



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การวิจัยและพัฒนาสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของ
พืชเศรษฐกิจที่เพาะปลูกในดินเค็ม

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา และคณะ

พฤษภาคม 2552

สัญญาเลขที่ MRG 5080058

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การวิจัยและพัฒนาสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจ
ที่เพาะปลูกในดินเค็ม

Research and Development for Growth Promoters of Economic Plant
Cultivated in Saline Soil

คณะผู้วิจัย

ผศ. ดร. กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
อ. ดร. เกศสุคนธ์ มณีวรรณ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

นักวิจัยที่ปรึกษา

ศ. ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ. ดร. บรรยง ทুমแสน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้า (ผศ.ดร. กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา) หัวหน้าโครงการวิจัยนี้ ขอส่งความระลึกถึง และความขอบพระคุณอย่างสูงแก่ ผศ.ดร. สุรลักษณ์ รอดทอง อาจารย์สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในระดับปริญญาเอกของข้าพเจ้า ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ด้าน จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อมแก่ข้าพเจ้าด้วยความตั้งใจที่เปี่ยมล้น และมีการปฏิบัติตนเป็นต้นแบบที่ดีมากด้าน การทำงาน จนทำให้ข้าพเจ้าเกิดความรักในการศึกษาจุลินทรีย์ และรักในวิชาชีพการเป็นครูผู้ให้ความรู้ แก่นิสิตมากยิ่งขึ้น

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอย่างสูงแก่ ศ.ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ อ.ดร. บรรยง ทুমแสน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากร การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณารับหน้าที่เป็นนักวิจัยที่ปรึกษาให้แก่ โครงการวิจัยนี้ โดยท่านทั้งสองได้เสียสละเวลาอันมีค่าในการพิจารณา และให้ข้อเสนอแนะที่มีค่ายิ่งต่อ การทำวิจัย การเขียนรายงานการวิจัย และการตรวจแก้ต้นฉบับสำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ นานาชาติ อาจารย์ทั้งสองท่านทำให้ข้าพเจ้าซาบซึ้งถึงควมมีคุณค่าแห่งการดำรงตนเป็นครูผู้ให้ที่ดี ที่ ควรยิ่งแก่การนำไปปฏิบัติตาม โดยเฉพาะท่าน อ.ดร. บรรยง ทুমแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ และ ช่วยเหลือทางวิชาการแก่ข้าพเจ้าโดยที่ไม่เคยรู้จักกันมาก่อน

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีจากการสนับสนุนของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในด้านห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือวิเคราะห์ต่าง ๆ ตลอดจนบุคคลต่าง ๆ ในภาควิชา ทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และ นางสาวสุจรรยา ทรัพย์ศิริโสภา นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ซึ่งข้าพเจ้าขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอแสดงความขอบคุณอย่างสูงต่อแหล่งทุนสนับสนุนการวิจัยคือ สำนักงานกองทุน สนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่สนับสนุนทุนพัฒนา ศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่แก่ข้าพเจ้าในการทำโครงการวิจัยนี้ ทำให้โจทย์วิจัยที่ข้าพเจ้า คิดได้รับการสานต่อ และทำให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสนในการเพิ่มเติมทักษะในการทำวิจัยภายใต้การแนะนำ ทางวิชาการจากนักวิจัยที่ปรึกษา และภายใต้การประสานงานดูแลโครงการวิจัยจาก สกว. ด้วยดี สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณทุกคำแนะนำในการทำวิจัยจากผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้มาให้คำแนะนำที่มี ประโยชน์อย่างยิ่งเมื่อครั้งนำเสนอผลการวิจัยในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

รหัสโครงการ : MRG 5080058

ชื่อโครงการ : การวิจัยและพัฒนาสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจ
ที่เพาะปลูกในดินเค็ม

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ผศ.ดร. กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา และ อ.ดร. เกศสุคนธ์ มณีวรรณ
สังกัดภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย
มหาสารคาม

E-mail Address : karb90@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 ธันวาคม พ.ศ. 2549 ถึง 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2552

ดินเค็มพบแพร่กระจายทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตแห้งแล้ง และกึ่งแห้งแล้งที่ทำการเกษตรด้วยการชลประทาน ปัญหาหลักของการเกษตรกรรมในพื้นที่ดินเค็มคือผลกระทบจากความเค็มของดินที่มีต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช จุลินทรีย์ในดิน และคุณสมบัติของดินด้วยกลไกต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเป็นปัจจัยที่ชักนำให้พืชเกิดการสร้างเอทิลีนจากสภาวะเครียดจากความเค็ม ทำให้เกิดการยับยั้งการยืดตัวของรากและลำต้น ตลอดจนการที่ความเค็มทำให้ลดการสะสมฟอสฟอรัสในพืช และเปลี่ยนรูปฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชไปเป็นรูปที่ถูกตรึง การวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาให้ความสำคัญกับการใช้แบคทีเรียสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria, PGPB) เนื่องจากปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นแนวทางการเกษตรที่ยั่งยืน โครงการวิจัยนี้ให้ความสนใจกับบทบาทของ PGPB 2 กลุ่มคือ แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่เป็นตัวทำลาย 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดเอทิลีนในพืช เพื่อช่วยให้พืชลดการสร้างเอทิลีนในสภาวะความเครียดเนื่องจากเกลือ (Salt stress-induced ethylene) และสนใจบทบาทของแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต เพื่อช่วยให้พืชได้รับฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากความเค็มเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญยิ่งต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในดิน ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรีย PGPB ที่ทนเค็ม ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และสามารถละลายฟอสเฟต จึงน่าจะทำให้แบคทีเรียมีการรอดชีวิตที่ดีกว่าการใช้ PGPB ที่ไม่ทนเค็ม พืชที่เลือกใช้ในการศึกษาคือ มะเขือเทศ เนื่องจากเป็นพืชสวนที่นิยมบริโภค มีการปรับตัวเข้ากับสภาพอากาศต่าง ๆ ได้ดี และปลูกกันอย่างแพร่หลาย แต่ปัญหาสำคัญในการเพาะปลูกคือความเค็มของดิน โดยเป็นปัญหาทั้งต่อการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโต และการให้ผลผลิต

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase และสายพันธุ์ที่สามารถละลายฟอสเฟตอย่างละ 1 ไอโซเลท จากตัวอย่างแบคทีเรียทนเค็ม และแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดแยกมาจากดินเค็มบริเวณอ่างเก็บน้ำหนองบ่อ จังหวัดมหาสารคาม ของงานวิจัยที่ผ่านมา โดยอาศัยความสามารถในการเจริญในอาหารที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน และ

ความสามารถในการละลายอินทรีย์ฟอสเฟตในอาหาร modified Pikovskaya (MPVK) ตามลำดับ และอาศัยความสามารถในการเจริญในอาหารดั่งกล่าวที่อุณหภูมิ และความเค็มในช่วงกว้าง ตามลำดับ ทั้งนี้ การคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase อาศัยผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ร่วมด้วย เตรียมหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในอัตราส่วน 1:1 และศึกษาการรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมรูปแบบน้ำในตุ๊กกลางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และรูปแบบแห้งในตุ๊กกลางขุยมะพร้าว หลังจากนั้น ศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่ระดับความเค็มต่าง ๆ ในสภาพห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การงอก ดัชนีการงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 14 วัน และศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในดินเค็มในสภาพเรือนเพาะชำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized completely block design (RCBD) 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธีทดลอง คือ 1) ไม่เติมหัวเชื้อ และไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม) 2) เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ 3) เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และไม่เติมหัวเชื้อ 4) เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ 5) เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และไม่เติมหัวเชื้อ และ 6) ไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ ในกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้ปุ๋ย คำนวณปริมาณปุ๋ยที่ต้องเติมสำหรับธาตุอาหารแต่ละตัวให้มีปริมาณธาตุอาหารเท่ากันโดยคิดเทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ย N:P:K เท่ากับ 15:15:15 ในอัตรา 40 กิโลกรัมต่อไร่ วิเคราะห์ข้อมูลผลการเจริญเติบโตของพืชอายุ 30 และ 60 วัน ปริมาณการสะสมฟอสฟอรัสของพืชอายุ 60 วัน คุณสมบัติทางกาย และเคมีบางประการของดิน ทั้งก่อนปลูก และเมื่อพืชมีอายุ 60 วัน ตลอดจนวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในดิน เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของแต่ละกรรมวิธีทดลองด้วย least significant difference test (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสถิติ Statistix (NH Analytical Software, USA.)

ผลการคัดเลือกได้แบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase และแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถละลายฟอสเฟต คือ แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* B2r และ *B. megaterium* A12ag ตามลำดับ หัวเชื้อผสมทั้งรูปแบบน้ำในตุ๊กกลางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และรูปแบบแห้งในตุ๊กกลางขุยมะพร้าว มีการรอดชีวิตต่ำกว่า 4.0 Log CFU/ml หรือ กรัมของตุ๊กกลาง จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมกับตุ๊กกลางขานอ้อย พบว่า ตุ๊กกลางขานอ้อยทำให้แบคทีเรียในหัวเชื้อผสมมีการรอดชีวิตสูงมาก เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ 30°C โดยมีจำนวนเท่ากับจำนวนเริ่มต้นคือ 9.13 Log CFU/กรัมของขานอ้อย การศึกษาผลของหัวเชื้อผสม *B. licheniformis* B2r และ *B. megaterium* A12ag ต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า การเติมหัวเชื้อผสมให้กับเมล็ดมะเขือเทศที่ระดับความเค็ม 0 30 60 90 และ 120 mM NaCl ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอก ดัชนีการงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของมะเขือเทศอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อผสม การศึกษาผลของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในตุ๊กกลางขานอ้อยต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่ปลูกในดินเค็มในสภาพเรือนเพาะชำ พบว่า ในกรรมวิธีทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อผสมร่วมกับการเติมปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟต ทำให้ต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน มีค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และความสูงมากกว่ากรรมวิธีทดลองอื่น และทำให้ต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 60 วัน มีค่าน้ำหนักสด น้ำหนัก

แห้ง ความสูง คลอโรฟิลล์ พื้นที่ใบ และเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัส มากกว่ากรรมวิธีทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ตลอดจนทำให้ดินมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชมากกว่ากรรมวิธีทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณแบคทีเรียในดินมีค่าสูงสุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีทดลองที่เติมปุ๋ยเคมี N:P:K ร่วมกับขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ และชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อและไม่เติมปุ๋ยแต่เติมขานอ้อยปลอดเชื้อ และพบว่ากรรมวิธีทดลองที่เติมปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟต แต่ไม่เติมหัวเชื้อ ทำให้ต้นมะเขือเทศมีการเจริญเติบโตน้อยกว่ากรรมวิธีทดลองที่มีการใช้ปุ๋ยเคมี N:P:K แต่ไม่เติมหัวเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการใช้หินฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสแทนปุ๋ยเคมีโดยไม่มีการเติมจุลินทรีย์ช่วยย่อยละลายฟอสเฟต ทำให้พืชไม่สามารถนำฟอสฟอรัสในหินฟอสเฟตมาใช้ประโยชน์ได้ดีเท่ากับฟอสฟอรัสของปุ๋ยเคมี จากผลการศึกษาที่ได้ อาจกล่าวได้ว่าหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase *B. licheniformis* B2r และแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถละลายฟอสเฟต *B. megaterium* A12ag สามารถช่วยในการย่อยละลายอินทรีย์ฟอสเฟต และส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่ปลูกในดินเค็มได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถรอดชีวิตในดินที่เติมลงไปได้ดี อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติมด้านวัสดุตัวกลางต่าง ๆ หรือการใช้เทคนิคอื่นในการเตรียมหัวเชื้อผสม ร่วมกับการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย เพื่อให้ได้หัวเชื้อสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด และควรศึกษาผลของหัวเชื้อเดี่ยว หรือหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้นี้กับดินที่มีความเค็มระดับต่าง ๆ และกับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกมากในพื้นที่ดินเค็มของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อันจะเป็นการช่วยส่งเสริมการปลูกพืชในพื้นที่ดินเค็มตามแนวทางเกษตรอินทรีย์อีกทางหนึ่ง

บทคัดย่อ

ดินเค็มเป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตทางการเกษตรในพื้นที่แห้งแล้ง และกึ่งแห้งแล้ง สภาพดินเค็มเป็นปัจจัยเหนี่ยวนำให้พืชสร้างเอทิลีนจากการใช้ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) เป็นสารตั้งต้น ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการยืดตัวของรากและลำต้น นอกจากนี้ธรรมชาติของดินเค็มทำให้ฟอสฟอรัสถูกตรึง มีความเป็นประโยชน์ต่อพืชต่ำ แบคทีเรียทนเค็มที่สร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อผลสำเร็จของการใช้ปุ๋ยชีวภาพ การทดลองนี้ดำเนินการภายใต้สมมติฐานที่ว่า แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase สามารถช่วยลดสภาวะเครียดจากความเค็มในมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill. c.v. Seeda) และแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ที่ย่อยละลายฟอสเฟต สามารถเพิ่มฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์แก่พืชที่ปลูกในสภาวะเค็มได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase และสายพันธุ์ที่ย่อยละลายฟอสเฟต และเตรียมเป็นหัวเชื้อผสมในอัตราส่วน 1:1 ตรวจสอบหาชนิดของหัวเชื้อผสมที่สามารถทำให้เกิดการรอดชีวิตของแบคทีเรียสูงสุด ศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่ปลูกในห้องปฏิบัติการภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม 0 30 60 90 และ 120 mM NaCl และศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่ปลูกในดินเค็ม

แบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase และแบคทีเรียทนเค็มที่ย่อยละลายฟอสเฟต ที่คัดเลือกได้คือ *Bacillus licheniformis* B2r และ *B. megaterium* A12ag ตามลำดับ หัวเชื้อผสมแบบแห้งในตัวอย่างชานอ้อยที่อุณหภูมิ 4°C และ 30°C ในเวลา 4 สัปดาห์ของการเก็บรักษา ให้ค่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียดีที่สุด การใช้หัวเชื้อผสมทำให้มะเขือเทศที่ปลูกในทุกระดับความเค็มที่ศึกษาในสภาพห้องปฏิบัติการมีเปอร์เซ็นต์การงอก ดัชนีการงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของต้นกล้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าการใช้หัวเชื้อผสมรวมกับการใช้ปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟตทำให้น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ปริมาณคลอโรฟิลล์ พื้นที่ใบ และปริมาณฟอสฟอรัสของต้นกล้ามะเขือเทศที่ปลูกในดินเค็ม 3.3 dS/m เพิ่มขึ้นกว่ากรรมวิธีทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาที่ได้บ่งชี้ถึงความสำคัญ และความเป็นไปได้ของการใช้แบคทีเรียทนเค็มที่สร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่ปลูกในดินเค็มได้

คำหลัก: แบคทีเรียสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต ดินเค็ม

Abstract

Saline soil causes a serious problem for agricultural production in the arid and semi-arid areas. Saline soil is a factor that induces plant to produce ethylene by using 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) as a precursor and consequently inhibit the elongation of plant root and shoot. Moreover, the nature of saline soil leads to fixation of phosphorus which results in low available phosphorus for plant. For successful introduction of biofertilizer for solving problems of saline soil, the salt-tolerant plant growth promoting bacteria play a crucial role as bacterial inoculants. This experiment was conducted under the hypothesis that the salt-tolerant ACC deaminase producing bacteria and the salt-tolerant phosphate solubilizing bacteria could alleviate the stressful effects of salinity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. c.v. Seeda) and increase available phosphorus for plant growing under saline condition. This research was thus aimed to select for salt-tolerant ACC deaminase producing bacterium strain and salt-tolerant phosphate solubilizing bacterium strain, and then used as a co-culture at ratio 1:1. The effective formulation for maintaining the highest survival of mixed bacterial inoculants was also determined. The effects of co-culture on tomato growth at various salinity levels (0, 30, 60, 90 and 120 mM NaCl) under laboratory conditions were investigated. In addition, evaluation of their effects on tomato growth in saline soil under greenhouse conditions was also performed.

Bacillus licheniformis B2r and *Bacillus megaterium* A12ag were selected as salt-tolerant ACC deaminase producing bacterium strain and salt-tolerant phosphate solubilizing bacterium strain, respectively. The sugarcane bagasse was the best carrier for maintaining bacterial survival of the dry co-culture formulation over a period of 1 month under storage at both 4°C and 30°C. The co-culture significantly increased the levels of germination percentage, germination index, root length, and seedling dry weight of tomato under laboratory conditions at all salinity levels. Furthermore, under soil salinity at 3 dS/m, the treatment that used co-culture, N:K from chemical fertilizer and P from rock phosphate resulted in levels of fresh weight, dry weight, chlorophyll content, leaf area, and phosphorus content of tomato plants higher than the other treatments. These results indicate the importance and feasibility of using salt-tolerant plant growth promoting bacteria for enhancement of tomato growth in saline soil.

Keywords: Plant growth promoting bacteria, ACC deaminase producing bacteria, phosphate solubilizing bacteria, saline soil

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ii
บทคัดย่อ	v
Abstract	vi
สารบัญ	vii
สารบัญตาราง	viii
สารบัญภาพ	ix
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน	18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	42
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	43
ภาคผนวก ข ซ็อนนิตและรหัสเชื้อจุลินทรีย์	45
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ฟอสเฟตละลาย และกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase	47
ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	51
ภาคผนวก จ ภาพประกอบจากการวิจัย	110
ภาคผนวก ฉ Output จากโครงการวิจัย	112

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 อิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของพืช	3
ตารางที่ 4.1 แสดงการเจริญของแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ จากการวัดค่า optical density ที่ 600 nm	19
ตารางที่ 4.2 แสดงการเจริญของแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ จากการวัดค่า optical density ที่ 600 nm	19
ตารางที่ 4.3 ปริมาณฟอสเฟตละลายที่แบคทีเรียสามารถละลายได้	21
ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสเฟตละลาย (mg/l) ในวันที่ 5 ของแบคทีเรียที่ศึกษาในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ	22
ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสเฟตละลาย (mg/l) ในวันที่ 5 ของแบคทีเรียที่ศึกษาที่ระดับความเค็มต่าง ๆ	23
ตารางที่ 4.6 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบน้ำเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์	24
ตารางที่ 4.7 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในขุยมะพร้าวที่ไม่ผ่านการล้าง และไม่มีการเติม CaCO_3 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์	25
ตารางที่ 4.8 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในขุยมะพร้าว เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์	25
ตารางที่ 4.9 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในขุยมะพร้าวที่ผ่านการล้างและเติม CaCO_3 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์	26
ตารางที่ 4.10 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในขาน้อย เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30°C เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์	26
ตารางที่ 4.11 ผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน ในสภาพเรือนเพาะชำ	32
ตารางที่ 4.12 ผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 60 วัน ในสภาพเรือนเพาะชำ	33
ตารางที่ 4.13 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของดินก่อนปลูก	33
ตารางที่ 4.14 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินในวันเก็บเกี่ยว (วันที่ 60 ของการปลูก)	34
ตารางที่ 4.15 ปริมาณแบคทีเรีย (log CFU/ กรัมของดิน) ในดินที่ปลูกมะเขือเทศในเรือนเพาะชำนาน 2 4 6 และ 8 สัปดาห์	36

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 การสังเคราะห์เอทิลีน	5
ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานของแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ในการลดปริมาณเอทิลีนบริเวณรากพืช	7
ภาพที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร DF salt minimal medium ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์	18
ภาพที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียที่ศึกษา	20
ภาพที่ 4.3 ผลของหัวเชื้อผสมต่อ (ก) เปอร์เซ็นต์การงอก (ข) ดัชนีการงอก (ค) ความยาวของรากต้นกล้าอายุ 14 วัน และ (ง) น้ำหนักแห้งของต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 14 วัน ที่ปลูกในระดับความเค็มต่าง ๆ ในสภาพห้องปฏิบัติการ	28
ภาพที่ 4.4 ผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศที่ปลูกในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยแปรผันระดับความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ (ก) 0 mM (ข) 30 mM (ค) 60 mM (ง) 90 mM และ (จ) 120 mM	29
ภาพที่ 4.5 ลักษณะของรากต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 14 วัน (ก) ที่เมล็ดไม่ผ่านการเติมหัวเชื้อผสม และ (ข) ที่เมล็ดผ่านการเติมหัวเชื้อผสม	30
ภาพที่ 4.6 การเจริญและยืดเกาะของแบคทีเรียบริเวณรากต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 14 วัน ที่เมล็ดผ่านการเติมหัวเชื้อผสม และปลูกในสภาพห้องปฏิบัติการที่ระดับความเค็ม (ก) 30 mM NaCl และ (ข) 120 mM NaCl	30
ภาพที่ 4.7 ปริมาณแบคทีเรียในดินจากตัวอย่างของดินที่ปลูกเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์	35

บทที่ 1 บทนำ

ดินที่มีค่าเกลือทั้งหมดมากกว่า 0.15% และค่าความนำไฟฟ้า 2 mS/cm หรือมากกว่า จัดว่าเป็นดินเค็ม (Landon, 1991) ดินเค็มพบแพร่กระจายทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตแห้งแล้ง และกึ่งแห้งแล้งที่ทำการเกษตรด้วยการชลประทาน (Keren, 2000) ปัญหาหลักของการเกษตรกรรมในพื้นที่ดินเค็มคือผลกระทบจากความเค็มของดินที่มีต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช จุลินทรีย์ในดิน และคุณสมบัติของดินด้วยกลไกต่าง ๆ อีออนของเกลือนอกจากจะเป็นพิษโดยตรงต่อพืชแล้ว ในทางอ้อมมันยังมีผลต่อความดันออสโมติก ทำให้ปริมาณน้ำที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ลดลง และเป็นปัจจัยที่ชักนำให้เกิดการสร้างเอทิลีน (Mayak และคณะ, 2004) ทำให้เกิดการยับยั้งการยึดตัวของรากและลำต้น (Deikman, 1997) นอกจากนี้ความเค็มยังส่งผลกระทบต่อการเจริญ กิจกรรม และชนิดของจุลินทรีย์ในดิน ทำให้แบคทีเรียที่รอดชีวิตและเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในดินเค็มคือ แบคทีเรียทนเค็ม และแบคทีเรียชอบเค็ม (Zahran, 1997) แบคทีเรียที่สร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria, PGPB) เป็นแบคทีเรียในดินที่มีความสำคัญยิ่งต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ ช่วยสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ ACC deaminase เพื่อลดระดับเอทิลีนในพืช (Hontzeas และคณะ, 2006; Ghosh และคณะ, 2003; Glick, 2005) สร้างฮอร์โมนคล้ายกรดอินทรีย์ กรดจิบเบอเรลลิน และสารประกอบไซโตไคนิน รวมทั้งช่วยละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Nautiyal และคณะ, 2000, Egamberdiyeva และ Höflich, 2004, Son และคณะ, 2006) เป็นต้น การวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาให้ความสำคัญกับการใช้แบคทีเรีย PGPB เนื่องจากมีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นการเกษตรที่ยั่งยืน อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรีย PGPB ที่ไม่ชอบเค็มกับดินเค็มมีข้อจำกัดด้านการเจริญของเชื้อ ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรีย PGPB ที่ทนเค็ม หรือชอบเค็มเพื่อนำมาใช้กับดินเค็มจึงน่าจะให้ผลดีกว่า พืชที่เลือกใช้ในการศึกษาคือ มะเขือเทศ เนื่องจากเป็นพืชสวนที่นิยมบริโภค และปลูกกันอย่างแพร่หลาย มันมีการปรับตัวเข้ากับสภาพอากาศต่าง ๆ ได้ดี แต่สิ่งที่เป็นปัญหาสำคัญคือความเค็มของดิน โดยเป็นปัญหาทั้งต่อการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโต และการให้ผลผลิต (Cuartero และ Fernaández-Muñoz, 1999)

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียทนเค็ม และแบคทีเรียชอบเค็ม ที่ได้รับการคัดเลือกจากดินเค็มบริเวณอ่างเก็บน้ำหนองบ่อ จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย (Chookietwattana, 2004) โดยพิจารณาจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่เป็นตัวทำลาย 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดเอทิลีนในมะเขือเทศ เพื่อช่วยลดการสร้างเอทิลีนในสภาวะความเครียดเนื่องจากเกลือ (Salt stress-induced ethylene) รวมทั้งความสามารถในการละลายฟอสเฟต เพื่อให้มะเขือเทศสามารถนำฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้ โดยมุ่งหวังในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ และพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ เพื่อเพาะปลูกในพื้นที่ดินเค็มในอนาคต

1.1 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินเค็ม
- 2) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่ละลายฟอสเฟต จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินเค็ม
- 3) เพื่อศึกษาผลของหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาวะเค็มทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในสภาพเรือนเพาะชำ

1.2 ขอบเขตการวิจัย

- 1) ตัวอย่างแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินเค็มบริเวณอ่างเก็บน้ำหนองบ่อ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม จากการศึกษาของ Chookietwattana (2003)
- 2) พืชที่ใช้ในการศึกษา คือ มะเขือเทศสีดา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้สายพันธุ์แบคทีเรียทนเค็มหรือชอบเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase และที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดี
- 2) ทราบผลการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศที่มีการใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟต
- 3) สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในพื้นที่ดินเค็ม

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ดินเค็ม และผลต่อพืช

ดินเค็ม หมายถึง ดินที่มีค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดิน (Electrical conductivity; EC) ที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำที่สูงกว่า 2 เดซิซีเมนต่อเมตร (ds/m) ที่อุณหภูมิ 25°C และมีค่าเกลือทั้งหมดมากกว่า 0.15% (Landon, 1991) ร้อยละของโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable Sodium Percentage: ESP) น้อยกว่า 15 และ pH มักจะน้อยกว่า 8.5 เกลือที่พบบ่อยมักเป็นเกลือ คลอไรด์ และซัลเฟตของโซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียม (สมศรี, 2542)

ความเค็มมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม ผลในทางตรง (Sparks, 1995; Maas, 1990) ได้แก่ การยืดระยะเวลาในการงอกของเมล็ดพืช ลดเปอร์เซ็นต์การงอก ลดการเจริญเติบโตของต้นกล้า การเป็นพิษของธาตุโซเดียม ลดปริมาณคลอโรฟิลล์และอัตราการสังเคราะห์แสง และยับยั้งการดูดน้ำโพแทสเซียมและแคลเซียมของพืช (เพิ่มพูน, 2527) เป็นต้น ส่วนผลทางอ้อมเป็นผลจากความเค็มต่อคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของดิน ได้แก่ การทำให้ค่าความดันออสโมติก (Osmotic pressure) สูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณน้ำที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ลดลง ลดการซาบซึมน้ำของดิน และลดปริมาณและความหลากหลายชนิดของจุลินทรีย์ในดิน เป็นต้น ผลกระทบของดินเค็มต่อพืชแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.1) ขึ้นอยู่กับฤดูกาล คุณสมบัติของดิน ลักษณะการชลประทานของพื้นที่เพาะปลูก ชนิดของพืช ระยะการเจริญเติบโต เป็นต้น (Sparks, 1995) พืชที่ขึ้นในดินเค็มโดยมากมักพบตายเป็นหย่อม ต้นแคระแกรน การเจริญเติบโตของพืชทั้งแปลงไม่สม่ำเสมอ ส่วนใหญ่ขนาดใบลดลง และมีใบสีเขียวเข้มกว่าปกติ ใบหนา หรือมีอาการอวบน้ำ ใบกรอบกระด้าง ใบไหม้จากปลายใบมายังโคนใบ และใบแก่จะไหม้ก่อนใบอ่อน

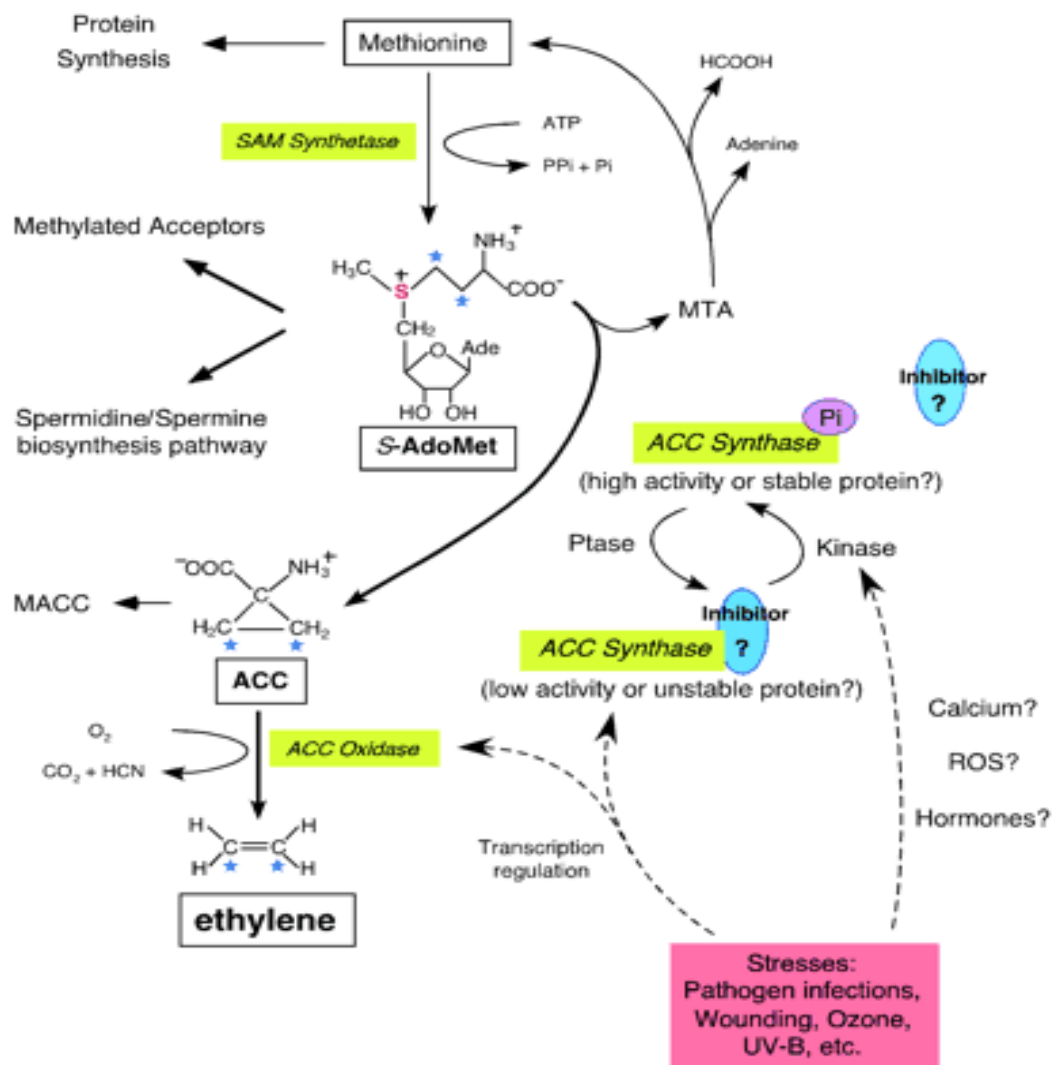
ตารางที่ 2.1 อิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของพืช

EC (ds/m)	Total salt content (%)	Designation	Crop reaction
0-2	<0.15	Salt free	Salinity effects are mostly negligible except for the most sensitive plants
4-8	0.15-0.35	Slightly saline	Yield of many crops restricted
8-15	0.35-0.65	Moderately saline	Only tolerant crops yield satisfactory
> 15	> 0.65	Strongly saline	Only very tolerant crops yield satisfactory

ที่มา: Landon (1991)

2.2 เอทิลีนและผลต่อพืช

เอทิลีนเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่มีคุณสมบัติเป็นก๊าซที่พืชสร้างขึ้นจากกระบวนการทางชีวเคมี หรือได้จากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทางเคมี อิทธิพลของเอทิลีนต่อพืชซึ่งเป็นที่ทราบกันทั่วไป ลำดับแรกคือ การเป็นฮอร์โมนพืชที่ทำให้เกิดการสุกของผลไม้ และกระตุ้นการหลุดร่วงของ ดอก ผล และ ใบพืช การศึกษาผลของเอทิลีนต่อพืชในระยะต่อมาพบว่า เอทิลีนมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้า โดยในระยะของการเริ่มงอกพืชจะมีการสร้างเอทิลีนในบริเวณใกล้ปลายยอดของต้นกล้าในลักษณะโค้งงอเป็นตะขอที่แน่น (Tightly hooked) และใช้ส่วนที่เป็นตะขอนั้นดันผ่านสิ่งกีดขวางในดินได้โดยไม่เกิดการเสียหายต่อจุดเจริญที่ปลายยอด เมื่อต้นกล้าโผล่พ้นดิน การสร้างเอทิลีนก็จะลดน้อยลง ส่วนของ ตะขอก็จะคลายตัวออก และยืดตัวตั้งตรงตามปกติ แต่ในสภาวะที่พืชได้รับความเครียด พืชจะมีการสร้าง เอทิลีนเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการยับยั้งการยืดตัวตามแนวยาวของลำต้น และราก (Abeles และคณะ, 1992) ในสภาวะปกติพืชสร้างเอทิลีนตลอดเวลาในปริมาณน้อย แต่เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด เช่น สารเคมี ความแห้งแล้ง ความเค็ม น้ำท่วม รังสีอัลตราไวโอเลต ปริมาณออกซิเจนต่ำ การเข้าทำลายของโรคและ แมลง และการมีบาดแผล เป็นต้น พืชจะมีการสังเคราะห์เอทิลีนมากกว่าปกติ เนื่องจากสภาวะเครียดเป็น ปัจจัยที่กระตุ้นให้พืชมีการสร้างเอนไซม์ทั้ง S-adenosyl-methionine synthetase (SAM synthetase) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACC synthase) และ ACC oxidase ที่เกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์เอทิลีน เรียกว่า การสร้างเอทิลีนภายใต้สภาวะเครียด (Stress ethylene production หรือ stress-induced ethylene) (Morgan และ Drew, 1997) เอทิลีนที่พืชสร้างขึ้นมากกว่าปกติใน สภาวะเครียดส่งผลในระดับที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และระยะการเจริญเติบโตของพืช เป็นต้น โดยทั่วไป เอทิลีนทำให้เกิดการเร่งกระบวนการเสื่อมตามอายุ ทำให้เกิดการเอนหรือโน้มลงของใบ และยับยั้งการออกดอกของพืชหลายชนิด สำหรับผลต่อระบบรากพืช เอทิลีนยับยั้งการยืดขยายตัว ตามยาวของรากแก้ว แต่ส่งเสริมการขยายตัวในทางขวาง นอกจากนี้ยังส่งผลกระตุ้นการสร้างรากขนอ่อน (Abeles และคณะ, 1992) และรากฝอยเพิ่มขึ้น (Clark และคณะ, 1999) ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง การสังเคราะห์เอทิลีนในพืช (ภาพที่ 2.1) เริ่มจากกรดอะมิโน methionine ภายในเซลล์ ได้รับการ กระตุ้นจากเอนไซม์ S-adenosyl-methionine synthetase (SAM synthetase) ให้เปลี่ยนเป็น S-adenosyl-methionine (S-AdoMet) และมีการใช้ ATP 1 โมเลกุล S-AdoMet ที่เกิดขึ้นเป็นตัวให้หมู่ เมธิลแก่ตัวรับหมู่เมธิลต่าง ๆ ของเซลล์ได้แก่ กรดนิวคลีอิก โปรตีน และไขมัน เป็นต้น และเป็นสารตั้งต้น ของกระบวนการสร้าง polyamine (Spermidine/Spermine pathway) นอกจากนี้ S-AdoMet ที่เกิดขึ้น สามารถแตกตัวเป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid หรือ ACC โดยอาศัยกิจกรรมของ เอนไซม์ ACC synthase เป็นตัวคะตะลิสต์ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนรูปต่อไปเป็นเอทิลีนโดยอาศัยเอนไซม์ ACC oxidase นอกจากนี้ ในขั้นตอนการแตกตัวของ SAM เป็น ACC ผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นคือ 5', S-methylthioadenosine (MTA) ซึ่งจะหมุนเวียนเข้าสู่วัฏจักรของการสร้างกรดอะมิโน methionine ใหม่ อันเป็นการรักษาระดับความเข้มข้นของ methionine ในเซลล์ขณะที่เซลล์มีการสร้างเอทิลีน นอกจากนี้ ACC ส่วนหนึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็น N-malonyl ACC (MAACC) ซึ่งเป็นรูปเฉื่อย โดย N-malonyl transferase



ภาพที่ 2.1 การสังเคราะห์เอทิลีน

ที่มา: Wang และคณะ (2002)

2.3 ฟอสฟอรัสในดินและบทบาทต่อพืช

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืชที่มีบทบาทสำคัญในการเสริมสร้างการเจริญเติบโต สร้างความแข็งแรงให้แก่พืช ทั้งส่วนที่อยู่เหนือดินและรากตลอดจนการออกดอกออกผล ปริมาณฟอสฟอรัสในดินโดยเฉลี่ยมีเพียง 0.06 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของไนโตรเจนเท่ากับ 0.14 และโพแทสเซียมเท่ากับ 0.83 เปอร์เซ็นต์ ทำให้พืชขาดแคลนฟอสฟอรัส ส่งผลให้การเจริญเติบโตของพืชผิดปกติ โดยแสดงอาการต่าง ๆ ได้แก่ ต้นเล็กผอมแกร็น ไม่เถาอาจพบลำต้นบิดเป็นเกลียว เนื้อไม้แข็งเปราะหักง่าย ใบเล็กผิดปกติ สีของใบล่างมักมีสีเหลืองปนสีอื่น สีของใบบนใกล้เคียงกับสีของใบล่างต่างกันเด่นชัด ออกดอกช้ากว่าปกติ ดอกอาจจะเล็กและเปอร์เซ็นต์ของดอกที่ติดผลต่ำกว่าปกติ พืชแก่ช้า รากผอม บาง สั้น และมีจำนวนจำกัด ฟอสฟอรัสที่พบในพืชเกือบทั้งหมดได้มาจากดิน (มีส่วนน้อยที่ติดมากับเมล็ด) พืชดูดกินฟอสฟอรัสในรูปของไอออนฟอสเฟต ซึ่งส่วนใหญ่เป็น monobasic orthophosphate (H_2PO_4^-) และ dibasic orthophosphate (HPO_4^{2-}) ฟอสฟอรัสในดินแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท (ถวิล, 2548) คือ

2.3.1 ฟอสเฟตอินทรีย์

ฟอสเฟตอินทรีย์ในดินประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิดโดยเฉลี่ยแล้วพบว่ามี nucleic acid 2% phospholipid 1% และ inositol phosphate 35% ส่วนอีก 68% ของฟอสเฟตอินทรีย์ยังไม่สามารถจำแนกชนิดว่าเป็นสารประกอบใด ฟอสเฟตอินทรีย์มีแนวโน้มที่มีมากหรือน้อยตามปริมาณของอินทรีย์วัตถุในดิน ดังนั้นในดินชั้นบนจึงมีฟอสเฟตอินทรีย์มากกว่าดินชั้นล่าง

2.3.2 ฟอสเฟตอนินทรีย์

ฟอสเฟตอนินทรีย์ในดิน มีทั้งพวกที่เป็นไอออนฟอสเฟตในสารละลายดิน และพวกที่เป็นสารประกอบหรือแร่ที่เป็นของแข็งอยู่ในดิน ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 พวกใหญ่ ๆ คือ

1) พวกแร่ (Mineral form) ในดินมีทั้งที่เป็นแร่ปฐมภูมิ (Primary mineral) ของดิน เช่น fluorapatite, $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaF}_2$ และ chlorapatite, $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCl}_2$ ซึ่งพบอยู่ในหินอัคนี และแร่ทุติยภูมิ (Secondary mineral) ซึ่งมีมากมาย เพราะไอออนฟอสเฟตว่องไวในการทำปฏิกิริยามากอย่างใดก็ตาม พวกแร่ฟอสเฟตมีความสามารถในการละลายในน้ำได้น้อยมาก แร่ที่เกิดขึ้นใหม่สามารถละลายได้ดีกว่าแร่ที่เกิดขึ้นมาแล้ว หรือแร่ที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนมากจะละลายได้ยากกว่าแร่ที่มีโครงสร้างโมเลกุลง่าย ๆ

2) สารประกอบฟอสเฟตที่เกิดจากการใส่ปุ๋ยลงไปดิน เมื่อใส่ปุ๋ยฟอสเฟตพวกที่ละลายน้ำได้ดี เช่น $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ลงไปในดินที่มีแคลเซียม แมกนีเซียมสูง จะเกิดเป็นสารประกอบฟอสเฟตชนิดต่าง ๆ ที่ละลายน้ำได้น้อยลงกว่าเดิม และทำให้ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสต่อพืชลดลงตามไปด้วย เช่น การเปลี่ยนไปเป็น CaHPO_4 , $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ หรือ $\text{Ca}(\text{NH}_4)_2(\text{HPO}_4)_2$ แล้วเปลี่ยนไปเป็น octa-calcium phosphate, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$ ซึ่งค่อนข้างเสถียร ละลายน้ำได้บ้างเล็กน้อย และในที่สุดอาจเปลี่ยนไปเป็น hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ และ fluorapatite ซึ่งละลายยากในที่สุด

3) Adsorbed phosphate ไอออนฟอสเฟตที่ถูกดูดซับอยู่ตามผิวของ hydrous oxide ของเหล็ก อะลูมิเนียม และแร่ดินเหนียวซิลิเกต (Silicate clay) ฟอสเฟตเหล่านี้ถูกตรึง (Fixed) และยากแก่การปลดปล่อยกลับออกไปในสารละลายดิน

2.4 แบคทีเรียที่สร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช

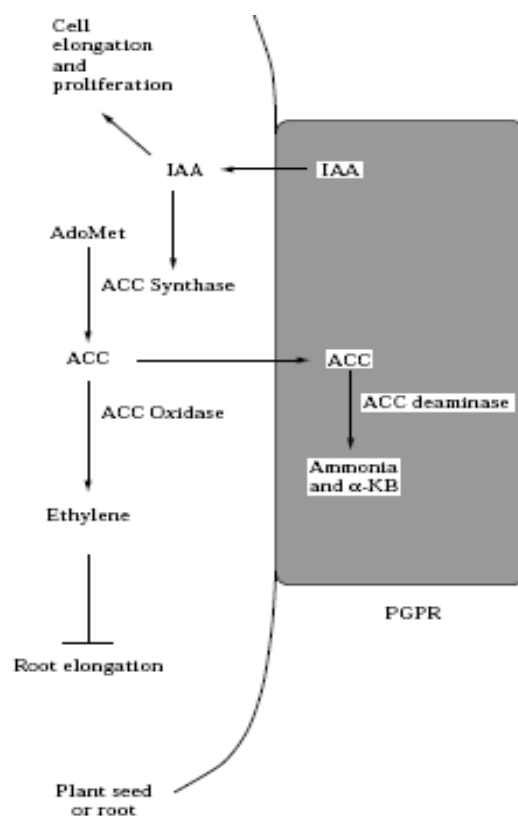
แบคทีเรียที่สร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria, PGPB) หรือที่เรียกว่า แบคทีเรียรอบรากพืชที่สร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ บทบาทในทางตรง ได้แก่ การเพิ่มธาตุอาหารให้แก่พืชด้วยการตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟตในรูปที่ถูกตรึงไปเป็นรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ และการสร้างฮอร์โมนที่เป็นประโยชน์แก่พืช เป็นต้น ส่วนบทบาททางอ้อม ได้แก่ การยับยั้ง หรือการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคพืช ทำให้ช่วยลดการเกิดโรคพืช เป็นต้น สำหรับการศึกษาวิจัยนี้ เน้นบทบาทของ PGPB 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และแบคทีเรียละลายฟอสเฟต โดยมุ่งหวังผลในการลด

การสร้างเอทิลีนของพืชในสภาวะเครียดจากความเค็มของดิน และช่วยเปลี่ยนรูปฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงในดินเค็มให้อยู่ในรูปฟอสฟอรัสละลาย แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มมีรายละเอียดที่สรุปได้พอสังเขป ดังนี้

2.4.1 แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase

แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase เป็นแบคทีเรียที่สามารถลดระดับของเอทิลีนในพืชได้ โดยการที่แบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane -1-carboxylate deaminase (ACC deaminase) มาใช้ ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญที่พืชใช้ในการสังเคราะห์เอทิลีนเป็นแหล่งไนโตรเจน และย่อยสลายไปเป็นแอมโมเนียและ α - ketobutyrate ทำให้เอทิลีนถูกสร้างน้อยลง ส่งผลให้รากพืชมีการยืดยาวต่อไปได้ กลไกการทำงานของ PGPR ที่เป็นแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ในการลดปริมาณเอทิลีนบริเวณรากพืชแสดงดังภาพที่ 2.2

นอกจากนี้ การที่แบคทีเรียเข้าจับเกาะที่ผิวของรากหรือเมล็ดพืชที่กำลังมีการเจริญเติบโต จะใช้กรดอะมิโน tryptophan ที่มาจาก exudates ของรากหรือเมล็ดพืชเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IAA ซึ่งถ้าแบคทีเรียสร้าง IAA ในปริมาณที่เหมาะสม ทำงานร่วมกับ IAA ที่มีอยู่เดิมในพืช ก็จะไปส่งเสริมการยืดยาวหรือการเจริญเติบโตของพืชได้ และบางส่วนก็จะไปส่งเสริมการสร้าง ACC ซึ่ง แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase สามารถนำ ACC ไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้ปริมาณเอทิลีนลดลงตามลำดับ



ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานของแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase

ในการลดปริมาณเอทิลีนบริเวณรากพืช

ที่มา: Glick และคณะ (1998)

2.4.2 แบคทีเรียในดินกับการแปรสภาพฟอสฟอรัส

แบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากที่สุดในดิน โดยทั่วไปพบในช่วงประมาณ 10^8 - 10^9 CFU ต่อดิน 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) แบคทีเรียมีความหลากหลายในรูปแบบของการดำรงชีวิตสูง ทั้งด้านความหลากหลายในด้านการสร้างสารอาหารและแหล่งพลังงาน ด้านความต้องการออกซิเจน และด้านอุณหภูมิในการเจริญ เป็นต้น ดังนั้น แบคทีเรียจึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการหมุนเวียนสารต่าง ๆ และต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัสซึ่งเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากไนโตรเจน แต่มักมีปริมาณต่ำและอยู่ในรูปที่ถูกตรึง

การแปรสภาพฟอสฟอรัสขึ้นอยู่กับบทบาทของจุลินทรีย์เป็นหลัก แบคทีเรียในดินมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแปรสภาพฟอสฟอรัสใน 2 ลักษณะ ลักษณะแรกคือ การแปรสภาพจาก อนินทรีย์ฟอสฟอรัสเป็นอินทรีย์ฟอสฟอรัส (Immobilization of phosphorus) ซึ่งแบคทีเรียจะดูดซึม อนินทรีย์ฟอสฟอรัสไปใช้ในการเปลี่ยนเป็นองค์ประกอบของเซลล์และสารต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการดำเนินกิจกรรมของเซลล์ในรูปอินทรีย์ฟอสฟอรัส ลักษณะที่สองคือ การแปรสภาพจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสเป็นอนินทรีย์ฟอสฟอรัส (Mineralization of organic phosphorus) ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสต่อพืช และช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน โดยอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียย่อยละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria) ได้แก่ *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* และ *Erwinia* เป็นต้น (Rodriguez และคณะ, 1999) แบคทีเรียย่อยละลายฟอสเฟตมีกลไกในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชด้านการให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชด้วยการสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์สู่ดิน เช่น กรด lactic, isobutyric, acetic, gluconic, oxalic, และ succinic เป็นต้น เพื่อช่วยในการละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัส และการสร้างเอนไซม์ phosphatases ในการย่อยสลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสไปเป็นอนินทรีย์ฟอสฟอรัส นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการปลดปล่อยสารคีเลตที่สามารถจับไอออนของธาตุเหล็ก และอลูมิเนียมที่เป็นตัวตรึงฟอสฟอรัส ทำให้พืชสามารถนำฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ramos และคณะ (2002) ศึกษาผลของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ต่อการเจริญเติบโตของต้น alder (*Alnus glutinosa*) พบว่า *B. licheniformis* สามารถส่งเสริมการเจริญของต้น alder อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อแบคทีเรีย โดยทำให้ต้น alder มีระบบรากที่สมบูรณ์ และมีพื้นที่ผิวของใบเพิ่มขึ้น

Sundara และคณะ (2002) ศึกษาผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ *Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum* โดยเตรียมเป็นหัวเชื้อในตุ๋นกลางลิกไนต์ และใช้ในอัตรา 10 Kg/ha พบว่า ดินบริเวณรอบรากต้นอ้อยมีปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้น และทำให้ปริมาณ และผลผลิตของอ้อยสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Ghosh และคณะ (2003) ศึกษาผลของ PGPB ที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus circulans* DUC1, *Bacillus firmus* DUC2 และ *Bacillus globisporus* DUC3 ต่อการเจริญเติบโตของต้น canola พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ทำให้ความยาวของรากต้นกล้า canola ที่ปลูกในสภาพห้องปฏิบัติการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และทำให้ต้น canola ที่ปลูกในเรือนเพาะชำมีน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Dey และคณะ (2004) สามารถคัดแยกแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase จากดินบริเวณรอบรากต้นถั่วได้ 9 ไอโซเลท ผลการจัดจำแนกชนิดพบว่าแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท นี้อยู่ในสกุล *Pseudomonas* และสามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดและเพิ่มความยาวของรากต้นถั่วอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลจากการที่แบคทีเรียมีการสร้างสาร siderophore สาร indole acetic acid และมีความสามารถย่อยละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสได้

Wu และคณะ (2005) ศึกษาผลของปุ๋ยชีวภาพสูตรที่เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และแบคทีเรียที่ละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม เปรียบเทียบกับปุ๋ยชีวภาพเชื้อราไมคอร์ไรซาร์ ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพด ผลการศึกษาพบว่า การใช้ปุ๋ยชีวภาพในปริมาณเพียงครึ่งหนึ่งของปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมี และการใช้ปุ๋ยอินทรีย์นั้นให้ผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดที่คล้ายคลึงกัน ทั้งนี้ปุ๋ยชีวภาพสามารถทำให้ข้าวโพดมีอัตราการงอกของเมล็ดสูง และให้ชีวมวลสูงสุด เนื่องจากการช่วยเพิ่มธาตุอาหารสำหรับพืช และช่วยปรับปรุงคุณสมบัติต่าง ๆ ของดิน

Mayak และคณะ (2004) ศึกษาผลของความเค็มและการเติมเชื้อ *Achromobacter piechaudi* ARV 8 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ต่อการพัฒนาราก และยอดของเมล็ดมะเขือเทศที่เพาะปลูกภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม 0 120 และ 207 mM NaCl ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า ที่ระดับความเค็ม 120 mM NaCl การเติมแบคทีเรีย ทำให้ต้นมะเขือเทศพัฒนาเป็นราก และยอดได้ดีที่สุด และผลการศึกษาภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม 0 43 86 และ 172 mM NaCl ในสภาพเรือนเพาะชำ พบว่า ที่ระดับความเค็ม 43 mM NaCl การเติมแบคทีเรีย ทำให้ต้นมะเขือเทศมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Son และคณะ (2006) ศึกษาการละลายอินทรีย์ฟอสเฟตของจุลินทรีย์ *Pantoea agglomerans* R-42 ที่แยกได้จากรากถั่วเหลืองในเมือง Miryang ประเทศเกาหลี โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว modified Pikovskaya (MPVK) ที่มีอินทรีย์ฟอสเฟตผสมอยู่ และแปรผันสภาวะที่ศึกษาให้มีความเข้มข้นของเกลือ 1-5 เปอร์เซ็นต์ pH 3-11 และอุณหภูมิ 5-45°C ผลการศึกษาพบว่า *Pantoea agglomerans* R-42 สามารถเจริญได้ทุกอุณหภูมิแต่ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 25-35°C เจริญได้ดี และระหว่างอุณหภูมิ 20-30°C มีการละลายฟอสเฟตมากที่สุดถึง 201 mg/l สำหรับการศึกษา pH พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญและละลายฟอสเฟตได้เหมือนกันทุกๆ ค่าที่ทดสอบ แต่ในช่วง pH 10 ขึ้นไปการละลายฟอสเฟตจะลดลง

Chen และคณะ (2006) คัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินเขตร้อนบริเวณใกล้เมือง Thichung ประเทศไต้หวัน ได้ 33 ชนิด โดยเชื้อมีความสามารถในการละลาย tricalcium phosphate ในอาหาร Pikovskaya (PVK) และให้ปริมาณฟอสเฟตละลายอยู่ในช่วง 31.5 ถึง 519.7 mg/l

Shaharooni และคณะ (2006) คัดแยก PGPR ที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase จากดินรอบราก ต้นข้าวโพด และศึกษาผลของเชื้อที่คัดแยกได้ต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วเขียว พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้ช่วยเพิ่มความยาวของราก ความสูงของลำต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นถั่วเขียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1) วัสดุและอุปกรณ์ในการเลี้ยงจุลินทรีย์

วัสดุและอุปกรณ์พื้นฐานในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหาร modified Pikovskaya (MPVK) (Son และคณะ, 2006) (ภาคผนวก ก)

อาหาร halobacteria (Atlas, 1997) (ภาคผนวก ก)

อาหาร DF salt minimal medium (Dworkin และ Foster, 1958) (ภาคผนวก ก)

2) วัสดุและอุปกรณ์ในการศึกษาจุลินทรีย์

ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ BIO-RAD Laboratories, USA.

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase

อุปกรณ์เครื่องแก้วพื้นฐานและสารเคมีในการวิเคราะห์ฟอสเฟต

Spectrophotometer รุ่น sp-3000-UV

เครื่อง Electrical conductivity (EC) รุ่น Consort C535 (Montreal-Biotech Inc, England)

3) วัสดุและอุปกรณ์ในการศึกษาพืช

เมล็ดมะเขือเทศ ตราศรแดง (บริษัท อีสท์ เวสต์ ซีด จำกัด, ประเทศไทย)

วัสดุและอุปกรณ์พื้นฐานในการเพาะเลี้ยงพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ และเรือนเพาะชำ

สารเคมีสำหรับการใช้เป็นปุ๋ยเคมี และฆ่าเชื้อเมล็ดพืชและกระถางปลูก

เครื่องวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Inc., Japan)

เครื่องวัดพื้นที่ใบ AM 300 (ADC Bioscientific, England)

4) เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณอ่างเก็บน้ำหนองบ่อ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม จากการศึกษาของ Chookietwattana (2003) จำนวน 84 ไอโซเลท (รายละเอียดดังภาคผนวก ข) โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกจากดินเค็มด้วยอาหาร halobacteria ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M และ 1.6 M ซึ่งในที่นี้เรียกว่า แบคทีเรียกลุ่ม A (76 ไอโซเลท) และแบคทีเรียกลุ่ม B (12 ไอโซเลท) ตามลำดับ

3.2 วิธีวิจัย

3.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase

3.2.1.1 การคัดเลือกขั้นแรก

เป็นการคัดเลือกขั้นต้นเพื่อตรวจหาแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากดินเค็มเลี้ยงในอาหารเหลว DF salt minimal medium ปริมาตร 200 ml ที่มี 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid (ACC) 3.0 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M และ 1.6 M สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม A และ B ตามลำดับ บ่มที่

อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 600 nm คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 5 ไอโซเลท สำหรับการคัดเลือกต่อไปในขั้นที่สอง

3.2.1.2 การคัดเลือกขั้นที่สอง

เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase จากความสามารถในการเจริญได้ที่มีความเค็มและอุณหภูมิช่วงกว้าง โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1.1 ในอาหารแข็ง DF salt minimal medium ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M และ 1.6 M สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม A และ B ตามลำดับที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชุดแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็งผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 10^8 CFU/ml และใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาผลของอุณหภูมิ และความเค็มต่อการเจริญ แต่ละการศึกษาทำสองซ้ำตามวิธีการดังนี้

1) การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ

ปลูกเชื้อเริ่มต้นเข้มข้น 1% ลงในอาหาร DF salt minimal medium ปริมาตร 200 ml ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ กัน คือ 30 35 และ 45°C และเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm

2) การศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญ

ปลูกเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหาร DF salt minimal medium ปริมาตร 200 ml ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2 0.4 0.8 1.2 และ 1.6 M นำไปเขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm

3.2.1.3 การคัดเลือกขั้นที่สาม

เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ เก็บเกี่ยวเซลล์ และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ตามวิธีการของ Penrose และ Glick (2003) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกขั้นที่สองใน DF salt minimal medium ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M หลังจากนั้นจึงเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ แล้วนำเซลล์ไปผ่านการ toluenized ด้วยสารละลายโทลูอีน 5% จากนั้นเติมสารละลาย ACC ลงไปใน toluenized cells เอนไซม์ ACC deaminase ที่มีใน toluenized cells จะย่อย ACC และได้เป็น α -ketobutyrate โดยปริมาณที่ได้เป็นปฏิกิริยาตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่มีอยู่ วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ α -ketobutyrate ที่ความยาวคลื่น 540 nm ทำการวิเคราะห์สองซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ α -ketobutyrate (ภาคผนวก ค) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยชุดวิเคราะห์โปรตีน BIO-RAD protein assay ของ BIO-RAD Laboratories, USA.

3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถละลายฟอสเฟต

3.2.2.1 การคัดเลือกขั้นแรก

เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถละลาย tricalcium phosphate ในอาหารแข็ง modified Pikovskaya (MPVK) (Son และคณะ, 2006) โดย ทำ point inoculate แบคทีเรียกลุ่ม A และแบคทีเรียกลุ่ม B บนอาหารแข็ง MPVK ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M และ 1.6 M ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 5 วัน คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างส่วนใสรอบโคโลนีสำหรับการคัดเลือกต่อไปในขั้นที่สอง

3.2.2.2 การคัดเลือกขั้นที่สอง

เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถละลาย tricalcium phosphate ในอาหารเหลว MPVK ตามขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยขีดเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกขั้นแรกบนอาหารแข็งเอียง MPVK ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M และ 1.6 M สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม A และ B ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขูดเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารไปผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 160 mM ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 10^8 CFU/ml

2) ปลูกเชื้อแบคทีเรียด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MPVK ปริมาตร 150 ml ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M และ 1.6 M สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม A และ B ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่ 200 rpm

3) เก็บตัวอย่างปริมาตร 2 ml ในวันที่ 0 1 2 3 4 และ 5 ละลายใน 1 N HCl ในอัตราส่วน 1:1 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm และในวันที่ 5 วันเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 17,418 g นาน 30 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตละลายตามวิธีของกรมพัฒนาที่ดิน (2548) (ภาคผนวก ค) ทำการวิเคราะห์สองซ้ำ

3.2.2.3 การคัดเลือกขั้นที่สาม

เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด และสามารถเจริญได้ที่มีความเค็มและอุณหภูมิช่วงกว้าง เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2.2 ในอาหารแข็ง MPVK ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นขูดแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็งผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 7.0) ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 10^8 CFU/ml แต่ละการศึกษาในการคัดเลือกขั้นที่สามทำสองซ้ำ ตามวิธีการดังนี้

1) การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ปลูกเชื้อเริ่มต้นเข้มข้น 1% ลงในอาหารเหลว MPVK ปริมาตร 100 ml ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 30 35 และ 45°C และเขย่าที่ 200 rpm ในวันที่ 0 1 2 3 4 เก็บตัวอย่างปริมาตร 2 ml และในวันที่ 5 วันเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 ml นำ

ตัวอย่างที่ได้ละลายใน 1 N HCl ในอัตราส่วน 1:1 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 17,418 g นาน 30 นาที และนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตละลายตามวิธีของกรมพัฒนาที่ดิน (2548)

2) การศึกษาผลของความเค็มต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ปลูกเชื้อเริ่มต้นเข้มข้น 1% ลงในอาหารเหลว MPVK ปริมาตร 100 ml ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2 0.4 0.8 1.2 และ 1.6 M บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าที่ 200 rpm ในวันที่ 5 เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 ml นำไปละลายใน 1 N HCl ในอัตราส่วน 1:1 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 17,418 g นาน 30 นาที และนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตละลายตามวิธีของกรมพัฒนาที่ดิน (2548)

3.2.3 การศึกษาการรอดชีวิตของหัวเชื้อผสม

เตรียมหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase และ แบคทีเรียทนเค็มที่ละลายฟอสเฟต สายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase ในอาหารแข็ง DF salt minimal medium ที่มี 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid (ACC) 3.0 mM และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M ส่วนแบคทีเรียทนเค็มที่ละลายฟอสเฟตเลี้ยงเฉพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MPVK ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขูดเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง ปรับปริมาณเชื้อเป็น 10^7 CFU/ml ด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm หลังจากนั้นนำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อผสมแบบน้ำสำหรับการเตรียมหัวเชื้อผสมแบบแห้งนั้นใช้วัสดุตัวกลางคือ ขุยมะพร้าวบดละเอียดขนาด 0.3-0.5 mm ที่ผ่านการเตรียมที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ 1) ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำและไม่มีการเติม CaCO_3 2) ผ่านการล้างด้วยน้ำ 3) ผ่านการล้างด้วยน้ำ และมีการเติม CaCO_3 โดยการล้างด้วยน้ำเป็นการแช่ขุยมะพร้าวในน้ำที่ไหลผ่านเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C ตามด้วยการทำให้ปลอดเชื้อสำหรับการเติม CaCO_3 นั้นทำการเติมภายหลังการอบแห้งก่อนนำขุยมะพร้าวไปทำให้ปลอดเชื้อ เพื่อใช้เป็นบัฟเฟอร์ในการควบคุม pH ของขุยมะพร้าวให้มีค่าประมาณ 7 นำหัวเชื้อผสมแบบน้ำไปผสมกับขุยมะพร้าวปลอดเชื้อในอัตราส่วนเท่ากับ 1:1 เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ประมาณ 10^7 CFU/กรัม ของขุยมะพร้าว ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตในหัวเชื้อผสมแบบน้ำและแบบแห้งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 20 30 และ 40°C เมื่อเวลาเริ่มต้น และภายหลังการเก็บ 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ โดยอาศัยเทคนิค spread plate บนอาหาร halobacteria ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M เนื่องจากผลการศึกษาพบว่าหัวเชื้อผสมแบบน้ำ และแบบแห้งในขุยมะพร้าวมีการรอดชีวิตต่ำ จึงได้ทำการทดลองกับวัสดุตัวกลางใหม่คือ ชานอ้อย โดยบดชานอ้อยให้มีขนาด 0.3-0.5 mm นำไปทำให้ปลอดเชื้อ และผสมกับหัวเชื้อในอัตราส่วน 1:1 สำหรับใช้เป็นชานอ้อยที่มีหัวเชื้อในการศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาพเรือนเพาะชำ

3.2.4 การศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาพห้องปฏิบัติการ

เป็นการศึกษาผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด ตามวิธีการของ International Seed Testing Association (1993) มีขั้นตอน ดังนี้

1) ขีตช่องตารางขนาด 1 ตารางเซนติเมตร บนกระดาษกรอง แล้วบรรจุลงบนจานเพาะเลี้ยง โดยให้แผ่นที่มีช่องตารางอยู่แผ่นบนสุด นำจานเพาะเชื้อไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที

2) ฆ่าเชื้อเมล็ดมะเขือเทศ โดยนำเมล็ดมะเขือเทศล้างในน้ำสบู่ ตามด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจุ่มในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที แล้วแช่ในคลอโรกซ์ 15% พร้อมเขย่า นาน 15 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง

3) เตรียมหัวเชื้อผสมแบบน้ำตามวิธีการดังข้อ 3.2.3 โดยใช้ปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml

4) นำเมล็ดพืชที่ฆ่าเชื้อแล้วแช่ในสารแขวนลอยหัวเชื้อผสม นาน 1 ชั่วโมง ทำชุดควบคุม โดยนำเมล็ดแช่ใน 0.1 M Phosphate buffer pH 7.0 นาน 1 ชั่วโมง

5) เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 4 ml ที่มี $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.5 g/l เป็นแหล่งฟอสฟอรัส และมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0 30 60 90 และ 120 mM (เทียบเท่ากับค่าการนำไฟฟ้าประมาณ 0 3 6 9 และ 12 dS/m) ลงในจานเพาะเชื้อ สำหรับเป็นสารละลายให้ความเข้มข้นแก่เมล็ดมะเขือเทศ

6) วางเมล็ดมะเขือเทศ 25 เมล็ด/จานเพาะเชื้อ ลงบนแต่ละช่องของกระดาษกรอง

7) เพาะเมล็ดในสภาวะที่มีแสง 2000 ลักซ์ เวลา 16 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$

8) บันทึกการงอกของเมล็ดมะเขือเทศทุกวัน และตรวจนับต้นกล้าปกติในวันที่ 14 หลังการเพาะ นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การงอก และดัชนีการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ จากสูตรดังนี้

$$\text{ดัชนีการงอก} = \text{ผลบวกของ} \left[\frac{\text{จำนวนต้นที่งอกในแต่ละวัน}}{\text{จำนวนวันหลังเพาะ}} \right]$$

9) สุ่มต้นกล้ามะเขือเทศ อายุ 14 วัน ไปวัดความยาวราก หลังจากนั้นนำต้นกล้าทั้งหมดของแต่ละซ้ำในแต่ละระดับความเค็มที่ศึกษาไปทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 วัน เพื่อวิเคราะห์ค่าน้ำหนักแห้งของต้นกล้าในแต่ละระดับความเค็ม

10) นำส่วนรากของต้นกล้ามะเขือเทศ อายุ 14 วัน ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อยืนยันความสามารถในการเจริญบริเวณรากพืช โดยการตัดชิ้นส่วนพืชขนาด 1 เซนติเมตรไปแช่ใน 2.5% glutaraldehyde pH 7.2 ที่ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำตัวอย่างไปแช่ในไนโตรเจนเหลว 2 นาที แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer หลังจากนั้นจึงนำไปเคลือบด้วยทอง และตรวจสอบการยึดเกาะของเชื้อที่รากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM-6460LV, JEOL, Japan)

3.2.5 การศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาพเรือนเพาะชำ

3.2.5.1 เก็บตัวอย่างดินเค็ม ที่มีค่า ECe (1:5) เท่ากับ 3.3 dS/m จากอำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม ตากแห้งด้วยอากาศ จากนั้นนำมาร้อนผ่านตะแกรงขนาดรูพรุน 2 mm คลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างรอการนำไปใช้

3.2.5.2 ชั่งตัวอย่างดินเค็ม 2 กิโลกรัม บรรจุใส่ถุงพลาสติก สำหรับกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้ปุ๋ยเคมี หรือหินฟอสเฟต ทำการชั่งปุ๋ยเคมี หรือหินฟอสเฟตตามปริมาณที่ต้องการแล้วเติมลงไปในถุงบรรจุดิน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 90 นาที

3.2.5.3 นำกระถางปลูกพลาสติก (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางปากกระถาง 8 นิ้ว) แฉในคลอริกซ์ 15% นาน 30 นาที ล้างน้ำยาฆ่าเชื้อด้วยน้ำประปา บรรจุดินของแต่ละกรรมวิธีทดลองลงกระถาง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีทดลองทั้งหมด 6 กรรมวิธี ดังนี้

Treatment 1 - ไม่เติมหัวเชื้อ และไม่เติมปุ๋ย แต่เติมซานอ้อยปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม)

Treatment 2 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และเติมซานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 3 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 4 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และเติมซานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 5 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 6 - ไม่เติมปุ๋ย แต่เติมซานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

ในกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้ปุ๋ย คำนวณปริมาณปุ๋ยที่ต้องเติมสำหรับธาตุอาหารแต่ละตัวให้มีปริมาณธาตุอาหารเท่ากันโดยคิดเทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ย N:P:K เท่ากับ 15:15:15 ในอัตรา 40 กิโลกรัมต่อไร่

3.2.5.4 ทำการเพาะเมล็ดมะเขือเทศในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มีค่าการนำไฟฟ้า 3 dS/m เป็นเวลา 7 วัน โดยกรรมวิธีทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อใช้เมล็ดมะเขือเทศที่ผ่านการฆ่าเชื้อและแช่ในสารแขวนลอยหัวเชื้อผสม ส่วนชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อใช้เมล็ดมะเขือเทศที่ผ่านการฆ่าเชื้อและแช่ใน 0.1 M Phosphate buffer pH 7.0 สาร ย้ายต้นกล้าอายุ 7 วัน ลงปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ในเรือนเพาะชำ ทำการเติมซานอ้อยที่มีหัวเชื้อ ปริมาณ 10 กรัม ในวันที่ 10 และวันที่ 30 ของอายุพืชนับจากวันเพาะเมล็ด ควบคุมปริมาณความชื้นของดินที่ค่า water holding capacity ประมาณ 60%

3.2.5.5 ศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ โดยเก็บข้อมูล น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูง และปริมาณคลอโรฟิลล์ ของต้นมะเขือเทศที่อายุ 30 วัน และเก็บข้อมูล น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูง พื้นที่ใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณฟอสฟอรัสของต้นมะเขือเทศที่อายุ 60 วัน วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสของพืชตามวิธีการของกรมพัฒนาที่ดิน (2548)

3.2.5.6 ศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของดิน โดยวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณอินทรีย์วัตถุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมของดินในวันเริ่มปลูกและวันเก็บเกี่ยว (วันที่ 60 ของการปลูก) ตามวิธีการของกรมพัฒนาที่ดิน (2548) ทั้งนี้ในการวิเคราะห์ไนโตรเจนใช้วิธี Micro Kjeldahl

3.2.5.7 ศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในดิน โดยสุ่มตัวอย่างดินบริเวณรอบต้นพืชในสัปดาห์ที่ 2 4 6 และ 8 ของการปลูกไปทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี viable plate count อาศัยเทคนิค spread plate โดยใช้อาหาร halobacteria ที่มีปริมาณที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2 M

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

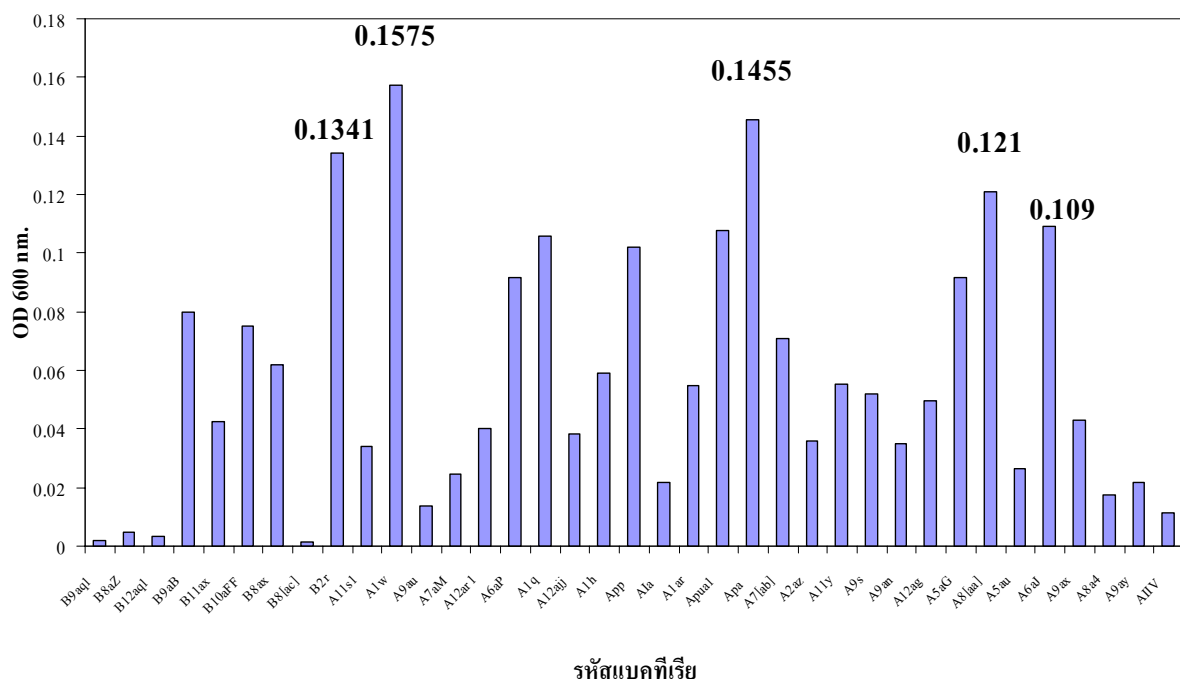
ในการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase และแบคทีเรียทนเค็มที่ละลายฟอสเฟตอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการหาค่าเฉลี่ย และใช้การวิเคราะห์สถิติแบบ Two-way Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสถิติ Statistix (NH Analytical Software, USA.) สำหรับการศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาพสภาพห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนเพาะชำ วางแผนการทดลองแบบ Randomized completely block design (RCBD) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของแต่ละกรรมวิธีทดลองด้วย least significant difference test (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสถิติ Statistix (NH Analytical Software, USA.)

บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน

4.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase

4.1.1 ผลการคัดเลือกรุ่นแรก

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม A และ B ในอาหารเหลว DF salt minimal medium ที่มี 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid (ACC) 3.0 mM และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M และ 1.6 M ตามลำดับ และศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์จากการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ค่า OD 600 nm ดังภาพที่ 4.1 พบว่า มีแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ 37 ไอโซเลท และในจำนวนนี้มี 5 ไอโซเลท ที่เจริญได้ดี คือ *Bacillus licheniformis* B2r *Halobacillus trueperi* A1w *B. vietnamensis* Apa *B. licheniformis* A8[aa] และ *B. vallismortis* A6aJ (ข้อสายพันธุ์ของแบคทีเรียแต่ละรหัสแสดงในภาคผนวก ข) การที่แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารดังกล่าวได้ดีนั้น อาจกล่าวได้ว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase และใช้ ACC เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญได้ (Fujino และคณะ, 2004) ทั้งนี้ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียสกุลหนึ่งซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ ACC deaminase (Penrose และ Glick, 2003)



ภาพที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร DF salt minimal medium ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์

4.1.2 ผลการคัดเลือกขั้นที่สอง

การศึกษาผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการเจริญของแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase จำนวน 5 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนแรก (ดังตารางที่ 4.1 และ 4.2) พบว่า *B. licheniformis* B2r ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร DF salt minimal medium ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M มีการเจริญสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่น นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 45°C ส่วนการศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญ พบว่า แบคทีเรียที่มีค่าเฉลี่ยการเจริญสูงในสามลำดับแรกของทุกระดับความเค็มที่ศึกษาคือ *B. vietnamensis* Apa *B. licheniformis* B2r และ *H. trueperi* A1W ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทนี้สำหรับการคัดเลือกขั้นตอนที่สามต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงการเจริญของแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ จากการวัดค่า optical density ที่ 600 nm

แบคทีเรีย	อุณหภูมิ			— X
	30°C	35°C	45°C	
<i>Bacillus licheniformis</i> B2r	0.6879 ^{Aa}	0.8337 ^{Aa}	0.8380 ^{Aa}	0.7865 ^a
<i>Halobacillus trueperi</i> A1W	0.5746 ^{Aa}	0.5360 ^{Ab}	0.5746 ^{Ab}	0.5617 ^{ab}
<i>Bacillus vietnamensis</i> Apa	0.1614 ^{Bab}	0.5347 ^{Ab}	0.5517 ^{Ab}	0.4159 ^{bc}
<i>Bacillus licheniformis</i> A8[aa]	0.3950 ^{Aab}	0.4353 ^{Ab}	0.3994 ^{Ab}	0.4099 ^{bc}
<i>Bacillus vallismortis</i> A6aJ	0.039 ^{Bb}	0.5581 ^{Ab}	0.3621 ^{Ab}	0.3198 ^c

หมายเหตุ: ^{ABC} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.2 แสดงการเจริญของแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ จากการวัดค่า optical density ที่ 600 nm

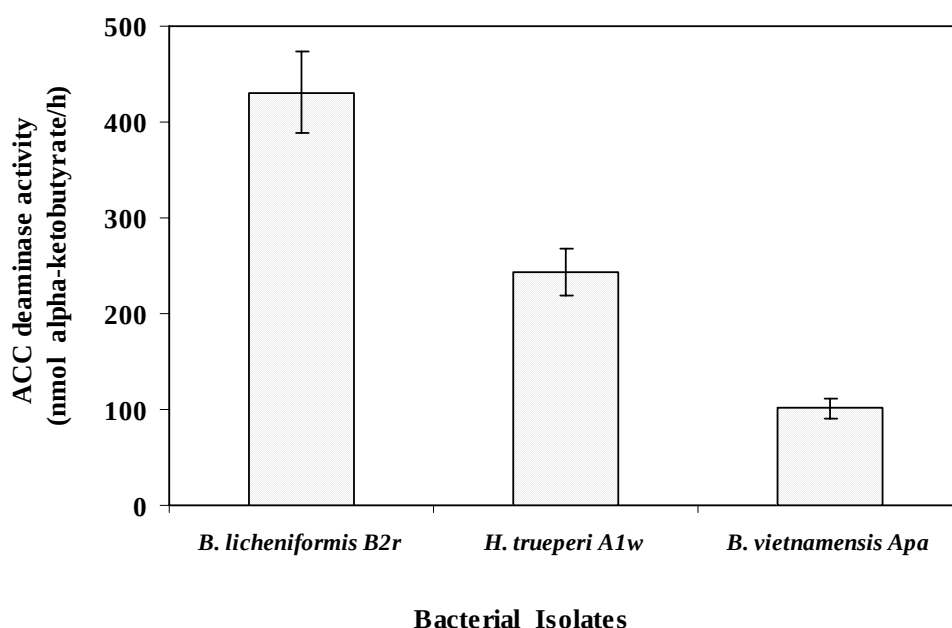
แบคทีเรีย	NaCl (M)					— X
	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	
<i>B. licheniformis</i> B2r	0.5681 ^{Aab}	0.5157 ^{ABb}	0.1411 ^{BCa}	0.0251 ^{Cc}	0.0244 ^{Ca}	0.2549 ^a
<i>H. trueperi</i> A1W	0.6591 ^{Aa}	0.5284 ^{Aa}	0.0743 ^{Ba}	0.0263 ^{Bc}	0.0247 ^{Ba}	0.2547 ^a
<i>B. vietnamensis</i> Apa	0.6033 ^{Aab}	0.5610 ^{BCa}	0.1841 ^{BCa}	0.0270 ^{Cab}	0.0233 ^{Ca}	0.2797 ^a
<i>B. licheniformis</i> A8[aa]	0.5361 ^{Aab}	0.3887 ^{ABab}	0.0267 ^{Ba}	0.0283 ^{Ba}	0.0223 ^{Ba}	0.2004 ^{ab}
<i>B. vallismortis</i> A6aJ	0.3486 ^{Ab}	0.1889 ^{ABb}	0.0673 ^{Ba}	0.0284 ^{Ba}	0.0239 ^{Ba}	0.1314 ^b

หมายเหตุ: ^{ABC} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

4.1.3 ผลการคัดเลือกชั้นที่สาม

จากการวัดกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการคัดเลือกชั้นที่สอง ดังภาพที่ 4.2 พบว่า *B. licheniformis* B2r ให้กิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase สูงที่สุด คือ เท่ากับ 431 nmol alpha-ketobutyrate/h ซึ่งถือว่ามีความอยู่ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียรอบรากพืชที่คัดแยกจากบริเวณรอบรากต้นข้าวโพดที่ให้กิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase เท่ากับ 340 nmol alpha-ketobutyrate/h (Shaharoon, 2006) ดังนั้นจึงคัดเลือก *B. licheniformis* B2r เป็นตัวแทนของแบคทีเรียหนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase



ภาพที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ของแบคทีเรียที่ศึกษา

4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

4.2.1 ผลการคัดเลือกชั้นแรก

จากการคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถสร้างส่วนใส (Clear zone) ในอาหารแข็ง modified Pikovskaya (MPVK) ที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 5 วัน พบว่า แบคทีเรียที่สามารถสร้างส่วนใสเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม A จำนวน 17 ไอโซเลท จากจำนวน 76 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus firmus* จำนวน 3 ไอโซเลท *B. bataviensis* จำนวน 1 ไอโซเลท *B. licheniformis* จำนวน 4 ไอโซเลท *B. megaterium* จำนวน 3 ไอโซเลท *B. subtilis* จำนวน 2 ไอโซเลท *B. vietnamensis* จำนวน 2 ไอโซเลท *Halobacillus trueperi* จำนวน 1 ไอโซเลท และ *Pseudomonas stutzeri* จำนวน 1 ไอโซเลท

4.2.2 ผลการคัดเลือกขั้นที่สอง

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการคัดเลือกขั้นแรกมาศึกษาการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว MPVK พบว่า แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงสุด 2 ไอโซเลท คือ *B. megaterium* A12ag และ *B. megaterium* Ally สามารถละลายฟอสเฟตได้เท่ากับ 177.90 และ 160.50 mg/l ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4.3) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ EI-Komy (2004) ที่ได้ค่าการละลายฟอสเฟตของ *B. megaterium* เท่ากับ 106.5 mg/l แต่ต่ำกว่าความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ *Pantoea agglomerans* R-42 ซึ่งได้ค่าการละลายฟอสเฟตสูงถึง 201 mg/l (Son และคณะ, 2006)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณฟอสเฟตละลายที่แบคทีเรียสามารถละลายได้

Culture	Soluble phosphate (mg/l)	Culture	Soluble phosphate (mg/l)
1. <i>B. megaterium</i> A12ag	177.9	10. <i>B. firmus</i> A8ah	158.8
2. <i>B. megaterium</i> Ally	160.5	11. <i>B. subtilis</i> A7[ab]	107.9
3. <i>B. megaterium</i> A6V	159.7	12. <i>B. subtilis</i> A7ab1	104.6
4. <i>B. licheniformis</i> A5aG	134.3	13. <i>B. vietnamensis</i> Apa	138.2
5. <i>B. licheniformis</i> A6aF	134.8	14. <i>B. vietnamensis</i> A8e	158.6
6. <i>B. licheniformis</i> A8av	132.3	15. <i>H. trueperi</i> A5y	142.1
7. <i>B. licheniformis</i> A8[aa]	138.6	16. <i>Psu. stutzeri</i> A12ar1	132.8
8. <i>B. firmus</i> Apj	114.6	17. <i>B. bataviensis</i> A7aA	145.7
9. <i>B. firmus</i> A1n1	143.0		

4.2.3 ผลการคัดเลือกขั้นที่สาม

การศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ *B. megaterium* A12ag และ *B. megaterium* Ally ในอาหารเหลว MPVK ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.6 M เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 35 และ 45°C เป็นเวลา 5 วัน ดังตารางที่ 4.4 พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟตของ *B. megaterium* Ally ในทางสถิติ โดยปริมาณฟอสเฟตละลายเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ ซึ่งที่อุณหภูมิ 45°C *B. megaterium* Ally ให้ปริมาณฟอสเฟตละลายสูงสุดเท่ากับ 135.1 mg/l แต่ผลการศึกษาใน *B. megaterium* A12ag พบว่า อุณหภูมิไม่มีผลในทางสถิติ ต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟต อย่างไรก็ตามปริมาณฟอสเฟตละลายของ *B. megaterium* A12ag มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C ตามลำดับ และลดลงที่อุณหภูมิ 45°C โดยให้ปริมาณฟอสเฟตละลายสูงสุดเท่ากับ 148.5 mg/l ที่อุณหภูมิ 35°C การที่แบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในรูปแบบที่แตกต่างกันนั้น อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และระดับอุณหภูมิที่

เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทแตกต่างกัน นอกจากนี้ หากพิจารณาในเชิงการคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่ละลายฟอสเฟตไปใช้ประโยชน์ร่วมกับแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase ควรเลือกแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมที่อุณหภูมิไม่สูงเกินกว่า 35°C เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงเกินกว่าระดับนี้จะทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase (Penrose และ Glick, 2003) ดังนั้นในประเด็นผลของอุณหภูมิ *B. megaterium* A12ag จึงมีข้อดีเหนือกว่า *B. megaterium* Ally

สำหรับการศึกษาผลของความเค็มต่อการละลายฟอสเฟตของ *B. megaterium* A12ag และ *B. megaterium* Ally ในอาหาร MPVK ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2 0.4 0.8 1.2 และ 1.6 M ดังตารางที่ 4.5 พบว่า ปริมาณฟอสเฟตละลายของทั้ง *B. megaterium* A12ag และ *B. megaterium* Ally มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0.2 และ 0.4 M ตามลำดับ และมีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0.8 1.2 และ 1.6 M ตามลำดับ โดย *B. megaterium* A12ag ให้ปริมาณฟอสเฟตละลายสูงสุดเท่ากับ 140.6 mg/l ที่ระดับความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.4 M การที่แบคทีเรียให้แนวโน้มในการละลายฟอสเฟตดังกล่าวมาแล้วนี้ อาจเป็นผลเนื่องจากอิทธิพลของความเค็มต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งจากการศึกษาของ Chookietwattana (2003) แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้เป็นแบคทีเรียทนเค็ม มีช่วงความเค็มที่สามารถเจริญได้ในอาหาร halobacteria คือ 0-8% NaCl (w/v) หรือ 0-1.6 M NaCl และช่วงความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 0-3% NaCl (w/v) (ไม่ได้แสดงข้อมูลในที่นี้) นอกจากนี้ การที่แบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทสามารถเจริญได้ในทุกระดับความเค็มที่ศึกษา และยังสามารถแสดงกิจกรรมในการย่อยละลายฟอสเฟต แสดงถึงข้อดีด้านการรอดชีวิต และการคงความสามารถในการดำเนินกิจกรรมหากนำไปประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อชีวภาพสำหรับดินเค็ม แต่เนื่องจาก *B. megaterium* A12ag ให้ค่าการละลายฟอสเฟตที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.4 M ที่สูงกว่า *B. megaterium* Ally ทำให้ *B. megaterium* A12ag มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์มากกว่า เนื่องจากโดยทั่วไปพืชไร่ พืชสวนที่มีการปลูกในพื้นที่ดินเค็ม มักมีค่าความเค็มไม่เกิน 9 ds/m นอกจากนี้ Stocker (1960) เสนอว่าดินที่มีความเค็มในรูปเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5% (ประมาณ 100 mM) เป็นค่าระดับความเค็มในรูปเกลือทั้งหมดที่ใช้เป็นเส้นแบ่งความเหมาะสมของดินสำหรับการปลูกพืชทั่วไป และพืชทนเค็ม ดังนั้น จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการละลายฟอสเฟต จึงคัดเลือกแบคทีเรีย *B. megaterium* A12ag เป็นตัวแทนของแบคทีเรียทนเค็มที่ละลายฟอสเฟต

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสเฟตละลาย (mg/l) ในวันที่ 5 ของแบคทีเรียที่ศึกษาในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ

Culture	Temperature (°C)		
	30	35	45
<i>B. megaterium</i> Ally	99.0 ^{Bb}	109.5 ^{Bb}	135.1 ^{Aa}
<i>B. megaterium</i> A12ag	140.8 ^{Aa}	148.5 ^{Aa}	119.3 ^{Ab}

หมายเหตุ: ^{ABC} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสเฟตละลาย (mg/l) ในวันที่ 5 ของแบคทีเรียที่ศึกษาที่ระดับความเค็มต่าง ๆ

Culture	NaCl (M)				
	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6
<i>B. megaterium</i> Ally	118.1 ^{Aa}	115.4 ^{Aa}	86.8 ^{Aa}	114.5 ^{Aa}	81.3 ^{Aa}
<i>B. megaterium</i> A12ag	138.3 ^{Aa}	140.6 ^{Aa}	115.1 ^{Aa}	62.1 ^{Bb}	52.8 ^{Ba}

หมายเหตุ: ^{ABC} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

4.3 การศึกษาการรอดชีวิตของหัวเชื้อผสม

จากการเตรียมหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase สายพันธุ์ *B. licheniformis* B2r และแบคทีเรียทนเค็มที่ละลายฟอสเฟต สายพันธุ์ *B. megaterium* A12ag ในอัตราส่วน 1:1 โดยเตรียมเป็นหัวเชื้อผสมรูปแบบน้ำ และหัวเชื้อผสมรูปแบบแห้งในตัวกลางขุยมะพร้าวที่มีวิธีการเตรียมขุยมะพร้าวต่างกัน 3 วิธี คือ 1) ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำและไม่มีการเติม CaCO_3 2) ผ่านการล้างด้วยน้ำ และ 3) ผ่านการล้างด้วยน้ำ และมีการเติม CaCO_3 ทำการเก็บรักษาหัวเชื้อผสมทั้ง 4 ชนิดนี้ที่อุณหภูมิ 4 20 30 และ 40°C ตรวจนับการรอดชีวิตของเชื้อในสัปดาห์ที่ 0 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า จำนวนแบคทีเรียในหัวเชื้อผสมทั้ง 4 ชนิดมีค่าลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณลดลงจากปริมาณเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 2 ในทุกอุณหภูมิของการเก็บรักษา และในสัปดาห์ที่ 4 จำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตมีค่าต่ำกว่า 4.0 log CFU/ml หรือ กรัมของตัวกลาง ดังตารางที่ 4.6 ถึง 4.9 ผลการศึกษาที่ได้บ่งชี้ว่า ตัวกลางของหัวเชื้อแบบน้ำคือ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ และตัวกลางของหัวเชื้อแบบแห้งคือ ขุยมะพร้าวนั้นไม่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวกลางในการเก็บรักษาหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียนี้ เนื่องจากในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับจำหน่ายเป็นปุ๋ยชีวภาพในเชิงพาณิชย์ควรมีอายุการเก็บรักษาได้นาน 1-1.5 ปี และหากเป็นการผลิตเพื่อใช้ในพื้นที่ควรมีอายุการเก็บรักษา 3-12 เดือน (Ben Rebah และคณะ, 2007) ตลอดจนจำนวนจุลินทรีย์ในหัวเชื้อตามมาตรฐานของปุ๋ยชีวภาพของประเทศออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ ราวินดา และประเทศไทยกำหนดว่าไม่ควรน้อยกว่า 5×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร หรือ กรัมของผลิตภัณฑ์ (Lupwayi และคณะ, 2000) สาเหตุที่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาหัวเชื้อผสมนั้น อาจเนื่องจากการมีปริมาณสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญและรอดชีวิตของแบคทีเรีย ดังนั้นควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในการปรับปรุงส่วนประกอบของของเหลวที่ใช้เป็นตัวกลางในการผลิตหัวเชื้อแบบน้ำ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียได้นานกว่านี้ ด้วยการเติมสารอาหารอื่น ๆ ได้แก่ กลูโคส กลีเซอรอล mannitol และ yeast extract เป็นต้น สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอน และวิตามินแก่แบคทีเรีย หรือการเติม trehalose สำหรับการช่วยให้เซลล์แบคทีเรียทนต่อสภาวะความร้อน หรือแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาได้ดียิ่งขึ้น (Singleton และคณะ, 2002) สำหรับสาเหตุที่แบคทีเรียในหัวเชื้อผสมแบบแห้งในขุยมะพร้าว

มะพร้าวมีการรอดชีวิตต่ำมากเช่นกันนั้น อาจเนื่องมาจากการที่ขุยมะพร้าวมีส่วนประกอบทางเคมีเป็น สารประกอบฟีนอลิกสูงซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ และมีค่า pH ค่อนข้างเป็นกรดคือ 5.1-5.6 (Tapia และ คณะ, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Albareda และคณะ (2008) ที่ใช้เปลือกของผลองุ่นในการเป็นตัวกลาง และพบว่าแบคทีเรียในหัวเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วภายในอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อเพียง 1 เดือน เนื่องจากพิษของสารฟีนอลิก นอกจากนี้การที่ขุยมะพร้าวมีปริมาณลิกนินสูงถึง 48% และมีค่า C/N ที่สูงมากคือ 112/1 (Shashirekha และ Rajarathnam, 2007) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถนำ คาร์บอนหรือไนโตรเจนของขุยมะพร้าวไปใช้ในการเจริญได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพื่อหาตัวกลางที่เหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อผสมแบบแห้งต่อไป เพราะคุณสมบัติของตัวกลางในการผลิตหัวเชื้อแบบแห้งที่ดีคือ ต้องไม่เป็นพิษ ส่งเสริมการเจริญและคงจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมายได้ เก็บความชื้นได้ดี มีลักษณะทางกายภาพและเคมีที่เป็นเนื้อเดียวกัน มีราคาถูก และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม (Stephan และ Rask, 2000) ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาหัวเชื้อผสมทั้ง 4 ชนิด พบว่า การรอดชีวิตของแบคทีเรียในหัวเชื้อผสมทั้ง 4 ชนิด มีแนวโน้มที่ไม่แตกต่างกัน โดยการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 30°C แบคทีเรียในหัวเชื้อผสมทั้ง 4 ชนิด มีแนวโน้มของการรอดชีวิตสูงที่สุด รองลงไปคือที่ อุณหภูมิ 20 °C และ 40°C ตามลำดับ

จากการที่ฟอสเฟตบัพเฟอร์และขุยมะพร้าวไม่เหมาะสมในการใช้เป็นตัวกลาง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยเลือกใช้ขานอ้อยเป็นวัสดุตัวกลางสำหรับหัวเชื้อแบบแห้ง ผลการศึกษา พบว่า แบคทีเรียในหัวเชื้อแบบแห้งตัวกลางขานอ้อยมีการรอดชีวิตสูงมาก โดยการเก็บรักษาหัวเชื้อทั้งที่ อุณหภูมิ 4 และ 30°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แบคทีเรียยังคงมีจำนวนเซลล์เท่ากับจำนวนเริ่มต้น คือ 9.13 log CFU ต่อกรัมของขุยมะพร้าว ดังตารางที่ 4.10 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ (Khavazi และ คณะ, 2007) ที่ใช้ขานอ้อยผสมกับ perlite ในอัตราส่วน 1:4 และพบว่าแบคทีเรียมีการรอดชีวิตสูงมาก โดยให้เหตุผลว่าขานอ้อยมีอินทรีย์วัตถุสูงถึง 53% มีค่า pH ใกล้เคียง 7 และรักษาความชื้นได้ดี ดังนั้น การทดลองผลของหัวเชื้อผสมในสภาพเรือนเพาะชำจึงใช้ขานอ้อยเป็นวัสดุตัวกลาง

ตารางที่ 4.6 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบน้ำเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/ml)			
	4°C	20°C	30°C	40°C
0	6.6737 ^{Ba}	6.7113 ^{ABa}	6.7370 ^{ABa}	6.8277 ^{Aa}
1	6.7900 ^{Aa}	6.7783 ^{Aa}	6.7757 ^{Aa}	6.8407 ^{Aa}
2	5.5460 ^{Bb}	5.7440 ^{Ab}	5.7123 ^{Ab}	5.6990 ^{Ab}
3	4.5187 ^{Bc}	4.6463 ^{Ac}	4.6680 ^{Ac}	4.5197 ^{Bc}
4	3.5897 ^{Bd}	3.6583 ^{ABd}	3.6720 ^{Ad}	3.1093 ^{Cd}

หมายเหตุ: ^{ABC} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.7 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในขุยมะพร้าวที่ไม่ผ่านการล้าง และไม่มีการเติม CaCO_3 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/กรัม ของขุยมะพร้าว)			
	4°C	20°C	30°C	40°C
0	6.7610 ^{Aa}	6.7100 ^{Aa}	6.7390 ^{Aa}	6.8367 ^{Aa}
1	6.6413 ^{Aa}	6.7517 ^{Aa}	6.7653 ^{Aa}	6.8327 ^{Aa}
2	5.5440 ^{Ab}	5.5890 ^{Ab}	5.6973 ^{Ab}	5.6837 ^{Ab}
3	4.5927 ^{Ac}	4.6233 ^{Ac}	4.6650 ^{Ac}	4.3920 ^{Bc}
4	3.5627 ^{Cd}	3.6520 ^{ABd}	3.6703 ^{Ad}	3.0900 ^{Dd}

หมายเหตุ: ^{ABC} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.8 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในขุยมะพร้าวที่ผ่านการล้าง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/กรัม ของขุยมะพร้าว)			
	4°C	20°C	30°C	40°C
0	6.7477 ^{Aa}	6.7390 ^{Aa}	6.8207 ^{Aa}	6.7957 ^{Aa}
1	6.6513 ^{Ba}	6.7527 ^{ABa}	6.8180 ^{Aa}	6.7253 ^{ABa}
2	5.5357 ^{Bb}	5.7123 ^{ABb}	6.1610 ^{Ab}	5.6580 ^{ABb}
3	4.2177 ^{Dc}	4.4090 ^{Cc}	4.6780 ^{Ac}	4.5210 ^{Bc}
4	3.4067 ^{Cd}	3.5163 ^{Bd}	3.7103 ^{Ad}	3.1633 ^{Dd}

หมายเหตุ: ^{ABC} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.9 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในขุยมะพร้าวที่ผ่านการล้างและเติม CaCO_3 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/กรัม ของขุยมะพร้าว)			
	4°C	20°C	30°C	40°C
0	6.8367 ^{Aa}	6.7440 ^{Aa}	6.8090 ^{Aa}	6.7317 ^{Aa}
1	6.7253 ^{BCb}	6.7780 ^{ABa}	6.8347 ^{Aa}	6.6737 ^{Ca}
2	5.5633 ^{Bc}	5.6183 ^{ABb}	6.1470 ^{Ab}	5.7410 ^{ABb}
3	4.3260 ^{Dd}	4.5753 ^{Bc}	4.6970 ^{Ac}	4.4737 ^{Cc}
4	3.4453 ^{Ce}	3.6040 ^{Bd}	3.7253 ^{Ad}	3.1233 ^{Dd}

หมายเหตุ: ^{ABC} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.10 การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในชานอ้อย เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30°C เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/กรัม ของชานอ้อย)	
	4°C	30°C
0	9.13 ^{Aa}	9.13 ^{Aa}
1	9.12 ^{Aa}	9.13 ^{Aa}
2	9.12 ^{Aa}	9.13 ^{Aa}
3	9.13 ^{Aa}	9.13 ^{Aa}
4	9.13 ^{Aa}	9.13 ^{Aa}

หมายเหตุ: ^{ABC} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

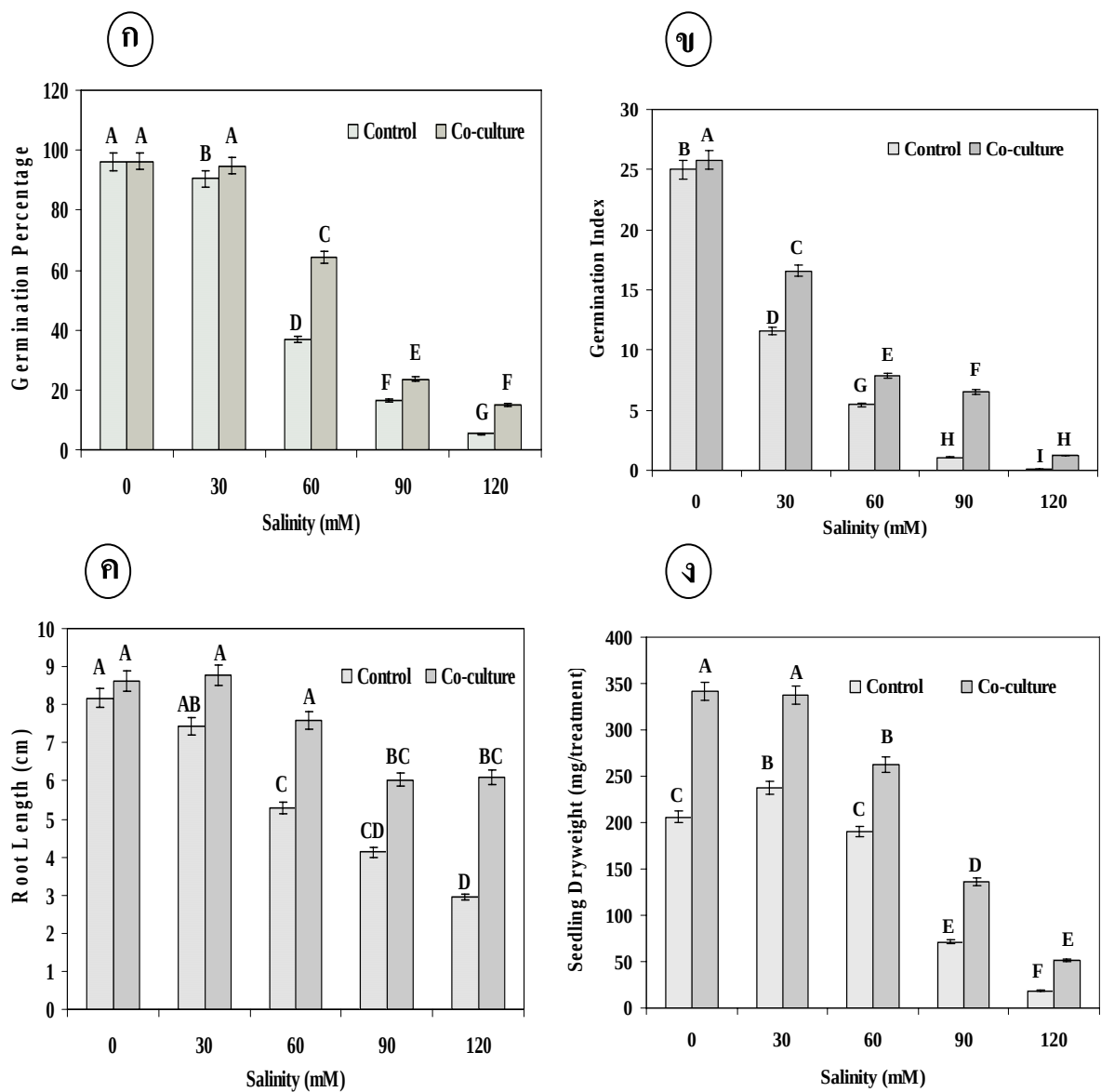
^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

4.4 ผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการเตรียมหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียที่เรย์ทเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase สายพันธุ์ *B. licheniformis* B2r และแบคทีเรียที่เรย์ทเค็มที่ละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ *B. megaterium* A12ag ในอัตราส่วน 1:1 และศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศที่เพาะปลูกในสภาวะความเค็ม โดยสารละลายให้ความเข้มข้น $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.5 g/l เป็นแหล่งฟอสฟอรัส และมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0 30 60 90 และ 120 mM พบว่าเมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การงอก ดัชนีการงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของต้นกล้ามะเขือเทศมีค่าลดลง (ดังภาพที่ 4.3) เนื่องจากความเค็มมีผลให้เมล็ดงอกช้ากว่าปกติและเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง (สมศรี, 2542) ในทุกระดับความเค็มที่ศึกษา การเติมหัวเชื้อ

ผสมแก๊สเมลิตมะเชื้อเทศช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอก ดัชนีการงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของต้นกล้ามะเชื้อเทศอายุ 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เมลิตมะเชื้อเทศไม่ได้รับการเติมเชื้อผสมของแบคทีเรีย และที่ระดับความเค็ม 90 และ 120 mM NaCl เมลิตมะเชื้อเทศที่ไม่ได้รับการเติมเชื้อผสมของแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถงอกได้ ในขณะที่เมลิตที่ได้รับการเติมเชื้อผสมของแบคทีเรีย ปรากฏการงอกของราก และจากการสังเกตพบว่ารากของต้นกล้ามะเชื้อเทศ ที่ได้รับการเติมเชื้อผสมของแบคทีเรีย (ภาพที่ 4.4) ส่วนใหญ่มีความยาวมากกว่ากรรมวิธีทดลองของเมลิตที่ไม่ได้รับการเติมเชื้อผสมของแบคทีเรียในทุกๆระดับความเค็มที่ศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *B. licheniformis* B2r ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase ช่วยลดความเครียดของต้นกล้าเมื่อเจริญในสภาวะเค็ม ทำให้รากของพืชยาวขึ้น (Dey และคณะ, 2004) และช่วยให้เมลิตมะเชื้อเทศต้านทานต่อความเค็มในระดับที่สูงขึ้นได้ (Mayak และคณะ, 2004)

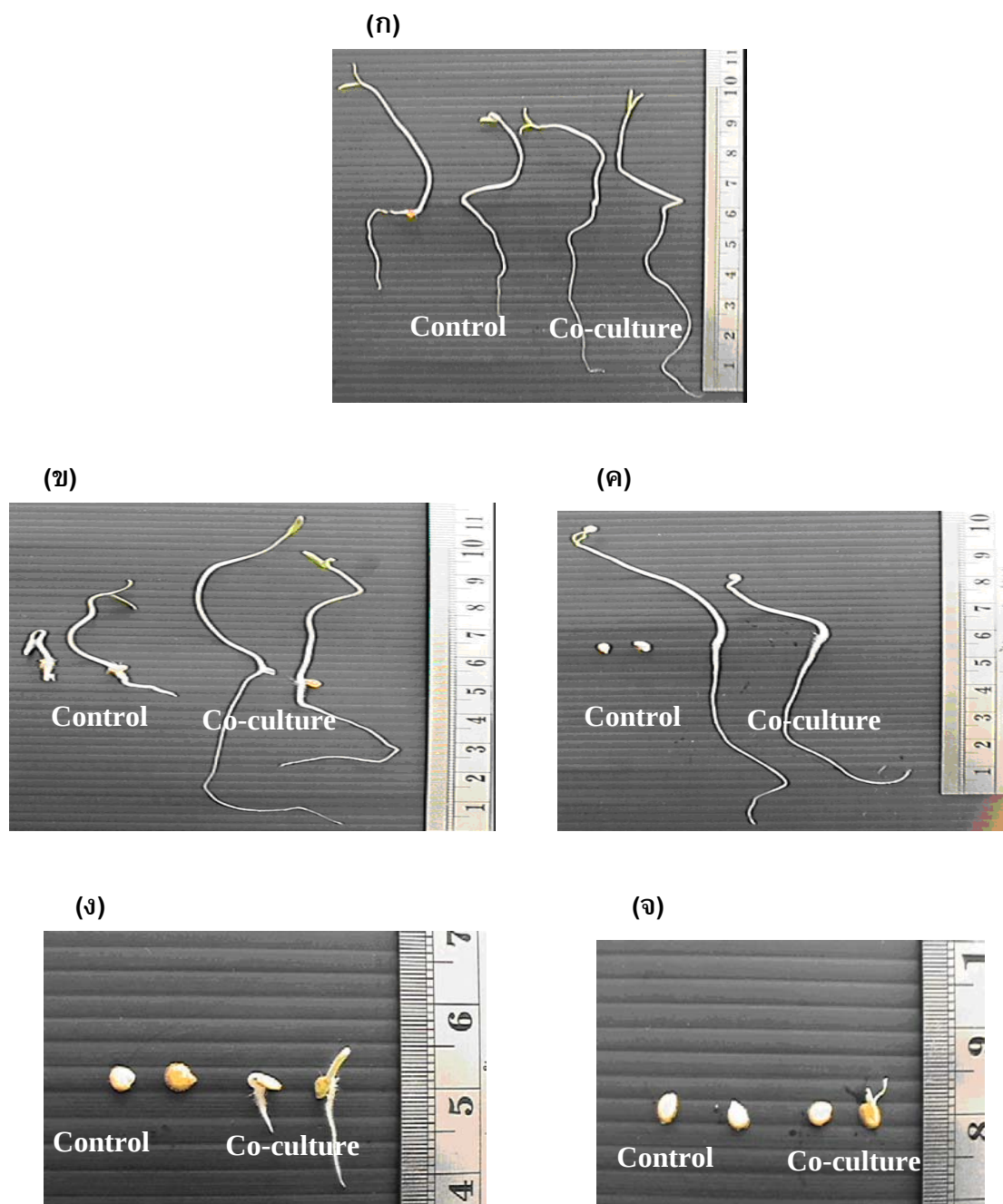
นอกจากนี้การที่กรรมวิธีทดลองซึ่งเมลิตผ่านการเติมหัวเชื้อผสมให้ผลการงอกและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเชื้อเทศสูงกว่าชุดควบคุม อาจเป็นผลเนื่องมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียทนเค็มที่ละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ *B. megaterium* A12ag ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Rodriguez และ Fraga (1999) และพบว่า รากของเมลิตที่ไม่ผ่านการเติมเชื้อมีรากขนอ่อนเป็นจำนวนมาก เนื่องจากการที่พืชเจริญเติบโตในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสต่ำ พืชจะมีการปรับตัวเพื่อช่วยในการดูดซึมฟอสฟอรัสด้วยการสร้างรากขนอ่อน ส่วนรากของเมลิตที่ผ่านการแช่เชื้อมีรากขนอ่อนน้อยกว่า และมีความยาวมากกว่า (ภาพที่ 4.5) อันเป็นลักษณะของรากที่ได้รับฟอสฟอรัสในปริมาณที่เพียงพอ ซึ่งสอดคล้องการรายงานของ Lambers และคณะ (2006) ลักษณะดังกล่าวเป็นสิ่งที่สามารถบ่งชี้ถึงความสามารถในการละลาย tricalcium phosphate ของ *B. megaterium* A12ag และผลการตรวจสอบการยึดเกาะของแบคทีเรียบริเวณรากต้นกล้าด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและยึดเกาะบริเวณรากพืชได้ในทุกระดับความเค็มที่ศึกษาดังตัวอย่างในภาพที่ 4.6



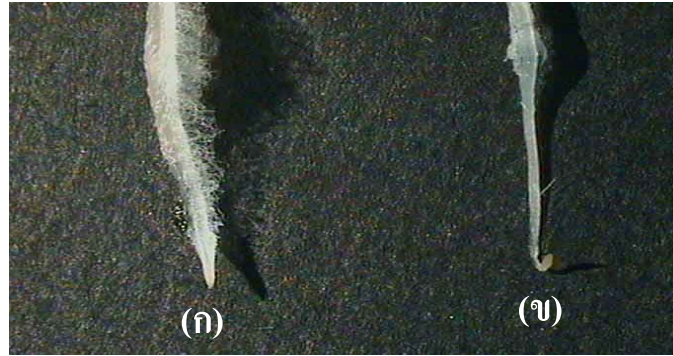
ภาพที่ 4.3 ผลของหัวเชื้อผสมต่อ (ก) เปอร์เซ็นต์การงอก (ข) ดัชนีการงอก (ค) ความยาวของรากต้นกล้าอายุ 14 วัน และ (ง) น้ำหนักแห้งของต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 14 วัน ที่ปลูกในระดับความเค็มต่าง ๆ ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีทดลองจากการทดลอง 4 ซ้ำ

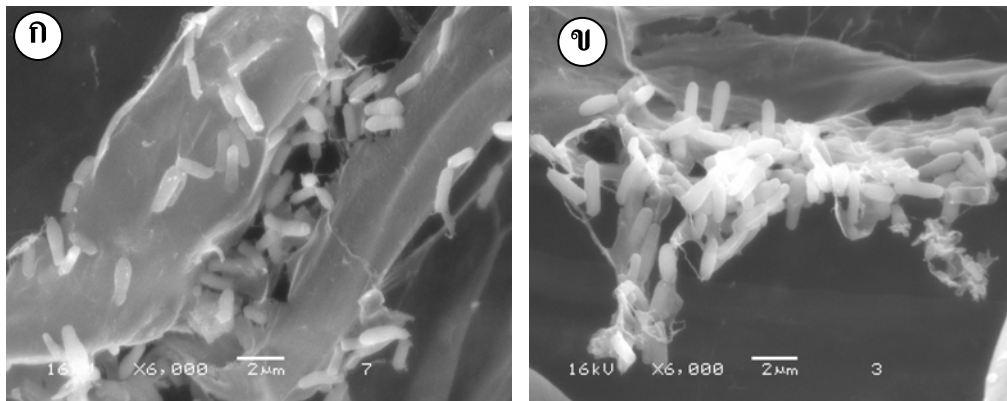
อักษรที่ระบุต่างกันเหนือกราฟแต่ละแท่งแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$



ภาพที่ 4.4 ผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศที่ปลูกในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยแปรผันระดับความเข้มข้นของแก๊สเอทิลีนคลอไรด์ที่ (ก) 0 mM (ข) 30 mM (ค) 60 mM (ง) 90 mM และ (จ) 120 mM



ภาพที่ 4.5 ลักษณะของรากต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 14 วัน (ก) ที่เมล็ดไม่ผ่านการเติมหัวเชื้อผสม และ (ข) ที่เมล็ดผ่านการเติมหัวเชื้อผสม



ภาพที่ 4.6 การเจริญและยึดเกาะของแบคทีเรียบริเวณรากต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 14 วัน ที่เมล็ดผ่านการเติมหัวเชื้อผสม และปลูกในสภาพห้องปฏิบัติการที่ระดับความเค็ม (ก) 30 mM NaCl และ (ข) 120 mM NaCl

4.5 ผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาพเรือนเพาะชำ

4.5.1 ผลต่อการเจริญเติบโตของพืช

การศึกษาผลของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในตัวกลางขานอ้อยต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาพเรือนเพาะชำ โดยทำการทดลองกับดินเค็มที่เก็บตัวอย่างมาจากพื้นที่ดินเค็ม บริเวณอ่างเก็บน้ำหนองบ่อ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม ออกแบบกรรมวิธีทดลองทั้งหมด 6 กรรมวิธี คือ 1) Treatment 1 ไม่เติมหัวเชื้อ และไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยปลอดเชื้อ 2) Treatment 2 เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ 3) Treatment 3 เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และไม่เติมหัวเชื้อ 4) Treatment 4 เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ 5) Treatment 5 เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และไม่เติมหัวเชื้อ และ 6) Treatment 6 ไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อในกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้ปุ๋ย คำนวณปริมาณปุ๋ยที่ต้องเติมสำหรับธาตุอาหารแต่ละตัวให้มีปริมาณธาตุอาหารเท่ากันโดยคิดเทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ย N:P:K เท่ากับ 15:15:15 ในอัตรา 40 กิโลกรัมต่อไร่ เก็บข้อมูลผล

การเจริญเติบโตของพืชอายุ 30 และ 60 วัน การสะสมฟอสฟอรัสของพืชอายุ 60 วัน คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีบางประการของดินทั้งก่อนปลูก และในวันเก็บเกี่ยวเมื่อพืชมีอายุ 60 วัน ตลอดจนปริมาณจุลินทรีย์ในดิน ผลการศึกษาพบว่า ในกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้หัวเชื้อผสมในตัวยางขาน้อย ร่วมกับปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟต มะเขือเทศที่อายุ 30 วัน มีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และความสูงของต้น มากกว่ากรรมวิธีทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.11 และ 4.12) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sundara และคณะ (2002) และ Mayak และคณะ (2004) นอกจากนี้พบว่า มะเขือเทศที่อายุ 60 วัน มีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูงของต้น ปริมาณคลอโรฟิลล์ พื้นที่ใบ และปริมาณฟอสฟอรัสสูงที่สุด ตลอดจนมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญกว่ากรรมวิธีทดลองอื่นด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณคลอโรฟิลล์ไม่แตกต่างกันในทางสถิติกับกรรมวิธีทดลองอื่น และไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณคลอโรฟิลล์ในทุกกรรมวิธีทดลองด้วย ผลการศึกษาที่ได้แสดงว่าหัวเชื้อผสมที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตนั้นสามารถแสดงกิจกรรมในการละลายฟอสเฟตของหินฟอสเฟตได้เป็นอย่างดี เพราะในปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชที่เท่ากันของหินฟอสเฟตและปุ๋ยเคมีนั้น หินฟอสเฟตยังมีส่วนประกอบของฟอสเฟตอื่น ๆ ซึ่งอยู่รูปที่ถูกตรึง จึงทำให้มะเขือเทศในกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้หัวเชื้อผสมในตัวยางขาน้อย ร่วมกับปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟตได้รับฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปริมาณที่มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar และ Singh (2001) ที่พบว่า *Pseudomonas striata* สามารถละลายหินฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่ใช้ได้ในปริมาณสูงในวันที่ 45 และ 60 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ในหัวเชื้อผสมที่เติมให้แก่พืชนั้นมีการเจริญเพิ่มจำนวนอยู่ในช่วง 30 วันแรกของการปลูก และหลังจากนั้นเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุดและเข้าสู่ช่วง stationary phase จึงมีการสร้างกรดอินทรีย์ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิเพื่อย่อยหินฟอสเฟตและทำให้มะเขือเทศมีการเจริญเติบโตสูงสุดแตกต่างจากกรรมวิธีทดลองอื่นอย่างชัดเจนในวันที่ 60

นอกจากนี้ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในกรรมวิธีทดลองที่มีการเติมเฉพาะขาน้อยปลอดเชื้อ และกรรมวิธีทดลองที่เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และไม่เติมหัวเชื้อ ส่วนกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้ปุ๋ยเคมี N:K ร่วมกับการใช้หินฟอสเฟตในการเป็นแหล่งฟอสฟอรัส แต่ไม่มีการเติมหัวเชื้อผสม พบว่ามะเขือเทศมีแนวโน้มในการเจริญเติบโตต่ำที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่าความสูงของต้นทั้งในมะเขือเทศอายุ 30 และ 60 วัน มีค่าต่ำที่สุดกว่ากรรมวิธีทดลองอื่น หรือแม้กระทั่งชุดควบคุมที่ไม่มีการใช้ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองที่ได้อาจเป็นเพราะในชุดควบคุมนั้นแม้จะไม่มีการใช้ปุ๋ย แต่มีการเติมขาน้อยปลอดเชื้อ ในขณะที่กรรมวิธีทดลองที่มีการใช้ปุ๋ยเคมี N:K ร่วมกับการใช้หินฟอสเฟตนั้นไม่มีการเติมขาน้อยปลอดเชื้อ และจากการสังเกตกระถางปลูกของชุดควบคุมพบว่าเพียงสัปดาห์แรกของการปลูกมะเขือเทศ เศษขาน้อยมีลักษณะเปื่อยยุ่ย อีกทั้งมีลักษณะของเชื้อราและแบคทีเรียในธรรมชาติเจริญอยู่ จึงอาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ยึดเกาะกับขาน้อยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ ข้อสังเกตที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือ แม้ว่าจะมีการใช้ปุ๋ยเคมี N:K แต่การที่พืชไม่สามารถนำฟอสฟอรัสในหินฟอสเฟตไปใช้ประโยชน์ได้สามารถส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืชที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของพืช (Rodríguez และ Fraga, 1999)

4.5.2 ผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของดิน

ผลการวิเคราะห์ดินก่อนปลูกซึ่งเป็นดินเค็มที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณอ่างเก็บน้ำหนองบ่ออำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม เป็นดินที่มีความเค็มเล็กน้อย เนื่องจากช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเป็นฤดูฝน ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และมีเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย (Sandy clay loam) ดังตารางที่ 4.13 นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินในวันเก็บเกี่ยว ดังตารางที่ 4.14 พบว่า ดินมีค่า pH เพิ่มขึ้นจากดินก่อนการปลูกในทุกกรรมวิธีทดลอง ในกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้หัวเชื้อผสมในตัวกลางชานอ้อย ร่วมกับปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟต พบว่าดินมีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกรรมวิธีทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีค่า pH ต่ำที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 5.76 แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้เฉพาะปุ๋ยเคมี N:P:K ผลการศึกษาที่ได้กล่าวไว้ได้ว่า การที่ดินในกรรมวิธีทดลองนี้มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในปริมาณสูงที่สุดนั้นเกิดจากกิจกรรมในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในหัวเชื้อผสม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Han และคณะ (2006) ที่พบว่าการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตช่วยให้ดินมีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้หัวเชื้อแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตร่วมกับการเติมหินฟอสเฟต และส่งผลต่อเนื่องให้ทั้งส่วนต้นและรากพืชมีปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.11 ผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน ในสภาพเรือนเพาะชำ

Treatment	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม/ต้น)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/ต้น)	ความสูง (ซม.)	คลอโรฟิลล์ (SPAD)
1	330.8 ^{AB}	27.6 ^{AB}	8.2 ^B	27.967
2	285.8 ^B	17.0 ^B	6.7 ^B	27.108
3	455.8 ^{AB}	30.8 ^{AB}	7.3 ^B	27.292
4	713.5 ^A	51.4 ^A	13.0 ^A	28.962
5	105.3 ^B	3.2 ^B	3.8 ^C	28.800
6	291.7 ^B	18.7 ^B	6.9 ^B	29.989
F-Test	**	**	**	ns
LSD 0.05	0.2806	0.0206	1.7452	4.7076

Treatment 1 - ไม่เติมหัวเชื้อ และไม่เติมปุ๋ย แต่เติมชานอ้อยตลอดเชื้อ (ชุดควบคุม)

Treatment 2 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และเติมชานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 3 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 4 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และเติมชานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 5 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 6 - ไม่เติมปุ๋ย แต่เติมชานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

^{ABC} ตัวอักษรต่างกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.12 ผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 60 วัน ในสภาพเรือน
เพาะชำ

Treatment	น้ำหนักสด (กรัม/ต้น)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ต้น)	ความสูง (ซม./ต้น)	คลอโรฟิลล์ (SPAD)	พื้นที่ใบ (ตร. มม./ต้น)	Phosphorus (%)
1	2.7034 ^{AB}	0.2791 ^{AB}	11.075 ^C	28.558 ^B	22680 ^C	0.1175 ^D
2	2.1688 ^B	0.2057 ^{BC}	13.650 ^{BC}	17.500 ^E	27473 ^B	0.185 ^{CD}
3	3.2259 ^{AB}	0.3655 ^{AB}	17.550 ^B	28.183 ^B	19712 ^D	0.285 ^{AB}
4	5.1733 ^A	0.5004 ^A	26.867 ^A	31.117 ^A	30140 ^A	0.3125 ^A
5	0.7978 ^B	0.0967 ^{BC}	12.300 ^{BC}	21.400 ^D	10153 ^F	0.1875 ^{CD}
6	0.7166 ^B	0.0745 ^C	8.500 ^C	25.671 ^C	13453 ^E	0.220 ^{BC}
F-Test	*	*	**	**	**	**
LSD 0.05	2.5841	0.2763	4.6149	1.6818	644.80	0.0827

Treatment 1 - ไม่เติมหัวเชื้อ และไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม)

Treatment 2 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 3 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 4 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 5 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 6 - ไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

^{ABC} ตัวอักษรต่างกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.13 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของดินก่อนปลูก

pH (1:1 H ₂ O)	ECe (1:5) (dS/m)	Organic Matter (%)	Total Nitrogen (%)	Available phosphorus, Bray II (ppm)	Extractable potassium (ppm)	Soil texture
5.5	3.3	0.74	0.04	6.85	39.00	sandy clay loam

ตารางที่ 4.14 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินในวันเก็บเกี่ยว (วันที่ 60 ของการปลูก)

Treatment	pH (1:1 H ₂ O)	Organic Matter (%)	Total Nitrogen (%)	Available phosphorus, Bray II (ppm)	Extractable potassium (ppm)
1	6.50 ^A	0.6025 ^B	0.0325 ^B	6.450 ^E	35.25 ^B
2	6.50 ^A	0.720 ^A	0.1925 ^A	30.5875 ^C	51.25 ^A
3	5.80 ^B	0.430 ^C	0.0200 ^B	9.4175 ^E	42.50 ^{AB}
4	5.76 ^B	0.4365 ^C	0.0200 ^B	52.5825 ^A	43.0 ^{AB}
5	6.40 ^A	0.420 ^C	0.0200 ^B	46.200 ^B	51.0 ^A
6	6.265 ^{AB}	0.670 ^B	0.0333 ^B	21.1325 ^D	36.325 ^B
F-Test	*	**	*	**	**
LSD 0.05	0.5734	0.1168	0.1105	5.2692	9.2189

Treatment 1 - ไม่เติมหัวเชื้อ และไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม)

Treatment 2 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 3 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 4 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 5 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 6 - ไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

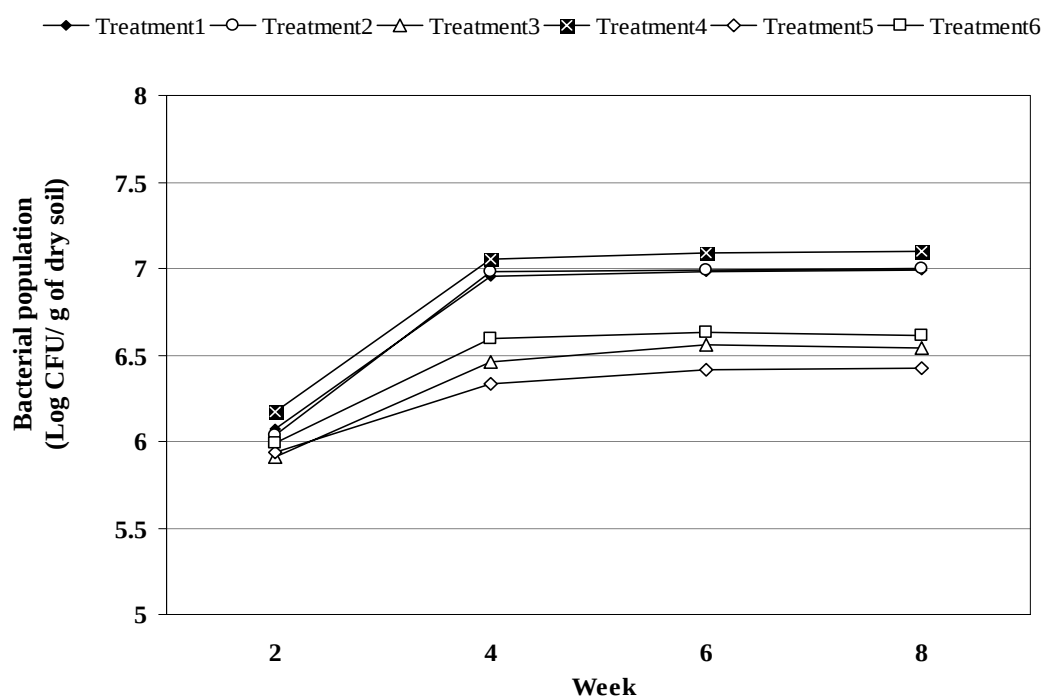
^{ABC} ตัวอักษรต่างกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

4.5.3 ผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ในดิน

จากการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในดินโดยตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี viable plate count ในอาหาร halobacteria ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2 M ของดินที่ปลูกเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า กรรมวิธีทดลองที่ 4 ที่มีการใช้หัวเชื้อผสมในตัวอย่างขานอ้อยร่วมกับปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟตมีปริมาณจุลินทรีย์ในดินสูงสุด รองลงมาคือกรรมวิธีทดลองที่เติมปุ๋ยเคมี N:P:K ร่วมกับขานอ้อยที่มีหัวเชื้อผสม และชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อผสมและไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยปลอดเชื้อ ตามลำดับ แต่ปริมาณจุลินทรีย์ในสามกรรมวิธีทดลองนี้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากการที่หัวเชื้อของแบคทีเรีย (ในกรรมวิธีทดลองที่มีการใช้หัวเชื้อ) หรือจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่เจริญในขานอ้อย (ในกรรมวิธีทดลองที่เป็นชุดควบคุม) สามารถย่อยละลายฟอสเฟตรูปที่ถูกตรึงในดินได้ จุลินทรีย์ในดินจึงได้รับฟอสฟอรัสเสริมสำหรับการเจริญมากกว่า (ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และตารางที่ 4.15) ทำให้กรรมวิธีทดลองที่ 1 2 4 และ 6 ซึ่งมีการเติมขานอ้อยมีปริมาณแบคทีเรียในดินสูงกว่ากรรมวิธีทดลองที่ 3 และ 5 ที่ไม่มีการเติมขานอ้อย

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า ขานอ้อยนอกจากจะเป็นวัสดุตัวอย่างที่ทำให้หัวเชื้อแบคทีเรียมีการรอดชีวิตสูงแล้ว ยังสามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในดินตามธรรมชาติ และเป็นการเพิ่ม

อินทรีย์วัตถุในดินได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนั้น หัวเชื้อผสมของแบคทีเรียสามารถส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่ปลูกในสภาวะเค็มทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการ และในสภาพเรือนเพาะชำได้ดี ตลอดจนทำให้ดินที่ผ่านการเติมหัวเชื้อมีปริมาณฟอสฟอรัส และแบคทีเรียสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเติมหินฟอสเฟตร่วมด้วย ดังนั้นงานวิจัยจึงเป็นของเหลือใช้จากการเกษตรที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นวัสดุตัวกลางในการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase สายพันธุ์ *B. licheniformis* B2r และแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ *B. megaterium* A12ag อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านการปรับสภาพตัวกลางงานวิจัยให้มีประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อ และติดตามผลการรอดชีวิตของหัวเชื้อที่มีอายุการเก็บรักษาเป็นเวลานานอย่างน้อย 1 ปี ควรติดตามตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase และที่ย่อยละลายฟอสเฟต โดยใช้อาหารเฉพาะ เช่น อาหารที่มีอินทรีย์ฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส หรือมี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น และการนำหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากการศึกษานี้ไปใช้กับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น และกับสภาวะดินเค็มในระดับต่าง ๆ เพื่อการนำหัวเชื้อแบคทีเรียทนเค็มที่คัดแยกได้นี้ไปใช้ส่งเสริมการปลูกพืชในพื้นที่ดินเค็มได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น



ภาพที่ 4.7 ปริมาณแบคทีเรียในดินจากตัวอย่างของดินที่ปลูกเป็นเวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์

Treatment 1 - ไม่เติมหัวเชื้อ และไม่เติมปุ๋ย แต่เติมงานอ้อยตลอดเชื้อ (ชุดควบคุม)

Treatment 2 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และเติมงานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 3 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 4 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และเติมงานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 5 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 6 - ไม่เติมปุ๋ย แต่เติมงานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

ตารางที่ 4.15 ปริมาณแบคทีเรีย (log CFU/ กรัมของดิน) ในดินที่ปลูกมะเขือเทศในเรือนเพาะชำ ที่ระยะเวลาในการปลูกสัปดาห์ที่ 2 4 6 และ 8

Treatment	ระยะเวลาในการปลูก (สัปดาห์)			
	2	4	6	8
1	6.0683	6.9594 ^A	6.9785 ^A	6.9902 ^A
2	6.0352	6.9860 ^A	6.9940 ^A	7.0000 ^A
3	5.9040	6.4604 ^{BC}	6.5568 ^{BC}	6.5440 ^{BC}
4	6.1187	7.0528 ^A	7.0884 ^A	7.0959 ^A
5	5.9994	6.3949 ^C	6.4705 ^C	6.4790 ^C
6	5.9899	6.5914 ^B	6.6325 ^B	6.6144 ^B
F-Test	ns	**	**	**
LSD 0.05		0.1408	0.1205	0.1181

Treatment 1 - ไม่เติมหัวเชื้อ และไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม)

Treatment 2 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 3 - เติมปุ๋ยเคมี N:P:K และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 4 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และเติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

Treatment 5 - เติมปุ๋ยเคมี N:K หินฟอสเฟต และไม่เติมหัวเชื้อ

Treatment 6 - ไม่เติมปุ๋ย แต่เติมขานอ้อยที่มีหัวเชื้อ

^{ABC} ตัวอักษรต่างกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย

1. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ ACC deaminase คือ *B. licheniformis* B2r
2. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถละลายฟอสเฟต คือ *B. megaterium* A12ag
3. การศึกษาการรอดชีวิตของหัวเชื้อผสม *B. licheniformis* B2r และ *B. megaterium* A12ag (อัตราส่วน 1:1) พบว่า จำนวนแบคทีเรียในหัวเชื้อผสมรูปแบบน้ำในตุ๊กกลางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และรูปแบบแห้งในตุ๊กกลางขุยมะพร้าวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 20 30 และ 40°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีการรอดชีวิตต่ำกว่า 4.0 log CFU/ml หรือ กรัมของตุ๊กกลาง ในขณะที่หัวเชื้อผสมรูปแบบแห้งในตุ๊กกลางขุยมะพร้าว ทำให้แบคทีเรียในหัวเชื้อผสมมีการรอดชีวิตสูงมาก โดยมีจำนวนเท่ากับจำนวนเริ่มต้นเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ 30°C
4. การศึกษาผลของหัวเชื้อผสม *B. licheniformis* B2r และ *B. megaterium* A12ag ต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า การเติมหัวเชื้อผสมให้กับเมล็ดมะเขือเทศที่ระดับความเค็ม 0 30 60 90 และ 120 mM NaCl ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอก ดัชนีการงอก ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของมะเขือเทศอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อผสม
5. การศึกษาผลของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในตุ๊กกลางขุยมะพร้าวต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่ปลูกในดินเค็มในสภาพเรือนเพาะชำ พบว่า ในกรรมวิธีทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อผสมร่วมกับการเติมปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟต ทำให้ต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน มีค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และความสูงมากกว่ากรรมวิธีทดลองอื่น และทำให้ต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 60 วัน มีค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูง คลอโรฟิลล์ พื้นที่ใบ และเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัส มากกว่ากรรมวิธีทดลองอื่น
6. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของดินที่ปลูกมะเขือเทศ พบว่า ในทุกกรรมวิธีทดลอง pH ของดินหลังปลูกเพิ่มขึ้นจากดินก่อนปลูก และในกรรมวิธีทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อผสมร่วมกับการเติมปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟต ค่า pH ของดินหลังปลูกมีค่าต่ำสุด นอกจากนี้ ในกรรมวิธีทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อผสมร่วมกับการเติมปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟต ดินมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในปริมาณสูงที่สุด
7. ผลการตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดในดินหลังปลูก พบว่า ในกรรมวิธีทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อผสมร่วมกับการเติมปุ๋ยเคมี N:K และหินฟอสเฟต มีปริมาณแบคทีเรียในดินสูงสุด แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีทดลองที่เติมปุ๋ยเคมี N:P:K ร่วมกับขุยมะพร้าวที่มีหัวเชื้อ และชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อและไม่เติมปุ๋ยแต่เติมขุยมะพร้าวตลอดเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน. 2548. คู่มือการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน น้ำ ปุ๋ย พืช วัสดุปรับปรุงดิน และการวิเคราะห์เพื่อตรวจรับรองมาตรฐานสินค้า. กรุงเทพฯ: สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน.
- ถวิล ครุฑกุล. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เพิ่มพูน กীরติกสิกร. 2527. ดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สมศรี อรุณรัตน์. 2542. การปรับปรุงดินเค็มและดินโซดิก. ใน คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐ เรื่อง ดินเค็ม. กรุงเทพฯ: กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W. and Saltveit, Jr.M.E. 1992. **Ethylene in Plant Biology**. 2nd ed. New York: Academic Press.
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M. and Temprano, F.J. 2008. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. **Soil Biol Biochem.** 1–9
- Atlas, R.M. 1997. **Handbook of Microbiological Media**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A. and Tyagi, R.D. 2007. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. **Bioresource Technol.** 98(18): 3535-3546.
- 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. **Appl. Soil Ecol.** 34(1): 33-41.
- Chookietwattana, k. 2003. **Diversity of halophilic bacteria in saline soil at Nong Bo Reservoir, Mahasarakham Province, Thailand**. Ph.D. Thesis Suranaree University of Technology. Nakhon Ratchasima.
- Clark, D.G., Gubrium, E.K., Klee, H.J., Barrett, J.E. and Nell, T.A.1999. Root formation in ethylene insensitive plants. **Plant Physiol.** 121: 53-59.
- Cuartero, J. and Fernández-Muñoz, R. 1999. Tomato and salinity. **Scientia Horticulturae**. 78: 83-125.
- Deikman, J. (1997) Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. **Physiol. Plant.** 100: 561–566.

- Dey, R., Pal, K.K, Bhatt, D.M. and Chauhan, S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiol. Res.** 159: 371-394.
- Dworkin, M. and Foster, J. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. **J. Bacteriol.** 75: 592–601.
- Egamberdiyeva, D. & Höflich, G. 2004. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. **J. Arid Environ.** 56: 293-301.
- El-Komy, H.M.A., 2005. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for Successful Phosphorus and Nitrogen Nutrition of Wheat Plants. **Food Techol. Biotechnol.** 43(1): 19-27.
- Fujino, A, Ose, T., Yao, M., Tokiwano, T., Honma, M., Watanabe, N. and Tanaka, I. 2004. Structural and enzymatic properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase homologue from *Pyrococcus horikoshii*. **J. Mol. Biol.** 341: 999–1013.
- Ghosh, S., Penterman, J.N., Little, R.D., Chavez, R. and Glick, B.R. 2003. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. **Plant Physiol. Biochem.** 41: 277–281.
- Glick, B.R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters.** 251: 1–7.
- Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. **J theor Biol.** 190: 63-68.
- Han, H.S., Supanjani, S. and Lee, K. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. **Plant Soil Environ.** 52(3): 130–136.
- Hontzeas, N., Hontzeas, C.E. and Glick, B.R. 2006. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Biotechnol Adv.** 24: 420–426.
- International Seed Testing Association. 1993. **International Rules for Seed Testing.** Seed Sci. & Technol., 21, Supplement. Zürich.
- Keren, R. 2000. Salinity. In: Sumner, M.E. (Ed.), **Handbook of Soil Science.** Boca Raton: CRC Press.
- Khavazi, K, Rejali, F., Seguin, P. and Miransari, M. 2007. Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculants. **Enzyme and Microbial Technology.** 41: 780–784.

- Kumar, V. and Singh, K. P. 2001. Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Bioresource Technol.** 76: 173-175.
- Lambers, H., Shane, M.W. and Cramer, M.D. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. **Annals Bot.** 98: 693–713.
- Landon, J.R. 1991. **Booker Tropical Soil Manual.** Essex: Longman.
- Lupwayi N.Z., Olsen P.E., Sande E.S., Keyser H.H., Collins M.M., Singleton P.W. and Rice W.A. 2000. Inoculant quality and its evaluation. **Field Crops Res.** 65: 259-270.
- Maas, E.V. 1990. Crop salt tolerance. In Tanji, K.K. (Ed.). **Agricultural Salinity Assessment and Management.** New York: American Society of Civil Engineers.
- Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B.R. 2004. **Plant Physiol. Biochem.** 42: 565–572.
- Morgan, P.W. and Drew, M.C. 1997. Ethylene and plant responses to stress. **Physiol Plant.** 100(3): 620-630.
- Nautiyal, C.S., Bhaduria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. and Verma, D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiol. Lett.** 182: 291-296.
- Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiol Plant.** 118: 10–15.
- Ramos, B., Lucas G.J.A., Probanza, A., Barrientos, M.L. and Gutierrez M.F.J. 2002. Alterations in the rhizobacterial community associated with European alder growth when inoculated with PGPR strain *Bacillus licheniformis*. **Environmental and Experimental Botany.** 49:61-68.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol Adv.** 17: 319-339.
- Shaharoona, B., Arshad, M. and Zahir, Z.A. 2006. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiate* L.). **Lett. Appl. Microbiol.** 42: 155-159.
- Shashirekha, M.N. and Rajarathnam, S. 2007. Bioconversion and biotransformation of coir pith for economic production of *Pleurotus florida*: chemical and biochemical changes in coir pith during the mushroom growth and fructification. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 23: 1107-1114.
- Singleton, P., Keyser, H. and Sande, E. 2002. Development and evaluation of liquid inoculants. In: Herridge, D. (Ed.). **Inoculant and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam.** ACIAR Proceedings 109e. 52-66.

- Son, H – J., Park, G-T., Cha, M-S. and Heo, M-S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH- tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. **Bioresource Technol.** 97(2): 204-210.
- Spark, D.L. (1995). **Environmental Soil Chemistry**. California: Academic Press.
- Stephan, J.H.G. and Rask, H.M. 2000. Inoculant production and formulation. **Field Crops Res.** 65: 249-258.
- Stocker, O. 1960. Das Halophyten Problem. In: Pessaraki, M. (Ed.). 1999. **Handbook of Plant and Crop Stress**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker.
- Sundara, B., Natarajan, V. and Hari, K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Res.** 77: 43-49.
- Tapia, P.V., Ramos, J.Z.C., Garcia, P.S., Chavez, L.T., Romero, R.M.L. and Arredondo, J.L.O. 2008. Physical, chemical and biological characterization of coir dust. **Revista Fitotecnia Mexicana**. 31(4): 375-381.
- Wang, K. L-C, Li, H. and Ecker, J.R. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**. Supplement 2002: 131-151.
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C. and Wong, M.H. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**. 125(1-2): 155-166.
- Zahran, H.H. 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. **Biol. Fertil. Soils**. 25: 211–223.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหาร **modified Pikovskaya (MPVK)** (Son และคณะ, 2006)

Glucose	10	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	g
NaCl	0.2	g
KCl	0.2	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	g
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	g
Yeast extract	0.5	g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	0.5	g
Agar	1.5	g

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด ยกเว้น Ca₃(PO₄)₂ ในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1,000 ml และ ปรับ pH เป็น 7.5 และแยกฆ่าเชื้อ Ca₃(PO₄)₂ ที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที และผสมกับส่วนประกอบอื่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

1.2 อาหาร **Halobacteria medium** (Atlas, 1997)

Yeast extract	1.00	g
Casein hydrolysate	5.00	g
CaCl ₂ ·6 H ₂ O	0.28	g
KCl	5.00	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	10.00	g
KNO ₃	1.00	g
Disodium citrate	3.08	g
Agar	15-20	g

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 500 ml ใช้ความร้อนช่วยและคนจนเข้ากันดีเติมเกลือ NaCl ตามปริมาณที่ต้องการ คนจนละลายดีปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml และ ปรับ pH 7.2- 7.4 นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

1.3 อาหาร DF salt minimal medium ที่มี ACC เป็นแหล่งไนโตรเจน (Dworkin และ Foster, 1958)

KH_2PO_4	4.0 g
Na_2HPO_4	6.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
Glucose	2.0 g
Gluconic acid	2.0 g
Citric acid	2.0 g

Major trace elements และ minor trace elements อย่างละ 0.1 ml

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 500 ml ใช้ความร้อนช่วยและคนจนเข้ากันดีเติมเกลือ NaCl ตามปริมาณที่ต้องการ คนจนละลายดี ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ปรับ pH 7.2 แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที เมื่ออาหารเย็นตัวลง ทำการเติม ACC 3.0 mM สำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจนแก่แบคทีเรีย

ส่วนประกอบของ major trace elements

H_3BO_3	10.00 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11.19 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	124.60 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	78.22 mg
MoO_3	10.00 mg
Sterile distilled water	100 ml

เก็บที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 4°C

ส่วนประกอบของ minor trace elements

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100.00 mg
Sterile distilled water	10 ml

เก็บที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 4°C

ภาคผนวก ข
ชื่อชนิดและรหัสเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษาคือ เชื้อแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกได้จากดินเค็มบริเวณหนองบ่อ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม จากการศึกษาของ Chookietwattana (2003) ดังนี้

ตารางผนวกที่ ข-1 ชื่อชนิดและรหัสเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา

Isolate codes	Identified species	Isolate codes	Identified species
A9ax	<i>Bacillus aquimaris</i>	A6v	<i>Bacillus megateium</i>
A6u1	<i>Bacillus aquimaris</i>	A9ay	<i>Bacillus mycoides</i>
A10e	<i>Bacillus aquimaris</i>	A6aF	<i>Bacillus licheniformis</i>
A8a4	<i>Bacillus aquimaris</i>	A7aF	<i>Bacillus licheniformis</i>
A7g	<i>Bacillus aquimaris</i>	A8aV	<i>Bacillus licheniformis</i>
A7aA	<i>Bacillus bataviensis</i>	A8aT	<i>Bacillus licheniformis</i>
AlIV	<i>Bacillus circulans</i>	Alat	<i>Bacillus licheniformis</i>
A1h	<i>Bacillus firmus</i>	A5aG	<i>Bacillus licheniformis</i>
App	<i>Bacillus firmus</i>	A8[aa]	<i>Bacillus licheniformis</i>
A12ao	<i>Bacillus firmus</i>	A8an	<i>Bacillus licheniformis</i>
Ala	<i>Bacillus firmus</i>	A5[ac]	<i>Bacillus pumilus</i>
A1n1	<i>Bacillus firmus</i>	A5af1	<i>Bacillus pumilus</i>
Allp	<i>Bacillus firmus</i>	A8y	<i>Bacillus pumilus</i>
A10[ajj]	<i>Bacillus firmus</i>	A8aD1	<i>Bacillus pumilus</i>
A12f	<i>Bacillus firmus</i>	A1ar	<i>Bacillus pumilus</i>
A8ak1	<i>Bacillus firmus</i>	A8aD	<i>Bacillus pumilus</i>
A8ah	<i>Bacillus firmus</i>	Allau	<i>Bacillus pumilus</i>
A12g	<i>Bacillus firmus</i>	A5at	<i>Bacillus pumilus</i>
A8ai	<i>Bacillus firmus</i>	A6ar	<i>Bacillus pumilus</i>
Allah	<i>Bacillus firmus</i>	Apua1	<i>Bacillus pumilus</i>
Apj	<i>Bacillus firmus</i>	A8<ab>	<i>Bacillus subtilis</i>

ตารางผนวกที่ ข-1 (ต่อ)

Isolate codes	Identified species	Isolate codes	Identified species
A11y	<i>Bacillus firmus</i>	A10af	<i>Bacillus subtilis</i>
A9s	<i>Bacillus firmus</i>	A7[ab]	<i>Bacillus subtilis</i>
Ally	<i>Bacillus megateium</i>	A12[ab]	<i>Bacillus subtilis</i>
Alag	<i>Bacillus megateium</i>	A9ab2	<i>Bacillus subtilis</i>
A9an	<i>Bacillus megateium</i>	A8ab2	<i>Bacillus subtilis</i>
A12ag	<i>Bacillus megateium</i>	A9aDD	<i>Bacillus subtilis</i>
A8az1	<i>Bacillus subtilis</i>	B8aw	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
A7ab1	<i>Bacillus subtilis</i>	B9aq1	<i>Halobacillus litoralis</i>
A2az	<i>Bacillus subtilis</i>	B8aZ	<i>Vigribacillus pantothenicus</i>
A1az	<i>Bacillus vallismortis</i>	B12aq1	<i>Halomonas elongata</i>
A5au	<i>Bacillus vallismortis</i>	B9aB	<i>Haererehalobacter ostenderis</i>
A6aJ	<i>Bacillus vallismortis</i>	B12r1	<i>Halobacillus litoralis</i>
A8e	<i>Bacillus vietnamensis</i>	B2r	<i>Bacillus licheniformis</i>
A11b	<i>Bacillus vietnamensis</i>	B7aW	<i>Bacillus licheniformis</i>
A1c	<i>Bacillus vietnamensis</i>	B11ax	<i>Halomonas desiderata</i>
Apa	<i>Bacillus vietnamensis</i>	B10aFF	<i>Bacillus aquimaris</i>
A6aP	<i>Geobacillus</i> <i>caldoxylosilyticus</i>	B8ax	<i>Bacillus halodenitrificans</i>
A9au	<i>Halobacillus litoralis</i>	B8[ac]	<i>Halobacillus trueperi</i>
A10au	<i>Halobacillus litoralis</i>	A12ar1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
A9ajj	<i>Halobacillus litoralis</i>		
A7aM	<i>Halobacillus litoralis</i>		
A1q	<i>Halobacillus salinus</i>		
A11s1	<i>Halobacillus trueperi</i>		
A5y	<i>Halobacillus trueperi</i>		
A1w	<i>Halobacillus trueperi</i>		
A1u	<i>Halobacillus trueperi</i>		
A12ajj	<i>Marinobacter aquaeolei</i>		

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ฟอสเฟตละลาย และกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase

1. การวิเคราะห์ฟอสเฟตละลาย (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548)

1.1 การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ฟอสเฟต

1) Sulfuric acid solution 5 N, เติม conc. H_2SO_4 70 ml ลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

2) Antimony potassium tartrate solution, ละลาย $\text{KSbOC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ 1.3715 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตร จนได้ 500 ml ด้วยน้ำกลั่นเก็บในขวดแก้ว pyrex

3) Ammonium molybdate solution, ละลาย $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนได้ 500 ml ด้วยน้ำกลั่นเก็บในขวด polyethylene

4) Ascorbic acid solution 0.1 M, ละลาย ascorbic acid 1.76 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนได้ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายนี้ไว้ใน ตู้เย็น 1 สัปดาห์

5) Mixed reagent

- 50 ml Sulfuric acid solution (1)
- 5 ml Antimony potassium tartrate solution (2)
- 15 ml Ammonium molybdate solution (3)
- 30 ml Ascorbic acid solution (4)

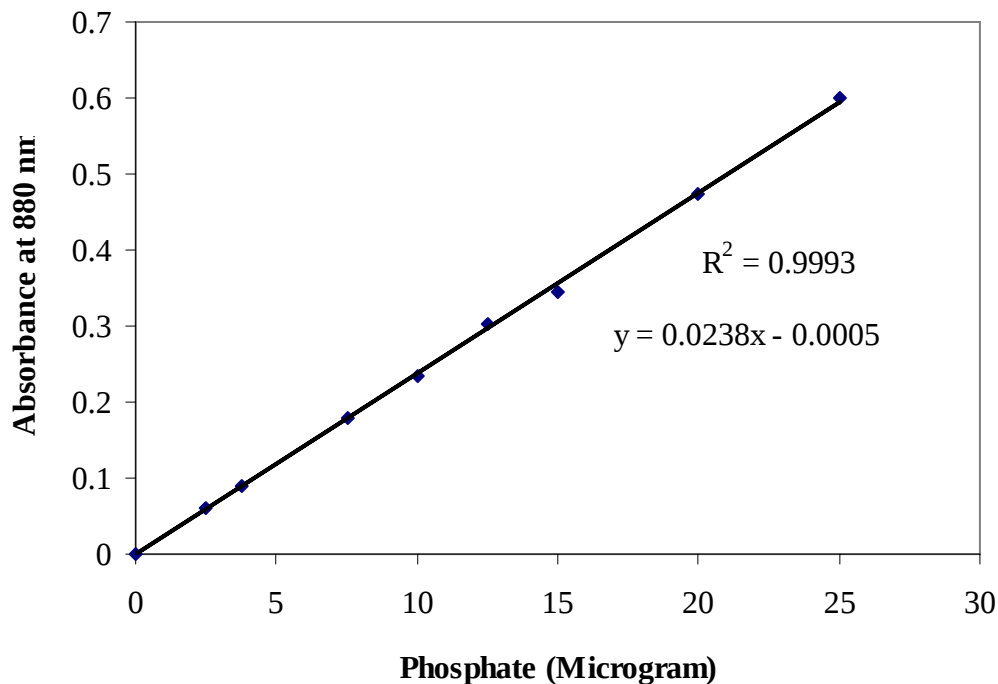
ผสมสารละลาย (1), (2) และ(3) ให้เข้ากันทิ้งไว้ 2-3 นาที และเติมสารละลาย (4) ผสมให้เข้ากัน ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนได้ 1,000 ml นำส่วนใดปริมาตร 2 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml จากนั้น ตั้งตัวอย่างปริมาตร 5 ml เติม mixed reagent ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไป วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 880 nm โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น blank จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณปริมาณฟอสเฟตดังสูตร

$$\text{ปริมาณฟอสเฟต (mg/l)} = \frac{\text{ปริมาณฟอสเฟตจากกราฟ (ไมโครกรัม)}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (ml)}}$$

1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1) Standard phosphorus solution 50 mg/l ละลาย KH_2PO_4 (Anhydrous) 0.2196 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนได้ 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น

2) เตรียม Standard phosphorus solution ให้มีปริมาณฟอสเฟตเท่ากับ 0, 2.5, 3.75, 7.5, 10.0, 15.0, 20 และ 25 ไมโครกรัม เติม mixed reagent ปริมาตร 1 ml ลงใน Standard phosphorus solution ที่เตรียมไว้ จำนวน 5 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 880 nm ภายใน 10-30 นาที จากนั้นนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังภาพผนวก ค-1



ภาพผนวก ค-1 กราฟมาตรฐานของฟอสเฟต

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

- 1) ปลูกเชื้อแบคทีเรียที่มีการเจริญอยู่ในระยะกลางถึงปลาย log phase ปริมาตร 5 μ l ลงในอาหาร tryptic soybean broth 7.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 32-35°C พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) เก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 8000g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
- 3) รินส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย 5.0 ml DF salt minimal medium ปั่นเหวี่ยงที่ 8000g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C รินส่วนน้ำใสทิ้ง
- 4) resuspend เซลล์ใน 7.5 ml DF salt minimal medium จากนั้น aliquot 0.5M ACC ที่แช่แข็งและผ่านการ thaw ปริมาตร 45 μ l เพื่อให้ได้ ACC 3.0 mM
- 5) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32-35°C พร้อมเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 6) เก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 8000g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
- 7) รินส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย 5 ml ของ 0.1M Tris-HCl pH 7.6 รินส่วนน้ำใสทิ้ง
- 8) ถ้ายังไม่วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทันที ควรเก็บ cell pellet ไว้ที่ -20°C
- 9) ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC เติม 1 ml ของ 0.1M Tris-HCl pH 7.6 ลงไปใน cell pellet vortex ให้เข้ากันดีแล้วเปิดลง microcentrifuge tube ใหม่ขนาด 1.5 ml
- 10) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16000g นาน 5 นาที จากนั้นรินส่วนน้ำใสทิ้ง

11) เติม 0.1M Tris-HCl pH 8.5 ปริมาตร 600 μ l จากนั้นเติมโทลูอีน (5%, v/v) 30 μ l และ vortex ที่ความเร็วสูงสุดนาน 30 วินาที สารละลายเอนไซม์ของตัวอย่างที่เตรียมได้นี้นำไปวิเคราะห์หา กิจกรรมของเอนไซม์ ACC

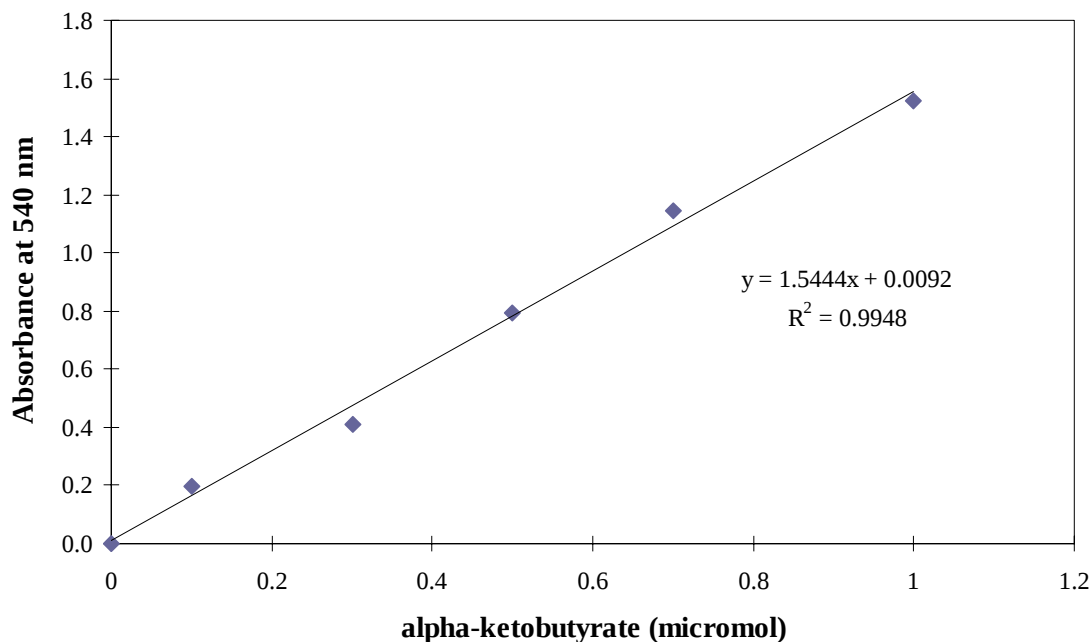
2.2 การทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ α -ketobutyrate

1) เตรียมสารละลายสต็อกมาตรฐาน α -ketobutyrate 100mM โดยใช้ 0.1M Tris-HCl pH 8.5 เป็นตัวทำละลาย เจือจางสารละลายสต็อกด้วยบัฟเฟอร์เดียวกันนี้ให้ได้ความเข้มข้น 10 mM และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

2) เตรียมอนุกรมของสารละลายมาตรฐาน α -ketobutyrate ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 μ mol โดยนำสารละลายสต็อกมาตรฐาน α -ketobutyrate เข้มข้น 10 mM เจือจางด้วย บัฟเฟอร์เดียวกันนี้ให้ได้ความเข้มข้น 0.1-1.0 μ mol

3) นำสารละลายมาตรฐาน α -ketobutyrate ของแต่ละความเข้มข้นมาปริมาตร 200 μ l เติม สารละลาย 0.2% 2,4 dinitrophenylhydrazine ปริมาตร 300 μ l (เตรียมโดยละลายใน 2M HCl) vortex ให้เข้ากันแล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ α -ketobutyrate เปลี่ยนรูปไปเป็น phenylhydrazone ตรวจหาปริมาณ phenylhydrazone ที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาตรงกับ α -ketobutyrate ที่มีในตัวอย่าง โดยการเติม 2M NaOH ปริมาตร 2.0 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

4) plot graph ค่าการดูดกลืนแสงในแกน y และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน α -ketobutyrate ในแกน x



ภาพผนวก ค-2 กราฟมาตรฐานของ α -ketobutyrate

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase

- 1) บีบ toluenized cells 200 μ l ใส่ลงใน microcentrifuge tube
- 2) เติม 0.5M ACC ปริมาตร 20 μ l ลงไป แล้ว vortex ให้ส่วนผสมเข้ากันดี จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15 นาที
- 3) เติม 0.56M HCl ปริมาตร 1 ml vortex ให้ส่วนผสมเข้ากันดี นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16000g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 4) บีบส่วนใสมา 1 ml เติม 0.56M HCl ปริมาตร 800 μ l vortex ให้ส่วนผสมเข้ากันดี
- 5) เติมสารละลาย 0.2% 2,4 dinitrophenylhydrazine ปริมาตร 300 μ l ในหลอดแก้วใหม่ที่สะอาด บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม 2M NaOH ปริมาตร 2.0 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
- 6) ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่รวม assay reagents, bacterial extract และ ACC ซึ่งต้องนำไปคิดด้วย ดังนั้นจึงต้องทำblank โดยเติมเฉพาะ assay reagents และ ACC และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหักลบจากตัวอย่าง หลังจากนั้นต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงของ assay reagent ที่ไม่มีการเติม ACC แล้วนำค่าที่ได้ไปหักลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ได้ครั้งแรก จึงจะเป็นค่าการดูดกลืนแสงแท้จริงของตัวอย่าง คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase

ภาคผนวก ง
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลวิเคราะห์สถิติด้านผลของความเค็ม และอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ผลของความเค็มต่อการเจริญของ *B. megaterium* A12ag

Completely Randomized AOV for phosphate

Source	DF	SS	MS	F	P
trt	4	27478.9	6869.73	1545	0.0000
Error	15	66.7	4.45		
Total	19	27545.6			

Grand Mean	101.79	CV	2.07	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances				2.28	4	0.6844
Cochran's Q		0.3260				
Largest Var / Smallest Var	6.4320					
Component of variance for between groups	1716.32					
Effective cell size	4.0					

trt Mean

NaCl 0.2 M	137.90
NaCl 0.4 M	141.50
NaCl 0.8 M	113.10
NaCl 1.2 M	63.83
NaCl 1.6 M	52.60

Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	1.0543
Std Error (Diff of 2 Means)	1.4909

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

NaCl 0.2 M	141.50	A
NaCl 0.4 M	137.90	B
NaCl 0.8 M	113.10	C
NaCl 1.2 M	63.825	D
NaCl 1.6 M	52.600	E

Alpha	0.05	Standard Error for Comparison	1.4909
-------	------	-------------------------------	--------

Critical T Value 2.131 Critical Value for Comparison 3.1779

All 5 means are significantly different from one another.

ผลของความเค็มต่อการเจริญของ *B. megaterium* Ally

Completely Randomized AOV for phosphate

Source	DF	SS	MS	F	P
trt	4	19401.4	4850.35	436	0.0000
Error	15	167.0	11.13		
Total	19	19568.4			

Grand Mean	88.360	CV	3.78	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances				11.3	4	0.0238
Cochran's Q		0.7170				

Largest Var / Smallest Var 25.481

Component of variance for between groups 1209.80

Effective cell size 4.0

trt Mean

NaCl 0.2 M 119.80

NaCl 0.4 M 121.20

NaCl 0.8 M 97.20

NaCl 1.2 M 55.80

NaCl 1.6 M 47.80

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 1.6684

Std Error (Diff of 2 Means) 2.3595

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

NaCl 0.2 M 121.20 A

NaCl 0.4 M 119.80 A

NaCl 0.8 M 97.200 B

NaCl 1.2 M 55.800 C

NaCl 1.6 M 47.800 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.3595

Critical T Value 2.131 Critical Value for Comparison 5.0292

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

***B. megaterium* A12ag – *B. megaterium* Ally ⁴/₁ NaCl 0.2 M**

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

A12ag 137.90 A

Ally 119.80 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.1247

Critical T Value 2.447 Critical Value for Comparison 2.7521

All 2 means are significantly different from one another.

***B. megaterium* A12ag – *B. megaterium* Ally ⁴/₁ NaCl 0.4 M**

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

A12ag 141.50 A

Ally 121.20 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.0944

Critical T Value 2.447 Critical Value for Comparison 5.1249

All 2 means are significantly different from one another.

***B. megaterium* A12ag – Ally ⁴/₁ NaCl 0.8 M**

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

A12ag 113.10 A

Ally 97.200 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.3628

Critical T Value 2.447 Critical Value for Comparison 8.2284

All 2 means are significantly different from one another.

***B. megaterium* A12ag – *B. megaterium* Ally ⁴/₁ NaCl 1.2 M**

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

A12ag 63.825 A

Ally 55.800 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.3573

Critical T Value 2.447 Critical Value for Comparison 3.3212

All 2 means are significantly different from one another.

***B. megaterium* A12ag – *B. megaterium* Ally ที่ NaCl 1.6 M**

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

A12ag 52.600 A

Ally 47.800 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.8206

Critical T Value 2.447 Critical Value for Comparison 2.0079

All 2 means are significantly different from one another.

ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *B. megaterium* A12ag

Completely Randomized AOV for phosphate

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

trt	2	1824.88	912.438	545	0.0000
-----	---	---------	---------	-----	--------

Error	9	15.07	1.674		
-------	---	-------	-------	--	--

Total	11	1839.94			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean	136.18	CV	0.95	Chi-Sq	DF	P
------------	--------	----	------	--------	----	---

Bartlett's Test of Equal Variances				1.64	2	0.4407
------------------------------------	--	--	--	------	---	--------

Cochran's Q		0.6257				
-------------	--	--------	--	--	--	--

Largest Var / Smallest Var	4.8595					
----------------------------	--------	--	--	--	--	--

Component of variance for between groups	227.691					
--	---------	--	--	--	--	--

Effective cell size	4.0					
---------------------	-----	--	--	--	--	--

trt Mean

30 140.80

35 148.43

45 119.30

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.6469

Std Error (Diff of 2 Means) 0.9149

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

35 148.43 A
30 140.80 B
45 119.30 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.9149

Critical T Value 2.262 Critical Value for Comparison 2.0697

All 3 means are significantly different from one another.

ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *B. megaterium* Ally

Completely Randomized AOV for phosphate

Source	DF	SS	MS	F	P
trt	2	854.507	427.253	595	0.0000
Error	9	6.460	0.718		
Total	11	860.967			

Grand Mean 118.33 CV 0.72 Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances 0.54 2 0.7640

Cochran's Q 0.5046

Largest Var / Smallest Var 2.4328

Component of variance for between groups 106.634

Effective cell size 4.0

trt Mean

30 124.40
35 124.20
45 106.40

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.4236

Std Error (Diff of 2 Means) 0.5991

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

30 124.40 A
35 124.20 A
45 106.40 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5991

Critical T Value 2.262 Critical Value for Comparison 1.3552

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

***B. megaterium* A12ag – *B. megaterium* Ally ที่ อุณหภูมิ 30°C**

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

A12ag 140.80 A

Ally 124.40 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.6807

Critical T Value 2.447 Critical Value for Comparison 1.6656

All 2 means are significantly different from one another.

***B. megaterium* A12ag – *B. megaterium* Ally ที่ อุณหภูมิ 35°C**

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

A12ag 148.43 A

Ally 124.20 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.9473

Critical T Value 2.447 Critical Value for Comparison 2.3178

All 2 means are significantly different from one another.

***B. megaterium* A12ag – *B. megaterium* Ally ที่ อุณหภูมิ 45°C**

LSD All-Pairwise Comparisons Test of phosphate by trt

trt Mean Homogeneous Groups

A12ag 119.30 A

Ally 106.40 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.6583

Critical T Value 2.447 Critical Value for Comparison 1.6108

All 2 means are significantly different from one another.

2. ผลวิเคราะห์สถิติการรอดชีวิตของหัวเชื้อผสม

ผลการรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบน้ำ

ที่อุณหภูมิ 4°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	22.8807	5.72018	1108	0.0000
Error	10	0.0516	0.00516		
Total	14	22.9323			

Grand Mean	5.4236	CV	1.32	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances				7.31	4	0.1202
Cochran's Q		0.5492				
Largest Var / Smallest Var	168.69					
Component of variance for between groups	1.90501					
Effective cell size				3.0		

wk Mean

0	6.6737
1	6.7900
2	5.5460
3	4.5187
4	3.5897

Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.0415
Std Error (Diff of 2 Means)	0.0587

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

1	6.7900	A
0	6.6737	A
2	5.5460	B
3	4.5187	C
4	3.5897	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0587

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.1307

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 20°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	21.8436	5.46089	1302	0.0000
Error	10	0.0419	0.00419		
Total	14	21.8855			

Grand Mean 5.5077 CV 1.18

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

3.10 4 0.5412

Cochran's Q 0.3079

Largest Var / Smallest Var 21.076

Component of variance for between groups 1.81890

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7113

1 6.7783

2 5.7440

3 4.6463

4 3.6583

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0374

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0529

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

1 6.7783 A

0 6.7113 A

2 5.7440 B

3 4.6463 C

4 3.6583 D

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0529

Critical T Value 3.169 Critical Value for Comparison 0.1676

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Completely Randomized AOV for survival

ที่อุณหภูมิ 30°C

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	21.7066	5.42666	6486	0.0000
Error	10	0.0084	0.00084		
Total	14	21.7150			

Grand Mean 5.5130 CV 0.52 Chi-Sq DF P
Bartlett's Test of Equal Variances 3.08 4 0.5440
Cochran's Q 0.3588
Largest Var / Smallest Var 9.9404
Component of variance for between groups 1.80861
Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7370
1 6.7757
2 5.7123
3 4.6680
4 3.6720

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 0.0167
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0236

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

1 6.7757 A
0 6.7370 A
2 5.7123 B
3 4.6680 C
4 3.6720 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0236
Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.0526

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 40°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	30.6759	7.66897	6210	0.0000
Error	10	0.0123	0.00123		
Total	14	30.6882			

Grand Mean 5.3993 CV 0.65 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 2.91 4 0.5722
 Cochran's Q 0.3816
 Largest Var / Smallest Var 13.943
 Component of variance for between groups 2.55591
 Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.8277
 1 6.8407
 2 5.6990
 3 4.5197
 4 3.1093

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 0.0203
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0287

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

1 6.8407 A
 0 6.8277 A
 2 5.6990 B
 3 4.5197 C
 4 3.1093 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0287
 Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.0639

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Week 0 compare temperature

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

40 6.8277 A

30 6.7370 AB

20 6.7113 AB

4 6.6737 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0636

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.1466

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Week 1 compare temperature

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

40 6.8407 A

4 6.7900 A

20 6.7783 A

30 6.7757 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0313

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.0721

There are no significant pairwise differences among the means.

Week 2 compare temperature

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

20 5.7440 A

30 5.7123 A

40 5.6990 A

4 5.5460 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0340

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.0783

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Week 3 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 4.6680 A
20 4.6463 A
40 4.5197 B
4 4.5187 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0463

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.1068

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Week 4 compare temperature

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

30 3.6720 A
20 3.6583 AB
4 3.5897 B
40 3.1093 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0347

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.0799

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

การรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในขุยมะพร้าว

ที่อุณหภูมิ 4°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	22.3184	5.57961	223	0.0000
Error	10	0.2504	0.02504		
Total	14	22.5688			

Grand Mean 5.4203 CV 2.92

At least one group variance is near zero, variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 1.85152

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7610

1 6.6413

2 5.5440

3 4.5927

4 3.5627

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0914

Std Error (Diff of 2 Means) 0.1292

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk**wk Mean Homogeneous Groups**

0 6.7610 A

1 6.6413 A

2 5.5440 B

3 4.5927 C

4 3.5627 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1292

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.2879

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 20°C**Completely Randomized AOV for survival**

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	21.6489	5.41221	169	0.0000
Error	10	0.3197	0.03197		
Total	14	21.9686			

Grand Mean 5.4652 CV 3.27

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

9.06 4 0.0596

Cochran's Q 0.8022

Largest Var / Smallest Var 61.641

Component of variance for between groups 1.79341

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7100

1 6.7517

2 5.5890

3 4.6233

4 3.6520

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.1032

Std Error (Diff of 2 Means) 0.1460

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk**wk Mean Homogeneous Groups**

1 6.7517 A

0 6.7100 A

2 5.5890 B

3 4.6233 C

4 3.6520 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1460

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.3253

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 30°C**Completely Randomized AOV for survival**

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

wk	4	21.6593	5.41482	2975	0.0000
----	---	---------	---------	------	--------

Error	10	0.0182	0.00182		
-------	----	--------	---------	--	--

Total	14	21.6775			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean 5.5074 CV 0.77

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

3.79 4 0.4348

Cochran's Q 0.5349

Largest Var / Smallest Var 16.431

Component of variance for between groups 1.80433

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7390

1 6.7653

2 5.6973

3 4.6650

4 3.6703

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0246

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0348

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk**wk Mean Homogeneous Groups**

1 6.7653 A

0 6.7390 A

2 5.6973 B

3 4.6650 C

4 3.6703 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0348

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.0776

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 40°C**Completely Randomized AOV for survival**

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

wk	4	31.6312	7.90780	1085	0.0000
----	---	---------	---------	------	--------

Error	10	0.0729	0.00729		
-------	----	--------	---------	--	--

Total	14	31.7041			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean 5.3670 CV 1.59

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

4.76 4 0.3132

Cochran's Q 0.4491

Largest Var / Smallest Var 23.209

Component of variance for between groups 2.63350

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.8367

1 6.8327

2 5.6837

3 4.3920

4 3.0900

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0493

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0697

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

0 6.8367 A

1 6.8327 A

2 5.6837 B

3 4.3920 C

4 3.0900 D

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0697

Critical T Value 3.169 Critical Value for Comparison 0.2210

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Week 0 compare temperature

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

40 6.8367 A

4 6.7610 A

30 6.7390 A

20 6.7100 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0804

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.1853

There are no significant pairwise differences among the means.

Week 1 compare temperature

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

40 6.8327 A

30 6.7653 A

20 6.7517 A

4 6.6413 A

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.1335

Critical T Value 3.355 Critical Value for Comparison 0.4479

There are no significant pairwise differences among the means.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

40 6.8327 A

30 6.7653 A

20 6.7517 A

4 6.6413 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1335

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.3078

There are no significant pairwise differences among the means.

Week 2 compare temperature

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

30 5.6973 A

40 5.6837 A

20 5.5890 A

4 5.5440 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1477

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.3405

There are no significant pairwise differences among the means.

Week 3 compare temperature

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

30 4.6650 A

20 4.6233 A

4 4.5927 A

40 4.3920 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0846

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.1952

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Week 4 compare temperature

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

temp Mean Homogeneous Groups

30 3.6703 A

20 3.6520 AB

4 3.5627 B

40 3.0900 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0430

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.0992

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

การรอดชีวิตของหัวเชื้อแบบแห้งในขุยมะพร้าวที่ผ่านการล้าง

ที่อุณหภูมิ 4°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	26.1985	6.54963	648	0.0000
Error	10	0.1011	0.01011		
Total	14	26.2996			

Grand Mean 5.3118 CV 1.89

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

1.94 4 0.7468

Cochran's Q 0.4820

Largest Var / Smallest Var 6.8849

Component of variance for between groups 2.17984

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7477

1 6.6513

2 5.5357

3 4.2177

4 3.4067

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0580

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0821

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

0 6.7477 A

1 6.6513 A

2 5.5357 B

3 4.2177 C

4 3.4067 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0821

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.1829

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 20°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	24.7413	6.18534	3001	0.0000
Error	10	0.0206	0.00206		
Total	14	24.7620			

Grand Mean 5.4259 CV 0.84

Bartlett's Test of Equal Variances

Cochran's Q 0.3878

Chi-Sq	DF	P
1.39	4	0.8454

Largest Var / Smallest Var 4.5352

Component of variance for between groups 2.06109

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7390

1 6.7527

2 5.7123

3 4.4090

4 3.5163

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0262

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0371

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

1 6.7527 A

0 6.7390 A

2 5.7123 B

3 4.4090 C

4 3.5163 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0371

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.0826

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 30°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	23.1064	5.77660	82.6	0.0000
Error	10	0.6992	0.06992		
Total	14	23.8056			

Grand Mean 5.6376 CV 4.69

Bartlett's Test of Equal Variances

Cochran's Q 0.9966

Chi-Sq	DF	P
36.6	4	0.0000

Largest Var / Smallest Var 7519.9

Component of variance for between groups 1.90222

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.8207

1 6.8180

2 6.1610

3 4.6780

4 3.7103

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.1527

Std Error (Diff of 2 Means) 0.2159

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

0 6.8207 A

1 6.8180 A

2 6.1610 B

3 4.6780 C

4 3.7103 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2159

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.4811

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 40°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	28.6276	7.15691	2248	0.0000
Error	10	0.0318	0.00318		
Total	14	28.6595			

Grand Mean 5.3727 CV 1.05

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

2.85 4 0.5832

Cochran's Q 0.3591

Largest Var / Smallest Var 18.659

Component of variance for between groups 2.38457

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7957

1 6.7253

2 5.6580

3 4.5210

4 3.1633

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0326

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0461

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

0 6.7957 A

1 6.7253 A

2 5.6580 B

3 4.5210 C

4 3.1633 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0461

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.1026

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

Week 0 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 6.8207 A

40 6.7957 A

4 6.7477 A

20 6.7390 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0388

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.0894

There are no significant pairwise differences among the means.

Week 1 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 6.8180 A
20 6.7527 AB
40 6.7253 AB
4 6.6513 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0703

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.1620

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Week 2 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 6.1610 A
20 5.7123 AB
40 5.6580 AB
4 5.5357 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2468

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.5692

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Week 3 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 4.6780 A
40 4.5210 B
20 4.4090 C
4 4.2177 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0448

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.1033

All 4 means are significantly different from one another.

Week 4 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 3.7103 A
 20 3.5163 B
 4 3.4067 C
 40 3.1633 D
 Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0412
 Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.0951
 All 4 means are significantly different from one another.

ผลการรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมในขุยมะพร้าวที่ผ่านการล้างและเติม CaCO_3
 ที่อุณหภูมิ 4°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	26.4578	6.61444	1837	0.0000
Error	10	0.0360	0.00360		
Total	14	26.4938			

	Grand Mean	CV	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	5.3793	1.12	4.34	4	0.3624
Cochran's Q		0.5736			
Largest Var / Smallest Var		22.237			
Component of variance for between groups	2.20361				
Effective cell size		3.0			

wk Mean

0 6.8367
 1 6.7253
 2 5.5633
 3 4.3260
 4 3.4453

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 0.0346
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0490

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk	Mean	Homogeneous Groups
0	6.8367	A
1	6.7253	B

2 5.5633 C
 3 4.3260 D
 4 3.4453 E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0490

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.1092

All 5 means are significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 20°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	22.9144	5.72861	3517	0.0000
Error	10	0.0163	0.00163		
Total	14	22.9307			

Grand Mean 5.4639 CV 0.74

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

2.60 4 0.6272

Cochran's Q 0.4520

Largest Var / Smallest Var 11.361

Component of variance for between groups 1.90899

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7440
 1 6.7780
 2 5.6183
 3 4.5753
 4 3.6040

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0233

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0330

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

1 6.7780 A
 0 6.7440 A
 2 5.6183 B
 3 4.5753 C

4 3.6040 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0330

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.0734

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 30°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	22.8180	5.70450	89.2	0.0000
Error	10	0.6394	0.06394		
Total	14	23.4574			

Grand Mean 5.6426 CV 4.48

Chi-Sq	DF	P
29.5	4	0.0000

Bartlett's Test of Equal Variances

Cochran's Q 0.9882

Largest Var / Smallest Var 2582.6

Component of variance for between groups 1.88019

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.8090

1 6.8347

2 6.1470

3 4.6970

4 3.7253

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.1460

Std Error (Diff of 2 Means) 0.2065

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

1 6.8347 A

0 6.8090 A

2 6.1470 B

3 4.6970 C

4 3.7253 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2065

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.4600

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ที่อุณหภูมิ 40°C

Completely Randomized AOV for survival

Source	DF	SS	MS	F	P
wk	4	28.6199	7.15498	2591	0.0000
Error	10	0.0276	0.00276		
Total	14	28.6475			

Grand Mean 5.3487 CV 0.98

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

1.04 4 0.9034

Cochran's Q 0.3209

Largest Var / Smallest Var 4.0380

Component of variance for between groups 2.38407

Effective cell size 3.0

wk Mean

0 6.7317

1 6.6737

2 5.7410

3 4.4737

4 3.1233

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0303

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0429

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by wk

wk Mean Homogeneous Groups

0 6.7317 A

1 6.6737 A

2 5.7410 B

3 4.4737 C

4 3.1233 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0429

Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.0956

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of survival by temp

Week 0 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

4 6.8367 A

30 6.8090 A

20 6.7440 A

40 6.7317 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0539

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.1244

There are no significant pairwise differences among the means.

Week 1 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 6.8347 A

20 6.7780 AB

4 6.7253 BC

40 6.6737 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0329

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.0758

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Week 2 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 6.1470 A

40 5.7410 AB

20 5.6183 AB

4 5.5633 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2321

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.5351

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Week 3 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 4.6970 A
20 4.5753 B
40 4.4737 C
4 4.3260 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0372

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.0859

All 4 means are significantly different from one another.

Week 4 compare temperature

temp Mean Homogeneous Groups

30 3.7253 A
20 3.6040 B
4 3.4453 C
40 3.1233 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0267

Critical T Value 2.306 Critical Value for Comparison 0.0615

All 4 means are significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์สถิติการรอดชีวิตของหัวเชื้อผสมแบบแห้งในชานอ้อย

หัวเชื้อผสมแบบแห้งในชานอ้อย ที่ สัปดาห์ 0 (4 และ 30°C)

Completely Randomized AOV for W0

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	1	2.017E-05	2.017E-05	0.58	0.4881
Error	4	1.387E-04	3.467E-05		
Total	5	1.588E-04			

Grand Mean 9.1278 CV 0.06

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

0.06 1 0.8060

Cochran's Q 0.5962

Largest Var / Smallest Var 1.4762
 Component of variance for between groups -4.833E-06
 Effective cell size 3.0

Trt Mean

1 9.1260
 2 9.1297

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 3.399E-03
 Std Error (Diff of 2 Means) 4.807E-03

LSD All-Pairwise Comparisons Test of W0 by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

2 9.1297 A
 1 9.1260 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.807E-03
 Critical T Value 2.776 Critical Value for Comparison 0.0133
 There are no significant pairwise differences among the means.

หัวเชื้อผสมแบบแห้ง ชานอ้อย ที่ สัปดาห์ 1 (4 และ 30°C)

Completely Randomized AOV for W1

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	1	2.407E-04	2.407E-04	5.25	0.0837
Error	4	1.833E-04	4.583E-05		
Total	5	4.240E-04			

	Grand Mean	CV	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	9.1280	0.07	1.61	1	0.2046
Cochran's Q		0.8982			

Largest Var / Smallest Var 8.8214
 Component of variance for between groups 6.494E-05
 Effective cell size 3.0

Trt Mean

1 9.1217
 2 9.1343

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 3.909E-03

Std Error (Diff of 2 Means) 5.528E-03

LSD All-Pairwise Comparisons Test of W1 by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

2 9.1343 A

1 9.1217 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 5.528E-03

Critical T Value 2.776 Critical Value for Comparison 0.0153

There are no significant pairwise differences among the means.

หัวข้อผสมแบบแห้ง ชานอ้อย ที่ สัปดาห์ 2 (4 และ 30°C)

Completely Randomized AOV for W2

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Trt	1	1.667E-05	1.667E-05	0.46	0.5354
-----	---	-----------	-----------	------	--------

Error	4	1.453E-04	3.633E-05		
-------	---	-----------	-----------	--	--

Total	5	1.620E-04			
-------	---	-----------	--	--	--

Grand Mean 9.1260 CV 0.07

Chi-Sq	DF	P
--------	----	---

Bartlett's Test of Equal Variances

0.58	1	0.4473
------	---	--------

Cochran's Q 0.7752

Largest Var / Smallest Var 3.4490

Component of variance for between groups -6.556E-06

Effective cell size 3.0

Trt Mean

1 9.1243

2 9.1277

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 3.480E-03

Std Error (Diff of 2 Means) 4.922E-03

LSD All-Pairwise Comparisons Test of W2 by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

2 9.1277 A

1 9.1243 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.922E-03

Critical T Value 2.776 Critical Value for Comparison 0.0137

There are no significant pairwise differences among the means.

หัวเชื้อผสมแบบแห้ง ชานอ้อย ที่ สัปดาห์ 3 (4 และ 30°C)

Completely Randomized AOV for W3

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	1	8.167E-06	8.167E-06	0.21	0.6677
Error	4	1.527E-04	3.817E-05		
Total	5	1.608E-04			
Grand Mean	9.1268	CV 0.07		Chi-Sq	DF P
Bartlett's Test of Equal Variances				0.03	1 0.8722
Cochran's Q		0.5633			
Largest Var / Smallest Var		1.2900			
Component of variance for between groups		-1.000E-05			
Effective cell size			3.0		

Trt Mean

1 9.1280

2 9.1257

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 3.567E-03

Std Error (Diff of 2 Means) 5.044E-03

LSD All-Pairwise Comparisons Test of W3 by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

1 9.1280 A

2 9.1257 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 5.044E-03

Critical T Value 2.776 Critical Value for Comparison 0.0140

There are no significant pairwise differences among the means.

หัวเชื้อผสมแบบแห้ง ชานอ้อย ที่ สัปดาห์ 4 (4 และ 30°C)

Completely Randomized AOV for W4

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	1	6.017E-05	6.017E-05	1.08	0.3572
Error	4	2.227E-04	5.567E-05		
Total	5	2.828E-04			
Grand Mean	9.1292	CV 0.08		Chi-Sq	DF P
Bartlett's Test of Equal Variances				0.07	1 0.7947

Cochran's Q 0.6018
 Largest Var / Smallest Var 1.5113
 Component of variance for between groups 1.500E-06
 Effective cell size 3.0

Trt Mean

1 9.1323
 2 9.1260

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 4.308E-03
 Std Error (Diff of 2 Means) 6.092E-03

LSD All-Pairwise Comparisons Test of W4 by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

1 9.1323 A
 2 9.1260 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 6.092E-03
 Critical T Value 2.776 Critical Value for Comparison 0.0169
 There are no significant pairwise differences among the means.

**3. ผลวิเคราะห์สถิติของพืชที่ปลูกในสภาพห้องปฏิบัติการ
 ผลวิเคราะห์สถิติเปอร์เซ็นต์การงอกในสภาพห้องปฏิบัติการ**

LSD All-Pairwise Comparisons Test of ger1 for main

main Mean Homogeneous Groups

2 58.700 A
 1 48.950 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.7141
 Critical T Value 3.182 Critical Value for Comparison 2.2727
 Error term used: rep*main, 3 DF

All 2 means are significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of ger1 for sub

sub Mean Homogeneous Groups

1 96.125 A
 2 92.625 B
 3 50.500 C
 4 19.875 D

5 10.000 E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.8938

Critical T Value 2.064 Critical Value for Comparison 1.8448

Error term used: rep*main*sub, 24 DF

All 5 means are significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of ger1 for main*sub

main sub Mean Homogeneous Groups

2 1 96.250 A

1 1 96.000 A

2 2 94.750 A

1 2 90.500 B

2 3 64.250 C

1 3 36.750 D

2 4 23.500 E

1 4 16.250 F

2 5 14.750 F

1 5 5.250 G

Comparisons of means for the same level of main

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.2641

Critical T Value 2.064 Critical Value for Comparison 2.6089

Error term used: rep*main*sub, 24 DF

Comparisons of means for different levels of main

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.3373

Critical T Value 2.383 Critical Value for Comparison 3.1866

Error terms used: rep*main and rep*main*sub

There are 7 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์สถิติดัชนีการรอกในสภาพห้องปฏิบัติการ

LSD All-Pairwise Comparisons Test of in_g1 for main

main Mean Homogeneous Groups

2 11.603 A

1 8.647 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0590
 Critical T Value 3.182 Critical Value for Comparison 0.1878
 Error term used: rep*main, 3 DF
 All 2 means are significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of in_g1 for sub

sub Mean Homogeneous Groups

1 25.400 A
 2 14.093 B
 3 6.654 C
 4 3.790 D
 5 0.686 E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1322
 Critical T Value 2.064 Critical Value for Comparison 0.2728
 Error term used: rep*main*sub, 24 DF
 All 5 means are significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of in_g1 for main*sub

main sub Mean Homogeneous Groups

2 1 25.808 A
 1 1 24.992 B
 2 2 16.597 C
 1 2 11.589 D
 2 3 7.862 E
 2 4 6.502 F
 1 3 5.446 G
 2 5 1.246 H
 1 4 1.079 H
 1 5 0.127 I

Comparisons of means for the same level of main

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1869
 Critical T Value 2.064 Critical Value for Comparison 0.3858
 Error term used: rep*main*sub, 24 DF
 Comparisons of means for different levels of main

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1773

Critical T Value 2.188 Critical Value for Comparison 0.3879

Error terms used: rep*main and rep*main*sub

There are 9 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์สถิติความยาวรากของต้นกล้าในสภาพห้องปฏิบัติการ

LSD All-Pairwise Comparisons Test of root for main

main Mean Homogeneous Groups

2 7.4200 A

1 5.5950 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5131

Critical T Value 3.182 Critical Value for Comparison 1.6328

Error term used: rep*main, 3 DF

All 2 means are significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of root for sub

sub Mean Homogeneous Groups

1 8.4000 A

2 8.1000 A

3 6.4375 B

4 5.0750 C

5 4.5250 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.4818

Critical T Value 2.064 Critical Value for Comparison 0.9943

Error term used: rep*main*sub, 24 DF

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of root for main*sub

main sub Mean Homogeneous Groups

2 2 8.7750 A

2 1 8.6250 A

1 1 8.1750 A

2	3	7.5750	A
1	2	7.4250	AB
2	5	6.1000	BC
2	4	6.0250	BC
1	3	5.3000	C
1	4	4.1250	CD
1	5	2.9500	D

Comparisons of means for the same level of main

Alpha	0.05	Standard Error for Comparison	0.6813
Critical T Value	2.064	Critical Value for Comparison	1.4062
Error term used: rep*main*sub, 24 DF			

Comparisons of means for different levels of main

Alpha	0.05	Standard Error for Comparison	0.7966
Critical T Value	2.528	Critical Value for Comparison	2.0137
Error terms used: rep*main and rep*main*sub			

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์สถิติน้ำหนักแห้งของต้นกล้าในสภาพห้องปฏิบัติการ

LSD All-Pairwise Comparisons Test of dw1 for main

main Mean Homogeneous Groups

2	0.2260	A
1	0.1447	B

Alpha	0.01	Standard Error for Comparison	5.252E-03
Critical T Value	5.841	Critical Value for Comparison	0.0307
Error term used: rep*main, 3 DF			

All 2 means are significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of dw1 for sub

sub Mean Homogeneous Groups

2	0.2872	A
1	0.2740	A
3	0.2266	B
4	0.1037	C

5 0.0352 D

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 7.958E-03

Critical T Value 2.797 Critical Value for Comparison 0.0223

Error term used: rep*main*sub, 24 DF

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of dw1 for main*sub

main sub Mean Homogeneous Groups

2 1 0.3418 A

2 2 0.3374 A

2 3 0.2625 B

1 2 0.2370 BC

1 1 0.2062 CD

1 3 0.1906 D

2 4 0.1365 E

1 4 0.0709 F

2 5 0.0517 FG

1 5 0.0186 G

Comparisons of means for the same level of main

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0113

Critical T Value 2.797 Critical Value for Comparison 0.0315

Error term used: rep*main*sub, 24 DF

Comparisons of means for different levels of main

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0114

Critical T Value 3.448 Critical Value for Comparison 0.0392

Error terms used: rep*main and rep*main*sub

There are 7 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

4. ผลวิเคราะห์สถิติการเจริญเติบโตของพืชอายุ 30 วัน ที่ปลูกในสภาพเรือนเพาะชำ

ผลวิเคราะห์น้ำหนักรากสด 30 วัน

Completely Randomized AOV for Fresh

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	0.83983	0.16797	4.71	0.0063
Error	18	0.64215	0.03567		
Total	23	1.48198			

Grand Mean	0.3638	CV	51.92	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances				50.4	5	0.0000

Cochran's Q 0.5834

Largest Var / Smallest Var 1.873E+07

Component of variance for between groups 0.03307

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1	0.3308
2	0.2858
3	0.4558
4	0.7135
5	0.1053
6	0.2917

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.0944

Std Error (Diff of 2 Means) 0.1336

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Fresh by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4	0.7135	A
3	0.4558	AB
1	0.3308	BC
6	0.2917	BC
2	0.2858	BC
5	0.1053	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1336

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 0.2806

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์น้ำหนักร้าง 30 วัน

Completely Randomized AOV for Dry

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	0.00526	0.00105	5.50	0.0030
Error	18	0.00345	0.00019		
Total	23	0.00871			

Grand Mean 0.0248 CV 55.86

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

34.0 5 0.0000

Cochran's Q 0.4735

Largest Var / Smallest Var 81597

Component of variance for between groups 2.153E-04

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 0.0276

2 0.0170

3 0.0308

4 0.0514

5 0.0032

6 0.0187

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 6.918E-03

Std Error (Diff of 2 Means) 9.784E-03

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Dry by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4 0.0514 A

3 0.0308 AB

1 0.0276 B

6 0.0187 BC

2 0.0170 BC

5 3.20E-03 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 9.784E-03

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 0.0206

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์ความสูงของต้นกล้าอายุ 30 วัน

Completely Randomized AOV for Height

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	180.197	36.0394	26.1	0.0000
Error	18	24.843	1.3801		
Total	23	205.040			

Grand Mean 7.6542 CV 15.35

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

17.0 5 0.0046

Cochran's Q 0.3711

Largest Var / Smallest Var 461.00

Component of variance for between groups 8.66482

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 8.225

2 6.725

3 7.300

4 12.975

5 3.800

6 6.900

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.5874

Std Error (Diff of 2 Means) 0.8307

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Height by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4 12.975 A

1 8.2250 B

3 7.3000 B

6 6.9000 B

2 6.7250 B

5 3.8000 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.8307

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 1.7452

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นกล้าอายุ 30 วัน

Completely Randomized AOV for chloro

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Trt	5	24.291	4.8581	0.48	0.7838
-----	---	--------	--------	------	--------

Error	18	180.748	10.0415		
-------	----	---------	---------	--	--

Total	23	205.038			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean 28.353 CV 11.18

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances 48.9 5 0.0000

Cochran's Q 0.4623

Largest Var / Smallest Var 4.178E+07

Component of variance for between groups -1.29586

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 27.967

2 27.108

3 27.292

4 28.963

5 28.800

6 29.989

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 1.5844

Std Error (Diff of 2 Means) 2.2407

LSD All-Pairwise Comparisons Test of chloro by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

6 29.989 A

4 28.963 A

5 28.800 A

1 27.967 A

3 27.292 A

2 27.108 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.2407

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 4.7076

There are no significant pairwise differences among the means.

5. ผลวิเคราะห์สถิติการเจริญเติบโตของพืชอายุ 60 วัน ที่ปลูกในสภาพเรือนเพาะชำ

ผลวิเคราะห์น้ำหนักสด 60 วัน

Completely Randomized AOV for Fresh

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	55.579	11.1159	3.67	0.0182
Error	18	54.465	3.0258		
Total	23	110.044			

Grand Mean 2.4643 CV 70.59

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

64.5 5 0.0000

Cochran's Q 0.5148

Largest Var / Smallest Var 1.402E+09

Component of variance for between groups 2.02251

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 2.7034

2 2.1689

3 3.2259

4 5.1733

5 0.7978

6 0.7166

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.8697

Std Error (Diff of 2 Means) 1.2300

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Fresh by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4 5.1733 A

3 3.2259 AB

1 2.7034 AB

2 2.1689 B

5 0.7978 B

6 0.7166 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.2300

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 2.5841

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์น้ำหนักรากแห้ง 60 วัน

Completely Randomized AOV for Dry

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	0.53230	0.10646	3.08	0.0352
Error	18	0.62276	0.03460		
Total	23	1.15506			

Grand Mean 0.2536 CV 73.34

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

56.9 5 0.0000

Cochran's Q 0.4937

Largest Var / Smallest Var 1.537E+07

Component of variance for between groups 0.01797

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 0.2791

2 0.2057

3 0.3655

4 0.5004

5 0.0967

6 0.0745

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.0930

Std Error (Diff of 2 Means) 0.1315

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Dry by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4 0.5004 A

3 0.3655 AB
 1 0.2791 ABC
 2 0.2057 BC
 5 0.0967 BC
 6 0.0745 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1315

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 0.2763

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์ความสูงของต้นกล้าอายุ 30 วัน

Completely Randomized AOV for Height

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	856.35	171.270	17.7	0.0000
Error	18	173.70	9.650		
Total	23	1030.06			

Grand Mean 14.990 CV 20.72

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

20.4 5 0.0011

Cochran's Q 0.4940

Largest Var / Smallest Var 4290.2

Component of variance for between groups 40.4050

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 11.075
 2 13.650
 3 17.550
 4 26.867
 5 12.300
 6 8.500

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 1.5532

Std Error (Diff of 2 Means) 2.1966

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Height by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4	26.867	A
3	17.550	B
2	13.650	BC
5	12.300	CD
1	11.075	CD
6	8.5000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.1966

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 4.6149

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นกล้าอายุ 60 วัน

Completely Randomized AOV for Chlorophyll

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	515.535	103.107	80.5	0.0000
Error	18	23.068	1.282		
Total	23	538.603			

Grand Mean 25.405 CV 4.46

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

24.4 5 0.0002

Cochran's Q 0.7965

Largest Var / Smallest Var 918.72

Component of variance for between groups 25.4563

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1	28.558
2	17.500
3	28.183
4	31.117
5	21.400
6	25.671

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.5660

Std Error (Diff of 2 Means) 0.8005

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Chlorophyll by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4	31.117	A
1	28.558	B
3	28.183	B
6	25.671	C
5	21.400	D
2	17.500	E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.8005

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 1.6818

There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ผลวิเคราะห์พื้นที่ใบของต้นกล้าอายุ 60 วัน

Completely Randomized AOV for Leaf

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	1.214E+09	2.429E+08	1289	0.0000
Error	18	3391056	188392		
Total	23	1.218E+09			

Grand Mean	20602	CV 2.11	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances			31.7	5	0.0000
Cochran's Q		0.3375			
Largest Var / Smallest Var		572284			

Component of variance for between groups 6.067E+07

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1	22680
2	27473
3	19712
4	30140
5	10153
6	13453

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 217.02

Std Error (Diff of 2 Means) 306.91

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Leaf by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4	30140	A
2	27473	B
1	22680	C
3	19712	D
6	13453	E
5	10153	F

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 306.91

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 644.80

All 6 means are significantly different from one another.

6. ผลวิเคราะห์สถิติธาตุอาหารของพืชอายุ 60 วัน ที่ปลูกในภาพเรือนเพาะชำ

P วิเคราะห์พืช

Completely Randomized AOV for P

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	0.10217	0.02043	6.60	0.0012
Error	18	0.05573	0.00310		
Total	23	0.15790			

Grand Mean 0.2179 CV 25.53

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

7.17 5 0.2082

Cochran's Q 0.3926

Largest Var / Smallest Var 48.611

Component of variance for between groups 0.00433

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1	0.1175
2	0.1850
3	0.2850
4	0.3125
5	0.1875
6	0.2200

Observations per Mean 4
 Standard Error of a Mean 0.0278
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0393

LSD All-Pairwise Comparisons Test of P by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4 0.3125 A
 3 0.2850 AB
 6 0.2200 BC
 5 0.1875 CD
 2 0.1850 CD
 1 0.1175 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0393

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 0.0827

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

K วิเคราะห์พีช

Completely Randomized AOV for K

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	7.9006	1.58013	7.44	0.0006
Error	18	3.8239	0.21244		
Total	23	11.7245			

Grand Mean 2.6467 CV 17.41

Chi-Sq	DF	P
34.6	5	0.0000

Bartlett's Test of Equal Variances

Cochran's Q 0.7000

Largest Var / Smallest Var 13384

Component of variance for between groups 0.34192

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 2.3225
 2 1.6500
 3 3.2425
 4 2.7325
 5 3.3600

6 2.5725

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.2305

Std Error (Diff of 2 Means) 0.3259

LSD All-Pairwise Comparisons Test of K by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

5 3.3600 A

3 3.2425 AB

4 2.7325 ABC

6 2.5725 BC

1 2.3225 CD

2 1.6500 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3259

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 0.6847

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

7. ผลวิเคราะห์สถิติของดิน

วิเคราะห์ pH ของ ดิน

Completely Randomized AOV for pH

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Trt	5	2.30508	0.46102	3.09	0.0345
-----	---	---------	---------	------	--------

Error	18	2.68170	0.14898		
-------	----	---------	---------	--	--

Total	23	4.98678			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean 6.2058 CV 6.22

Chi-Sq	DF	P
--------	----	---

Bartlett's Test of Equal Variances

13.0	5	0.0236
------	---	--------

Cochran's Q 0.6439

Largest Var / Smallest Var 86.335

Component of variance for between groups 0.07801

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 6.5050

2 6.5000

3 5.8000

4 5.7650

5 6.4000

6 6.2650

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.1930

Std Error (Diff of 2 Means) 0.2729

LSD All-Pairwise Comparisons Test of pH by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

1 6.5050 A

2 6.5000 A

5 6.4000 A

6 6.2650 AB

3 5.8000 B

4 5.7650 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2729

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 0.5734

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

วิเคราะห์ดิน organic matter

Completely Randomized AOV for OM

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Trt	5	0.30916	0.06183	10.0	0.0001
-----	---	---------	---------	------	--------

Error	18	0.11122	0.00618		
-------	----	---------	---------	--	--

Total	23	0.42037			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean 0.5353 CV 14.69

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

21.5 5 0.0007

Cochran's Q 0.7685

Largest Var / Smallest Var 427.37

Component of variance for between groups 0.01391

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 0.6025

2 0.7200

3 0.4300

4 0.4365

5 0.4200

6 0.6025

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.0393

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0556

LSD All-Pairwise Comparisons Test of OM by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

2 0.7200 A

1 0.6025 B

6 0.6025 B

4 0.4365 C

3 0.4300 C

5 0.4200 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0556

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 0.1168

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

วิเคราะห์ดิน Total N

Completely Randomized AOV for Total N

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Trt	5	0.09415	0.01883	3.40	0.0244
-----	---	---------	---------	------	--------

Error	18	0.09962	0.00553		
-------	----	---------	---------	--	--

Total	23	0.19377			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean 0.0530 CV 140.25

At least one group variance is near zero, variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 0.00332

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 0.0325

2 0.1925

3 0.0200

4 0.0200
 5 0.0200
 6 0.0333
 Observations per Mean 4
 Standard Error of a Mean 0.0372
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0526

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Total N by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

2 0.1925 A
 6 0.0333 B
 1 0.0325 B
 3 0.0200 B
 4 0.0200 B
 5 0.0200 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0526

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 0.1105

There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

วิเคราะห์ดิน P

Completely Randomized AOV for P

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	7194.66	1438.93	114	0.0000
Error	18	226.45	12.58		
Total	23	7421.12			

Grand Mean 27.728 CV 12.79

Bartlett's Test of Equal Variances

Cochran's Q 0.4804

Largest Var / Smallest Var 51.317

Component of variance for between groups 356.588

Effective cell size 4.0

Chi-Sq	DF	P
17.6	5	0.0035

Trt Mean

1 6.450
 2 30.587
 3 9.418
 4 52.583
 5 46.200
 6 21.133

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 1.7735

Std Error (Diff of 2 Means) 2.5081

LSD All-Pairwise Comparisons Test of P by Trt**Trt Mean Homogeneous Groups**

4 52.582 A
 5 46.200 B
 2 30.588 C
 6 21.133 D
 3 9.4175 E
 1 6.4500 E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.5081

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 5.2692

There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

วิเคราะห์ดิน K**Completely Randomized AOV for K**

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	946.55	189.310	4.92	0.0052
Error	18	693.17	38.509		
Total	23	1639.72			

Grand Mean 43.221 CV 14.36

Bartlett's Test of Equal Variances

Cochran's Q 0.4454

Largest Var / Smallest Var 154.38

Component of variance for between groups 37.7003

Chi-Sq	DF	P
18.1	5	0.0028

Effective cell size 4.0

Trt Mean

1 35.250
2 51.250
3 42.500
4 43.000
5 51.000
6 36.325

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 3.1028

Std Error (Diff of 2 Means) 4.3880

LSD All-Pairwise Comparisons Test of K by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

2 51.250 A
5 51.000 A
4 43.000 AB
3 42.500 AB
6 36.325 B
1 35.250 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.3880

Critical T Value 2.101 Critical Value for Comparison 9.2189

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

วิเคราะห์ดินปริมาณจุลินทรีย์ (Log CFU/g of dry soil)

จุลินทรีย์ดิน สัปดาห์ที่ 2

Completely Randomized AOV for wk2

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	0.08124	0.01625	0.89	0.5168
Error	12	0.21877	0.01823		
Total	17	0.30001			

Grand Mean 6.0192 CV 2.24

Bartlett's Test of Equal Variances

Cochran's Q 0.5825

Chi-Sq DF P

5.71 5 0.3354

Largest Var / Smallest Var 21.787

Component of variance for between groups -6.609E-04

Effective cell size 3.0

Trt Mean

1 6.0683
2 6.0352
3 5.9040
4 6.1187
5 5.9994
6 5.9899

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0780

Std Error (Diff of 2 Means) 0.1102

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of wk2 by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4 6.1187 A
1 6.0683 A
2 6.0352 A
5 5.9994 A
6 5.9899 A
3 5.9040 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1102

Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 0.3704

There are no significant pairwise differences among the means.

จุลินทรีย์ดิน สัปดาห์ที่ 4

Completely Randomized AOV for wk4

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	1.27735	0.25547	96.9	0.0000
Error	12	0.03163	0.00264		
Total	17	1.30898			

Grand Mean 6.7408 CV 0.76

Bartlett's Test of Equal Variances

Cochran's Q 0.8177

Chi-Sq	DF	P
26.1	5	0.0001

Largest Var / Smallest Var 10645
 Component of variance for between groups 0.08428
 Effective cell size 3.0

Trt Mean

1 6.9594
 2 6.9860
 3 6.4604
 4 7.0528
 5 6.3949
 6 6.5914

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 0.0296
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0419

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of wk4 by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4 7.0528 A
 2 6.9860 A
 1 6.9594 A
 6 6.5914 B
 3 6.4604 BC
 5 6.3949 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0419
 Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 0.1408

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

จุลินทรีย์ดิน สัปดาห์ที่ 6

Completely Randomized AOV for wk6

Source	DF	SS	MS	F	P
Trt	5	1.04224	0.20845	108	0.0000
Error	12	0.02316	0.00193		
Total	17	1.06540			
Grand Mean	6.7868	CV 0.65			

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances 21.5 5 0.0007

Cochran's Q 0.8762

Largest Var / Smallest Var 1611.2

Component of variance for between groups 0.06884

Effective cell size 3.0

Trt Mean

1 6.9785

2 6.9940

3 6.5568

4 7.0884

5 6.4705

6 6.6325

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0254

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0359

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of wk6 by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4 7.0884 A

2 6.9940 A

1 6.9785 A

6 6.6325 B

3 6.5568 BC

5 6.4705 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0359

Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 0.1205

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

จุลินทรีย์ดิน สัปดาห์ที่ 8

Completely Randomized AOV for wk8

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Trt	5	1.09745	0.21949	118	0.0000
-----	---	---------	---------	-----	--------

Error	12	0.02224	0.00185		
-------	----	---------	---------	--	--

Total 17 1.11969

Grand Mean 6.7872 CV 0.63

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances

19.4 5 0.0016

Cochran's Q 0.8997

Largest Var / Smallest Var 348.12

Component of variance for between groups 0.07255

Effective cell size 3.0

Trt Mean

1 6.9902

2 7.0000

3 6.5440

4 7.0959

5 6.4790

6 6.6144

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0249

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0352

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of wk8 by Trt

Trt Mean Homogeneous Groups

4 7.0959 A

2 7.0000 A

1 6.9902 A

6 6.6144 B

3 6.5440 BC

5 6.4790 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0352

Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 0.1181

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ภาคผนวก จ
ภาพประกอบจากการวิจัย



ภาพผนวก จ-1 แสดงการศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศที่ระดับความเค็มต่าง ๆ ในสภาพห้องปฏิบัติการ



ภาพผนวก จ-2 การเก็บตัวอย่างดินเค็มที่อ่างเก็บน้ำหนองบ่อ อ. บรบือ จ. มหาสารคาม



ภาพผนวก จ-3 แสดงการศึกษาผลของหัวเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาพ
เรือนเพาะชำในบางกรรมวิธีทดลอง

ภาคผนวก จ
Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ กำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ ทั้งนี้ได้จัดทำ manuscript สำหรับการตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Sustainable Agriculture เสร็จสิ้นแล้ว ดังนี้

**Screening of Efficient Salt-tolerant Phosphate Solubilizing Bacterium
and Its effect on Promoting Plant Growth
Under Saline Conditions**

Kannika Chookietwattana

Kedsukon Maneewan

Banyong Toomsan

ABSTRACT. Eighty-four halotolerant bacterial strains were used to screen for the efficient salt-tolerant phosphate solubilizing bacterium (PSB). They were selected mainly on the basis of the ability to solubilize the insoluble phosphate in the modified Pikovskaya broth under various salt concentrations and temperature. A *Bacillus megaterium* A12ag was selected as the efficient salt-tolerant PSB because it demonstrated the highest soluble phosphate solubilization activity under saline conditions. The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Seeda) seeds inoculated with the bacterium significantly increased the germination percentage, germination index, root length and seedling dry weight. The results suggested that the salt-tolerant PSB may be used to alleviate the effects of salts and provide great potential for use as biofertilizer in the arid and salt affected areas.

KEYWORDS. phosphate solubilizing bacteria; salt-tolerant bacteria; plant growth-promoting bacteria

Kannika Chookietwattana (karb90@yahoo.com) and Kedsukon Maneewan (kedsukon.m@msu.ac.th) are affiliated with Mahasarakham University, Faculty of Technology, Department of Biotechnology, Mahasarakham, Thailand.

Banyong Toomsan (banyang@kku.ac.th) is affiliated with Khon Kaen University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Science and Agricultural Resources, Khon Kaen, Thailand.

Address correspondence to: Kannika Chookietwattana at the above address.

INTRODUCTION

Saline soil is distributed throughout the world especially in the arid and semiarid regions where agriculture performs under irrigation (Pessarakli and Szabolcs, 2000). The phosphorus deficiency frequently compounds the problems of saline soil of the tropics (Landon, 1991). High salinity affects plant growth through (i) the osmotic effects; (ii) toxicity of salt ions; and (iii) the changes in the physical and chemical properties of soil (Keren, 2000). It also suppresses the phosphorus uptake by plant roots and reduces the available phosphorus by sorption processes and low solubility of the Ca-P minerals (Grattan & Grieve, 1999). Since phosphorus is a critical nutrient limiting plant growth (Sharpley, 2000), the adverse effects on plant growth in saline soil are multiplied. Consequently, the yields and profits of agricultural productions in saline soil are reduced drastically (Keren, 2000). In this respect, the use of chemical fertilizers is the most common approach to improve soil fertility. However, the available phosphorus in the chemical fertilizers is rapidly fixed to the unavailable forms (Yadav & Dadarwal, 1997) and accounts for low phosphorus use efficiency. Phosphate solubilizing bacteria (PSB) are known to improve the solubilization of fixed soil phosphorus by the production of organic acids and acid phosphatases, and result in increased of crop yields (Rodríguez & Fraga, 1999). The PSB-based biofertilizers appear more effective choice than the chemical fertilizers in maintaining the high available phosphorus and are also friendly to the environment. The accomplishments of PSB in promoting plant growth were documented elsewhere (Datta, et al. 1982 ; Kim et al., 1998 ; Wahid & Mehana, 2000 ; Rojas et al. 2001 ; Egamberdiyeva & Höflich, 2004).

Key factors for the successful applications of microbial inoculants are their abilities to survive, outcompete with the often well adapted native microflora, and colonize in the rhizosphere (Bashan, 1998). High salinity appears to influence the phosphate solubilizing

activity of PSB (Yahya and Al-Azawi, 1989 ; Son et al., 2006). The PSB with stress-tolerant properties, in the same manner as the stress conditions to be applied, could exhibit greater phosphate solubilizing activity than the PSB without stressed-tolerant properties. Stress-tolerant PSB, due to their establishment and performance, are less affected by stress conditions. Bacterial strains which were isolated from alkaline soils (salt content about 2% (w/v) and pH as high as 10.5) showed the high potential in the solubilization of insoluble phosphates at high salt and high pH (Johri et al., 1999 ; Nautiyal et al., 2000). Thus, screening for the salt-tolerant PSB is a crucial prerequisite step to seeking efficient bacterial strains to use as plant growth promoter in saline soil. In addition, there are extremely few research data indicating the outcomes of salt-tolerant PSB that applied to increased crop yields in saline soil. Therefore, the aims of this study were (i) to screen for the efficient salt-tolerant phosphate solubilizing bacterium which can solubilize the insoluble phosphate in the wide ranges of salinity and temperature; and (ii) to evaluate its effects on tomato plants grown *in vitro* and under saline conditions.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and Culture Conditions

Eighty-four salt-tolerant bacterial strains used in the experiment were obtained from the previous work (Chookietwattana, 2003). For inoculum preparation, bacterial strains were individually cultured at 30°C for 24 h on halobacteria medium which contained the following ingredients per liter: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10.0 g; casein hydrolysate 5.0 g; KCl, 5.0 g; disodium citrate 3.0 g; KNO_3 1.0 g; yeast extract 1.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; NaCl 0.6 M; and agar 15.0 g. Bacterial cells were scraped from the plates and diluted to obtain 10^8 CFU ml^{-1} by adjusting their optical density at 600 nm. to approximately 1.0 using phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0).

Screening of Efficient Salt-tolerant PSB

The screening procedure comprised the three consecutive screening steps. Each step was performed with three replicates. For a primary screening step, eighty-four salt-tolerant bacterial strains were screened for their phosphate solubilizing ability by point inoculating them on modified Pikovskaya (MPVK) agar medium containing 0.6 M NaCl. The plates were incubated at 30°C for 5 d. Only the bacterial strains that formed the clear haloes around their colonies were selected for using in the next screening step. In a secondary screening step, the quantitative analysis of phosphate solubilization was carried out with Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 150 ml of MPVK broth inoculated with the bacterial strains (1% inoculum with 10^8 CFU ml^{-1}). The autoclaved and uninoculated medium served as the negative controls. The flasks were incubated for 5 d at 30°C with shaking at 200 rpm. The cultures were harvested by centrifugation at 17,418 rpm for 30 min. The soluble phosphate in the culture

supernatant was determined colorimetrically by using the method of APHA, AWWA & WEF (1998). A tertiary screening step was carried out to quantify the soluble phosphate from the phosphate solubilizing ability of bacterial strains under various salt concentrations (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, and 1.6 M NaCl) at 30°C and under various temperatures (30, 35, and 45°C) at 0.6 M NaCl.

The MPVK (modified Pikovskaya) medium contained (per liter): 1.0% (w v⁻¹) glucose, 0.05% (w v⁻¹) (NH₄)₂SO₄, 0.02% (w v⁻¹) NaCl, 0.02% (w v⁻¹) KCl, 0.01% (w v⁻¹) CaCl₂·2H₂O, 0.01% (w v⁻¹) MgSO₄·7H₂O, 0.05% (w v⁻¹) MnSO₄·7H₂O, 0.05% (w v⁻¹) FeSO₄·7H₂O, and 0.05% (w v⁻¹) yeast extract in distilled water (pH 7.5). NaCl and agar were supplemented as required. The tricalcium phosphate (Ca₃(PO₄)₂) at 0.5% (w v⁻¹) was added as a source of an insoluble phosphate. It was autoclaved separately from the other ingredients then aseptically mixed together. This medium was first described by Pikovskaya (1948) and was modified by Son et al. (2006).

Germination and Seedling Growth Assessment

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Seeda) seeds were surface disinfected by immersion in 70% ethanol for 1 min, followed by 15 min in 0.9% (w w⁻¹) sodium hypochlorite. They were then washed three times with sterile distilled water. An inoculum of the efficient salt-tolerant PSB was prepared. The disinfected seeds were immersed in either the bacterial inoculum (10⁸ CFU ml⁻¹) or phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) for one hour and were used as inoculated and uninoculated treatment, respectively. Germination assays were performed according to ISTA (1993). Four replicates of 25 seeds were germinated in sterilized Petri dishes (9.0 cm diameter) containing two sheets of filter papers moistened initially with 4 ml of 0.5% (w v⁻¹) sterilized tricalcium phosphate solution supplemented with

NaCl at 0, 30, 60, 90, and 120 mM. The Petri dishes were then placed under artificial light which provided light intensity at 2,000 lux for 16 h daily and at a temperature of $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Germination was observed daily. The germination percentage and germination index were calculated. Two weeks after germination, the dry weight of the seedlings was determined by drying at 70°C for 3 d.

Bacterial Root Colonization Assessment

The survival and ability of the inoculated bacteria to colonize plant roots were assessed by the visualization of plant roots under the light and scanning electron microscopy (SEM). For SEM visualization, root pieces of interest were dissected about 1 cm from the whole roots and fixed in 2.5% glutaraldehyde prepared in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 at 4°C for overnight. The fixed specimens were washed with phosphate buffer three times, each for 15 min. The specimens were further fixed in 1% osmic acid for 2 h at room temperature and rinsed with distilled water for three times, each for 15 min. The samples were frozen with liquid nitrogen for 2 min and then dehydrated using the freeze dryer. After that, the samples were gold coated and examined under a scanning electron microscope (JEOL, JSM-6460LV).

Statistical Analysis

Means of soluble phosphate (mg l^{-1}) solubilized by salt-tolerant PSB were statistically compared using LSD values ($P < 0.05$). The experimental design for the study of germination and seedling growth assessment was two factors factorial arranged in a randomized completely block design; with four replications and 25 seeds per replicate. One way analysis of variance (ANOVA) was made to determine any significant differences between the groups

at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed by using the SPSS 11.0 for Windows software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Screening of Efficient Salt-tolerant PSB

Saline soil is a common habitat of halotolerant (salt-tolerant) and halophilic (salt-loving) bacteria (Quesada et al., 1982; Zahran, 1997 ; Ventosa et al., 1998). They have adapted during evolution (genotypic and/or phenotypic adaptation) to tolerate high salinity and optimally grow in hypersaline environments (Imhoff, 1993). Thus, the best environment to search for the efficient salt-tolerant PSB to use as microbial inoculants in saline soil is saline soil itself. In this study, the 84 salt-tolerant bacterial strains which were isolated from saline soil of the previous work (Chookietwattana, 2003) were used as resource cultures of bacteria. The screening procedures were composed of three consecutive steps: primary, secondary, and tertiary-screening. In the primary screening step, of the 84 salt-tolerant bacterial strains, 28 strains were able to produce a clear zone on the MPVK agar plate in the presence of 0.6 M NaCl at 30°C. They belonged to the genera *Bacillus*, *Halomonas*, *Delaya*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, and *Vigribacillus* (data not presented).

In the secondary screening step, the 28 strains were tested for their ability to solubilize the insoluble phosphate in the MPVK broth containing 0.6 M NaCl. This screening step was conducted for obtaining more reliable results since the screening technique based on the visible clear zone on the agar plate was not an infallible technique (Nautiyal, 1999). In addition, it was also used for selecting the strains which have high phosphate solubilizing activity and also for reducing the time-consuming work and chemical costs to perform a tertiary screening. Out of 28 salt-tolerant PSB strains, 2 bacterial strains, namely: *B. megaterium* AIIy; and *B. megaterium* A12ag, showed the highest soluble phosphate at the first and second rank (data not presented), hence they were chosen for a further screening step.

The species of PSB selected in this screening step was the same as that studied by Arora and Gaur (1979) since bacteria in the genus *Bacillus* are reported as one of the most powerful PSB (Illmer & Schinner, 1992 ; Rodríguez & Fraga, 1999 ; Ray, 2005). Increased crop yields by inoculation of *Bacillus* spp., either through single inoculation or co-inoculation with the other plant growth-promoting bacteria, were reported by several researchers with several plant species (Rojas, et al, 2001 ; Sundara, et al., 2002 ; Ghosh, et al., 2003 ; Egamberdiyeva & Höflich, 2004). Furthermore, among species in the genus *Bacillus*, *B. megaterium* is one of the most well known PSB which was successful in enhancing crop yields in the Soviet Union (Smith et al., 1961) and India (Gaur, 1990).

The tertiary screening step was performed in order to screen for the best salt-tolerant phosphate solubilizing bacterium which had the highest phosphate solubilizing activity at a wide range of salt and temperature levels. Comparative studies on the influence of salt (NaCl) and temperature on phosphate solubilizing activity of *B. megaterium* AIIy and *B. megaterium* A12ag revealed that both of them were able to solubilize the insoluble phosphate at all levels of NaCl and temperatures studied (Table 1 and 2). These results infer that they had been well adapted to the salt stress conditions. It seemed, therefore, that the strains isolated from saline soil have the genetic potential to solubilize the insoluble phosphate at high salt and high temperature. The insoluble phosphate solubilization of both strains were significantly enhanced with increasing amounts of NaCl from 0.2 to 0.4 M, but decreased when NaCl was equal to or above 0.8 M. These results could be due to the influence of salt on their growth. In this respect, although they are salt-tolerant bacteria but their adaptations are limited in some salinity ranges which results from their ancestry. This is not a surprise result since halotolerants and halophilic microorganisms have limited degrees of salt tolerances and salt requirements (Larsen, 1986 ; Kushner, 1993). The P solubilization of both strains was highest in MPVK broth containing NaCl at 0.4 M (approximately 40 dS cm⁻¹) and decreased at or

above 0.8 M NaCl. These results imply that they could have a high potential to solubilize the insoluble phosphate in saline soil. The reasons for this consideration are that the soil salinity recommended for plantation of most crops should not be higher than 80 mM. The salinity above 0.3 M is vital for plant growth even in many halophytes. In addition, there are also very few opportunities for the microbial inoculants to face with such extreme salinity. However, among both strains, *B. megaterium* A12ag released the highest amount of soluble phosphate than *B. megaterium* AIIy at every level of salt concentrations.

In studying the influence of temperature on phosphate solubilizing activity, the insoluble phosphate solubilization of both strains was significantly increased when temperature was increased from 30°C to 35°C, but decreased when temperature rose to 45°C. These results might be due to the influence of temperature on their growth which subsequently affects the phosphate solubilization. The results agree with the study of Nautiyal (2000) in which the phosphate solubilization was markedly reduced at 45°C. Overall, *B. megaterium* A12ag was less affected by fluctuations of salt and temperature than *B. megaterium* AIIy. According to the results obtained, these two strains were different genetically. *B. megaterium* A12ag proved to be the most efficient salt-tolerant PSB in which it performed the highest phosphate solubilizing activity and maintained the high activity in the wide ranges of salinity and temperature. Therefore, *B. megaterium* A12ag was selected as the efficient salt-tolerant phosphate solubilizing bacterium. It was then tested for the potential in promoting the growth of tomato which grew under saline conditions.

TABLE 1. The soluble phosphate (mg l^{-1}) solubilized by *B. megaterium* A12ag in the MPVK broth containing tricalcium phosphate at 30°C and various NaCl concentrations

Culture	NaCl (M)				
	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6
<i>B. megaterium</i> AllY	119.8±1.4 ^{Ab}	121.2±3.2 ^{Ab}	97.2±6.3 ^{Bb}	55.8±1.4 ^{Ca}	47.8±1.3 ^{Ca}
<i>B. megaterium</i> A12ag	137.9±1.8 ^{Aa}	141.5±2.7 ^{Aa}	113.1±2.3 ^{Ba}	63.9±2.3 ^{Ca}	52.6±1.1 ^{Da}

Each value represents mean $\pm$ SD of three replicates per treatment.

^{ABC} Values with the same letter within rows indicate no significant differences with $P \geq 0.05$.

^{abc} Values with the same letter within columns indicate no significant difference with $P \geq 0.05$.

TABLE 2. The soluble phosphate (mg l^{-1}) solubilized by *B. megaterium* A12ag in the MPVK broth containing tricalcium phosphate and 0.6 M NaCl at various temperatures

Culture	Temperature (°C)		
	30	35	45
<i>B. megaterium</i> AllY	124.4±0.8 ^{Ab}	124.2±0.7 ^{Ab}	106.4±1.0 ^{Bb}
<i>B. megaterium</i> A12ag	140.8±1.1 ^{Aa}	148.5±1.8 ^{Aa}	119.3±0.8 ^{Ba}

Each value represents mean $\pm$ SD of three replicates per treatment.

^{ABC} Values with the same letter within rows indicate no significant difference with $P \geq 0.05$.

^{abc} Values with the same letter within columns indicate no significant difference with $P \geq 0.05$.

Effect of Efficient Salt-tolerant PSB on Tomato Plant Growth

The rationale of this study is based on the hypothesis that an inoculation of the efficient salt-tolerant PSB, the *B. megaterium* A12ag, could solubilize the insoluble phosphate and provides sufficient available P for plants grown under saline conditions which consequently results in enhancement of plant growth. To study the effects of the selected bacterium on promoting tomato growth under saline conditions, the suspension of *B. megaterium* A12ag was used to inoculate tomato seeds prior to plant under saline conditions and supplemented with insoluble phosphate. The germination percentage, germination index, root length, and dry weight of the seedlings inoculated with *B. megaterium* A12ag were compared with those uninoculated seedlings. In order to clearly determine the effects of salt stress and bacterial inoculation, uninoculated treatment was also conducted at all NaCl concentrations along with the inoculated treatment. The study on salt influencing tomato growth found that the germination percentage, germination index, and seedling dry weight of both the inoculated and uninoculated treatment were significantly reduced as salinity increased (Figure 1). The reduction of tomato seed germination was mainly due to the delayed-actions of salt on seed germination by interfering with the uptake of essential nutrients, the direct toxicity effects of salt ions, and the prevention of seed water uptake in the first phase of germination (Ayers, 1952 ; Flowers & Flowers, 2005). In addition, salinity also caused changes in growth morphology and physiology of plant roots (Cuartero & Fernaández-Muñoz, 1999). In the respect of salinity on P uptake, salinity inhibits P uptake by plant roots, P translocation from root to shoot, and retranslocation of P from old to young leaves (Martínez et al., 1996).

Observing the effect of the efficient salt-tolerant PSB on tomato plants grown under saline conditions and supplemented with insoluble phosphate reveals that the tomato seeds

inoculated with *B. megaterium* A12ag showed trends in enhancing germination percentage, germination index, root length, and seedling dry weight over the uninoculated treatment. When tomato seeds were inoculated by the efficient salt-tolerant phosphate solubilizing bacterium, a significant increase in germination percentage and root length was found at NaCl between 30 to 120 mM. In addition, a significant increase in the germination index and seedling dry weight of the inoculated treatments was found at NaCl between 0-120 mM. The increasing of germination percentage and root length might be a result of increasing available phosphorus from microbial activity which was then taken up by plants for the emergence and development of the seedlings since only the insoluble phosphate was applied as a source of nutrients for tomato seeds. These results were agreed with the study of Awad et al. (1990). The visual observation of tomato roots indicated that roots of tomato seedlings inoculated by salt-tolerant PSB had less root hair length and density than the uninoculated treatment (Figure 2). These results may be due to the higher level of available phosphorus in the inoculated treatment than the uninoculated treatment according to the activity of salt-tolerant PSB. The reasons for these results are that low P concentration in the root medium of uninoculated treatment led to the development and elongation of root hair to ensure a sufficient uptake of P when available P in soil limits growth (Foeshe & Jungk, 1983 ; Lambers et al., 2006). Bates & Lynch (2001) also reported that root hair development strongly responded to the change in local phosphate concentration. The influence of phosphorus availability on root hair development is controlled by a large number of genes (Herrera-Estrella et al., 2001).

In order to ascertain the colonization of salt-tolerant PSB on the plant roots, roots of inoculated treatment were observed under the light microscope and SEM. The SEM observations (Figure 3) confirmed *in vitro* binding of *B. megaterium* A12ag to tomato root surface and root hairs. They could colonize tomato roots in NaCl ranging from 0 – 120 mM.

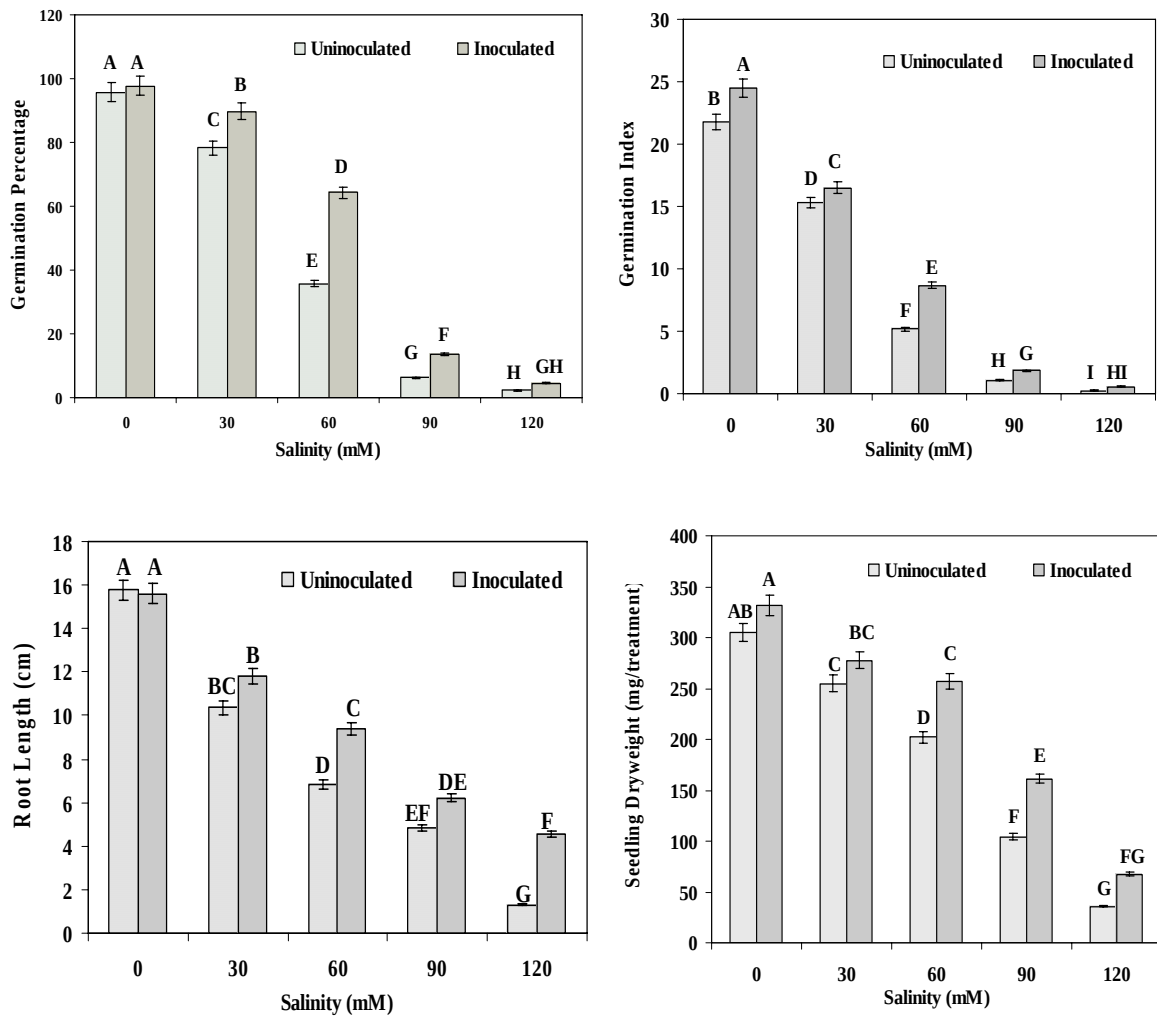


FIGURE 1. Effect of salt-tolerant PSB *B. megaterium* A12ag on tomato plants grown under diverse salt concentrations and with additional insoluble phosphate. Each value represents mean $\pm$ SD of four replicates per treatment. ^{ABC} Values with the same letter above bar indicate no significant difference with $P \geq 0.05$.

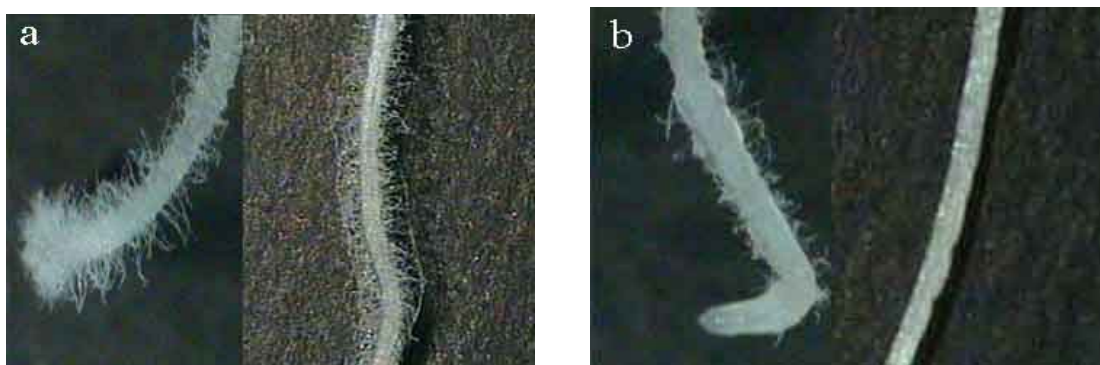


FIGURE 2. External structure of tomato root: (a) uninoculated, (b) inoculated.

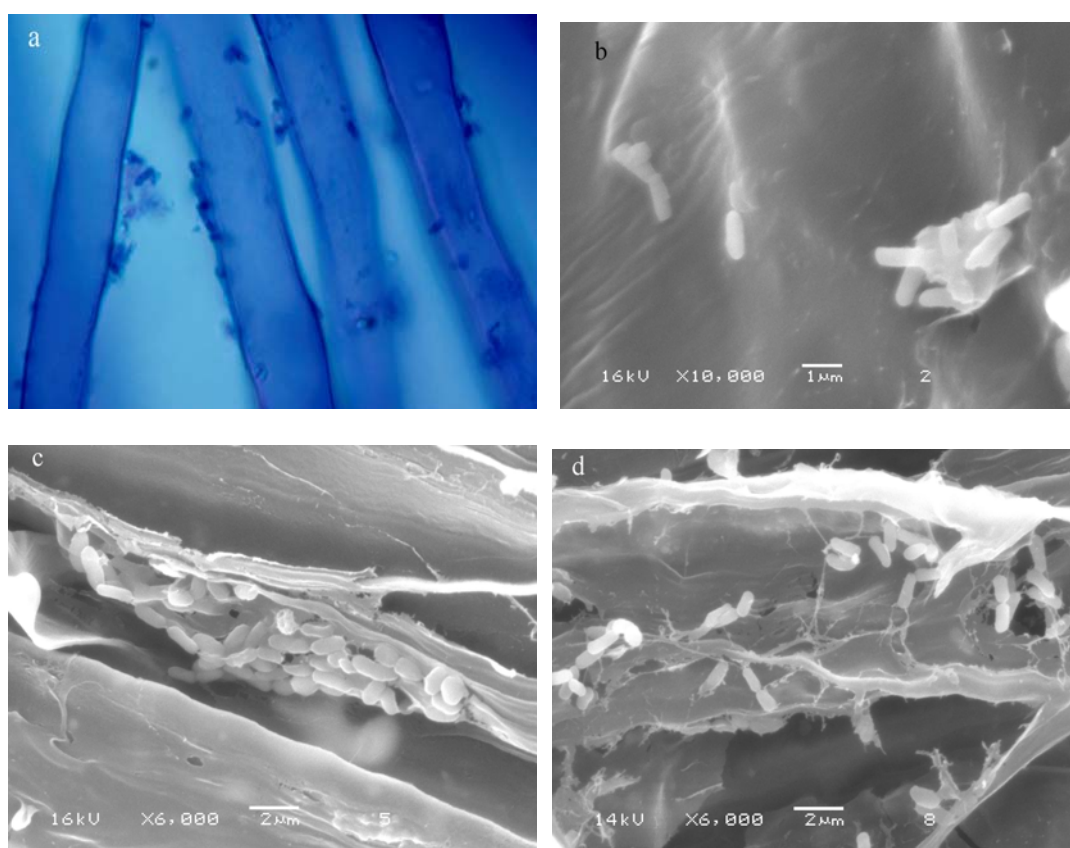


FIGURE 3. Micrograph of tomato roots in which their seeds were inoculated with *B. megaterium* A12ag (a). Clusters of bacteria were observed on the root surface under light microscope. Panels b, c, and d are SEM micrographs. Colonization of inoculated bacteria were also observed on the surface of tomato roots under: (b) 30 mM NaCl at 7 d of incubation; (c) 30 mM NaCl at 14 d of incubation; and (d) 120 mM NaCl at 14 d of incubation.

CONCLUSION

The present study revealed that the selected salt- tolerant PSB, *B. megaterium* A12ag, can solubilize phosphate in the presence of high salt and high temperature. The bacterium showed a significant promoting effect on the germination and growth of the tomato seedlings grown *in vitro* and under saline conditions. To our knowledge this is the first report of salt-tolerant PSB demonstrating their survival and ability to enhance plant growth under saline conditions. However, saline soil is much more complex than those *in vitro*. Therefore, further study on the activity of salt-tolerant PSB in combination with the environmental factor of saline soil is suggested to obtain the great potential for using the bacterium for future application as biofertilizer.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund grant MRG 5080058. The corresponding author is thankful to Prof. Dr. Siriwat Wongsiri and Dr. Banyong Toomsan for their kind help and constructive suggestion during the course of investigation.

REFERENCES

- APHA, AWWA & WEF. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. United Book Press, Baltimore.
- Arora, D. & Gaur, C. 1979. Microbial solubilization of different inorganic phosphates. *Indian J. Exp. Biol.* 17:1258–61.
- Awad, A.S., Edwards, D.G. & Campbell, L.C. 1990. Phosphorus enhancement of salt tolerance of tomato. *Crop Sci.* 30:123-128.
- Ayers, A.D. 1952. Seed germination is affected by soil moisture and salinity. *Agron. J.* 44:82-84.
- Bashan, Y. 1998. Inoculant of plant growth-promoting bacteria. *Biotechnol. Adv.* 16(4):729-770.
- Bates, T.R. & Lynch, J.P. 2001. Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. *Plant and Soil.* 236:243–250.
- Chen, Y.P., Rheka, P.D., Arun, A.B. & Shen, F.T. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34:33-41.
- Chookietwattana, K. 2003. Diversity of halophilic bacteria in saline soil at Nong Bo Reservoir, Mahasarakham Province, Thailand. Ph.D. Thesis. Suranaree University of Technology. Nakhon Ratchasima.
- Crocker, W. Hitchcock, A.E. & Zimmerman, P.W. 1932. Ethylene-induced epinasty of leaves and the relation of gravity to it. Quoted in: Abeles, F.B., Morgan, P.W. & Saltveit, Jr.M.E. 1992. Ethylene in Plant Biology. 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- Cuartero, J. & Fernández-Muñoz, R. 1999. Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae.* 78:83-125.

- Datta, M., Banik, S. & Gupta, R.K. 1982. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant Soil*. 69:365-383.
- Deikman, J. 1997. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiol. Plant*. 100:561–566.
- Dey, R., Pal, K.K, Bhatt, D.M. & Chauhan, S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res*. 159:371-394.
- Egamberdiyeva, D. & Höflich, G. 2004. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. *J. Arid Environ*. 56:293-301.
- Flowers T.J. & Flowers, S.A. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders?. *Agr. Water Manage*. 78:15-24.
- Foeshe, D. & Jungk A. 1983. Influence of phosphate and nitrate supply on root hair formation of rape, spinach and tomato plants. *Plant and Soil*. 74:359-368.
- Gaind, S. & Gaur, A.C. 1991. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. *Plant Soil*. 133:141-149.
- Gaur, A.C. 1990. Phosphate solubilizing microorganisms as biofertilizers. Omega Scientific Publishers, New Delhi.
- Ghosh, S., Penterman, J.N., Little, R.D., Chavez, R. & Glick, B.R. 2003. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol Biochem*. 41:277–281.
- Glick, B.R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett*. 251:1-7.

- Grattan, S.R. & Grieve, C.M. 1999. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. In: Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker, New York, pp. 203-213.
- Grichko, V.P. & Glick, B.R. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Bioch.* 39:11-17.
- Herrera-Estrella, L., Lopez-Bucio, J. & Grierson, C. 2001. Molecular characterization of the effects of phosphorus on the development of root hairs in Arabidopsis. In: W. J. Horst et al. (Eds.). Plant Nutrition – Food Security and Sustainability of Agro-ecosystems. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 20-21.
- Illmer, P. & Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 24:389–395.
- Imhoff, J.F. 1993. Osmotic adaptation in halophilic and halotolerant microorganisms. In: Vreeland, R.H. & Hochstein, L.I. (Eds.). The Biology of Halophilic Bacteria. CRC Press, Boca Raton, pp. 211-212.
- Johri, J.K., Surange, S. & Nautiyal, C.S. 1999. Occurrence of salt, pH and temperature tolerant phosphate solubilizing bacteria in alkaline soils. *Curr. Microbiol.* 39:89–93.
- Jusaitis, M. 1986. Rooting of intact mungbean hypocotyls stimulated by auxin, ACC and low temperature. *Hort. Sci.* 21:1024-1025.
- Keren, R. 2000. Salinity. In: Sumner, M.E. (Ed.), Handbook of Soil Science. CRC Press, Boca Raton, pp. G3–G25.
- Kim, K.Y., Jordan, D. & McDonald, G.A. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fert. Soils.* 26:79–87.
- Kushner, D.J. 1993. The Biology of Halophilic Bacteria. CRC Press, Florida.

- Lambers, H., Shane, M.W. & Cramer, M.D. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals. Bot.* 98:693–713.
- Landon, J.R. 1991. Booker Tropical Soil Manual. Longman, Essex.
- Larsen, R. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* 39:3-7.
- Martínez, V., Bernstein, N. & Läuchli, A. 1996. Salt-induced inhibition of phosphorus transport in lettuce plants. *Physiol. Plant.* 97:118-122.
- Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B.R. 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and peppers. *Plant Sci.* 166:525-530.
- Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B.R. 2004b. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 42:565–572.
- Nautiyal, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. & Verma, D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 291-296.
- Penrose, D.M. & Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant.* 118:10–15.
- Pessarakli, M. & Szabolcs, I. 2000. Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. In: Pessarakli, M. (Ed.). Handbook of Plant and Crop Stress. New York, Marcel Dekker.
- Peterson, T.A., Reinsel, M.D. & Krizek, D.T. 1991. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv Better Bush) plant response to root restriction 11 Root respiration and ethylene generation. *J. Exp. Bot.* 42:1241–1249.

- Quesada, E., Ventosa, A., Rodriguez-Valera, F. & Ramos-Cormenzana, A. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J. Appl. Microbiol.* 53:155-161.
- Ray, R.C. & Edison, S. 2005. Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture- An overview. In: Ray, R.C. (Ed.). Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture. Volume I. Science Publishers, Enfield.
- Rodríguez, H. & Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17(4-5):319-339.
- Rojas, A., Holguin, G., Glick, B.R. & Bashan, Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35(2):181-187.
- Sharpley, A. 2000. Phosphorus availability. In Sumner, M.E. (Ed.). Handbook of Soil Science. Boca Raton, CRC Press.
- Son, H – J., Park, G-T., Cha, M-S. & Heo, M-S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH- tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technol.* 97(2): 204-210.
- Sundara, B., Natarajan, V. & Hari, K. 2002. Influence of phosphate solubilizing bacteria on the changed in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crop Res.* 77:43-49.
- Ventosa, A., Marquez, M.C., Garabito, M.J. & Arahál, D.R. 1998. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles.* 2(3):297-304.
- Wahid, O.A. & Mehana, T.A. 2000. Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorus-uptake by wheat and faba bean plants. *Microbiol. Res.* 155(3):221-7.

- Yahya, A.I. & Al-Azawi, S.K. 1989. Occurrence of phosphate-solubilizing bacteria in some Iraqi soils. *Plant Soil*. 117:135-141.
- Yadav, K.S. & Dadarwal, K.R. 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. In: Dadarwal, K.R. (Ed.): *Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production*. Scientific Publishers, Jodhpur, pp. 293–308.
- Zahran, H.H., Moharram, A.M. & Mohammad, H.A. 1992. Some ecological and physiological studies on bacteria isolated from salt-affected soils of Egypt. *J. Basic Microb.* 32(6):405-413.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ในเชิงวิชาการ ด้านการพัฒนาการเรียนการสอนของวิชาในระดับปริญญาตรี คือ วิชา Biotechnology in Biodiversity and Conservation และวิชาในระดับบัณฑิตศึกษา คือ Environmental Biotechnology, Advanced Microbiology

3. การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ 1 เรื่อง ในการประชุม International Conference of the Thai Society for Biotechnology ณ โรงแรมตักสิลา จ. มหาสารคาม วันที่ 14-17 ตุลาคม พ.ศ. 2551
ดังบทความต่อไปนี้

Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology

TSB 2008 : "Biotechnology for Global Care"

Taksila Hotel, Mahasarakham, October 14th – 17th 2008

T6P49-114

EFFECTS OF SALT-TOLERANT PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA ON PROMOTING PLANT GROWTH UNDER SALINE CONDITIONS

Chookietwattana, K.^{1*}, Maneewan, K.¹, Wongsiri, S.¹, Toomsan, B.²

¹Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University,
Mahasarakham, Thailand

² Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Abstract

Soil salinity causes the detrimental effects on the growth and yield of plant. In saline soil, phosphorus is appeared in the low content and also rapidly fixed to the unavailable forms. Phosphate solubilizing bacteria (PSB) are plant growth promoting bacteria which can solubilize the insoluble phosphate to the soluble phosphate. This study was conducted to investigate phosphate solubilizing activity of salt-tolerant phosphate solubilizing bacterium strain *Bacillus megaterium* A12ag under various salt concentrations (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, and 1.6 M NaCl). Effects of the strain on promoting tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Seeda) growth under various saline conditions (0, 30, 60, 90, and 120 mM) were also evaluated. The germination percentage and germination index of tomato seeds inoculated with the bacterial strain were significantly increased at NaCl between 30 to 90 mM while the benefit for seedling dry weight could be investigated at 60 mM. Our results suggested that the *B. megaterium* A12ag has a high potential to enhance plant growth under saline environments.

Keywords: phosphate solubilizing bacteria; salt-tolerant bacteria; plant growth-promoting bacteria

*Corresponding author.

Tel.:0-4372-1728 ext. 15; Fax: 0-4374-3135

E-mail: karb90@yahoo.com