Ergeb. Enzymforsch., 3, 23-56.

Chen, Y. P., Rekha, P.D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. -A. and Young, C. C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied soil Ecology. 34 : 33-41.

Brunel, B., Périssol, C., Fernandez, M., Boeufgras, J. M. and Le Petit, J. 1994. Occurrence of *Bacillus* species on evergreen oak leaves. FEMS Microbiol. Ecol. 14: 331-342.

Chen, W. M., Faria, de S. M., Stratiott, R., Pitard, R. M., Simoes- Araujo, J. L., Chou, J. H., Chou, Y. J., Barrios, E, Prscott, A. R., Ellioh, G. N., Sprent, J. I., Young, J. P. W. and James, E. K. 2005. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes : a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. Appl Environ Microbiol 71 : 7461-7471.

Chevanet, C., Besson, F. and Michel, G. 1985. Effect of various growth condition on spore formation and bacillomycin L production in *B. subtilis*. J. Microbiol. 32: 254-258.

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clement, C. and Barka, E.A. 2005. Endophytic colonization of Vitis vinifera L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN, Appl. Environ. Microbiol. 71: 1685-1693.

Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganism for biological control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytophatho. 31: 53-80.

Claydon, N., Alan, M., Hanson, J. R. and Avent, A. G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Trans. Br. Mycol. Sec. 88: 503-513.

Dakora, F.D. and Phillips, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low – nutrient environment. Plant and Soil 245: 35 – 47.

Dalal, R.C. 1978. Soil organic phosphorus. Advances in Agronomy 29: 83-117.

De, S., M-J, B. D., Nair, S. and Chandramohan, D. 2000. Phosphate solubilizing Indian peninsula. Indian Journal of Marine Sciences. 29: 48-51.

Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by Trichoderma harzinum. Can. J. Micobiol. 28: 719-725.

El-hamshary, O.I.M. and Khattab, A.A. 2008. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and their Fusants Against *Fusarium solani*. Cell of Molecular Biology. 2(2): 24-29.

Fenice, M., Selbman, L., Federici, F. and Vassilev, N. 2000. Application of encapsulated Pennicillium variable P16 in solubilization of rock phosphate. Bioresource Technology 73: 157-162.

Ferreira, J. G. S. Matthee, F. N. and Thomas, A. C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonisticstrain of *Bacillus subtilis*. Phytopathology 81: 281-283.

Fokkema, N. J. 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Dreschlera Sorokianiana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and rye leaves with pollen. Physiological Plant Pathology. 3: 195-205.

Foth, D. H. and Ellis, G. B. 1997. Phosphorus In Soil Fertility. (ed Ellis, G.B.) pp. 145-159. Tokyo. Lewis publisher.

Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol 26: 75-91.

Freitas, J. R. Benerjee, M. R. and Germida, J. J. 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (Brssica napus L.). Biology and Fertility of soil 24: 358-364.

Gilbert, G. S., Handelsman, J. and Parke, J. L. 1990. Bacterial communities in soil and on soilbean roots and the effects of a biological control agent. Phytopathology 80: 995-1001.

Giovanni, G., Ron, J. Y., Pietrino, D. and John, G. H. 2009. Novel strains of nodulating Burkholderia have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. Soil Biology and Biochemistry 41: 125–134.

Goldstein, A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospect. Am. J. Altern. Agricult. 1: 57-65.

Gyaneshwar, P., Kumar, G. N. Parekh, L. J. and Poole, P. S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil 245: 83-93.

Hall, T. J., Schreiber, L. R. and Leben, C. 1986. Effect of xylem-colonizing *Bacillus* spp. On Verticillium with in maples. Plant Dis. 70: 521-524.

Hemwall, J. B. 1957. The fixation of phosphorus by soil. Advances in Agronomy 9: 95-112.

Howell, C. R., Beier, R. C. and Stipanovic, R. D. 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possiblerole in biological control of *Pythium preemergenee* damping-off by the bacterium. Phytopathology 78: 1075-1078.

Idris, A., Labuschagne, N. and Korsten, L. 2009. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. Journal of Agricultural Science 147, 17–30.

Illmer, P. and Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biology snd Biochemical 24: 389-395.

Illmer, P. and Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphate solubilization mechanism. Soil Biology and Biochemical 27: 257-263.

Jaiganesh, V., Eswaran, A., Balabaskar, P. and Hannan, C. 2007. Antagonistic activity of *Serratia marescens* against *Pyricularia oryzae*. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 35(2): 48-54.

Kantachote, D. Kowpong, K., Charernjiratrakul, W., and Pengnoo, A., 2009. Microbial succession in a fermenting of wild forest noni (*Morinda coreia* Ham) fruit plus molasses and its role in producing a liquid fertilizer. Electronic Journal of Biotechnology 12 (3) : 1-11.

Kim, K. Y. Jordan, D. and McDonald, G. A. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biol Fertil Soils 26:79–87.

King, J. K. 1932. The colorimetric determination of phosphorus. Biochem. J. 26: 298.

Kpomblekou-A, K. and Tabatabai, M. A. 2003. Effect of low-molecular weight organic acid on phosphorus release and phytoavailability of phosphorus in phosphate rocks added to soil. Agriculture Ecosystems and Environment 100: 275-284.

Krieg, R. and Holt, N. 1984. Bergy′s Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I Williams and Wilkins. ed. Baltimore. USA.

Kunopagan, J. and Thongwai, N. 2005. Growth inhibition of Microbes causing with In *Cureuma alismatifolia* by antagonistic bacteria.Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology.

Luigi, C., Paola, C., Laura, D., Gluseppe, I., Yury, H., Annamaria, B., Claudia, D., Silvia, T., Graziana, M., Flavio, Z. and Roberto, R. 2004. Exopolysaccharides produced by *Burkholderia cenocepacia recA* lineages IIIA and IIIB. European Cystic Fibrosis Society. 3(3): 165-172.

Nakamo, M. M., Mohamed, A. M., and Zuber, P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lypopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 170: 5662-5668.

Nourozian, J., Etbarian, H. R. and Khodakaramian, G. 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria.Songklanakarin J. Sci. Technol. 28: 29-38.

Madira M, and Sheela S. 2009. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* Sm and its ability to modulate plant growth. European Journal of soil Biology 45: 73-80.

Madira M, and Sheela S. 2008. An ipdC gene knorck - out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implication on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. Antonie van Leeuwenhock 93: 425-433.

Marco, A., Abrito, A. and Fabian, R. M. 2004. Gibberellic Acid Production by Free and Immobilized Cells in Different Culture Systems. Applied Biochemistry and Biotechnology .113–116.

Martens, D. A. and Frankenberger, W. T. 1991. On-Line Solid-Phase Extraction of Soil Auxins Produced from Exogenously-Applied Tryptophan with Ion-Suppression Reverse- Phase HPLC Analysis. Chromatographia 32: 417-423.

Martensson, A. M. and Torstensson, L. 1996. Monitoring sewage sludge using heterotrophic Nitrogen fixing microorganism.Soil Biol.Biochem. 28: 1621-1630.

Martinez, C., Michaud, M., Belanger, R. R. and Tweddell, R. J. 2002. Identification of soils suppressive against *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. Soil Biol. Biochem. 34: 1861-1868.

Meyer, J. M., Hohnadel, D. and Halle. F. 1989. Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. J. Gen. Microbiol. 135:1479-1487.

Montealegre, J. R., Reyes, R., Perez, L. M., Hervera, R., Silva, P. and Besoain, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato.Electronic Journal Biotechnology.

Moulin, L, Munive, A, Dreyfus, B. and Biovin-Masson, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the beta- subclass of proteobacteria. Nature 411: 948 – 950.

Oh, Y., Seol, E., Kim, J. R. and Park, S. 2003. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. International Journal of Hydrogen Energy 28: 1353-1359.

Omife, C. and Ikotum, T. 1987. Inhibition of growth of some plant pathogens by antagonistic microorganism J. basic microbial 27(9): 515-519.

Pal, K. K. 1995. Rhizobacteria as biological control agents for soil-borne plant pathogenic fungi. Ph. D Thesis, IARI, New Delhi, India.

Pal, K. K., Tilak, K. V. B. R., Saxena, A. K., Dey, R. and Singh C. S., 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol. Res. 156: 209–223.

Patricia, D., Maria, C., Andrew, D. C. and Pamela, A. 1998. Siderophore Production by Cystic Fibrosis Isolates of *Burkholderia cepacia.* INFECTION AND IMMUNITY. 66(2): 874-877.

Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakono, M. and Ushiyama, K. 1992. Biological control of crown and root rot and bacterial with of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58: 329-339.

Pusey, L. P. and Willson, C. L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Dis. 68: 753-756.

Pusey, L. P., Hotchkiss, M. W., Dulmage, H. T., Baumgardner, R. A. Zehr E. I., Reilly, C. C. and Wilson, C.L. 1988. Pilot test for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control of peach brown rot. Plant Dis. 72: 622-626.

Ra-Yong, P., Mee-Hwa, C., Hui-Yu, S. and Sung-Heui, S. 2005. Production of Catechol-Siderophore and Utilization of Transferrin-Bound Iron in *Bacillus cereus*. Biol. Pharm. Bull. 28(6): 1132-1135.

Reddy, M. S., Kumar, S., Babita, K. and Reddy, M. S. 2002. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphate by *Aspergillus tubingesis* and *Aspergillus* niger. Bioresource Technology 84: 187-189.

Reyes, L., Bazirамekenga. R., Bernier, L. and Antoun, H. 2001. Solubilization of phosphate rocks and mineral by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. Soil Biology and Biochemistry 33: 1741-1747.

Roberts, W., Li, D. P., Meyer, S. L. F., Lohrke, S., Lumdsen, R. D. and Hebbar, K. P. 2002. Broad spectrum anti-biotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F, Crop Prot. 21: 29-135.

Rhodes, D. J. 1993. Formulation of biological control agent In Exploitation of Microorganism. Edited by Jones, D. G. London : Chapinan and Hall , 411- 435.

Rodriguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilization bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advance 17: 319-339.

Rytter, J. L., Lukezie, F. L., Craig, R. and Moorman, G. W. 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. Phytopathology 79: 367-370.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sandra, B., Natarjan, V. and Hari, K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. Field Crops Research. 77: 43-49.

Sato, N., Ikeda, S., Mikami, T. and Matsumoto, T. 1999. *Bacillus cereus* Dissociates Hemoglobin and Uses Released Heme as an Iron Source. Biol. Pharm. Bull., 22: 1118—1121.

Scheyn, B. and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160: 47-56.

Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. H. M. and Peer, R. V. 1990. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing *Psuedomonas* on rhizosphere interaction. Plant and Soil 129: 75-83.

Selvaraj, P., Munusamy, M. and Tongmin, S. 2007. Quorum-sensing signals produced by plant-growth promoting *Burkholderia* strains under in vitro and in planta conditions. Research in Microbiology 158: 287-294.

Shahandeh, H., Hossner, L. R. and Tumer, F. T. 2003. Phosphorus relationship to manganese and iron in rice soil. Soil science 168: 489-500.

Shibata, R. and Yano, K. 2003. Phosphorus acquisition from non-labile source in peanut and pigconpea with mycorrhizal interaction. Applied soil Ecology 24: 133-141.

Shlomo, P., Fanya, I. and Ilan, C. 1995. Control of Rhizoctonia solani and Sclerotium rofsii in the greenhouse using endophytic Bacillus spp. European Journal of Plant pathology. 101: 665-672.

Sinclair, J. B., Agrihotre, P. V. Singh, N., Chaute, B. S., Singh, U. S. and Swivedi, J. S. 1989. *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant disease. PERSPECTIVE IN PHYTOPHATOLOGY. Pp. 367-374.

Singh, R. K., Mishra, R. P. N., Jaiswal, H. K., Kumar, V., Pandey, S., Rao, S. B. and Annapurna, K. 2006. Isolation and identification of natura endophytic rhizobia from Oryza sativa (Oryza sativa L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. Curr Microbiol 20:1–7.

Smith, F. W., Jackson, P. J. and Van den Berg, P.J. 1990. Internal phosphorus flows during development of phosphorus stress in Stylosanthes hamata. Australian Journal of Plant Physiology 17: 451-464.

Sneath, P. H. A. 1986. Bergy ′ s Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II Williams and Wilkins. ed. Baltimore. USA.

Sokol, P. A. 1986. Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. J. Clin. Microbiol. 23:560-562.

Stenzel, K., Steinter, U. and Schoenbeck, F. 1985. Effect of induced resistance on the difficiency of powdery mildew harstoria in wheat and barley. PHYSIOL PLANT PATPOL. 27(3): 357-367.

Stephan, H., Freund, S., Beck, W., Jung, G., Meyer, J. M. and Winkelmann, G. 1993. Ornibactinsa new family of siderophores from *Pseudomonas*. Biometals 6:93-100.

Tao, G. C., Tian, S. J., Cai, M. Y. and Xie, G. H. 2008. Phosphate-Solubilizing and Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. Pedosphere 18(4): 515–523.

Thind, B. S., Jindal, K. K., Onanamanickam, S. S. and Manhadevan, A. 1988. Evaluation of green gram seed microflora for the eradication of X.C. pv. Vignaeradiatae from green gram seed ADVACE IN RESEARCH ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA INI. BIOSCI SEP. pp. 119-127.

Toro, M., Azcon, R. and Barea, J. M. 1997. Improvement of arbuscular mychorhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioactivity (^{32}P) and nutrient cycling. Applied and Environmental Microbiology 63: 4408-4412.

Trivedi, P., Kumar, B., Pendey, A. and Palni, L. M. S. 2003. Growth promotion of rice by phosphate – solubilizing bio-inoculants in Hawalayan location. Plant. Soil sci. 102: 291-299.

Tschen, J. S. M. 1987. Control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. Trans. Mycol. Soc. Japan. 28: 483-493.

Utkhede, R. S. and Rahe, J. E. 1983. Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. Phytopathology 73: 890-893.

Vassilev, N., Vassileva, M., Fenice, N. and Federici, F. 2001. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphate and P plant acquisition. Bioresource Technology 79: 263-271.

Vats, P. and Banerjee, U. C. 2004. Production studies and catalytic properties of phytase (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolase): an overview. Enzyme and Microbial Technology 35: 3-14.

Vazquez, P., Holgium, G., Puente, M. E. lopez-Cortes, A. and Basham, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangrove in a semiarid coastal lagoon. Biology and Fertility of soil 30 : 460-468.

Visca, P., Ciervo, A., Sanfilippo, V. and Orsi. N. 1993. Iron-regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. J. Gen. Microbiol. 139:1995-2001.

William, J. P. 1989. Production of Poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon source. Appl. Microbial Biotechnol. 31: 329-333.

Wilson, C. L. and Wisniewski, M. E. 1989. Biological control of postharvest diseases Of fruits and vegetables : an emerging technology. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 425-441.

Whitelaw, M. A., Harden, T. J. and Helyar, R. K. 1999. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. Soil Biology and Biochemistry 31: 656-665.

Yanfeng, H., Yunzhi, P., Yanping, L. Xiujin, L. and Kuisheng, W. 2008. Physicochemical Characterization of Rice Straw Pretreated with Sodium Hydroxide in the Solid State for Enhancing Biogas Production. Energy and Fuels 22: 2775–2781

Yasmin, S, Rahman, Bakar, M. A, Malik, K. A. and Hafeez, F. Y. 2004. Isolation, characterization and benefical effect of rice associated plant growth-promoting bacteria from Zanzibar soil. J. Basic Microbiol 44: 241-252.

http://chemsci.kku.ac.th/chalerm/research.htm : 11-12-2007

http://csu.sut.ac.th/doc/rhizobium.pdf : 14-08-2007

http://mylesson.swu.ac.th/bi456/Plant%20hormone/lesson2.html: 15-08-2007

http://th.wikipidia.org/wiki : 16-08-2007

http://seedcenter17.doae.go.th/farmer/pest/rice_xx2-05_ newDisease008.html

http://www.ptl.ricethailand.org/data/disease.htm : 12-06-2007

http://www.ricethailand.go.th/rkb/data 005/rice xx2-05 assort02.html : 12-06-2007

http://www.sc.chula.ac.th/botany/eClass/2305101/nutrition.pdf : 14-08-2007

http://www.scribd.com/doc/14008603: 20-04-2009

http://www.sripatum.ac.th/online/preeya/F.htm : 15-08-2007

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP)

Glucose	10	g
$Ca_3(PO_4)_2$	5	g
$MgCl_2.6H_2O$	5	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.25	g
KCl	0.2	g
$(NH_4)_2SO_4$	0.1	g
Bromo phenolblue	0.01	g
น้ำกลั่น	1000	ml
pH	7.0	

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH เป็น 7.0 นำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที โดยในสูตรดัดแปลง เปลี่ยนจาก $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 0.1 g/L เป็น yeast extract 0.05 g/L

2. N_2-free medium (Burk, 1934)

Sucrose	10	g
K_2HPO_4	0.64	g
KH_2PO_4	0.16	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g
NaCl	0.2	g
$CaSO_4.2H_2O$	0.05	g
Na_2MoO_4	0.001	g
$FeSO_4$	0.003	g
pH	6.8 ± 0.2	

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH เป็น 6.8 นำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. Pikovskaya medium

Glucose	10	g
$Ca_3(PO_4)_2$	5	g
NaCl	0.2	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	g
KCl	0.2	g
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	g
$MnSO_4.H_2O$	0.002	g
$FeSO_4.7H_2O$	0.002	g
น้ำกลั่น	1000	ml
pH	7.0	

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH เป็น 7.0 นำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. CAS (Chrome Azural S) Agar

CAS	30.25	mg
$FeCl_3.6H_2O$	5	ml
HDTMA	36.45	mg
Pipes	15.12	g
NaOH	6	g
Deionized water	500	ml
pH	7.0	

วิธีเตรียม

1. ละลาย CAS 30.25 mg ในน้ำ Deionized water 25 ml แล้วผสม CAS solution กับ $FeCl_3.6H_2O$ 5 ml
2. ละลาย HDTMA 36.45 mg ใน Deionized water 20 ml
3. ผสมส่วนผสมในข้อ 1 และ 2 เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
4. การเตรียมวุ้น (Agar)
   4.1 ผสม Deionized water 450 ml กับวุ้น 7.5 g
   4.2 เติม Pipes 15.12 g และ NaOH 6 g แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5. ผสมส่วนผสมในข้อ 3 และ 4 เข้าด้วยกัน
6. ปรับ pH = 7.0

ภาคผนวก ข

1. การทดสอบการละลายฟอสเฟต โดยทำให้เกิดสีด้วยวิธีโมลิบดีนัมบลู (จำเป็น, 2547)

1.1 สารเคมี

1.1.1 น้ำยาทำให้เกิดสี (color reagent)

(1) สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 3 % น้ำหนักโดยปริมาตร (w/v): ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate: $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 15.00 กรัม ในน้ำที่ปราศจากไอออน ประมาณ 250 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน (98 % w/v : H_2SO_4) ลงไป 140 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ให้เย็นและปรับปริมาตร เป็น 500 มิลลิลิตร

(2) สารละลายแอนทิโมนีโพแทสเซียมทาร์เทรต 0.1 % w/v: ละลายแอนทิโมนีโพแทสเซียมทาร์เทรต (Antimony potassium tatrate : $KSbO.C_4H_4O_6.0.5\ H_2O$) 0.5 กรัม ในน้ำที่ปราศจากไอออน ประมาณ 400 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร เป็น 500 มิลลิลิตร

(3) สารละลายกรดบอริก 5 % w/v: ละลายกรดบอริก (Boric acid : H_3BO_3) 25 กรัม ในน้ำร้อน ประมาณ 450 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ให้เย็นและปรับปริมาตร เป็น 500 มิลลิลิตร

เวลาใช้ให้ผสมสารละลายในข้อ 2.1, 2.2, 2.3 และน้ำที่ปราศจากไอออน อัตราส่วน 1:1:3:10 โดยปริมาตรให้ได้ปริมาตรตามต้องการที่จะใช้

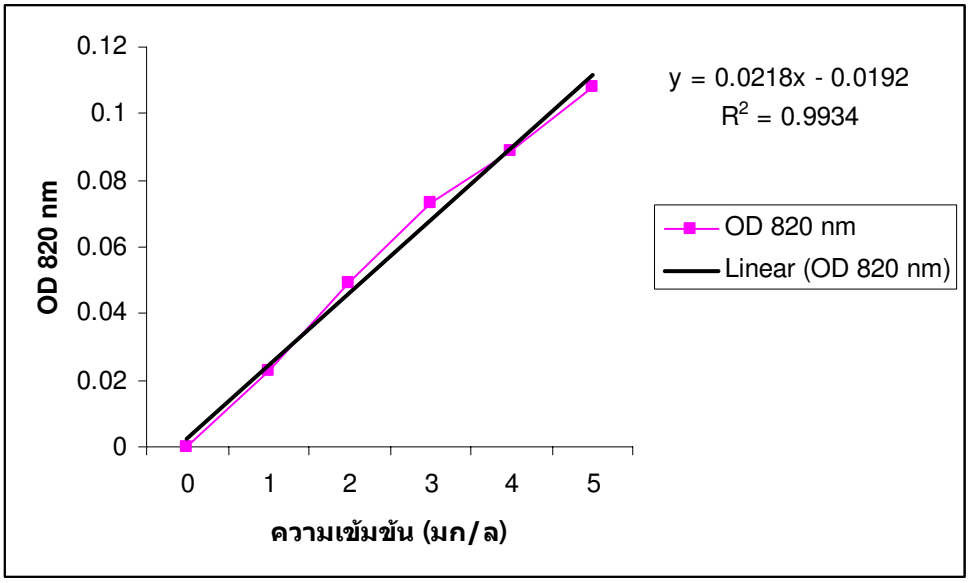
1.1.2 สารละลายกรดแอสคอร์บิก 0.5 % w/v: ละลายกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid: $C_6H_8O_6$) 0.50 กรัม ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน และปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ไม่ควรเก็บไว้เกิน 2 วัน

1.1.3 สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร : ดูดสารละลายฟอสฟอรัส 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรโดยใช้น้ำยาเบรย์ทู เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

1.2 การทำให้เกิดสี

1.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสารตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

1.2.2 เติมน้ำยาทำให้เกิดสี และสารละลายกรดแอสคอร์บิก ลงไปอย่างละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีสีน้ำเงินเกิดขึ้น จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าและปล่อยให้เกิดปฏิกริยาจนสมบูรณ์โดยใช้เวลาประมาณ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่องวิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 820 นาโนเมตร



รูปที่ 1ข : กราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส โดยใช้ KH_2PO_4 เป็นสารละลายมาตรฐาน

2. วิเคราะห์โปรตีน (Lowry method)

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลาย Na_2CO_3 2 % ใน 0.1 N NaOH

2.1.2 สารละลาย 0.5 % $CuSO_4.5H_2O$ ใน 1% Sodium potassium tartrate

2.1.3 สารละลาย alkaline copper ซึ่งเตรียมได้โดยใช้ 50 มิลลิลิตร ของสารละลายในข้อ 1 แล้วเติมสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (การเตรียมสารละลายนี้จะเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

2.1.4 สารละลาย Folin – ciocateus phenol reagent 1 N นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้

2.2 วิธีการ

2.2.1 ใส่สารตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง

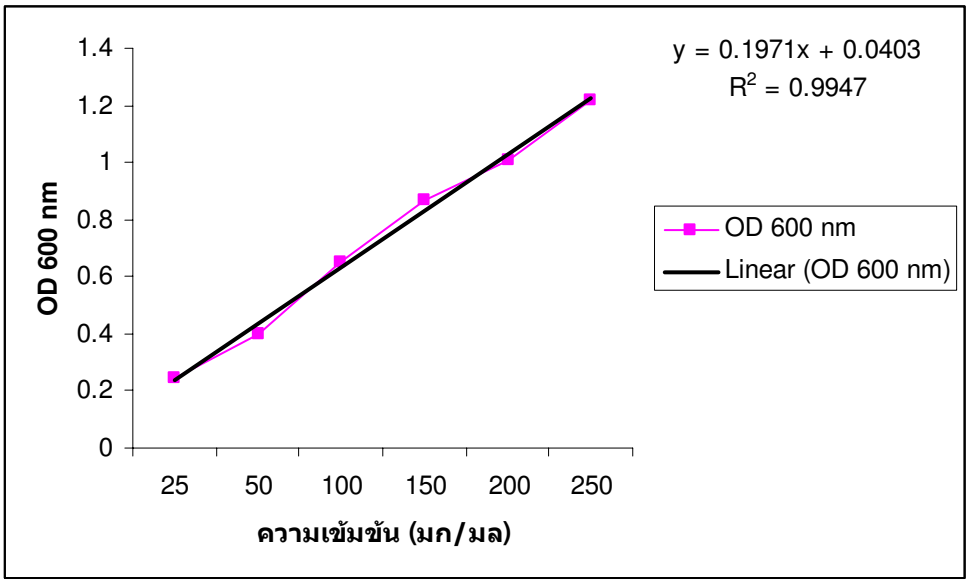
2.2.2 เติมสารละลาย alkaline copper 5.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2.2.3 เติมสารละลาย Folin – ciocateus phenol reagent 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

2.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

เตรียมโดยใช้ Bovine serum albumin ปริมาณ 0.250 กรัม ละลายใน Volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำสารละลาย Stock solution เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร



รูปที่ 2ข : กราฟมาตรฐานของโปรตีน โดยใช้ Bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน

3. การย้อมสี cyst

3.1 สารเคมี

- Glacial acetic acid	8.5	ml
- Sodium sulphate (anhydrous)	3.25	g
- Neutral red	200	mg
- Light Green S.F. Yellowish	200	mg
- Ethanol	50	ml
- น้ำกลั่น	100	ml

นำส่วนผสมดังกล่าวรวมกับน้ำ กวนอย่างต่อเนื่อง หลังจากนั้น 15 นาที กำจัดตะกอนที่เกิดขึ้นโดยการกรองผ่านกระดาษกรองที่มี pore size 0.5 μm

3.2 วิธีการ

1. หยดสีย้อมลงบนแผ่นสไลด์
2. นำเชื้อมาเกลี่ยในสีย้อม
3. ปล่อยให้แห้ง แล้วผ่านเปลวไฟอ่อนๆ

4. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ cyst ติดสีเขียวอยูบริเวณผนังเซลล์ ภายนอกเซลล์ติดสีน้ำตาลแดง

4. การย้อมเอนโดสปอร์

4.1 สารเคมี

- Malachite green solution
- Safranin O solution

4.2 วิธีการ

1. เกลี่ยเชื้อ (smear) ลงบนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง
2. นำสไลด์ผ่านเปลวไฟ เพื่อให้เชื้อติดกับสไลด์
3. หยด malachite green ให้ท่วมรอย smear อุ่นด้วยเปลวไฟนาน 2-3 นาที ระวังอย่าให้เดือด เติม malachite green เมื่อมีการระเหย
4. ล้างออกด้วยน้ำสะอาด
5. หยด safranin O ทิ้งไว้ 30 นาที
6. ล้างออกด้วยน้ำสะอาด นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียจะติดสีแดงของ Safranin O และสปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green

ภาคผนวก ค

ผลการเทียบเคียง

1. ผลการเทียบเคียง *Burkholderia cenocepacia* A29 โดยวิธี 16S rRNA gene

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis
Sample Name : A29

---

522 bp Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments:		SCORE	E VALUE
EU684748	Burkholderia cenocepacia strain ZYB002	1004	0.0
EU418711	Burkholderia sp. GL12	1004	0.0
CP001025	Burkholderia ambifaria MC40-6	1004	0.0
AB366333.1	Burkholderia sp. SBH-11	1004	0.0
AB366332.1	Burkholderia sp. SBH-10	1004	0.0

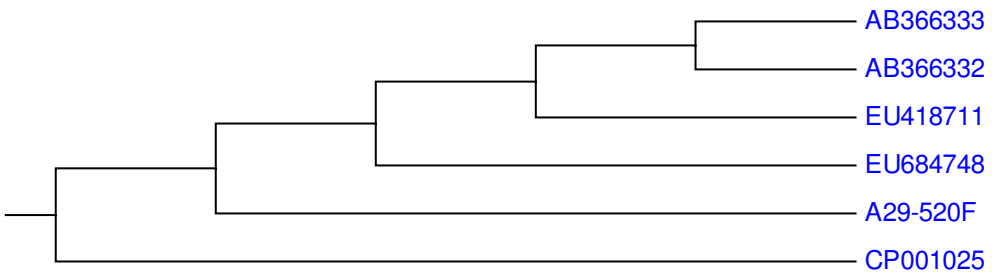
BLASTN 2.2.18+
Reference:
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: GS17R46201R

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
7,676,946 sequences; 25,241,785,921 total letters

Query = A29-520F Length=522
>A29-520F
TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)



> gb|EU684748.1| Burkholderia cenocepacia strain ZYB002 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence Length=1483

Score = 1004 bits (522), Expect = 0.0
Identities = 522/522 (100%), Gaps = 0/522 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA  600

Query  61    GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG  660

Query  121   GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG  720

Query  181   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT  780

Query  241   TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG  840

Query  301   GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG  900

Query  361   ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA  960
```

```
Query  421   GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
1020

Query  481   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  522
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  1062


> gb|EU418711.1|  Burkholderia sp. GL12 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1422

 Score = 1004 bits (522),  Expect = 0.0
 Identities = 522/522 (100%), Gaps = 0/522 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  546   TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
605

Query  61    GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  606   GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
665

Query  121   GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  666   GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
725

Query  181   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  726   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
785

Query  241   TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  786   TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
845

Query  301   GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  846   GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
905

Query  361   ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  906   ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
965

Query  421   GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct  966   GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
1025

Query  481   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  522
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1026  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  1067


> gb|CP001025.1|  Burkholderia ambifaria MC40-6 chromosome 1, complete
sequence
Length=3443583

 Score = 1004 bits (522),  Expect = 0.0
 Identities = 522/522 (100%), Gaps = 0/522 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1        TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2385602  TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
2385543

Query  61       GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2385542  GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
2385483

Query  121      GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2385482  GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
2385423

Query  181      GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2385422  GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
2385363

Query  241      TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2385362  TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
2385303

Query  301      GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
360
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2385302  GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
2385243

Query  361      ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
420
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2385242  ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
2385183

Query  421      GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
480
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2385182  GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
2385123
```

```
Query  481      TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  522
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2385122  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  2385081
```

Features in this part of subject sequence:
rRNA-16S ribosomal RNA

Score = 998 bits (519), Expect = 0.0
Identities = 521/522 (99%), Gaps = 0/522 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query  1      TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22894  TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
22835

Query  61     GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22834  GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
22775

Query  121    GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22774  GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
22715

Query  181    GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22714  GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
22655

Query  241    TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22654  TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
22595

Query  301    GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22594  GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
22535

Query  361    ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22534  ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
22475

Query  421    GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
480
              |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22474  GAGGCGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
22415

Query  481    TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  522
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22414  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  22373
```

```
 Features in this part of subject sequence:
   rRNA-16S ribosomal RNA

 Score =  998 bits (519),  Expect = 0.0
 Identities = 521/522 (99%), Gaps = 0/522 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1       TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
60
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299507  TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
299566

Query  61      GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
120
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299567  GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
299626

Query  121     GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
180
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299627  GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
299686

Query  181     GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
240
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299687  GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
299746

Query  241     TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
300
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299747  TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
299806

Query  301     GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
360
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299807  GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
299866

Query  361     ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
420
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299867  ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
299926

Query  421     GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
480
               |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299927  GAGGCGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
299986

Query  481     TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  522
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299987  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  300028
```

Features in this part of subject sequence:
rRNA-16S ribosomal RNA

Score = 998 bits (519), Expect = 0.0
Identities = 521/522 (99%), Gaps = 0/522 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1       TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
60
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532144  TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
532203

Query  61      GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
120
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532204  GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
532263

Query  121     GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
180
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532264  GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
532323

Query  181     GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
240
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532324  GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
532383

Query  241     TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
300
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532384  TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
532443

Query  301     GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
360
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532444  GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
532503

Query  361     ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
420
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532504  ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
532563

Query  421     GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
480
               |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532564  GAGGCGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
532623

Query  481     TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  522
               |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532624  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  532665
```

> dbj|AB366333.1| Burkholderia sp. SBH-11 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence Length=1488

```
 Score = 1004 bits (522),  Expect = 0.0
 Identities = 522/522 (100%), Gaps = 0/522 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  561   TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA
620

Query  61    GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  621   GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
680

Query  121   GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  681   GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG
740

Query  181   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  741   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT
800

Query  241   TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  801   TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
860

Query  301   GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  861   GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG
920

Query  361   ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  921   ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA
980

Query  421   GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  981   GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
1040

Query  481   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  522
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1041  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  1082
```

> dbj|AB366332.1| Burkholderia sp. SBH-10 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence Length=1290

Score = 1004 bits (522), Expect = 0.0
Identities = 522/522 (100%), Gaps = 0/522 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  492   TAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTA  551

Query  61    GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  552   GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG  611

Query  121   GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  612   GAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG  671

Query  181   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  672   GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGT  731

Query  241   TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  732   TGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG  791

Query  301   GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  792   GTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGG  851

Query  361   ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  852   ATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGA  911

Query  421   GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  912   GAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG  971

Query  481   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  522
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  972   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  1013
```

```
LOCUS       EU684748               1483 bp    DNA     linear   BCT 08-JUN-
2008
DEFINITION  Burkholderia cenocepacia strain ZYB002 16S ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   EU684748
VERSION     EU684748.1  GI:189311113
KEYWORDS    .
SOURCE      Burkholderia cenocepacia
  ORGANISM  Burkholderia cenocepacia
            Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;
            Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1483)
  AUTHORS   Zhang,Y., Shu,Z. and Huang,J.
  TITLE     The 16S rDNA of the strain ZYB002 which can produce lipase
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1483)
  AUTHORS   Zhang,Y., Shu,Z. and Huang,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (30-APR-2008) Engineering Research Center of
Industrial
            Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University,
            Shangjie, Fuzhou, Fujian 350108, P. R. China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1483
                     /organism="Burkholderia cenocepacia"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="ZYB002"
                     /db_xref="taxon:95486"
     rRNA            <1..>1483
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 cttaacatgc aagtcgacgg cagcacgggt gcttgcacct ggtggcgagt ggcgaacggg
       61 tgagtaatac atcggaacat gtcctgtagt gggggatagc ccggcgaaag ccggattaat
      121 accgcatacg atctacggat gaaagcgggg gaccttcggg cctcgcgcta tagggttggc
      181 cgatggctga ttagctagtt ggtggggtaa aggcctacca aggcgacgat cagtagctgg
      241 tctgagagga cgaccagcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca
      301 gcagtgggga attttggaca atgggcgaaa gcctgatcca gcaatgccgc gtgtgtgaag
      361 aaggccttcg ggttgtaaag cacttttgtc cggaaagaaa tccttggctc taatacagtc
      421 gggggatgac ggtaccggaa gaataagcac cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa
      481 tacgtagggt gcaagcgtta atcggaatta ctgggcgtaa agcgtgcgca ggcggtttgc
      541 taagaccgat gtgaaatccc cgggctcaac ctgggaactg cattggtgac tggcaggcta
      601 gagtatggca gaggggggta gaattccacg tgtagcagtg aaatgcgtag agatgtggag
      661 gaataccgat ggcgaaggca gccccctggg ccaatactga cgctcatgca cgaaagcgtg
      721 gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccct aaacgatgtc aactagttgt
      781 tggggattca tttccttagt aacgtagcta acgcgtgaag ttgaccgcct ggggagtacg
      841 gtcgcaagat taaaactcaa aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gatgatgtgg
      901 attaattcga tgcaacgcga aaaaccttac ctacccttga catggtcgga atcctgctga
      961 gaggtgggag tgctcgaaag agaaccggcg cacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg
     1021 tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttgtcctt agttgctacg
     1081 caagagcact ctaaggagac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaag
     1141 tcctcatggc ccttatgggt agggcttcac acgtcataca atggtcggaa cagagggttg
     1201 ccaacccgcg aggggagct aatcccagaa aaccgatcgt agtccggatt gcactctgca
     1261 actcgagtgc atgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagcatgccg cggtgaatac
     1321 gttcccgggt cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtgggtttta ccagaagtgg
     1381 ctagtctaac cgcaaggagg acggtcacca cggtaggatt catgactggg gtgaagtcgt
     1441 aacaaggtag ccgtatcgga aggtgcggct ggatccaccc tcc
```

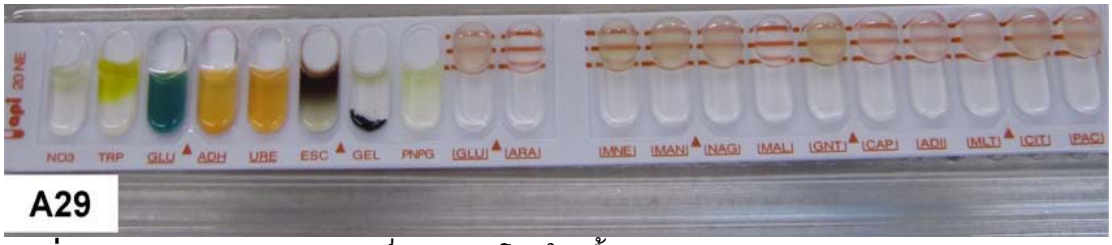
```
LOCUS       EU418711               1422 bp    DNA     linear   BCT 01-MAY-
2008
DEFINITION  Burkholderia sp. GL12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   EU418711
VERSION     EU418711.1  GI:172073128
KEYWORDS    .
SOURCE      Burkholderia sp. GL12
  ORGANISM  Burkholderia sp. GL12
            Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;
            Burkholderiaceae; Burkholderia.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1422)
  AUTHORS   Sun,L. and Sheng,X.
  TITLE     Diversity of endophytic bacteria from copper mine
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1422)
  AUTHORS   Sun,L. and Sheng,X.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-JAN-2008) Department of Microbiology, College of
Life
            Science, Tongwei Road No. 6, Nanjing, Jingsu 210095, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1422
                     /organism="Burkholderia sp. GL12"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="GL12"
                     /db_xref="taxon:517350"
     rRNA            <1..>1422
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tgccttacac atgcaagtcg aacggcagca cgggtgcttg cacctggtgg cgagtggcga
       61 acgggtgagt aatacatcgg aacatgtcct gtagtggggg atagcccggc gaaagccgga
      121 ttaataccgc atacgatcta cggatgaaag cgggggacct tcgggcctcg cgctataggg
      181 ttggccgatg gctgattagc tagttggtgg ggtaaaggcc taccaaggcg acgatcagta
      241 gctggtctga gaggacgacc agccacactg ggactgagac acggcccaga ctcctacggg
      301 aggcagcagt ggggaatttt ggacaatggg cgaaagcctg atccagcaat gccgcgtgtg
      361 tgaagaaggc cttcgggttg taaagcactt ttgtccggaa agaaatcctt gactctaata
      421 cagtcggggg atgacggtac cggaagaata agcaccggct aactacgtgc cagcagccgc
      481 ggtaatacgt agggtgcgag cgttaatcgg aattactggg cgtaaagcgt gcgcaggcgg
      541 tttgctaaga ccgatgtgaa atccccgggc tcaacctggg aactgcattg gtgactggca
      601 ggctagagta tggcagaggg gggtagaatt ccacgtgtag cagtgaaatg cgtagagatg
      661 tggaggaata ccgatggcga aggcagcccc ctgggccaat actgacgctc atgcacgaaa
      721 gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccctaaacg atgtcaacta
      781 gttgttgggg attcatttcc ttagtaacgt agctaacgcg tgaagttgac cgcctgggga
      841 gtacggtcgc aagattaaaa ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cggtggatga
      901 tgtggattaa ttcgatgcaa cgcgaaaaac cttacctacc cttgacatgg tcggaatcct
      961 gctgagaggt gggagtgctc gaaagagaac cggcgcacag gtgctgcatg gctgtcgtca
     1021 gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg tccttagttg
     1081 ctacgcaaga gcactctaag gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg
     1141 tcaagtcctc atggcccttа tgggtagggc ttcacacgtc atacaatggt cggaacagag
     1201 ggttgccaac ccgcgagggg gagctaatcc cagaaaaccg atcgtagtcc ggattgcact
     1261 ctgcaactcg agtgcatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg
     1321 aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtggg ttttaccaga
     1381 agtggctagt ctaaccgcaa ggaggacggt caccacggta gg
```

```
LOCUS       CP001025             3443583 bp    DNA     circular BCT 03-APR-
2008
DEFINITION  Burkholderia ambifaria MC40-6 chromosome 1, complete sequence.
ACCESSION   CP001025 AAUZ01000000 AAUZ01000001-AAUZ01000036
VERSION     CP001025.1  GI:171991584
PROJECT     GenomeProject:17411
KEYWORDS    .
SOURCE      Burkholderia ambifaria MC40-6
  ORGANISM  Burkholderia ambifaria MC40-6
            Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;
            Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex.
REFERENCE   1  (bases 1 to 3443583)
  AUTHORS   Copeland,A., Lucas,S., Lapidus,A., Glavina del Rio,T., Dalin,E.,
            Tice,H., Pitluck,S., Chain,P., Malfatti,S., Shin,M., Vergez,L.,
            Lang,D., Schmutz,J., Larimer,F., Land,M., Hauser,L.,
Kyrpides,N.,
            Lykidis,A., Ramette,A., Konstantinidis,K., Tiedje,J. and
            Richardson,P.
  CONSRTM   US DOE Joint Genome Institute
  TITLE     Complete sequence of chromosome1 of Burkholderia ambifaria MC40-
6
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 3443583)
  AUTHORS   Copeland,A., Lucas,S., Lapidus,A., Glavina del Rio,T., Dalin,E.,
            Tice,H., Pitluck,S., Chain,P., Malfatti,S., Shin,M., Vergez,L.,
            Lang,D., Schmutz,J., Larimer,F., Land,M., Hauser,L.,
Kyrpides,N.,
            Lykidis,A., Ramette,A., Konstantinidis,K., Tiedje,J. and
            Richardson,P.
  CONSRTM   US DOE Joint Genome Institute
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (02-APR-2008) US DOE Joint Genome Institute, 2800
            Mitchell Drive B100, Walnut Creek, CA 94598-1698, USA
COMMENT     URL -- http://www.jgi.doe.gov
            JGI Project ID: 4002673
            Source DNA and bacteria available from James Tiedje
            (tiedjej@msu.edu)
            Contacts: James Tiedje (tiedjej@msu.edu)
            Paul Richardson (microbes@cuba.jgi-psf.org)
            Quality assurance done by JGI-Stanford
            Annotation done by JGI-ORNL and JGI-PGF
            Finishing done by JGI-LLNL
            Finished microbial genomes have been curated to close all gaps
with
            greater than 98% coverage of at least two independent clones.
Each
            base pair has a minimum q (quality) value of 30 and the total
error
            rate is less than one per 50000.
            The JGI and collaborators endorse the principles for the
            distribution and use of large scale sequencing data adopted by
the
            larger genome sequencing community and urge users of this data
to
            follow them. it is our intention to publish the work of this
            project in a timely fashion and we welcome collaborative
            interaction on the project and analysis.
            (http://www.genome.gov/page.cfm?pageID=10506376).
```

```
LOCUS       AB366333               1488 bp    DNA     linear   BCT 11-JUL-
2008
DEFINITION  Burkholderia sp. SBH-11 gene for 16S ribosomal RNA, partial
            sequence.
ACCESSION   AB366333
VERSION     AB366333.1  GI:171703193
KEYWORDS    .
SOURCE      Burkholderia sp. SBH-11
  ORGANISM  Burkholderia sp. SBH-11
            Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;
            Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Otsuka,S., Sudiana,I., Komori,A., Isobe,K., Deguchi,S.,
            Nishiyama,M., Shimizu,H. and Senoo,K.
  TITLE     Community Structure of Soil Bacteria in a Tropical Rainforest
            Several Years After Fire
  JOURNAL   Microbes Environ. 23, 49-56 (2008)
REFERENCE   2  (bases 1 to 1488)
  AUTHORS   Otsuka,S. and Sudiana,I.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (01-NOV-2007) Contact:Shigeto Otsuka The University of
            Tokyo; Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1488
                     /organism="Burkholderia sp. SBH-11"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="SBH-11"
                     /isolation_source="Soil"
                     /db_xref="taxon:482087"
                     /country="Indonesia:East Kalimantan, Bukit Bangkirai"
                     /collection_date="Sep-2001"
                     /collected_by="OTSUKA & SUDIANA"
                     /identified_by="OTSUKA & SUDIANA"
     rRNA            <1..>1488
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tgaacgctgg cggcatgcct tacacatgca agtcgaacgg cagcacgggt gcttgcacct
       61 ggtggcgagt ggcggacggg tgagtaatac atcggaacat gtcctgtagt gggggatagc
      121 ccggcgaaag ccggattaat accgcatacg atctacggat gaaagcgggg gaccttcggg
      181 cctcgcgcta taggggttgc cgatggctga ttagctagtt ggtggggtaa aggcctacca
      241 aggcgacgat cagtagctgg tctgagagga cgaccagcca cactgggact gagacacggc
      301 ccagactcct acgggaggca gcagtgggga attttggaca atgggcgaaa gcctgatcca
      361 gcaatgccgc gtgtgtgaag aaggccttcg ggttgtaaag cacttttgtc cggaaagaaa
      421 tccttggctc taatacagtc gggggatgac ggtaccggaa gaataagcac cggctaacta
      481 cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgtta atcggaatta ctgggcgtaa
      541 agcgtgcgca ggcggtttgc taagaccgat gtgaaatccc cgggctcaac ctgggaactg
      601 cattggtgac tggcaggcta gagtatggca gaggggggta gaattccacg tgtagcagtg
      661 aaatgcgtag agatgtggag gaataccgat ggcgaaggca gccccctggg ccaatactga
      721 cgctcatgca cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccct
      781 aaacgatgtc aactagttgt tggggattca tttccttagt aacgtagcta acgcgtgaag
      841 ttgaccgcct ggggagtacg gtcgcaagat taaaactcaa aggaattgac ggggacccgc
      901 acaagcggtg gatgatgtgg attaattcga tgcaacgcga aaaaccttac ctacccttga
      961 catggtcgga atcctgctga gaggtgggag tgctcgaaag agaaccggcg cacaggtgct
     1021 gcatggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac
     1081 ccttgtcctt agttgctacg caagagcact ctaaggagac tgccggtgac aaaccggagg
     1141 aaggtgggga tgacgtcaag tcctcatggc ccttatgggt agggcttcac acgtcataca
     1201 atggtcggaa cagagggttg ccaacccgcg aggggagct aatcccagaa aaccgatcgt
     1261 agtccggatt gcactctgca actcgagtgc atgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat
     1321 cagcatgccg cggtgaatac gttcccgggt cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga
     1381 gtgggtttta ccagaagtgg ctagtctaac cgcaaggagg acggtcacca cggtaggatt
     1441 catgactggg gtgaagtcgt aacaaggtag ccgtattcgg aaggtgcg
```

```
LOCUS       AB366332               1290 bp    DNA     linear   BCT 11-JUL-
2008
DEFINITION  Burkholderia sp. SBH-10 gene for 16S ribosomal RNA, partial
            sequence.
ACCESSION   AB366332
VERSION     AB366332.1  GI:171703192
KEYWORDS    .
SOURCE      Burkholderia sp. SBH-10
  ORGANISM  Burkholderia sp. SBH-10
            Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;
            Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Otsuka,S., Sudiana,I., Komori,A., Isobe,K., Deguchi,S.,
            Nishiyama,M., Shimizu,H. and Senoo,K.
  TITLE     Community Structure of Soil Bacteria in a Tropical Rainforest
            Several Years After Fire
  JOURNAL   Microbes Environ. 23, 49-56 (2008)
REFERENCE   2  (bases 1 to 1290)
  AUTHORS   Otsuka,S. and Sudiana,I.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (01-NOV-2007) Contact:Shigeto Otsuka The University of
            Tokyo; Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1290
                     /organism="Burkholderia sp. SBH-10"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="SBH-10"
                     /isolation_source="Soil"
                     /db_xref="taxon:482086"
                     /country="Indonesia:East Kalimantan, Bukit Bangkirai"
                     /collection_date="Sep-2001"
                     /collected_by="OTSUKA & SUDIANA"
                     /identified_by="OTSUKA & SUDIANA"
     rRNA            <1..>1290
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tggcgaacgg gtgagtaata catcggaaca tgtcctgtag tgggggatag cccggcgaaa
       61 gccggattaa taccgcatac gatctacgga tgaaagcggg ggaccttcgg gcctcgcgct
      121 atagggttgg ccgatggctg attagctagt tggtggggta aaggcctacc aaggcgacga
      181 tcagtagctg gtctgagagg acgaccagcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc
      241 tacgggaggc agcagtgggg aattttggac aatgggcgaa agcctgatcc agcaatgccg
      301 cgtgtgtgaa gaaggccttc gggttgtaaa gcacttttgt ccggaaagaa atccttggcy
      361 ctaatacagt cgggggatga cggtaccgga agaataagca ccggctaact acgtgccagc
      421 agccgcggta atacgtaggg tgcgagcgtt aatcggaatt actgggcgta aagcgtgcgc
      481 aggcggtttg ctaagaccga tgtgaaatcc ccgggctcaa cctgggaact gcattggtga
      541 ctggcaggct agagtatggc agaggggggt agaattccac gtgtagcagt gaaatgcgta
      601 gagatgtgga ggaataccga tggcgaaggc agccccctgg gccaatactg acgctcatgc
      661 acgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccc taaacgatgt
      721 caactagttg ttggggattc atttccttag taacgtagct aacgcgtgaa gttgaccgcc
      781 tggggagtac ggtcgcaaga ttaaaactca aaggaattga cggggacccg cacaagcggt
      841 ggatgatgtg gattaattcg atgcaacgcg aaaaaccttа cctacccttg acatggtcgg
      901 aatcctgctg agaggtggga gtgctcgaaa gagaaccggc gcacaggtgc tgcatggctg
      961 tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttgtcct
     1021 tagttgctac gcaagagcac tctaaggaga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg
     1081 atgacgtcaa gtcctcatgg cccttatggg tagggcttca cacgtcatac aatggtcgga
     1141 acagagggtt gccaacccgc gaggggagc taatcccaga aaaccgatcg tagtccggat
     1201 tgcactctgc aactcgagtg catgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc
     1261 gcggtgaata cgttcccggg tcttgtacac
```

2. ผลการเทียบเคียง *Burkholderia cenocepacia* A29 โดยวิธี 20NE API kit เปรียบเทียบกับ *Burkholderia cepacia* TISTR 1869 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain)



รูปที่ 1ค ผลของ 20NE API kit ซึ่งทดสอบโดยใช้เชื้อ *Burkholderia cenocepacia* A29

รูปที่ 2ค ผลของ 20NE API kit ซึ่งทดสอบโดยใช้เชื้อ *Burkholderia cepacia* TISTR 1869

3. ผลการเทียบเคียง *Bacillus cereus* B36 โดยวิธี 16S rRNA gene

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis
Sample Name : B36

---

482 bp Identification

Homology Search with BLASTn program from NCBI database

```
Sequences producing significant alignments:                          SCORE
E VALUE

EF472264  Bacillus cereus strain LQ84                                  857
        0.0
FJ227312  Bacillus cereus strain bh11                                  856
        0.0
FJ215792  Bacillus sp. 3434BRRJ                                        856
        0.0
FJ227501  Bacillus cereus strain PHECC-1                               856
        0.0
FJ210679  Bacillus cereus strain AR52                                  856
        0.0
```

BLASTN 2.2.18+
Reference:
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: GSJU75S7011

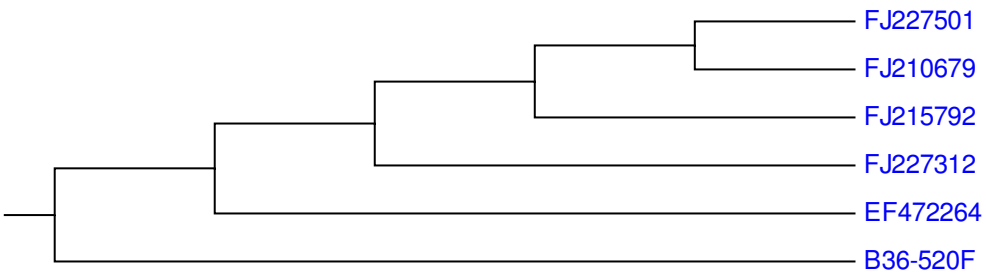
Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
7,692,188 sequences; 25,266,579,029 total letters

Query= B36-520F Length=482

```
>B36-520F
ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CC
```

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4

Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)



> gb|EF472264.1| Bacillus cereus strain LQ84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1412

Score = 863 bits (956), Expect = 0.0
Identities = 482/483 (99%), Gaps = 1/483 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  606   ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  665

Query  61    AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  666   AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC  725

Query  121   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  726   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  785

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  786   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA  845

Query  241   GCACTCCGCCT-GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC  299
             |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  846   GCACTCCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC  905

Query  300   GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT  359
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  906   GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT  965

Query  360   TGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGG  419
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  966   TGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGG  1025
```

```
Query  420   TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
479
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1026  TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
1085

Query  480   CCC  482
             |||
Sbjct  1086  CCC  1088
```

> gb|FJ227312.1| Bacillus cereus strain bh11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1453

```
 Score =  861 bits (954),  Expect = 0.0
 Identities = 481/482 (99%), Gaps = 1/482 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  609   ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
668

Query  61    AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  669   AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
728

Query  121   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  729   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
788

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  789   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
848

Query  241   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  849   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
908

Query  301   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
360
             |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  909   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT-CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
967

Query  361   GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  968   GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
1027

Query  421   GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct  1028  GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
1087

Query  481   CC  482
              ||
Sbjct  1088  CC  1089


> gb|FJ215792.1|  Bacillus sp. 3434BRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1249

 Score =  861 bits (954),  Expect = 0.0
 Identities = 481/482 (99%), Gaps = 1/482 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  491   ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
550

Query  61    AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  551   AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
610

Query  121   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  611   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
670

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  671   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
730

Query  241   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  731   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
790

Query  301   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
360
              |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  791   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT-CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
849

Query  361   GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  850   GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
909

Query  421   GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  910   GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
969

Query  481   CC  482
```

```
            ||
Sbjct  970  CC  971
```

> gb|FJ227501.1| Bacillus cereus strain PHECC-1 16S ribosomal RNA gene, partial
Sequence Length=1476

Score = 861 bits (954), Expect = 0.0
Identities = 481/482 (99%), Gaps = 1/482 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  617   ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  676

Query  61    AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  677   AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC  736

Query  121   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  737   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  796

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  797   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA  856

Query  241   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  857   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  916

Query  301   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT  360
             |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  917   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT-CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT  975

Query  361   GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  976   GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT  1035

Query  421   GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1036  GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  1095

Query  481   CC  482
             ||
```

```
Sbjct  1096  CC  1097


> gb|FJ210679.1|  Bacillus cereus strain AR52 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1506

 Score =  861 bits (954),  Expect = 0.0
 Identities = 481/482 (99%), Gaps = 1/482 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  618   ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
677

Query  61    AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  678   AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
737

Query  121   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  738   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
797

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  798   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
857

Query  241   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  858   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
917

Query  301   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
360
             |||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  918   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT-CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
976

Query  361   GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  977   GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
1036

Query  421   GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1037  GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
1096

Query  481   CC  482
             ||
Sbjct  1097  CC  1098
```

```
LOCUS       EF472264               1412 bp    DNA     linear   BCT 10-APR-
2007
DEFINITION  Bacillus cereus strain LQ84 16S ribosomal RNA gene, partial
            sequence.
ACCESSION   EF472264
VERSION     EF472264.1  GI:141447886
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus cereus
  ORGANISM  Bacillus cereus
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;
Bacillus
            cereus group.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1412)
  AUTHORS   Jiang,D. and Niu,T.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-MAR-2007) Food Biotechnology, Food Science, No 17
of
            Qinghua East Road, Beijing 100083, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1412
                     /organism="Bacillus cereus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="LQ84"
                     /db_xref="taxon:1396"
                     /note="PCR_primers=fwd_name: 27f, rev_name: 1541r"
     rRNA            <1..>1412
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gggcggcgtg ctatacatgc aagtcgagcg aatggattaa gagcttgctc ttatgaagtt
       61 agcgctgtat cggtgagtaa cacgtgggta acctgcccat aagactggga taactccggg
      121 aaaccggggc taataccgga taacattttg aactgcatgg ttcgaaattg aaaggcggct
      181 tcggctgtca cttatggatg gacccgcgtc gcattagcta gttggtgagg taacggctca
      241 ccaaggcaac gatgcgtagc cgacctgaga gggtgatcgg ccacactggg actgagacac
      301 ggcccagact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac
      361 ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggctt tcgggtcgta aaactctgtt gttagggaag
      421 aacaagtgct agttgaataa gctggcacct tgacggtacc taaccagaaa gccacggcta
      481 actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc gttatccgga attattgggc
      541 gtaaagcgcg cgcaggtggt ttcttaagtc tgatgtgaaa gcccacggct caaccgtgga
      601 gggtcattgg aaactgggag acttgagtgc agaagaggaa agtggaattc catgtgtagc
      661 ggtgaaatgc gtagagatat ggaggaacac cagtggcgaa ggcgactttc tggtctgtaa
      721 ctgacactga ggcgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg
      781 ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagagg gtttccgccc tttagtgctg aagttaacgc
      841 attaagcact ccgcctgggg gagtacggcc gcaaggctga aactcaaagg aattgacggg
      901 ggcccgcaca agcggtggag catgtggttt aattccgaag caacgcgaag aaccttacca
      961 ggtcttgaca tcctctgaaa accctagaga tagggcttct ccttcgggag cagagtgaca
     1021 ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag
     1081 cgcaaccctt gatcttagtt gccatcatta agttgggcac tctaaggtga ctgccggtga
     1141 caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca
     1201 cacgtgctac aatggacggt acaaagagct gcaagaccgc gaggtggagc taatctcata
     1261 aaaccgttct cagttcggat tgtaggctgc aactcgccta catgaagctg gaatcgctag
     1321 taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc
     1381 acaccacgag agtttgtaac acccgaagtc gg
```

```
LOCUS       FJ227312                1453 bp    DNA     linear   BCT 15-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus cereus strain bh11 16S ribosomal RNA gene, partial
            sequence.
ACCESSION   FJ227312
VERSION     FJ227312.1  GI:209401547
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus cereus
  ORGANISM  Bacillus cereus
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;
Bacillus
            cereus group.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1453)
  AUTHORS   Hua,C. and Dong,M.
  TITLE     PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis and
            identification of the microbial consortium present in Xinjiang
Boza
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1453)
  AUTHORS   Dong,M. and Hua,C.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-SEP-2008) College of Food Science and Technology,
            Nanjing Agricultural University, 1 Weigang Road, Nanjing,
Jiangsu
            210095, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1453
                     /organism="Bacillus cereus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="bh11"
                     /isolation_source="fermented beverage"
                     /db_xref="taxon:1396"
                     /country="China: Xinjiang"
     rRNA            <1..>1453
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 cccgtggggg cgtgctataa tgcaagtcga gcgaatggat tgagagcttg ctctcaagaa
       61 gttagcggcg gacgggtgag taacacgtgg gtaacctgcc cataagactg ggataactcc
      121 gggaaaccgg ggctaatacc ggataacatt ttgaactgca tggttcgaaa ttgaaaggcg
      181 gcttcggctg tcacttatgg atggacccgc gtcgcattag ctagttggtg aggtaacggc
      241 tcaccaaggc aacgatgcgt agccgacctg agagggtgat cggccacact gggactgaga
      301 cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct
      361 gacggagcaa cgccgcgtga gtgatgaagg ctttcgggtc gtaaaactct gttgttaggg
      421 aagaacaagt gctagttgaa taagctggca ccttgacggt acctaaccag aaagccacgg
      481 ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtaggtggca agcgttatcc ggaattattg
      541 ggcgtaaagc gcgcgcaggt ggtttcttaa gtctgatgtg aaagcccacg gctcaaccgt
      601 ggagggtcat tggaaactgg gagacttgag tgcagaagag gaaagtggaa ttccatgtgt
      661 agcggtgaaa tgcgtagaga tatggaggaa caccagtggc gaaggcgact ttctggtctg
      721 taactgacac tgaggcgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc
      781 acgccgtaaa cgatgagtgc taagtgttag agggtttccg cccttagtg ctgaagttaa
      841 cgcattaagc actccgcctg gggagtacgg ccgcaaggct gaaactcaaa ggaattgacg
      901 ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc
      961 aggtcttgac atcctctgaa aaccctagag atagggcttc tccttcggga gcagagtgac
     1021 aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga
     1081 gcgcaaccct tgatcttagt tgccatcatt aagttgggca ctctaaggtg actgccggtg
     1141 acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg cccccttatga cctgggctac
     1201 acacgtgcta caatggacgg tacaaagagc tgcaagaccg cgaggtggag ctaatctcat
     1261 aaaaccgttc tcagttcgga ttgtaggctg caactcgcct acatgaagct ggaatcgcta
     1321 gtaatcgcgg atcagcatgc cgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt
     1381 cacaccacga gagtttgtaa cacccgaagt cggtggggta acctttttga gccagccgcc
     1441 taaggtgaca aat
```

```
LOCUS       FJ215792               1249 bp    DNA     linear   BCT 14-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus sp. 3434BRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   FJ215792
VERSION     FJ215792.1  GI:209363282
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus sp. 3434BRRJ
  ORGANISM  Bacillus sp. 3434BRRJ
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1249)
  AUTHORS   Souza,M.O., Baio,P.V.P., Otsuki,K. and Vieira,V.V.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (12-SEP-2008) Microbiology, INCQS/FIOCRUZ, Avenida
            Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1249
                     /organism="Bacillus sp. 3434BRRJ"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="3434BRRJ"
                     /isolation_source="pharmaceutical product contaminant"
                     /db_xref="taxon:564847"
                     /country="Brazil: Rio de Janeiro"
     rRNA            <1..>1249
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ccgggaaacc ggggctaata ccggataaca ttttgaaccg catggttcga aattgaaagg
       61 cggcttcggc tgtcacttat ggatggaccc gcgtcgcatt agctagttgg tgaggtaacg
      121 gctcaccaag gcaacgatgc gtagccgacc tgagagggtg atcggccaca ctgggactga
      181 gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt
      241 ctgacggagc aacgccgcgt gagtgatgaa ggctttcggg tcgtaaaact ctgttgttag
      301 ggaagaacaa gtgctagttg aataagctgg caccttgacg gtacctaacc agaaagccac
      361 ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttat ccggaattat
      421 tgggcgtaaa gcgcgcgcag gtggtttctt aagtctgatg tgaaagccca cggctcaacc
      481 gtggagggtc attggaaact gggagacttg agtgcagaag aggaaagtgg aattccatgt
      541 gtagcggtga aatgcgtaga gatatggagg aacaccagtg gcgaaggcga ctttctggtc
      601 tgtaactgac actgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt
      661 ccacgccgta aacgatgagt gctaagtgtt agagggtttc cgccctttag tgctgaagtt
      721 aacgcattaa gcactccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctgaaactca aaggaattga
      781 cgggggcccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta
      841 ccaggtcttg acatcctctg aaaaccctag agatagggct tctccttcgg gagcagagtg
      901 acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac
      961 gagcgcaacc cttgatctta gttgccatca ttaagttggg cactctaagg tgactgccgg
     1021 tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgcccctcat gacctgggct
     1081 acacacgtgc tacaatggac ggtacaaaga gctgcaagac cgcgaggtgg agctaatctc
     1141 ataaaaccgt tctcagttcg gattgtaggc tgcaactcgc ctacatgaag ctggaatcgc
     1201 tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc gggccttgt
```

```
LOCUS       FJ227501               1476 bp    DNA     linear   BCT 13-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus cereus strain PHECC-1 16S ribosomal RNA gene, partial
            sequence.
ACCESSION   FJ227501
VERSION     FJ227501.1  GI:209170695
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus cereus
  ORGANISM  Bacillus cereus
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;
Bacillus
            cereus group.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1476)
  AUTHORS   Yang,L., Wen,H.Y., Lv,Z.P. and Jin,Q.J.
  TITLE     Cloning and analysis of 16S rRNA genes of bacterial strain
PHECC-1
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1476)
  AUTHORS   Yang,L., Wen,H.Y., Lv,Z.P. and Jin,Q.J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-SEP-2008) School of Life Science, Xuzhou Normal
            University, Shanghai Road 101, Tongshan New District, Xuzhou,
            Jiangsu 221116, P.R. China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1476
                     /organism="Bacillus cereus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="PHECC-1"
                     /db_xref="taxon:1396"
     rRNA            <1..>1476
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gatgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc gaatggatta agagcttgct
       61 cttatgaagt tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggt aacctgccca taagactggg
      121 ataactccgg gaaaccgggg ctaataccgg ataacatttt gaaccgcatg gttcgaaatt
      181 gaaaggcggc ttcggctgtc acttatggat ggacccgcgt cgcattagct agttggtgag
      241 gtaacggctc accaaggcaa cgatgcgtag ccgacctgag agggtgatcg gccacactgg
      301 gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc cgcaatggac
      361 gaaagtctga cggagcaacg ccgcgtgagt gatgaaggct ttcgggtcgt aaaactctgt
      421 tgttagggaa gaacaagtgc tagttgaata agctggcacc ttgacggtac ctaaccagaa
      481 agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgttatccgg
      541 aattattggg cgtaaagcgc gcgcaggtgg tttcttaagt ctgatgtgaa agcccacggc
      601 tcaaccgtgg agggtcattg gaaactggga gacttgagtg cagaagagga aagtggaatt
      661 ccatgtgtag cggtgaaatg cgtagagata tggaggaaca ccagtggcga aggcgacttt
      721 ctggtctgta actgacactg aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct
      781 ggtagtccac gccgtaaacg atgagtgcta agtgttagag ggtttccgcc ctttagtgct
      841 gaagttaacg cattaagcac tccgcctggg gagtacggcc gcaaggctga aactcaaagg
      901 aattgacggg ggcccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga
      961 accttaccag gtcttgacat cctctgaaaa ccctagagat agggcttctc cttcgggagc
     1021 agagtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc
     1081 cgcaacgagc gcaacccttg atcttagttg ccatcattaa gttgggcact ctaaggtgac
     1141 tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgacc
     1201 tgggctacac acgtgctaca atggacggta caaagagctg caagaccgcg aggtggagct
     1261 aatctcataa aaccgttctc agttcggatt gtaggctgca actcgcctac atgaagctgg
     1321 aatcgctagt aatcgcggat cagcatgccg cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca
     1381 ccgcccgtca caccacgaga gtttgtaaca cccgaagtcg gtggggtaac ctttttggag
     1441 ccagccgcct aaggtgggac agatgattgg ggtgaa
```

```
LOCUS       FJ210679                1506 bp    DNA     linear   BCT 07-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus cereus strain AR52 16S ribosomal RNA gene, partial
            sequence.
ACCESSION   FJ210679
VERSION     FJ210679.1  GI:208401170
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus cereus
  ORGANISM  Bacillus cereus
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;
Bacillus
            cereus group.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1506)
  AUTHORS   Xue,Q., Li,S., Yang,Y., Smalla,K. and Guo,J.
  TITLE     Rhizocompetence and antagonistic activity towards a range of
            genetically diverse Ralstonia solanacearum strains a novel
approach
            for selecting biocontrol agents
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1506)
  AUTHORS   Xue,Q., Li,S. and Guo,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (14-SEP-2008) Phytopathology, Plant Protection,
Weigang,
            Nanjing, Jiangsu 210095, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1506
                     /organism="Bacillus cereus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="AR52"
                     /isolation_source="soil"
                     /db_xref="taxon:1396"
     rRNA            <1..>1506
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ggatgaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgag cgaatggatt aagagcttgc
       61 tcttatgaag ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg taacctgccc ataagactgg
      121 gataactccg ggaaaccggg gctaataccg gataacattt tgaactgcat ggttcgaaat
      181 tgaaaggcgg cttcggctgt cacttatgga tggacccgcg tcgcattagc tagttggtga
      241 ggtaacggct caccaaggca acgatgcgta gccgacctga gagggtgatc ggccacactg
      301 ggactgagac acggcccaga ctcctacggg aggcagcagt agggaatctt ccgcaatgga
      361 cgaaagtctg acggagcaac gccgcgtgag tgatgaaggc tttcgggtcg taaaactctg
      421 ttgttaggga agaacaagtg ctagttgaat aagctggcac cttgacggta cctaaccaga
      481 aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa gcgttatccg
      541 gaattattgg gcgtaaagcg cgcgcaggtg gtttcttaag tctgatgtga aagcccacgg
      601 ctcaaccgtg gagggtcatt ggaaactggg agacttgagt gcagaagagg aaagtggaat
      661 tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagagat atggaggaac accagtggcg aaggcgactt
      721 tctggtctgt aactgacact gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc
      781 tggtagtcca cgccgtaaac gatgagtgct aagtgttaga gggtttccgc cctttagtgc
      841 tgaagttaac gcattaagca ctccgcctgg ggagtacggc cgcaaggctg aaactcaaag
      901 gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag
      961 aaccttacca ggtcttgaca tcctctgaaa accctagaga tagggcttct ccttcgggag
     1021 cagagtgaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc
     1081 ccgcaacgag cgcaaccctt gatcttagtt gccatcatta agttgggcac tctaaggtga
     1141 ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac
     1201 ctgggctaca cacgtgctac aatggacggt acaaagagct gcaagaccgc gaggtggagc
     1261 taatctcata aaaccgttct cagttcggat tgtaggctgc aactcgccta catgaagctg
     1321 gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac
     1381 accgcccgtc acaccacgag agtttgtaac acccgaagtc ggtggggtaa ccttttgga
     1441 gccagccgcc taaggtggga cagatgattg gggtgaagtc gtaacaaggt agccgtatcg
     1501 gaaggt
```

4. **ผลการเทียบเคียง *Bacillus cereus* B36 โดยวิธี 50CHB API kit เปรียบเทียบกับ *Bacillus cereus* TISTR 687 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain)**

รูปที่ 3ค ผลของ 50CHB API kit ซึ่งทดสอบโดยใช้เชื้อ *Bacillus cereus* B36

รูปที่ 4ค ผลของ 50CHB API kit ซึ่งทดสอบโดยใช้เชื้อ *Bacillus cereus* TISTR 687

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสัลวา ตอปี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010220143

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2546

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. ทุนผู้ช่วยสอน (พ.ศ. 2551 และ 2552) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนราชกรีฑาสโมสร (พ.ศ. 2550 และ 2551) จากสมาคมราชกรีฑาสโมสร

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Torpee, S., Charernjiratrakul, W., Kantachote, D. 2008. Selection of *Azotobacter* sp. and *Bacillus* sp. as inoculants to enhance Nitrogen and Phosphorus fertilizer. Proceeding of the 10th National Graduate Research Conference. Sukhothai Thamathirat Open University. September 11-12, 2009.