



ความหลากหลายของไรโซเบียมในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา Diversity of Rhizobia in Phranakhonsiayutthaya province

¹สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง

¹Sujidkanlaya Maruekarajitinplaeng

¹สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

^{*}Correspondent author: sujidkanlaya@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียมจากดิน ใน 16 อำเภอของจังหวัดพระนครศรีอยุธยา สามารถแยกแบคทีเรียได้ 160 ไอโซเลต สุ่มคัดเลือกแบคทีเรีย 25 ไอโซเลต มาศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาการเจริญบนอาหารวุ้นสูตร Yeast Extract Mannitol Agar (YMA) ที่มีคอนโกเรด 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือพวกเจริญเร็วและพวกเจริญช้าเมื่อนำมาศึกษาการสร้างกรดและด่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีบรอมไทมอลบลู เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสพบว่ามี 3 รูปแบบ คือ แบบที่ 1 สร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดตลอดระยะเวลาการบ่มเชื้อ 10 วัน แบบที่ 2 สร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างหลังจากบ่มเชื้อนาน 5 วัน จากนั้นสร้างกรดหลังจากบ่มเชื้อต่อเนื่องนานอีก 5 วัน แบบที่ 3 สร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ตลอดระยะเวลาการบ่มเชื้อ 10 วัน ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0.1-0.5 % จากการทดสอบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ต้านทานต่อ Chloramphenicol (30 µg) ผลการจำแนกเชื้อโดยใช้ 16S rDNA พบว่าเชื้อตัวแทนทั้ง 25 ไอโซเลต จำแนกได้ 4 ชนิดคือ *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Bradyrhizobium elkanii* และ *Shinorhizobium saheli*

Abstract

The purpose of this research was to isolate and study biodiversity of rhizobia from sixteen districts in Phranakhonsi Ayutthaya province. The result of bacterial isolation showed 160 isolates. The 25 from 160 isolates were randomly selected to study physiological on Yeast Extract Mannitol Agar (YMA) supplemented with 0.25 µg ml⁻¹ congo red. They were identified in 2 groups: fast growth and slower growth. Based on acid-base production on YMA with bromothymolblue as an indicator and incubated at 30°C, the results could be classified in 3 types. Type I soil Rhizobia produced only acid after 10-day incubation while type II secreted alkaline metabolize 5-day incubation and subsequently produced acid metabolize after continuous incubation for another 5 days. Type III released only alkaline throughout 10-day incubation. Furthermore, the effect of salinity on bacterial growth was studied with the variation of NaCl concentration. Most soil Rhizobia could be presented on the medium sup-

plemented with low concentration of NaCl. In addition, the resistant reaction of antibiotic was showed that most isolates were able to resist Chloramphenicol (30 µg). Comparative sequence analysis of the 25 isolates according to the 16S rDNA sequencing revealed that 25 isolates were classified as *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Bradyrhizobium elkanii* and *Sinorhizobium saheli*.

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางชีวภาพ, ไรโซเบียม, การตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ

Keywords: biodiversity, rhizobia, biological nitrogen fixation

บทนำ

ข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เพราะประชากรในประเทศส่วนใหญ่เป็นเกษตรกร และนิยมปลูกข้าวเป็นพืชหลัก เช่นเดียวกันกับเกษตรกรในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่มีอาชีพทำนาและนิยมปลูกข้าวเป็นพืชหลักด้วยเช่นกัน การทำการเกษตรของเกษตรกรไทยในปัจจุบันนิยมใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิต ซึ่งการใช้ปุ๋ยเคมีในการทำการเกษตรในระยะยาวนั้นส่งผลเสียหลายด้าน เช่น การทำให้เกิดปัญหาดินเสื่อมสภาพ การทำให้เกิดปัญหามลภาวะประเภทยูโทรฟิเคชัน (eutrofication) รวมทั้งยังส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตข้าวสูงขึ้นเนื่องจากปุ๋ยเคมีมีราคาแพง และส่งผลให้ประเทศขาดดุลการค้าทั้งนี้เพราะปุ๋ยเคมีส่วนมากได้จากการนำเข้าแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมี คือ การรณรงค์ให้เกษตรกรใช้ปุ๋ยอินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพและใช้กันอย่างแพร่หลาย (1) ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae ในภาวะที่เชื้อนี้อาศัยอยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่ว จะอยู่ในลักษณะที่ได้ประโยชน์ร่วมกันทั้งสองฝ่าย (symbiosis) โดยไรโซเบียมจะอาศัยอยู่ในโครงสร้างส่วนที่เป็นปมของพืชตระกูลถั่ว เซลล์อิสระของไรโซเบียมจะมีรูปร่างแบบแท่ง ขนาดของเซลล์กว้างประมาณ 0.5-0.9 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1.2-3.0 ไมโครเมตร (2) ไม่สร้างเอ็นโดสปอร์และเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา (3) เซลล์ของไรโซเบียมที่อยู่ในปมพืชตระกูลถั่ว รูปร่างเซลล์จะแตกต่างจากรูปร่างของเซลล์อิสระ โดยที่รูปร่างของเซลล์จะมีหลายแบบ เช่น รูปร่างคล้ายอักษร

เอกซ์ (X-shape) รูปร่างคล้ายอักษรวาย (Y-shape) หรือรูปร่างคล้ายรูปดาว (star shape) เรียกไรโซเบียมที่อาศัยในปมของพืชตระกูลถั่ว ว่าแบคทีเรีย (Bacteroid) (4) ซึ่งมีคุณสมบัติที่พิเศษอย่างหนึ่งคือ สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ ให้เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ กรมวิชาการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรปลูกพืชตระกูลถั่ว เป็นพืชหมุนเวียน ช่วยปรับปรุงโครงสร้างดิน เนื่องจากที่ปมรากมี ไรโซเบียม ที่อยู่ร่วมกันแบบได้ประโยชน์ทั้งสองฝ่าย โดยไรโซเบียมจะได้รับสารอาหารต่างๆ ที่พืชปล่อยออกมาทางราก ส่วนพืชตระกูลถั่วจะได้รับธาตุไนโตรเจนที่ถูกตรึงโดยไรโซเบียมให้มาอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้นอกจากนี้ปริมาณธาตุไนโตรเจนที่เหลือในดิน ก็จะช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชที่ปลูกหลังจากการปลูกพืชตระกูลถั่ว ไม่ว่าจะเป็นข้าว หรือพืชชนิดอื่นดังนั้นการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกพืชตระกูลถั่วเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับพืชหลักก็จะช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีลงได้ การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมในการเพิ่มผลผลิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วเหลืองมีอย่างแพร่หลายในประเทศที่เป็นผู้นำด้านการส่งออกถั่วเหลือง (5) และมีการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของไรโซเบียมถั่วเหลืองกันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่ส่งถั่วเหลืองเป็นสินค้าออก (6,7,8) สำหรับในประเทศไทยมีผู้ศึกษาด้านความหลากหลายของไรโซเบียมไว้บ้างเช่นกัน เช่น ในปี 1991 Thompson และคณะ (9) ศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียมที่แยกจากถั่วเหลืองและถั่วพุ่ม จากตัวอย่างดินในจังหวัดเชียงใหม่ ในปี 1997 Nuntagij และคณะ (10) ศึกษาการจำแนกไรโซเบียมในประเทศไทย แต่ไม่ได้ระบุไว้ชัดเจนว่าแยก

เชื้อจากพื้นดินพบเป็นชนิด *Bradyrhizobium japonicum* strain THA2 THA5, THA6, THA7 และ THA211 ในปี 2010 Sujidkanlaya (11) ศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียมถั่วเหลือง ใน 16 ตำบลของจังหวัดพิษณุโลก ผลการจำแนกเชื้อถั่วแทน 20 ไอโซเลต โดยใช้ 16S rDNA สามารถจำแนกไรโซเบียมถั่วเหลืองได้ 3 ชนิด (species) คือ *B. elkanii*, *B. japonicum* และ *B. yuanmingense* ยังไม่พบข้อมูลที่มีการศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียมที่แยกจากดินในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียม ที่แยกจากดิน ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งจะทำให้ได้คลังเชื้อไรโซเบียม และได้ข้อมูลทางด้านสรีรวิทยา และข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้ รวมทั้งมีแหล่งเชื้อไรโซเบียมที่จะใช้ในการคัดเลือกหาชนิดของไรโซเบียมที่มีความเหมาะสมกับพันธุ์ถั่ว และมีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน ที่มีศักยภาพเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพซึ่งนอกจากจะช่วยเพิ่มผลผลิตแล้ว ยังส่งผลดีทางอ้อมก็สามารถลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีในโตรเจนลงได้ ส่งผลให้เกษตรกรประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อปุ๋ยเคมี ทั้งยังเป็นการช่วยปรับปรุงโครงสร้างดินและช่วยลดการขาดดุลการค้ำของประเทศไทยในการนำเข้าปุ๋ยเคมีได้

2. วิธีการวิจัย

2.1 การแยกเชื้อไรโซเบียม

เก็บตัวอย่างดิน จาก 16 อำเภอ ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นำมาแยกเชื้อไรโซเบียมตามวิธีของ Somasegaran และ Hoben (3) ดังนี้ใส่ดินลงในกระถางที่อบฆ่าเชื้อแล้วกระถางละ 5 กิโลกรัม จากนั้นนำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เขียวใหม่ 60 ที่เพาะงอกรากแล้วปลูกลงในกระถางกระถางละ 5 เมล็ด รดด้วยสารอาหารสำหรับเลี้ยงต้นถั่ว ที่ไม่มีธาตุไนโตรเจน (Nitrogen free medium) พีเอช 6.8 นาน 4 สัปดาห์ แล้วเก็บส่วนปมมาแยกเชื้อ โดยการล้างปมรากด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง จากนั้นแช่ด้วย 95% แอลกอฮอล์ นาน 1 นาที ตามด้วยคลอโรกซ์ (chlorox) 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

ปลอดเชื้อ 7 ครั้ง นำปมมาผ่าด้วยมีดปลอดเชื้อแล้วใช้ลูบและบริเวณที่มีชมพูมาขีดลาก (streak) บนอาหารวุ้นสูตร YM (Yeast extract mannitol agar) ที่มีคองโกเรด (congo red) เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เป็นอินดิเคเตอร์(3) ป่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อมีแบคทีเรียเจริญเลือกโคโลนีเชื้อที่คาดว่าจะเป็ไรโซเบียม คือโคโลนีทุกแบบที่เจริญและมีโคโลนีสีชมพู เพราะเชื้อไรโซเบียมจะไม่ดูดซับสีคองโกเรดแล้วนำมาขีดลากบนอาหารวุ้นสูตร YM ใหม่จนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วจึงเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหารวุ้นเยียงสูตร YM เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเชื้อไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การศึกษาความสามารถในการเจริญ

กระตุ้น (activate) แบคทีเรียที่จะศึกษาโดยการขีดลากลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีคองโกเรดเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (3) ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วันศึกษาลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น รวมทั้งสังเกตการปรากฏโคโลนีของแบคทีเรียทดสอบ หากพบว่าแบคทีเรียที่ทดสอบเจริญให้เห็นโคโลนีภายใน 24 ชั่วโมง จะจัดว่าเป็นพวกเจริญเพิ่มจำนวนเร็ว แต่หากแบคทีเรียที่ทดสอบใช้เวลาในการเจริญให้เห็นโคโลนีนานกว่า 24 ชั่วโมง จะจัดว่าเป็นพวกเจริญเพิ่มจำนวนช้า

2.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

กระตุ้น แบคทีเรียที่จะศึกษาโดยการขีดลากลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีบรอมไทม์บลู (bromthymol blue) เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (3) ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วันศึกษาความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิของแบคทีเรียทดสอบโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากมีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่าแบคทีเรียทดสอบนั้นสร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นกรด แต่หากอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินเข้มแสดงว่าแบคทีเรียทดสอบนั้นสร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง

2.4 การทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์

กระตุ้นแบคทีเรียที่จะศึกษาโดยการซิดลากลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีคองโกเรดเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (3) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วันจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร YM ที่มี โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0% และ 3.0% ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลว โดยตรวจสอบ การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อขุนแสดงว่าแบคทีเรียทดสอบสามารถเจริญได้ แต่หากอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีใสแสดงว่าแบคทีเรียทดสอบไม่สามารถเจริญได้

2.5 การทดสอบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะโดยวิธี Agar disc diffusion (12)

กระตุ้นแบคทีเรียที่จะศึกษา โดยการซิดลากลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีคองโกเรด (congo red) เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (3) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน และใส่แบคทีเรีย 1 ลูป (loop) ลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 50 มิลลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (ความเข้มข้นของเซลล์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิตร) จากนั้นใช้สารละลายของเชื้อ 1 มิลลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารวุ้นสูตร YM นำแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ มาวางบนจานเพาะเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบผลโดยสังเกตการเจริญของเชื้อ หากเกิดบริเวณใสแสดงว่าสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ แต่หากไม่เกิดบริเวณใสแสดงว่าสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้สารปฏิชีวนะ 10 ชนิด (ผลิตโดยบริษัท Oxoid) ได้แก่ เจนตามัยซิน (Gentamycin, 10 μ g), สเตรมิโดมัยซิน (Streptomycin, 10 μ g), เตตราซัยคลิน (Tetracycline, 30 μ g), โพลีมัยซิน บี (Polymyxin B, 300 units), กานามัย

ซิน (Kanamycin, 30 μ g), ไรฟามพิซิน (Rifampicin, 5 μ g), เบซิทรากซิน (Bacitracin, 10 μ g), คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol, 30 μ g), แอมพิซิลลิน (Ampicillin, 10 μ g) และ อิริโทรมัยซิน (Erythromycin, 15 μ g)

2.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ใช้วิธีพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท แมคโครเจน (Macrogen) ประเทศเกาหลี ในการทำพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ 27f และ 1492r โปรแกรมปฏิบัติการพีซีอาร์คือ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที 55 องศาเซลเซียส 60 วินาที 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 30 รอบ แล้วทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ

27F : AgAgTTTgA TCM TGG CTC Ag

1492R : TAC ggY TAC CTT gTTACg ACT T

518F : CCA gCAGCCgCggTA ATA Cg

800R : TAC CAggg T ATC TAA TCC

2.7 การจำแนกเชื้อ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในข้อ 2.6 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) เปรียบเทียบข้อมูลเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

3.1 ผลการแยกไรโซเบียมโดยใช้หัวเหลืองเป็นพืชดักจับ

ผลจากการแยกเชื้อไรโซเบียมโดยการปลูกหัวเหลืองในตัวอย่างดินที่เก็บมาจาก 16 อำเภอในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา แล้วแยกเชื้อจากปมรากตามวิธีของ Somasegaran และ Hoben (3) ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. แบคทีเรียที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองโดยใช้ตัวอย่างจากดิน 16 อำเภอในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา

ลำดับที่	อำเภอที่เก็บตัวอย่างดิน	รหัสเชื้อ	จำนวนไอโซเลต
1	พระนครศรีอยุธยา	SM001-SM010	10
2	บ้านแพรก	SM011-SM020	10
3	มหาราช	SM021-SM030	10
4	ท่าเรือ	SM031-SM040	10
5	บางปะหัน	SM041-SM050	10
6	นครหลวง	SM051-SM060	10
7	ภาชี	SM061-SM070	10
8	อุทัย	SM071-SM080	10
9	วังน้อย	SM081-SM090	10
10	บางปะอิน	SM091-SM100	10
11	บางบาล	SM101-SM110	10
12	ผักไห่	SM111-SM120	10
13	เสนา	SM121-SM130	10
14	บางซ้าย	SM131-SM140	10
15	ลาดบัวหลวง	SM141-SM150	10
16	บางไทร	SM151-SM160	10

จากตารางที่ 1 เมื่อใช้ตัวอย่างดินที่เก็บมาจากพื้นที่ 16 อำเภอ ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยามาใช้ในการปลูกถั่วเหลืองแล้วเก็บปมรากมาแยกเชื้อ พบว่า มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญบนจานอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีคองโกเรด 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรเป็นอินดิเคเตอร์เป็นจำนวนมาก เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่ไม่ดูดซับสีคองโกเรด ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นคุณสมบัติเฉพาะของไรโซเบียม และเลือกเก็บเชื้อที่มีลักษณะปลีกลักษณะที่แตกต่าง เช่น ขนาดของโคโลนี ความมันวาว การสร้างเมือก ทำให้ได้เชื้อแบคทีเรีย อำเภอละ 10 ไอโซเลต รวมเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 160 ไอโซเลต

3.2 ผลการศึกษาลักษณะโคโลนี

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผลในข้อ 3.1 มาศึกษาลักษณะโคโลนี โดยการ cấyเชื้อลงบนจานอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีคองโกเรด 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรเป็นอินดิเคเตอร์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วันแล้วศึกษาลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น พบลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แตกต่างกัน 5 แบบ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียตัวแทนที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองจากตัวอย่างดิน 16 อำเภอในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา

แบบที่ 1 : SM002 โคโลนีขนาดปานกลาง ขอบโคโลนีเรียบ (entire) สร้างเมือกมาก

แบบที่ 2: SM011 โคโลนีขนาดเล็กมาก ขอบโคโลนีเรียบ (entire) สร้างเมือกน้อย

แบบที่ 3 : SM030 โคโลนีขนาดปานกลาง ขอบโคโลนีไม่เรียบ (undulate) และมีการสร้างเมือกน้อย

แบบที่ 4 : SM028 โคโลนีขนาดใหญ่ มันวาวคล้ายไข่มุก ขอบโคโลนีเรียบ (entire)และมีการสร้างเมือกน้อย

แบบที่ 5 : SM032 โคโลนีขนาดปานกลาง ขอบโคโลนีไม่เรียบ (undulate) และมีการสร้างเมือกมาก

รูปที่ 1 แสดงโคโลนีของตัวแทนเชื้อทั้ง 5 แบบ ที่แตกต่างกันที่พบในงานวิจัยนี้ กล่าวคือ แบบแรก ตัวแทนเชื้อคือ ไอโซเลต SM002 โคโลนีมีขนาดปานกลาง (เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนียาวระหว่าง 0.1-0.3 mm) ลักษณะขอบโคโลนีเรียบ (entire) สร้างเมือกมาก แบบที่สอง ตัวแทนเชื้อคือ ไอโซเลต SM011 โคโลนีมีขนาดเล็กมาก (เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนียาวน้อยกว่า 0.1 mm) ขอบโคโลนีเรียบสร้างเมือกน้อย แบบที่ 3 ตัวแทนเชื้อคือ ไอโซเลต SM030 โคโลนีมีขนาดปานกลางขอบโคโลนีไม่เรียบ (undulate) และมีการสร้างเมือกปริมาณน้อย แบบที่ 4 ตัวแทนเชื้อคือ ไอโซเลต SM028 โคโลนีมีขนาด

ใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนียาวมากกว่า 0.3 mm) มันวาวคล้ายไข่มุก (pearly) ขอบโคโลนีเรียบ (entire) และมีการสร้างเมือกปริมาณน้อย และแบบที่ 5 ตัวแทนเชื้อคือ ไอโซเลต SM032 โคโลนีมีขนาดปานกลาง ขอบโคโลนีไม่เรียบและมีการสร้างเมือกปริมาณมาก

3.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยา

ผลการศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

และการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ของเชื้อ ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.2 และ 2.3 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. การเจริญและความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิของไรโซเบียมที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองจากตัวอย่างดิน 16 อำเภอในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	คุณสมบัติเบื้องต้น		ลำดับที่	รหัสเชื้อ	คุณสมบัติเบื้องต้น	
		การเจริญเพิ่มจำนวน	การผลิตสารเมตาบอไลต์			การเจริญเพิ่มจำนวน	การผลิตสารเมตาบอไลต์
1	SM001	S	K	14	SM090	S	K / A
2	SM009	S	K / A	15	SM098	S	K
3	SM012	S	K / A	16	SM101	S	K
4	SM017	S	K / A	17	SM104	S	K / A
5	SM021	S	K / A	18	SM110	S	K
6	SM033	S	K	19	SM111	S	K
7	SM035	S	K	20	SM125	S	K
8	SM041	S	K / A	21	SM132	F	A
9	SM048	S	K	22	SM140	S	K / A
10	SM059	S	K	23	SM145	S	K / A
11	SM071	S	K	24	SM149	S	K / A
12	SM075	S	K	25	SM151	S	K / A
13	SM081	S	K				

หมายเหตุ S หมายถึง การเจริญเพิ่มจำนวนช้า

F หมายถึง การเจริญเพิ่มจำนวนเร็ว

A หมายถึง ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรด

K หมายถึง ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นด่าง

K/A หมายถึง ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นด่างจากนั้นผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรดตามมา

จากตารางที่ 2 สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 3 กลุ่มที่แตกต่างกัน คือ กลุ่มแรกมีการเจริญเพิ่มจำนวนเร็ว ขับสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรด ได้แก่ ไอโซเลต SM132 กลุ่มที่ 2 มีการเจริญเพิ่มจำนวนช้า ขับสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ได้แก่ ไอโซเลต SM001, SM033, SM035, SM048, SM059, SM071, SM075, SM81, SM98, SM101, SM110, SM111, และ SM125 กลุ่มที่ 3 คุณสมบัติการเจริญเพิ่มจำนวนช้า การขับสารทุติยภูมิในระยะแรกของการเจริญจะขับสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างและจะเปลี่ยนเป็นกรดเมื่อเชื้อ

ทดสอบมีอายุเพิ่มมากขึ้น (K/A) ได้แก่ ไอโซเลต SM009, SM012, SM017, SM021, SM090, SM104, SM140, SM145, SM149 และ SM151

3.4 ผลการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์

ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อ ในอาหารเหลวสูตร YM ที่มีปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แตกต่างกัน ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. การเจริญของไรโซเบียมที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองจากตัวอย่างดิน 16 อำเภอในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ในอาหารเหลวสูตรYMที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ระดับความเข้มข้นของ NaCl(%)ในอาหารเหลวสูตรYM				
		0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
1	SM001	+	+	-	-	-
2	SM009	+	+	-	-	-
3	SM012	+	+	-	-	-
4	SM017	+	+	-	-	-
5	SM021	+	+	-	-	-
6	SM033	+	+	-	-	-
7	SM035	+	+	-	-	-
8	SM041	+	+	-	-	-
9	SM048	+	+	-	-	-
10	SM059	+	+	-	-	-
11	SM071	+	+	-	-	-
12	SM075	+	+	-	-	-
13	SM081	+	+	-	-	-
14	SM090	+	+	-	-	-
15	SM098	+	+	-	-	-
16	SM101	+	+	-	-	-
17	SM104	+	+	-	-	-
18	SM110	+	+	-	-	-
19	SM111	+	+	-	-	-
20	SM125	+	+	-	-	-
21	SM132	+	+	+	+	+
22	SM140	+	+	-	-	-
23	SM145	-	-	-	-	-
24	SM149	-	-	-	-	-
25	SM151	-	-	-	-	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย + หมายถึงเชื้อทดสอบมีการเจริญ เครื่องหมาย – หมายถึง เชื้อทดสอบไม่มีการเจริญ

จากตารางที่ 3 พบว่า ส่วนใหญ่เชื้อทดสอบ SM125, และ SM140 พบ 1 ไอโซเลต คือ SM132 ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ 0.1% และ 0.5% ได้แก่ ไอโซเลต SM001, SM009, SM012, SM017, SM021, SM033 SM035, SM041, SM048, SM059, SM071, SM075, SM081, SM145, SM149 และ SM151 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 3% ได้ส่วนไอโซเลตที่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ได้ มี 3 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต SM090, SM098, SM101, SM104, SM110, SM111,

3.5 ผลการทดสอบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ Bacitracin, Chloramphenicol, Erythromycin, Gentamycin, Kanamycin, Polymyxin B, Rifampicin, Streptomycin และ Tetracycline ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งในงานวิจัยนี้ ใช้ยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ได้แก่ Ampicillin,

ตารางที่ 4. การตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของไรโซเบียมที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองจากตัวอย่างดิน 16 อำเภอในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา

Isolates	ชนิดของสารปฏิชีวนะ									
	Rifampicin 5 µg	Erythromycin 15 µg	PolymyxinB 300 units	Ampi Bacitra Genta Strepto				Chloram Kana Tetra		
				10 µg				30 µg		
SM001	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
SM009	+	++	-	-	-	+	++	-	-	+
SM012	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
SM017	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
SM021	+	++	+	+	-	+	++	-	-	+
SM033	++	-	-	-	-	+	-	-	++	+
SM035	++	-	-	+	-	-	-	-	++	-
SM041	-	-	-	++	-	+	+	-	+	-
SM048	++	-	-	-	-	+	-	-	++	-
SM059	++	-	+	+	-	+	-	-	++	+
SM071	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SM075	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
SM081	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SM090	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
SM098	-	-	-	-	-	+	+	-	++	-
SM101	+	+	+	+	-	+	++	-	-	-
SM104	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
SM110	+	-	-	-	-	+	+	-	++	-
SM111	++	-	-	-	-	+	+	-	++	+
SM125	-	-	-	+	-	+	+	+	++	+
SM132	++	-	++	+	-	++	++	-	++	++
SM140	+	++	+	+	-	+	++	-	-	+
SM145	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+
SM149	+	++	+	+	-	+	++	-	-	+
SM151	-	-	-	++	-	++	++	-	++	-

หมายเหตุ ชื่อยีสสารปฏิชีวนะ Ampi หมายถึง Ampicillin, Bacitra หมายถึง Bacitracin, Genta หมายถึง Gentamycin, Strepto หมายถึง Streptomycin, Chloram หมายถึง Chloramphenicol, Kana หมายถึง Kanamycin, Tetra หมายถึง Tetracycline เครื่องหมาย ++ เกิดบริเวณใสกว้างมากกว่า 1 เซนติเมตร + หมายถึงเกิดบริเวณใส - หมายถึงไม่เกิดบริเวณใส

จากตารางที่ 4 พบรูปแบบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อทดสอบที่หลากหลายมาก จากการทดสอบเชื้อ 25 ไอโซเลต พบเชื้อไอโซเลต SM001 และ SM012 sensitive ต่อสารปฏิชีวนะ 4 ชนิด คือ Rifampicin, PolymyxinB, Ampicillin และ Streptomycin และมี 3 ไอโซเลต คือ SM021, SM140 และ SM149 sensitive ต่อสารปฏิชีวนะ 6 ชนิด คือ Rifampicin, Erythromycin, PolymyxinB, Ampicillin, Gentamycin, Tetracycline ในขณะที่ไอโซเลตที่เหลือพบว่ามีการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบแตกต่างกัน

3.6 ผลการจำแนกเชื้อโดยใช้ 16S rDNA

ผลการจำแนกเชื้อ 25 ไอโซเลต โดยใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5. ผลการจำแนกชนิดของไรโซเบียมที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองจากตัวอย่างดิน 16 อำเภอในจังหวัดพระนครศรีอยุธยาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA

ลำดับที่	รหัสชื่อ	Length	% Identities	Blast report
1	SM001	1433	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense strain LMRT-M62</i>
2	SM009	1477	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
3	SM012	1433	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense strain LMRT-M62</i>
4	SM017	1415	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
5	SM021	1477	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
6	SM033	1452	100	<i>Bradyrhizobium elkanii strain STB8</i>
7	SM035	1450	99	<i>Bradyrhizobium elkanii strain STB245</i>
8	SM041	1450	100	<i>Bradyrhizobium japonicum strain NA249</i>
9	SM048	1451	99	<i>Bradyrhizobium elkanii strain STB120</i>
10	SM059	1450	99	<i>Bradyrhizobium elkanii strain NA8</i>
11	SM071	1450	99	<i>Bradyrhizobium elkanii strain STB245</i>
12	SM075	1405	99	<i>Bradyrhizobium elkanii strain STB245</i>
13	SM081	1412	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
14	SM090	1403	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
15	SM098	1451	99	<i>Bradyrhizobium elkanii strain STB120</i>
16	SM101	1393	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense strain LMTR-M62</i>
17	SM104	1477	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
18	SM110	1451	99	<i>Bradyrhizobium elkanii strain STB120</i>
19	SM111	1451	99	<i>Bradyrhizobium elkanii strain STB120</i>
20	SM125	1450	99	<i>Bradyrhizobium elkanii strain STB120</i>
21	SM132	1410	99	<i>Sinorhizobium saheli</i>
22	SM140	1453	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense strain TTC4</i>
23	SM145	1477	100	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
24	SM149	1477	99	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
25	SM151	1450	99	<i>Bradyrhizobium japonicum strain NA249</i>

จากตารางที่ 5 พบว่า ไรโซเบียม 12 ไอโซเลต (SM001, SM009, SM012, SM017, SM021 SM081, SM090, SM101, SM104, SM140, SM145, SM149) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *Bradyrhizobium yuanmingense* ไรโซเบียม 10 ไอโซเลต (SM033, SM035, SM048, SM059, SM071 SM075, SM098, SM110, SM111, SM125) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *Bradyrhizobium elkanii* ไรโซเบียม 2 ไอโซเลต (SM041, SM151) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *Bradyrhizobium japonicum* และ 1 ไอโซเลต (SM132) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *Sinorhizobium saheli*

3.7 การอภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียม ที่แยกจากตัวอย่างดินในพื้นที่ 16 อำเภอของจังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยการใช้ถั่วเหลืองเป็นพืชล่อ (Host trapping method) (3) แล้วศึกษาคุณสมบัติทั้งด้านสรีรวิทยาผนวกกับคุณสมบัติทางด้านพันธุกรรมของเชื้อ และนำข้อมูลทั้งสองด้านมาใช้ในการจำแนกเชื้อที่แยกได้ (Polyphasic taxonomy) ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้ในการจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรีย (13) ในงานวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อจากปมรากถั่วเหลืองได้ทั้งสิ้น 160 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะการเจริญ 2 แบบ เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีคอกโคเรตคือเป็นประเภทเจริญเร็วและประเภทเจริญช้า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น (14) ที่พบว่า ไรโซเบียมถั่วเหลืองหากแบ่งตามคุณสมบัติการเจริญจะมี 2 แบบเช่นกัน ผลจากการศึกษารูปร่างและลักษณะของโคโลนีของเชื้อพบว่าสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการใช้ทำนายชนิดของไรโซเบียม ได้ เช่น *B. japonicum* โคโลนีรูปร่างกลม ลักษณะของโคโลนีมีความมันวาวคล้ายไข่มุก ขอบโคโลนีเรียบสร้างเมือกน้อย เป็นต้น นอกจากนี้ผลจากการศึกษาข้อมูลด้านการจับสารพิษภูมิของเชื้อตัวแทน 25 ไอโซเลต ที่พบรูปแบบการจับสาร 3 ประเภทนั้น ก็สามารถนำข้อมูลมาผนวกกับลักษณะโคโลนีและลักษณะวิทยาของเชื้อในการทำนายชนิดของไรโซเบียมได้เช่นกัน (ตารางที่ 2 และตารางที่ 5) ยกตัวอย่างเช่น หากเชื้อทดสอบจับสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดตลอดระยะเวลา

เวลาการบ่มจะพบว่าเป็นพวกเจริญเร็ว ซึ่งในงานวิจัยนี้พบเชื้อไรโซเบียมที่เป็นพวกเจริญเร็วเพียง 1 ชนิดเท่านั้นคือ *S. saheli* (SM132) แต่หากเชื้อทดสอบจับสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างตลอดระยะเวลาการบ่ม จะพบว่าเป็นเชื้อนั้นเป็นไรโซเบียมชนิด *B. ekanii* (SM033, SM035, SM048, SM059, SM071 SM075, SM098, SM110, SM111, SM125) ในขณะที่หากเชื้อทดสอบจับสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างในช่วงแรกของการเจริญจากนั้นเมื่อเลี้ยงต่อเนื่องนานเพิ่มขึ้นเชื้อจะจับสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดชนิดไรโซเบียม นั้นจะเป็น *B. japonicum* (SM041, SM151)

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีปริมาณ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า มี 1 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี NaCl เข้มข้นสูงถึง 3% คือ *S. saheli* SM132 ซึ่งเป็นพวกเจริญเร็วซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gauri และคณะ (15) ที่พบว่าเชื้อไรโซเบียมพวกเจริญเร็วมักจะสามารถทนต่อภาวะที่มีความเค็มสูงๆ ได้ Hashem และคณะ (16) ยังพบว่าสภาวะที่มีความเค็มสูงจะส่งผลต่อการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมรวมทั้งประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อด้วย ดังนั้น ควรศึกษาเพิ่มเติมทางด้านความสามารถในการเข้าสร้างปม ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน รวมทั้งแข่งขันกับเชื้ออื่นๆ ในสภาพแวดล้อมจริงในแปลงเพาะปลูกของไรโซเบียมชนิด *S. saheli* SM132 เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ทางการเกษตรที่สภาพแวดล้อมของดินมีความเค็มสูงต่อไป

จากการทดสอบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อ 25 ไอโซเลต พบรูปแบบการตอบสนองมากถึง 22 รูปแบบ และพบว่าถึงแม้ว่าเชื้อทดสอบจะเป็นชนิดเดียวกัน (จำแนกโดย 16S rDNA) กลับพบว่ามีรูปแบบของการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะมีความแตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายเรื่อง ที่พบว่า ไรโซเบียมชนิดเดียวกันแต่แตกต่าง ไอโซเลต (Isolate) จะตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน (17,18,19) ทั้งนี้สืบเนื่องจาก ตามธรรมชาติเชื้อจุลินทรีย์มีกระบวนการถ่ายทอดสารพันธุกรรม (horizontal gene transfer) (20,21) ที่ส่งผลต่อวิวัฒนาการของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่พบว่าเกิดการถ่ายทอดได้มีทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับ

ปฏิกิริยาการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ ยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคต่างๆ ของเชื้อก่อโรค (virulence gene) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิต (symbiosis gene) คุณสมบัติดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระดับสายพันธุ์ได้

ผลการจำแนกเชื้อในงานวิจัยนี้พบว่ามีไรโซเบียมที่หลากหลายชนิด (species) โดยในงานวิจัยนี้พบชนิดไรโซเบียม 4 ชนิด คือ *B. yuanmingense* *B. japonicum* *B. elkanii* และ *S. saheli* แต่ในงานวิจัยที่ศึกษาด้านความหลากหลายของไรโซเบียมที่แยกเชื้อจากตัวอย่างดินในจังหวัดพิษณุโลก พบไรโซเบียม 3 ชนิด คือ *B. elkanii*, *B. japonicum* และ *B. yuanmingense* (11) ในขณะที่ในงานวิจัยของ Chen และคณะ (22) ที่ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและวงส่ววนวิวัฒนาการของไรโซเบียมในประเทศจีน ที่พบว่า มีไรโซเบียมหลายชนิดที่พบ และส่วนมากจะจัดอยู่ในสกุล (genus) *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* และ *Sinorhizobium* แต่ไม่พบ *B. elkanii* ในขณะที่สายพันธุ์ไรโซเบียมที่พบได้เสมอในประเทศจีนคือ *B. japonicum* ทั้งนี้การพบสายพันธุ์ไรโซเบียมที่แตกต่างกัน ในต่างพื้นที่ สืบเนื่องมาจากแต่ละพื้นที่นั้นคุณสมบัติของดินมีความแตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็น ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน อุณหภูมิของดิน รวมทั้งชนิดของพืชที่ปลูกในดิน ซึ่งล้วนส่งผลต่อการค้นพบชนิดของจุลินทรีย์ในดินด้วย ในงานวิจัยนี้นอกจากจะพบไรโซเบียมที่หลากหลายสายพันธุ์แล้วยังพบ *S. saheli* SM132 ซึ่งเป็นไรโซเบียมประเภทเจริญเร็ว และโดยปกติเชื่อนี้เป็นเชื้อที่อยู่ร่วมกันกับถั่วสน การที่ในงานวิจัยนี้พบเชื่อนี้ อาจสืบเนื่องมาจากการเกิด Horizontal transfer of symbiotic gene จากเชื้อที่เข้าสู่รากปมในถั่วสนมาทำให้เชื่อนี้มีความสามารถเข้าสู่รากปมในถั่วเหลืองได้ (23) ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป

4. สรุป

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เมื่ออยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่วจะสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปของธาตุไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกไรโซเบียม

จากดิน 16 อำเภอ ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา แล้วศึกษาความหลากหลาย ของไรโซเบียมที่แยกได้ ผลการวิจัยสามารถแยกแบคทีเรียได้ 160 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 5 แบบ สุ่มศึกษาไรโซเบียม 25 ไอโซเลต ด้านคุณสมบัติทางสรีรวิทยาเบื้องต้น สามารถจัดกลุ่มไรโซเบียมได้ 2 กลุ่มตามคุณสมบัติการเจริญบนอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีทองโกเรด 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร คือ เป็นพวกเจริญช้าทั้งหมด ยกเว้นไอโซเลต SM132 ที่เป็นพวกเจริญเร็ว ผลการศึกษาการผลิสารทุติยภูมิบนอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีบรอมไทม์บลูที่ 30°C พบรูปแบบการยับยสารทุติยภูมิ 3 แบบ คือ แบบที่ 1 ยับสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดตลอดระยะเวลาการบ่มเชื้อ 10 วัน แบบที่ 2 ยับสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างหลังจากบ่มเชื้อนาน 5 วัน จากนั้นจะยับยสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดหลังจากบ่มเชื้อต่อเนื่องนานอีก 5 วัน แบบที่ 3 ยับสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ตลอดระยะเวลาการบ่มเชื้อ 10 วัน ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ พบว่ามี 3 ไอโซเลตที่ไม่เจริญ (SM145, SM149, SM151) แต่เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่ำมี 1 ไอโซเลตที่สามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% (SM132) ผลการศึกษาการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด คือ Rifampicin, Erithromycin, PolymixinB, Ampicilin, Acitracin, Gentamycin, Streptomycin, Chloramphenicol, Kanamycin และ Tetracycline พบว่ามีรูปแบบการตอบสนองที่หลากหลาย และเมื่อจำแนกชนิดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า มีแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต (SM001, SM009, SM012, SM017, SM021, SM081, SM090, SM101, SM104, SM140, SM145, SM149) ที่ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium yuanmingense* มีแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต (SM033, SM035, SM048, SM059, SM071, SM075, SM098, SM110, SM111, SM125) ที่ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium elkanii* มีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต (SM041, SM151) ที่ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium japonicum* และมี 1 ไอโซเลต (SM132) ที่ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Sinorhizobium saheli*

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการส่งเสริมการวิจัยใน
อุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ สำนักงาน
คณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้การสนับสนุน
งบประมาณในการดำเนินงานวิจัย และ ขอขอบคุณ
มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่อำนวยความสะดวก
ในด้านสถานที่และอุปกรณ์การวิจัย รวมทั้ง
บุคลากรที่เกี่ยวข้องทุกท่าน

6. เอกสารอ้างอิง

- (1) Pamela M, Mariangela H, Fernando GB, Eliane VB, Pablo NH, Esperanza MR. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. 2006;29:315-332.
- (2) Jordan, D.C. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Family III Rhizobiaceae. In: Krieg, N.R., and Holt, J.G. (eds). Baltimore: William & Wilkins;1984. p. 234-244.
- (3) Somasegaran P, Hoben HJ. Handbook for Rhizobia; Methods in Legume-Rhizobium Technology. New York: Springer Verlag; 1994.
- (4) Alexander, M. Introduction to soil microbiology. 2nd. ed., New York and London: John Wiley and sons; 1977.
- (5) Aguilar DM, Lopez MV, Riccillo PM. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. J Biotechnol. 2001;91:181-188.
- (6) Hume DJ, Blair DH. Effect of number of *Bradyrhizobium liaoningense* sp. Nov, isolated from root of soybean. Int J Syst Bacteriol. 1992;45:706-711.
- (7) Young CC, Cheng KT. Genetic diversity of fast- and slow-growing soybean rhizobia determined by random amplified polymorphic DNA analysis. Biol Fertil soils. 1998;26:254-256.
- (8) Sharma RS, Mohammed A, Mishra V. Diversity in a promiscuous group of rhizobia from three *Sesbanias* pp. colonizing ecologically distinct habitats of the semi-arid Delhi region. Babu CR Res Microbiol. 2005;156:57-67.
- (9) Thomson JA, Bhromsiri A, Shutsrirung A, Lillakan S. Native root nodules bacteria of traditional soybean growing areas of northern Thailand. Plant and Soil. 1991;135:53-65.
- (10) Nuntagij A, Abe M, Uchiumi T, Seki Y, Boonkerd N, Higashi S. Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from soybean cultivation areas in Thailand. J Gen Appl Microbiol. 1997; 43: 183-187.
- (11) Sujidkanlaya M. Diversity of Soybean rhizobia in 16 subdistricts of Phitsanulok Province [PhD thesis]. Bangkok: Chulalongkorn University;2010.
- (12) Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45: 493-496.
- (13) Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev. 1996;60(2):407-438.
- (14) Elkan GH. Taxonomy of the Rhizobia. Canadian J Microbiol. 1992;38: 446-450.
- (15) Gauri, Ashok KS, Rajendra PB, Shaija P, Manjinder KB, Ashok N. Characterization of Rhizobium isolated from nodules^o of *Trifolium alexandrinum*. J Agri Tech. 2011;7(6):1705-1723.
- (16) Hasherm FM, Swelim DM, Kuykendell LD. Identification and Characterization of salt thermo-tolerant Leucacnanodulating *Rhizobium* strains. Biol Fertil Soils. 1998;27:335-341.

- (17) Milicic B, Delic D, Kuzmanovic D, Stajkovic O, Josic D. Intrinsic antibiotic resistance of different *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium galegae* strains. RoumaniaBiotLett. 2006;11(3): 2723-2731.
- (18) Antoun H. Strain identification in *Rhizobium meliloti* using the antibiotic disk susceptibility test. Plant and soil 1982;66:45-50.
- (19) Gwyn AB, Handelman J. A rapid method for the isolation and identification of *Rhizobium* from root nodules. J Microbiol Method. 1989;9:29-33.
- (20) Dobrindt U, Hacker J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. Current Opinion Microbiol. 2001;4:550-557.
- (21) Fernando GB, Pamela M, Jesiane S, Mariangela H. Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic gene from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in Brazilian Savannah Soil. Appl and Environ Micro. 2007;73(8):2635-2643.
- (22) Chen W, Huang Q, Xiong X. Distribution and biodiversity of soybean rhizobia in the soils of Shennongjia forest reserve, China. BiolFertil Soils. 2004;40:306-312.
- (23) Minamisawa K, Itakuba M, Suzuki M, Ichige K, Isawa T, Yuhashi K, Mitsui H. Horizontal transfer of nodulation gene in soil and microcosms from *Bradyrhizobium japonicum* to *B. elkanii*. Microb and Envi. 2002;17(2):82-90.