บทความวิจัย

การคัดแยกและใช้หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพื่อการปรับปรุงคุณภาพดิน

ประดับรัฐ ประจันเขตต์[1] สุทธวรรณ สุพรรณ[1] และ ทายาท ศรียาภัย[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์สำหรับนำมาใช้ในการเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดิน ผลการคัดแยกได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน 5 ไอโซเลต ได้แก่ RT01 RT02 RT03 RT04 และ RT05 ลักษณะโคโลนีของทุกไอโซเลตเป็นเมือก สีขาวขุ่น เซลล์รูปรี ติดสีแกรมลบ เมื่อนำเชื้อแต่ละไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระและศึกษาการเจริญในอาหาร Nitrogen-free medium พบว่า RT05 มีความสามารถเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด โดยตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนได้ 2.47 mg/L จากนั้น นำ RT05 มาศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพื่อเพิ่มธาตุอาหารในดินเสื่อมสภาพ พบว่าการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน RT05 เพียงครั้งเดียวให้ประสิทธิภาพการเพิ่มไนโตรเจนในดินหลังการเติมเชื้อเป็นเวลา 24 วัน โดยตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 3.82 mg/L และ 3.32 mg/L ตามลำดับ ซึ่งให้ผลมากกว่าการเติมหัวเชื้อเป็นระยะๆ นอกจากนี้ยังพบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียยังคงมีชีวิตและเพิ่มจำนวนอยู่ในดินที่ทำการทดสอบได้ การจำแนกสายพันธุ์ของ RT05 ด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Azotobacter tropicalis* จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนไอโซเลต RT05 มาใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อช่วยในการปรับปรุงคุณภาพดินได้

คำสำคัญ: ดิน การตรึงไนโตรเจน *Azotobacter*

---

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

[2] คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: thayat@g.swu.ac.th

Isolation and Application of Effective Nitrogen Fixing-bacterial inoculum for Soil Quality Improvement

Pradabrat Prajankate[1], Suttawan Saphan[1] and Thayat Sriyapai[2]

ABSTRACT

This research aimed to isolate effective free-living nitrogen fixing bacterium for utilizing as inoculum for enhancing nitrogen and bacterial populations in soil. The potential five isolates of nitrogen fixing-bacteria indicated as RT01, RT02, RT03, RT04 and RT05 were found to have the same characteristic of white mucous colony and gram negative oval cell shape. The result of nitrogen fixing independently ability test and studying of the growth in Nitrogen-free medium showed that RT05 was the highest of capable nitrogen fixation to 2.47 mg/L of ammonia-nitrogen production. RT05 was screened to study in the step of nitrogen fixation efficiency for decadent soil sample. After 24 days of adding RT05 nitrogen fixing bacteria inoculums in soil sample once time, the result showed that maximum NH_3-N and NO_3-N were 3.82 mg/L and 3.32 mg/L, respectively. These were higher than in soil samples adding inoculum higher than adding periodically. Furthermore, the survival and increasing of bacteria in soil samples were found. The identification of RT05 showed that 16S rDNA nucleotide sequence is similar to sequence of *Azotobacter tropicalis.* The results of this experiment show a possible trend to use the nitrogen fixing bacteria as inoculums for improvement of soil quality.

Keywords: Soil, Nitrogen Fixation, *Azotobacter*

---

[1] Division of Biology Faculty of Science and Technology, Rajamangala University Technology Thanyaburi

[2] Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University

[*] Corresponding author, e-mail: thayat@g.swu.ac.th

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการเพาะปลูกพืชสวน พืชไร่และพืชเศรษฐกิจ เพื่อตอบสนองความต้องการในการบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศมาเป็นเวลานาน ดินจึงเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญ สำหรับใช้ทำการเกษตร ปัจจุบันพบว่าสภาพดินมีความเสื่อมโทรมลง อันมีสาเหตุเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ [1] โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดการกษัยการของดิน นอกจากจะส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพ เคมีของดินแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อปริมาณและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน [2] นอกจากสาเหตุที่เกิดตามธรรมชาติ ที่ทำให้ไม่อาจใช้ประโยชน์จากดินได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ปัญหาที่ทำให้ดินสูญเสียความอุดมสมบูรณ์หรือลักษณะทางกายภาพของดิน มักเกิดจากการกระทำของมนุษย์ เนื่องจากปัจจุบันการเพิ่มขึ้นของประชากรสูง เกษตรกรจึงต้องทำการเพาะปลูกอย่างหนาแน่นในพื้นที่อันจำกัด เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการในการบริโภคเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ [3] นอกจากนี้ในพื้นที่ทางการเกษตร ที่เกษตรกรขาดความรู้ในการใช้ที่ดินอย่างเหมาะสม ขาดการบำรุงรักษาและการจัดการที่ถูกต้อง เช่น การเผาวัชพืช การเพาะปลูกพืชเป็นจำนวนมากในพื้นที่เดิมเป็นเวลานานก็มีส่วนทำให้ดินสูญเสียคาร์บอนและไนโตรเจนและยังมีผลต่อการดำรงชีวิตและการตายของปริมาณจุลินทรีย์ [4] วิธีการแก้ไขที่เกษตรกรนิยมใช้ คือ การใส่ปุ๋ยเคมีลงในดิน เพื่อเพิ่มธาตุอาหารให้กับที่พืชขาดแคลน เมื่อใช้ปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ผลกระทบที่เกิดขึ้นคือ สารเคมีที่ตกค้างในดินส่งผลให้คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินเปลี่ยนแปลง เช่น ดินเป็นกรด ธาตุอาหารบางชนิดถูกตรึงอยู่ในสภาพที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ทำให้พืชขาดแคลนธาตุอาหารอันเป็นผลจากดินที่เสื่อมคุณภาพ จากการศึกษาในปี ค.ศ. 2008 ของ Chen และคณะ [5] พบว่า ผลกระทบจากการใช้ยากำจัดวัชพืชในกลุ่มของยาฆ่าหญ้าในดินนาข้าว มีผลต่อกลุ่มจุลินทรีย์ดินและความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เมื่อกิจกรรมที่เกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวน้อยลง จึงทำให้สารประกอบไนโตรเจน ซึ่งเป็นธาตุหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชในดินลดลงตามไปด้วย ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของธาตุต่างๆ ในดิน จึงมีความสัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์ในดิน [6]

แนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นโดยวิธีการทางชีวภาพที่น่าสนใจ คือ การใช้จุลินทรีย์จากดิน เนื่องจากจุลินทรีย์ดินมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนรูปธาตุอาหารในดินให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ รวมทั้งยังมีผลต่อการปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน [7] ตัวอย่างเช่น การใช้แบคทีเรียไรโซเบียมในดินที่ขาดธาตุไนโตรเจน ซึ่งไรโซเบียมสามารถตรึงไนโตรเจนได้กับรากพืชตระกูลถั่วอย่างจำเพาะเจาะจง [8] แต่ในธรรมชาติ ยังมีกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยร่วมกับรากพืช ได้แก่ *Azotobacter, Bacillus* และ *Pseudomonas* ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาพอิสระได้และมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มธาตุอาหารในดิน ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ช่วยในการรีดิวซ์ไนโตรเจน (N_2) ในบรรยากาศให้เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียไนโตรเจน [9] ซึ่งพืชสามารถนำมาใช้ในการเจริญได้ดังนั้นการอยู่รอดและมีอยู่อย่างพอเพียงของประชากรจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในระบบนิเวศภาคพื้นดินจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนวัฏจักรของธาตุที่สำคัญ [10]

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบางชนิด เช่น *Azotobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งดำรงชีวิตอย่างอิสระ (free living) สามารถพบได้ในพื้นที่ดินเขตร้อน [11] ที่สามารถผลิต extracellular polymeric substances (ESP) มีลักษณะเป็นเมือก [12] ซึ่งมีส่วนสำคัญที่จะช่วยทำให้เนื้อดินเกาะติดกัน และสารเมือกที่ *Azotobacter* สร้างขึ้นยังมีผลทำให้เกิดความชื้นในดิน ส่งผลให้คุณสมบัติทางกายภาพของดินดีขึ้น คือเนื้อดินที่ร่วนซุยและความชื้นที่เหมาะสมสำหรับความต้องการของพืช EPS ยังมีส่วนช่วยในการทำให้เกิดการเน่าเปื่อยผุพังของเศษซากต่างๆ ในดิน [13] และทำให้เซลล์ของแบคทีเรียอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเกิดเป็นลักษณะฟิล์มชีวภาพสำหรับช่วยในการยึดเกาะกับพื้นผิวและยึดจับแร่ธาตุในดิน [14] การสร้างสารเมือกยังช่วยปกป้องแบคทีเรียจากการเปลี่ยนแปลงจากการกินของโปรโตซัวในดินและการเข้าโจมตีของฟาจ[15] *Azotobacter* สามารถสร้างซีสต์ (cyst) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำให้เซลล์ของ *Azotobacter* มีความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น เมื่ออุณหภูมิหรือค่าความเป็นกรด-ด่างของดินมีการเปลี่ยนแปลง ดินมีการปนเปื้อนโลหะหนักหรือสารพิษ *Azotobacter* ก็จะสร้างซีสต์มาห่อหุ้มเซลล์ปกติทำให้สามารถดำรงชีวิตอยู่รอดในดินได้เป็นเวลานานเมื่อดินกลับเข้าสู่สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม *Azotobacter* ก็จะเจริญกลับมาเป็นเซลล์ปกติ และช่วยตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดิม นอกจากนี้ *Azotobacter* ยังมีแฟลกเจลลาช่วยในการเคลื่อนที่ จึงสามารถกระจายตัวในดินได้ดี ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหากมีปริมาณ *Azotobacter* อยู่อย่างเหมาะสม ก็จะช่วยทำให้การตรึงไนโตรเจนในดินเกิดได้อย่างต่อเนื่องจากรายงานการวิจัยของ Dhevendaran และคณะ [16] พบว่า การประยุกต์ใช้ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ มีผลต่อการสร้างออกซินที่ช่วยในการเจริญของเมล็ดพืช

เนื่องจาก *Azotobacter* เป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนและมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ จึงควรมีการคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินเพื่อนำมาใช้การบำรุงดิน ส่งเสริมให้มีความหลากหลายทางชีวภาพในดินและถ่ายทอดความรู้ให้กับเกษตรกร [17] งานวิจัยนี้จึงได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระจากตัวอย่างดินในพื้นที่ทางการเกษตรแหล่งต่างๆ และนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มธาตุอาหารและปริมาณจุลินทรีย์ในดิน รวมทั้งจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ต่างๆ ใน ต.คลองหก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี ได้แก่ ดินนาข้าว ดินบริเวณแปลงเกษตร ดินรอบรากถั่ว ดินรอบรากข้าวโพด และดินบริเวณรอบสระพิพิธภัณฑ์บัว ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ชั่งตัวอย่างดินแหล่งละ 1 กรัม บดให้ละเอียดนำมากระจายลงบน Azotobacter agar [18] ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะสำหรับการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Azotobacter* จากนั้นบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ขึ้นรอบๆ ตัวอย่างดินมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์อีกครั้งในอาหาร Azotobacter agar เชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้จะนำมาย้อมสี แกรมเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระและการเจริญของแบคทีเรีย

การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเบื้องต้น โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้จำนวน 1 ห่วงลงใน Nitrogen free medium [18] ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงโดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยปิเปตต์ Nitrogen free medium ที่มีเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้มาวิเคราะห์แอมโมเนียด้วย Nessler's reagent [19] เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ Nitrogen free medium ที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย

จากนั้นนำไอโซเลทของแบคทีเรียที่ให้ผลเป็นบวก มาปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายลงใน Nitrogen free medium ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่าง Nitrogen free medium ที่มีเชื้อแต่ละไอโซเลต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำเอาส่วนใส ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน โดยวิธี Distillation [20] เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ Nitrogen free medium ที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย พร้อมทั้งตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต โดยการนำสารละลายเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน Nitrogen free medium ทุกๆ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นเลือกไอโซเลตของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระและการเจริญเติบโตสูงที่สุด มาศึกษาประสิทธิภาพการเพิ่มธาตุอาหารในดิน

ศึกษาประสิทธิภาพการเพิ่มธาตุอาหารในดินโดยแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ

เก็บตัวอย่างดินเสื่อมสภาพจากพื้นที่ทางการเกษตรของ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี มาวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน โดยวิธี Distillation และไนเตรท-ไนโตรเจน โดยวิธี Cadmium Reduction [20] และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในดินโดยใช้ Azotobacter agar เพื่อให้ทราบปริมาณไนโตรเจนและปริมาณแบคทีเรียในดินเบื้องต้น (ก่อนการเติมหัวเชื้อ) จากนั้นนำแบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระและการเจริญเติบโตสูงที่สุดมาเพาะเลี้ยงใน Nitrogen free medium บ่มเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนได้เชื้อที่มีความขุ่น 0.5 McFarland หรือ มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8-10^{10} CFU/ml เพื่อนำมาเป็นหัวเชื้อสำหรับเติมลงดินโดยแบ่งชุดการทดลองดังนี้ ชุดที่ 1 เติม Nitrogen free medium ที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ปริมาตร 5,000 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน 10 กิโลกรัม โดยเติมเชื้อเพียงครั้งเดียว และชุดที่ 2 เติม Nitrogen free medium ที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ครั้งละ 500 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 วัน จนครบ 24 วัน ในตัวอย่างดิน 10 กิโลกรัม เทียบกับชุดควบคุม คือตัวอย่างดิน 10 กิโลกรัม ที่ไม่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำทั้งชุดทดลองและชุดควบคุม) หลังการเติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนลงในตัวอย่างดิน ทำการเก็บตัวอย่างดินจำนวน 1 กรัม ในแต่ละชุดการทดลอง โดยเก็บทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 24 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนโดยวิธี Distillation และปริมาณ ไนเตรท-ไนโตรเจน โดยวิธี Cadmium reduction พร้อมทั้งตรวจนับปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในดิน และนำผลการ

ทดลองมาทดสอบค่าทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) โดยวิธี LSD (Least Square Difference) [21]

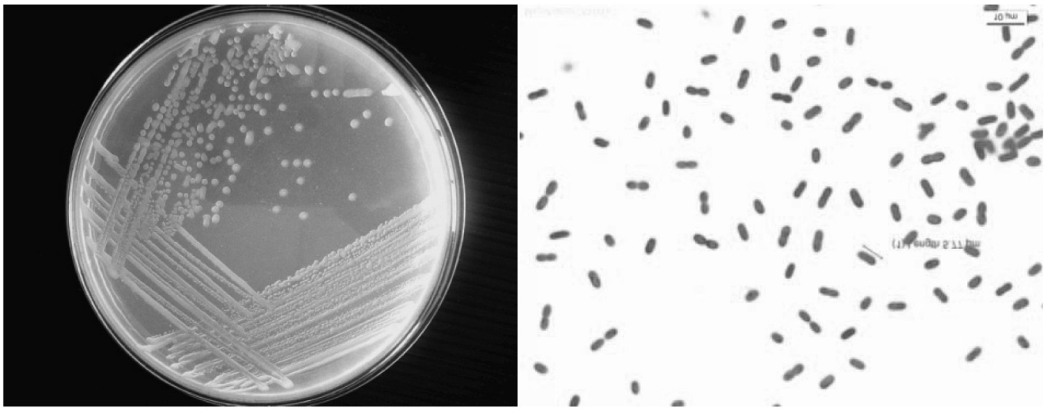
การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยยีน 16S rDNA

คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระที่คัดแยกได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการได้แก่ ความต้องการอากาศ คะตาเลส (catalase) ออกซิเดส (oxidase) MR-VP (methy red-voges proskaue) การใช้ซิเตรท (citrate utilization) การเคลื่อนที่ (motility) อินโดล (indole) และการหมักย่อยน้ำตาล [22] จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยชุดสกัดดีเอนเอสำเร็จรูปยี่ห้อ Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) เพื่อนำมาเป็น DNA แม่แบบ (template DNA) ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งใช้ universal primers ที่ถูกออกแบบมาจากลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ประยุกต์จากวิธีของ Lane [23] การจัดจำแนกสายพันธุ์ทำได้โดยนำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์โดยการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำลำดับนิวคลิโอไทด์ของแต่ละไอโซเลทมาวิเคราะห์สายพันธุ์โดยอาศัยโปรแกรม Blast ในฐานข้อมูลออนไลน์ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และวิเคราะห์แผนภูมิทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank NCBI ด้วยโปรแกรม MEGA 5.1

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ

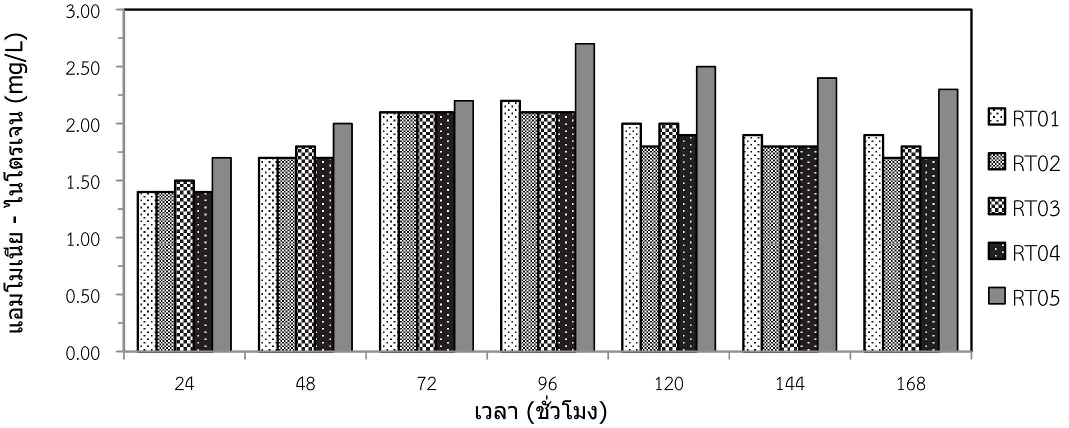
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระจากดินในพื้นที่การเกษตร พบลักษณะโคโลนีเป็นเมือก สีขาวขุ่นเจริญอยู่รอบๆ อนุภาคดินที่นำมาคัดแยกและสามารถนำมาคัดแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Azotobacter agar ได้ เมื่อศึกษาโครงสร้างและการติดสีย้อมของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อสร้างเมือกสัณฐานวิทยาของเซลล์ทุกไอโซเลตมีลักษณะที่คล้ายกันคือ มีรูปร่างเซลล์เป็นรูปรี คล้ายไข่ (Oval shape) ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ขนาดของเซลล์ตรวจวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยได้ 2 μm เซลล์ที่พบมีทั้งเซลล์เดี่ยว เรียงตัวกระจัดกระจายและเซลล์ที่เรียงติดกัน 2 เซลล์ (ภาพที่ 1) ซึ่งลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้น สอดคล้องกับรายงานของ Gauri และคณะ [24] ที่คัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากดินบริเวณรอบรากพืช Chennappa และคณะ [25] ที่คัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากดินนาข้าว และ Abdel-Aziez และคณะ [26] ที่คัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากดินที่มีการปลูกธัญพืชแหล่งต่างๆ โดยพบว่าเป็นจีนัส *Azotobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์เป็นรูปไข่ขนาดใหญ่ อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย สามารถสร้างซีสต์และสร้างเมือกได้



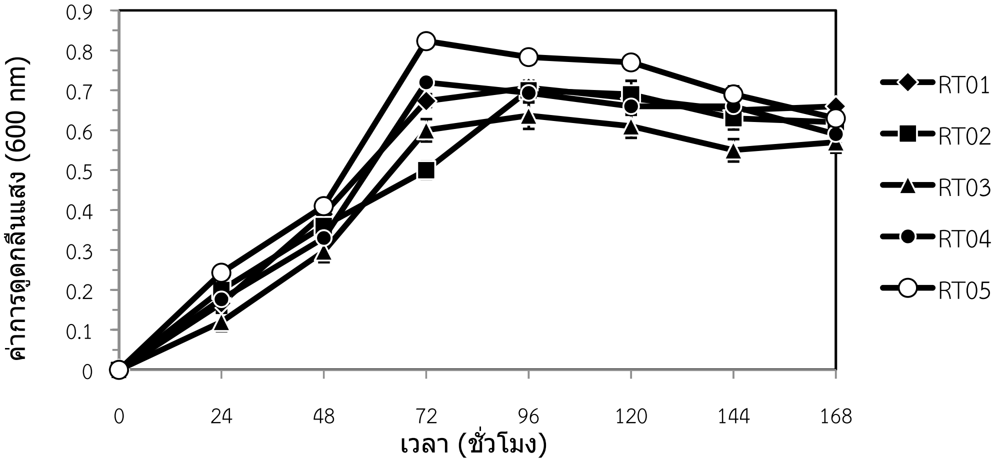
ภาพที่ 1 โคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้บนอาหาร Azotobacter agar

การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการเจริญของแบคทีเรีย

ทำการทดสอบศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ โดยก่อนและหลังการถ่ายเชื้อทุกไอโซเลตลงอาหาร Nitrogen free medium (ชั่วโมงที่ 0) ได้ทำการตรวจสอบปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดสอบพบว่าไม่พบแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลทเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงตรวจพบปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ Nitrogen free medium ที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต ซึ่งพบว่าหลังการบ่มเลี้ยง 96 ชั่วโมง ของไอโซเลท RT05 ตรวจพบปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ได้สูงที่สุดเท่ากับ 2.70 mg/L รองลงมาคือ ไอโซเลต RT01 ตรวจพบปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนเท่ากับ 2.20 mg/L ในขณะที่ ไอโซเลท RT02 RT04 และ RT03 มีปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน เท่ากับ 2.10 mg/L (ภาพที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวพบว่า RT05 มีปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน แตกต่างจากชุดควบคุมและ แตกต่างจากไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 สอดคล้องกับรายงานของ Ahmad และคณะ [27] ที่คัดแยกแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระจากดินบริเวณรอบรากพืช ซึ่งพบว่า *Azotobacter* ทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้ให้ผลการทดสอบการสร้างแอมโมเนียเป็นบวก ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียดังกล่าวมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสช่วยทำให้เกิดกลไกในการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนจากบรรยากาศให้อยู่ในรูปแอมโมเนียไนโตรเจนได้ และพบว่าเชื้อทุกไอโซเลตมีการเจริญเพิ่มขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงใน Nitrogen free medium ในชั่วโมงที่ 72 หลังการบ่มเลี้ยง โดยสามารถตรวจวัดการเจริญของไอโซเลท RT05 ได้สูงที่สุดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.82 (ภาพที่ 3) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ RT05 กับไอโซเลตอื่นๆ และ ชุดควบคุม โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อแบคทีเรียใน N_2-Free medium ในช่วงเวลาต่างๆ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 ดังนั้น ไอโซเลท RT05 จึงถูกคัดเลือกมาใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนในดินต่อไป



ภาพที่ 2 ศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (mg/L) ในอาหาร Nitrogen-free medium โดยแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ

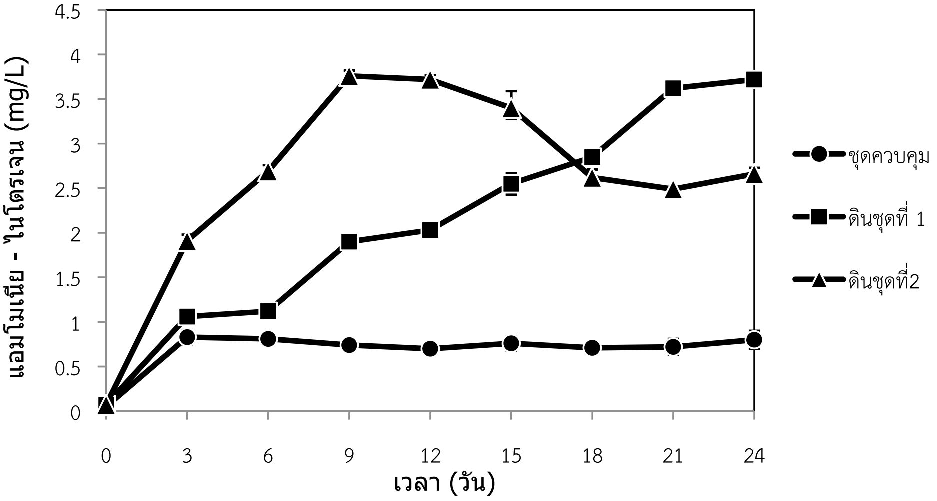


ภาพที่ 3 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ในอาหาร Nitrogen-free medium

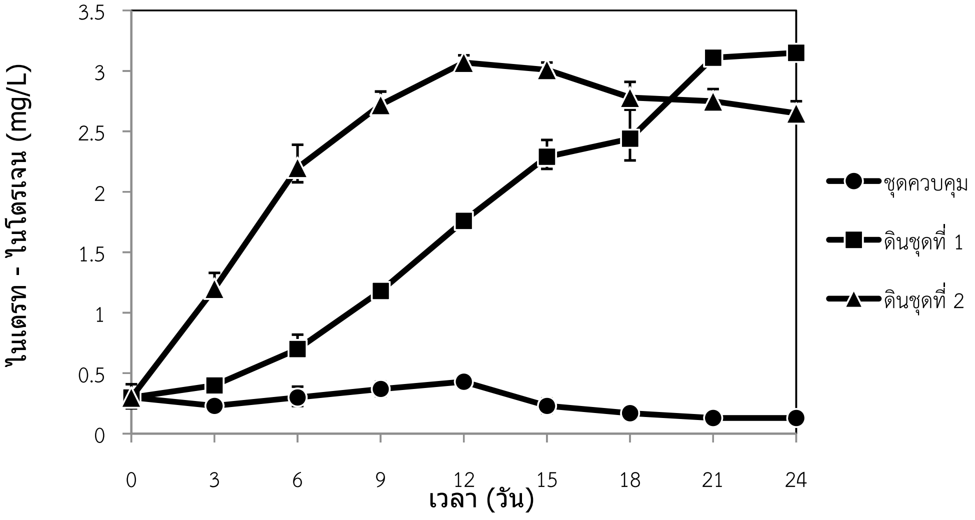
ประสิทธิภาพในการเพิ่มธาตุอาหารในดินโดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

จากการทดลองใช้เชื้อไอโซเลท RT05 เพื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในดินเสื่อมสภาพ พบว่าปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนในดินชุดที่ 1 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังจากการเติมเชื้อเริ่มต้นเพียงครั้งเดียวจนถึงวันที่ 24 ของการทดลอง โดยตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนในดินชุดที่ 1 ได้สูงสุดในวันที่ 24 ของการทดลองคือ 3.82 mg/L และ 3.32 mg/L ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจมีผลมาจากหัวเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงในดิน สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนีย-ไนโตรเจน และระหว่างการทดลองมีการพรวนดินเพื่อให้ดินได้รับอากาศ จึงทำให้แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ถูกออกซิไดซ์เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของไนเตรท-ไนโตรเจนได้ ซึ่งแตกต่างกับลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจนของตัวอย่างชุดที่ 2 ที่ทำการเติมเชื้อทุก 3 วัน พบว่าทั้งปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเพิ่มขึ้นสูงสุดใน

วันที่ 9 และวันที่ 12 ของการทดลอง โดยตรวจวัดแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนได้ 3.76 และ 3.11 mg/L ตามลำดับ จากนั้นปริมาณสารประกอบไนโตรเจนทั้งสองชนิดเริ่มลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากแบคทีเรียที่เติมเพิ่มลงไปอาจนำสารประกอบไนโตรเจนที่สะสมอยู่ในดินมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน จึงส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนมีค่าลดลง (ภาพที่ 4 และ 5) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนในดินทั้ง 2 ชุดทดลองโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05



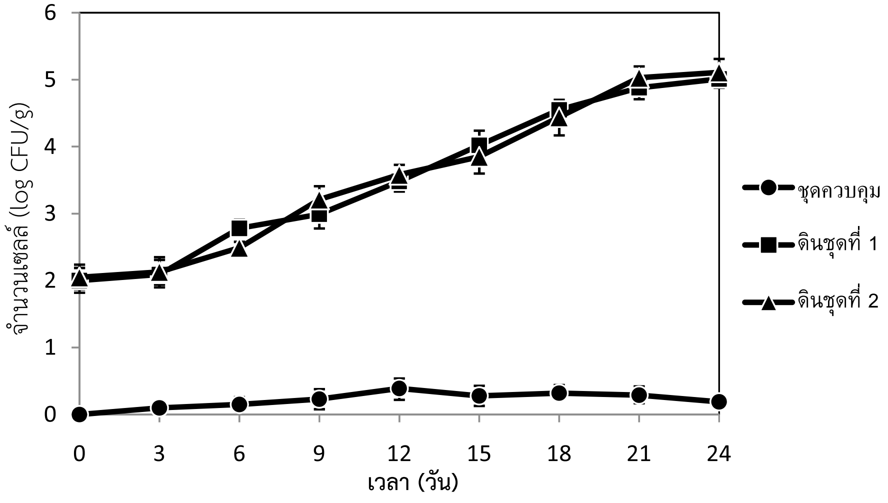
ภาพที่ 4 ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (mg/L) ในดินที่เติมหัวเชื้อเพียงครั้งเดียว (ชุดที่ 1) เปรียบเทียบกับการเติมหัวเชื้อทุกๆ 3 วัน (ชุดที่ 2) และชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อ



ภาพที่ 5 ปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจน (mg/L) ในดินที่เติมหัวเชื้อเพียงครั้งเดียว (ชุดที่ 1) เปรียบเทียบกับการเติมหัวเชื้อทุกๆ 3 วัน (ชุดที่ 2) และชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อ

เมื่อนำตัวอย่างดินมาตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ใน Azotobacter agar หลังการเติมหัวเชื้อพบว่าดินชุดที่ 1 และดินชุดที่ 2 มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นหลังการเติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนลงในดิน จนถึงวันที่ 24 ของการทดลองโดยตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในดินได้สูงสุด 1.03×10^5 CFU/g และ 1.64×10^5 CFU/g ตามลำดับ (ภาพที่ 6) และผลจากการทดลองพบว่าปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่พบมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Sharma และคณะ [28] ซึ่งตรวจวัดปริมาณ *A. chroococcum* ในดินสวนผลไม้ได้ 2.2×10^6 CFU/g เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณจุลินทรีย์ในแต่ละชุดการทดลอง โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในดินชุดที่ 1 และดินชุดที่ 2 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 ชุดการทดลองกับชุดควบคุม พบว่าปริมาณจุลินทรีย์มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Pesakovic และคณะ [29] ได้ทดลองใช้ปุ๋ยชีวภาพในรูปของหัวเชื้อ *Azotobacter* ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น เปรียบเทียบกับการใช้ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมปุ๋ยลงในดิน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่พบในดินที่ใช้ปุ๋ยชีวภาพมีปริมาณมากที่สุด แตกต่างจากดินที่ใช้ปุ๋ยเคมีและดินที่ไม่ได้เติมปุ๋ย ซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์ในดินน้อย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่แปรผันตามปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีการเจริญเพิ่มจำนวนได้ในดินอย่างต่อเนื่องทั้งในดินชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสามารถดำรงชีวิตอยู่รอดได้ในดินเป็นเวลามากกว่า 24 วัน และมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนได้ ดังนั้นหากต้องการนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมาใช้เพิ่มธาตุอาหารในดินที่เสื่อมสภาพให้ได้ผลอย่างรวดเร็ว ควรมีการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 9-12 วัน เพื่อให้เกิดการตรึงไนโตรเจนได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสังเกตได้จากผลการทดลองของตัวอย่างดินชุดที่ 2 และหลังจากนั้นไม่จำเป็นต้องเติมหัวเชื้อแบคทีเรียลงในดิน เนื่องจากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะสามารถปรับตัวเพิ่มจำนวนและมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนได้เพิ่มขึ้น ดังผลการทดลองในดินชุดที่ 1



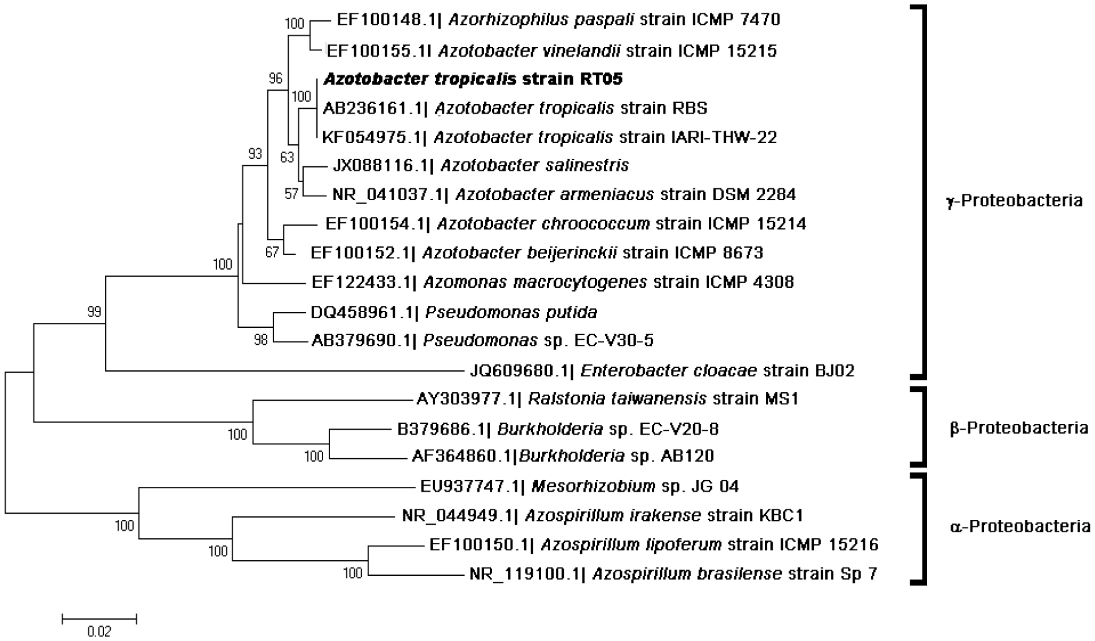
ภาพที่ 6 ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในดินที่เติมหัวเชื้อเพียงครั้งเดียว (ชุดที่ 1) เปรียบเทียบกับการเติมหัวเชื้อทุกๆ 3 วัน (ชุดที่ 2) และชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อ

การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการและจำแนกสายพันธุ์โดยยีน 16S rDNA

ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการ พบว่า RT05 สามารถเจริญใน deep glucose agar บริเวณด้านบนของหลอด แสดงให้เห็นว่าเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobe) สามารถสร้างเอนไซม์ คะตาเลส เอนไซม์ออกซิเดส และใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน ไม่สามารถสร้างกรดอินทรีย์และไม่พบการผลิตอะซีโตอินสามารถเคลื่อนที่ และสร้างอินโดลจากทริปโตเฟน สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และซูโครส แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA โดยใช้โปรแกรม BLAST และนำข้อมูลมาเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ RT05 ความยาว 1,354 เบส มีความคล้ายคลึง 100% กับเชื้อ *A. tropicalis* (ascession no. AB236161) ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนในการศึกษานี้ คือ *A. tropicalis* สายพันธุ์ RT05 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของสายพันธุ์ RT05 มาสร้างแผนภูมิพันธุกรรมกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มต่างๆ ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนได้ จากภาพที่ 7 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. tropicalis* สายพันธุ์ RT05 จัดอยู่ในกลุ่ม Gamma Proteobacteria ในแฟมิลี *Azotobacteriaceae* โดยมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในจีนัส *Pseudomonas, Azorhizophilus* และ *Azomonas* เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Aquilantia และคณะ [30] ที่คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระจากตัวอย่างดิน ซึ่งพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่จัดอยู่ในแฟมิลี *Azotobacteriaceae* นอกจากนี้ Aquilantia และคณะ [31] ยังได้นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาจัดจำแนกโดยใช้ 16S rRNA gene-based fingerprinting พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกคือแบคทีเรียในจีนัส *Azotobacter*

ตารางที่ 1 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการของ RT05

Catalase	Oxidase	MR	VP	Citrate utilization	Motility	Indole test	Glucose utilization	Lactose utilization	Sucrose utilization
+	+	-	-	+	+	+	+	-	+


100
EF100148.1| Azorhizophilus paspali strain ICMP 7470
EF100155.1| Azotobacter vinelandii strain ICMP 15215
96
Azotobacter tropicalis strain RT05
100
AB236161.1| Azotobacter tropicalis strain RBS
KF054975.1| Azotobacter tropicalis strain IARI-THW-22
93
63
JX088116.1| Azotobacter salinestris
57
NR_041037.1| Azotobacter armeniacus strain DSM 2284
EF100154.1| Azotobacter chroococcum strain ICMP 15214
67
EF100152.1| Azotobacter beijerinckii strain ICMP 8673
100
EF122433.1| Azomonas macrocytogenes strain ICMP 4308
99
DQ458961.1| Pseudomonas putida
98
AB379690.1| Pseudomonas sp. EC-V30-5
JQ609680.1| Enterobacter cloacae strain BJ02
AY303977.1| Ralstonia taiwanensis strain MS1
100
B379686.1| Burkholderia sp. EC-V20-8
100
AF364860.1|Burkholderia sp. AB120
EU937747.1| Mesorhizobium sp. JG 04
100
NR_044949.1| Azospirillum irakense strain KBC1
100
EF100150.1| Azospirillum lipoferum strain ICMP 15216
100
NR_119100.1| Azospirillum brasilense strain Sp 7
γ-Proteobacteria
β-Proteobacteria
α-Proteobacteria
0.02

ภาพที่ 7 แผนภูมิพันธุกรรมของ *Azotobacter tropicalis* สายพันธุ์ RT05 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในดินสายพันธุ์ต่างๆ

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระโดยใช้ Azotobacter agar พบโคโลนีของแบคทีเรียเป็นเมือก สีขาวขุ่น เซลล์เป็นรูปไข่ แกรมลบ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระและการเจริญใน N_2-free medium พบว่า RT05 มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระในดินโดย RT05 แสดงให้เห็นว่าการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเพียงครั้งเดียว ให้ประสิทธิภาพการเพิ่มธาตุอาหารในดินได้แตกต่างจากการเติมเป็นระยะๆ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนได้สูงสุด 3.82 และ 3.32 mg/L ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจนและแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในดินของแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 เมื่อนำ RT05 มาจำแนกสายพันธุ์พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *A. tropicalis* จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ สามารถคัดแยกได้จากดิน แบคทีเรียดังกล่าว สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและมีความเป็นไปได้ในการนำมาผลิตเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในการเพิ่มธาตุอาหารและปริมาณจุลินทรีย์ในดิน รวมทั้งปัจจัยทางกายภาพของดินและเนื้อดินมีคุณสมบัติดีขึ้นด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณงบประมาณสนับสนุนการวิจัยส่วนหนึ่งจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี และงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2558

เอกสารอ้างอิง

1. Windinga, A., Hund-Rinkeb K. and Rutgers, M. 2005. The Use of Microorganisms in Ecological Soil Classification and Assessment Concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 62: 230-248.
2. Hiltbrunner, D., Schulze, S., Hagedorn, F., Schmidt, M. W. I., and Zimmmermann, S. 2012. Cattle Trampling Alters Soil Properties and Changes Soil Microbial Communities in a Swiss Sub-Alpine Pasture. *Geoderma.* 170: 369-377.
3. Beare, M. H., Vikram, R. M., Tian, G., and Srivastava, S. C. 1996. Agricultural Intensification, Soil Biodiversity and Agroecosystem Function in the Tropics: The Role of Decomposer Biota. *Applied Soil Ecology.* 6: 87-108.
4. Lauer, F., Kösters, R., Preez, C. C., and Amelung, W. 2010. A Microbial Residues as Indicators of Soil Restoration in South African Secondary Pastures. *Soil Biology & Biochemistry.* 43: 787-794.
5. Chen, W. C., Yen, J. H., Chang, C. S., and Wang, Y. S. 2008. Effects of Herbicide Butachlor on Soil Microorganisms and on Nitrogen-Fixing Abilities in Paddy Soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 72: 120-127.
6. Blagodatskaya, E., and Kuzyakov, Y. 2013. Active Microorganisms in Soil: Critical Review of Estimation Criteria and Approaches. *Soil Biology & Biochemistry.* 67: 192-211.
7. Leaungvutiviroja, C., Piriyaprin, S., Limtong P., and Sasaki, K. 2010. Relationships between Soil Microorganisms and Nutrient Contents of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash and *Vetiveria nemoralis* (A.) Camus in some Problem Soils from Thailand. *Applied Soil Ecology.* 46: 95-102
8. Cauwenberghea, J. V., Verstraetea, B., Lemairea, B., Lievens, B., Michielsb, J., and Honnaya, O. 2014. Population Structure of Root Nodulating *Rhizobium leguminosarum* in *Vicia cracca* Populations at Local to Regional Geographic Scales. *Systematic and Applied Microbiology.* 37: 613-621.
9. Pedraza, R. O. 2008. Recent Advances in Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* 125: 25-35.

10. Kavadia, A., Vayenas, D. V., Pavlou S., and Aggelisa, G. 2007. Dynamics of Free-Living Nitrogen-Fixing Bacterial Populations in Antagonistic Conditions. *Ecological Modelling.* 200: 243-253.
11. Moreno, J., and Vargas-Garcfa, C. 1995. Growth and Nitrogenase Activity of *Azotobacter vilendii* in Chemically Defined Media Containing Glucose and *p*-Hydroxybenzoic acid. *Chemosphere.* 31(2): 2605-2610.
12. Redmile-Gordon, M. A., Brookes, P. C., Evershed, R. P., Goulding, K. W. T., and Hirsch, P. R. 1997. Measuring the Soil-Microbial Interface: Extraction of Extracellular Polymeric Substances (EPS) from Soil Biofilms. *Applied Soil Ecology.* 6: 3-16.
13. Welch, S. A., Barker, W. W., and Banfield, J. F. 1999. Microbial Extracellular Polysaccharides and Plagioclase Dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 63(9): 1405-1419.
14. More, T. T., Yadav J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. 2014. Microbial Extracellular Polysaccharides and Plagioclase Dissolution Extracellular Polymeric Substances of Bacteria and Their Potential Environmental Applications. *Journal of Environmental Management.* 144: 1-25.
15. Looijesteijn, P. J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., and Hugenholtz, J. 2001. Physiological Function of Exopolysaccharides Produced by *Lactococcus lactis. International Journal of Food Microbiology.* 64: 71-80.
16. Dhevendaran, K., Preetha G., and Vedha Hari, N. B. 2013. Studies on Nitrogen Fixing Bacteria and their Application on the Growth of Seedling of *Ocimum sanctum. Pharmacognosy Journal.* 5: 60-65.
17. Giller, K. E., Beare, M. H., Lavelle, P., Izac, A. M. N., and Swift, M. J. 1997. Agricultural Intensification, Soil Biodiversity and Agroecosystem Function. *Applied Soil Ecology.* 6: 3-16.
18. Atlas, R. M. 1993. Handbook of Microbiology Media. 2nd edition. Boca Raton, Florida. CRC Press.
19. Cappuccino, J. C., and Sherman, N. 1992. In: Microbiology: A Laboratory Manual, Third edition. New York. Benjamin/cummings Pub. Co. p. 125-179.
20. APHA, AWWA and WPCF. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th edition. Washington D.C. American Public Health Association.
21. Prem, S. M. 1998. Introductory Statistics. Third edition. New York. John wiley and Sons, Inc. p. 607-622.
22. Tchan, Y. T. 1984. Azotobacteriaceae. In: Krieg, N. R., and Host, J. G., editors. Bergey's Manualof Systematic Bacteriology, vol. 1. New York, Land LC. Springer-Verlag. p. 219-234.

23. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., editors. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Chichester. John Wiley and Sons, Inc. p. 371-375.
24. Gauri S. S., Mandal, M. S., Mondal, C. K., Dey, S., and Pati, R. B. 2009. Enhanced Production and Partial Characterization of an Extracellular Polysaccharide from Newly isolated Azotobacter sp. SSB81. *Bioresource Technology.* 100: 4240-4243.
25. Chennappa, G., Adkar-Purushothama, C. R., Suraj, U., Tamilvendan, K., and Sreenivasa, M. Y. 1999. Pesticide Tolerant *Azotobacter* Isolates from Paddy Growing Areas of Northern Karnataka, India. *World Journal of Microbiolology and Biotechnology.* 30: 1-7.
26. Abdel-Aziez, M. S., Eweda, E. W., Girgis, M. G. Z., and Abdel Ghany, F. B. 2014. Improving the Productivity and Quality of Black Cumin (Nigella sativa) by Using *Azotobacter* as N_2 Biofertilizer. *Annals of Agricultural Science.* 59(1): 95-108
27. Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. 2008. Screening of Free-Living Rhizospheric Bacteria for Their Multiple Plant Growth Promoting Activities. *Microbiological Research.* 163: 171-181.
28. Sharma, D. S., Kumar, P., Raj, H., and Bhardwaj K. S. 2009. Isolation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Azotobacter chroococcum* from Local Litchi Orchards and Evaluation of Their Activity in the Air-Layers System. *Scientia Horticulturae.* 123: 117-123.
29. Pesakovic, M., Karaklajic-Stajic, Z., Milenkovic, S., and Mitrovic, O. 2012. Biofertilizer Affecting Yield Related Characteristics of Strawberry (Fragaria × ananassa Duch.) and Soil Micro-organisms. *Scientia Horticulturae.* 150: 238-243.
30. Aquilantia, L., Favillib, F., and Clementia, F. 2004. Comparison of Different Srategies for Isolation and Preliminary Identification of *Azotobacter* from Soil Samples. *Soil Biology & Biochemistry.* 36: 1475-1483.
31. Aquilantia, L., Mannazzua, I., Papaa, R., Cavalcab, L., and Clementi, F. 2004. Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis for the Characterization of Azotobacteraceae: A Contribution to the Study of These Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria. *Journal of Microbiological Methods.* 57: 197-206.

ได้รับบทความวันที่ 9 มีนาคม 2558
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 23 เมษายน 2558