การศึกษาประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum brasilense* และ *A. lipoferum*

The Study on the Effectiveness of Carbon Sources for the Culturing of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*

อรุณี คงสอน[1] และธงชัย มาลา[1]

Arunee Kongsorn[1] and Thongchai Mala[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* เพื่อใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้ กลูโคส ซูโครส กรดมาลิก และกรดซักซินิก ปริมาณ 1, 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ในอาหาร MPSS เป็นแหล่งคาร์บอน ศึกษาในสภาพอาหารแข็ง และอาหารเหลวที่ไม่มีไนโตรเจนอนินทรีย์ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารเหลวที่มีกลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 12 ชั่วโมง มีการสร้างแคปซูลรูปไข่ ส่วนอาหารที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนมีการสร้างแคปซูลรูปไข่ที่อายุ 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเหลว พบว่า *A. brasilense* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เซลล์มีลักษณะ บิดเป็นเกลียว เส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ประมาณ 0.5 ไมโครเมตร และไม่เจริญเติบโตในอาหารที่มีกลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนเชื้อ *A. lipoferum* ไม่พบการสร้างแคปซูล และมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดในอาหารเหลวที่มีกรดซักซินิกเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ประมาณ 1.0 ไมโครเมตร การใช้กรดมาลิก 20 กรัมต่อลิตร จะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* มากที่สุด และการใช้กรดซักซินิกในอัตรา 20 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferum* มากที่สุด การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนอาจแยกเชื้อทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้

คำสำคัญ : การแยกเชื้อบริสุทธิ์ แหล่งคาร์บอน อะโซสไปริลลัม

ABSTRACT

The efficiency of carbon sources for the culturing of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* was studied for its isolation. The carbon sources consisted of glucose, sucrose, malic acid and succinic acid in the amount of 1, 5, 10 and 20 g/l of MPSS medium. The study was done both in solid and broth nitrogen free medium. The result showed that *A. brasilense* in glucose and sucrose containing broth at 12 hr produced oval capsule, while that in malic acid containing broth were produced at 48 hr. The growth of *A. brasilense* was the highest in 20 g/l of malic acid containing broth. The cell speared in

[1] ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Soil Scinence, Faculty of Agriculture at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

spiral with 0.5 μm in diameter and can not grow in glucose and sucrose containing solid medium. The capsule was not found in the culturing of *A. lipoferum*. The highest growth rate was found in 20 g/l succinic acid containing broth. The cell still appeared in rod shape with 1.0 μm approximately in diameter. Twenty gram per liter of malic acid in nitrogen free medium was the most suitable for growth of *A. brasilense* and succinic acid in the same quantity was the most suitable for *A. lipoferum*. The use of glucose as sole carbon source in nitrogen free medium may separate both species from together.

Keywords : azospirillum, carbon source, isolation of pure culture

E-mail : **akongsorn@hotmail.com**

คำนำ

อะโซสไปริลลัม (azospirillum) เป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จากบรรยากาศ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการให้ผลผลิตของพืช เช่น เมล็ด พืชอาหารสัตว์ ถั่ว และมะเขือเทศ (Okon, 1993) นอกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้ว อะโซสไปริลลัม ยังสามารถสร้างฮอร์โมนส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ Akbari *et al*. (2007) รายงานว่าฮอร์โมน IAA ที่ผลิตโดยเชื้ออะโซสไปริลลัม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากข้าวสาลี ที่ปลูกด้วยเมล็ด โดยการใส่เชื้อดังกล่าวมีผลทำให้ความยาวราก น้ำหนักแห้งของราก และขนรากเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Maria *et al*., 2002 ที่ทดสอบกับข้าวสาลีโดยการใส่เชื้อ *A. brasilense* พบว่ามวลชีวภาพ ผลผลิต และความเข้มข้นของไนโตรเจน สูงกว่าการไม่ใส่เชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. brasilense* ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลีโดยกระตุ้นการดูดใช้ไนโตรเจนโดยราก พืช C_4 เช่น ข้าวโพด อ้อย จะเป็นพืชอาศัยของ *A. lipoferum* มากกว่า *A. brasilense* ที่พบอาศัยอยู่ร่วมกับพืช C_3 เช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ซึ่งความสามารถในด้านต่าง ๆ ของเชื้อนั้นจำเป็นต้องมีการคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมตรงตามวัตถุประสงค์ของงาน

A. brasilense และ *A. lipoferum* มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน และเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นของทั้งสองชนิด (Martinez *et al*., 1984) เมื่อพิจารณาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันของอะโซสไปริลลัมพบว่า *A. lipoferum* ใช้ กลูโคส กลีเซอรอล แมนนิทอล และซอบิทอล เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ส่วน *A. brasilense* ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน *A. amazonense* ใช้ กลูโคส และ ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน *A. halopraeferens* ใช้กลีเซอรอล และ แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน และ *A. irakense* ใช้กลูโคส เพกติน และ ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Okon, 1993) งานวิจัยของ Loh *et al*. (1984) พบว่า *A. brasilense* Sp7 เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหาร AZO ที่ลดความเข้มข้นของไนโตรเจน และซักซิเนตที่เป็นแหล่งของคาร์บอนลง และไม่เจริญเติบโตในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในทางตรงกันข้าม *A. lipoferum* Sp59b สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีซักซิเนต หรือกลูโคส ผสมอยู่ อีกทั้ง *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* และ *A. irakense* มีลักษณะของ pleomorphic cell แต่ลักษณะนี้ไม่พบใน *A. brasilense* ความสามารถในการรีดิวซ์ NO_3^- เป็น NO_2^- พบใน *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* และ *A. iraken* แต่ความสามารถในการรีดิวซ์ NO_2^- ไปเป็น N_2O นั้นพบเฉพาะใน *A. lipoferum A. brasilense* และ *A. halopraeferens* เท่านั้น (Alef and Nannipieri, 1995)

Brenner and Staley (2005) รายงานว่า *A. lipoferum* และ *A. brasilense* จะแสดงลักษณะของแคปซูลเมื่ออยู่ในสภาพที่สูญเสียน้ำ และอุณหภูมิไม่เหมาะสมในสภาพขาดแคลนอาหาร ปัจจุบันนี้มีอาหารไม่กี่สูตรที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ได้แก่ สูตรของ Okon, Dobereiner, MPSS และ BMS สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถแยกชนิดของเชื้ออะโซสไปริลลัมออกจากกันอย่างชัดเจนนัก จึงต้องอาศัยความแตกต่างของการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ เพื่อพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสม ซึ่งเป็นหนทางที่น่าสนใจและพัฒนาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 4 x 4 factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 แหล่งคาร์บอน มี 4 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส กรดมาลิก และกรดซักซินิก ปัจจัยที่ 2 ปริมาณของแหล่งคาร์บอน มี 4 ระดับ คือ 1, 5, 10 และ 20 กรัม/ลิตร โดยทำการศึกษาในอาหารแข็ง และอาหารเหลวที่ไม่มีไนโตรเจนอนินทรีย์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบคือสูตร MPSS (modified peptone succinate salts medium :Martin *et al*., 2006) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ Peptone 5.0 กรัม/ลิตร, Succinic acid (free acid) 1.0 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัม/ลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 1.0 กรัม/ลิตร $FeCl_3.6H_2O$ 0.002 กรัม/ลิตร $MnSO_4.H_2O$ 0.002 กรัม/ลิตร และปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย KOH ดัดแปลงสูตรอาหารโดยใช้ กลูโคส ซูโครส กรดมาลิก และกรดซักซินิก ปริมาณ 1, 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารสูตร MPSS

3. ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง และสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา

เพาะเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ที่ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน บนอาหารแข็ง MPSS ดัดแปลง ภายหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกลักษณะของโคโลนีที่พบ คือ ขนาด รูปร่าง สี ระดับและผิวหน้าของโคโลนี ขอบ และการยอมให้แสงผ่านได้ ศึกษาสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยการย้อมแกรมตามวิธีการของ Davies *et al.* (1983) การสร้างแคปซูลตามวิธีการของ Anthony and Jr (1931) ตรวจดูชนิดของแฟลกเจลลา ตามวิธีการของ Washington *et al*. (2005)

4. ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเหลว

เตรียมกล้าเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ในอาหารเหลวสูตร MPSS ให้อากาศโดยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยงเอาเฉพาะเซลล์ ล้างเซลล์ด้วย 0.85 % NaCl ดูดเซลล์ 1 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 150 มิลลิลิตร ให้อากาศโดยการใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดค่า optical density (OD) ทุก 6 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เชื้อดูดกลืนได้สูงที่สุด ควบคู่ไปกับการตรวจดูปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต (log_{10} ของปริมาณเซลล์) โดยวิธีการ dilution plating method และศึกษาสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยการ

ย้อมแกรมตามวิธีการของ Davies *et al.* (1983) การสร้างแคปซูลตามวิธีการของ Anthony and Jr (1931) ตรวจดูชนิดของแฟลกเจลลาตามวิธีการของ Washington *et al.* (2005)

5. วิเคราะห์ข้อมูล

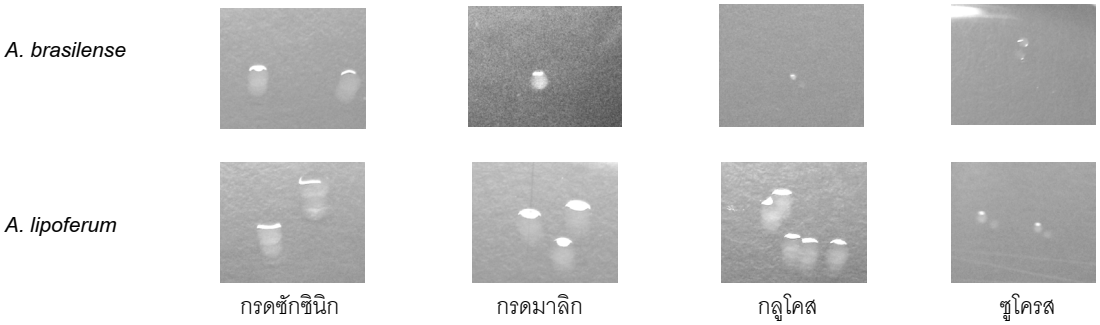
วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการของ Duncan ' s new multiple range test (DMRT)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะและสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการของเชื้ออะโซสไปริลลัม

A. brasilense สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารแข็งที่มี กรดมาลิก และกรดซักซินิก เป็นแหล่งคาร์บอน แต่เจริญเติบโตได้ไม่ดีในอาหารที่มี กลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งที่มี กรดมาลิก และกรดซักซินิก เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีขนาดใหญ่เนื่องจากเจริญเติบโตได้รวดเร็ว โคโลนีมีลักษณะ กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมันวาว ผิวหน้านูน ขนาดของโคโลนีเฉลี่ย 1.5-2.5 มิลลิเมตร ที่อายุ 72 ชั่วโมง ในขณะที่โคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มีกลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน มีขนาดเฉลี่ยเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร มีลักษณะ กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมันวาว แต่ผิวหน้านูนต่ำเนื่องจากเจริญเติบโตได้ช้า (ภาพที่ 1) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าขนาดโคโลนีของ *A. brasilense* มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์ของเชื้อ *A. brasilense* ที่เจริญในอาหารดัดแปลงสูตรต่าง ๆ พบว่าเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารที่มี กรดมาลิก และกรดซักซินิก เป็นแหล่งคาร์บอน ติดสีแกรมลบ เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง โค้งเล็กน้อย เซลล์มีขนาด 0.8-1.0 ไมโครเมตร (ภาพที่ 2) และยังพบอีกว่ามีการสร้าง polar flagellum เส้นเดียว เมื่อตรวจสอบที่ระยะ 72 ชั่วโมง อาหารที่มี กลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน ขนาดของเซลล์ค่อนข้างเล็กกว่า มีขนาด 0.5-0.8 ไมโครเมตร มีการสร้าง polar flagellum เส้นเดียว เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. brasilense และ A. lipoferum* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

A. lipoferum เจริญเติบโตได้ดีในอาหารดัดแปลงที่มี กรดมาลิก กรดซักซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนอาหารที่มี ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นเจริญเติบโตได้ไม่ดี โคโลนีของเชื้อบนอาหารที่มี กรดมาลิก กรดซักซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนมีลักษณะ กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่นเป็นมันวาว ผิวหน้านูนสูง โคโลนีมีขนาดใหญ่ ขนาด 2.0-3.0 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างจากโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน มี

ขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร ลักษณะทั่วไปคล้ายคลึงกับที่เจริญบนอาหารที่มี กรดมาลิก กรดซักซินิก และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน และผิวหน้าของโคโลนีจะนูนต่ำ (ภาพที่ 1) ซึ่งเห็นได้ว่าแหล่งของคาร์บอนมีผลต่อขนาดของโคโลนี (ตารางที่ 1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์ติดสีแกรมลบ เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง (vibriod) ขนาด 1.0-1.4 ไมโครเมตร มีการสร้าง polar flagellum เส้นเดียวเช่นเดียวกับ *A. brasilense* (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ขนาดโคโลนีของเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* บนอาหารดัดแปลง

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C)	ขนาดโคโลนี *A. brasilense* (มม.) ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร)				เฉลี่ย	ขนาดโคโลนี *A. lipoferum* (มม.) ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V, กรัม/ลิตร)				เฉลี่ย
	1	5	10	20		1	5	10	20	
กรดมาลิก	1.75	1.50	1.75	1.50	1.62a	1.25*ab*	2.25*bcd*	2.75*bcd*	2.00*bcd*	2.06a
กรดซักซินิก	1.75	2.25	1.75	1.50	1.81a	2.75*d*	2.00*abc*	2.00*ab*	2.00*bcd*	2.18a
กลูโคส	0.45	0.45	0.50	0.50	0.48b	2.75*ab*	2.00*bcd*	1.50*cd*	3.00*a*	2.31a
ซูโครส	0.45	0.45	0.45	0.50	0.46b	0.45*c*	0.45*c*	0.45*c*	0.50*c*	0.46b
เฉลี่ย	1.10	1.16	1.11	1.00		1.80	1.68	1.68	1.88	
F-test ; C	*					*				
; V	ns					ns				
; C x V	ns					*				
% CV	11.09					9.18				

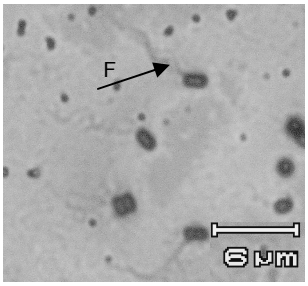
หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

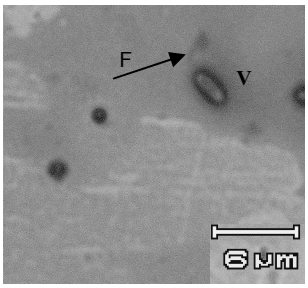
_/ หมายถึง การเปรียบเทียบความแตกต่างในกลุ่มข้อมูลที่มีปฏิสัมพันธ์กัน

2. การเจริญของเชื้ออะโซสไปริลลัมในอาหารเหลวดัดแปลง

A. brasilense เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตรที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ในอาหารสูตรที่มี กลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อเจริญเติบโตได้น้อยมาก ซึ่ง Guixiang *et al.* (2006) รายงานไว้ว่า *A. brasilense* ไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ยังมีความแปรปรวนในบางสายพันธุ์ที่สามารถใช้กลูโคสได้เล็กน้อย ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าเชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้เล็กน้อย แสดงให้เห็นว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *A. brasilense* (ภาพที่ 3) เมื่อพิจารณาค่า $\log_{10}$ ของปริมาณเซลล์ที่อายุ 24 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ กรดมาลิก ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร มีเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกับการใช้กรดมาลิก 20 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1)



A. brasilense



A. lipoferum

ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของเชื้อ *A. brasilense และ A. lipoferum* (F คือ polar flagellum, V คือ vibriod)

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารเหลวที่มีกลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อายุ 12 ชั่วโมง มีการสร้างแคปซูลรูปไข่ ส่วนอาหารที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนมีการสร้างแคปซูลรูปไข่ที่อายุ 48 ชั่วโมง ซึ่งการสร้างแคปซูลเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส หรือการขาดแคลนแหล่งอาหาร เป็นต้น (Mulyukin *et al*., 2009)

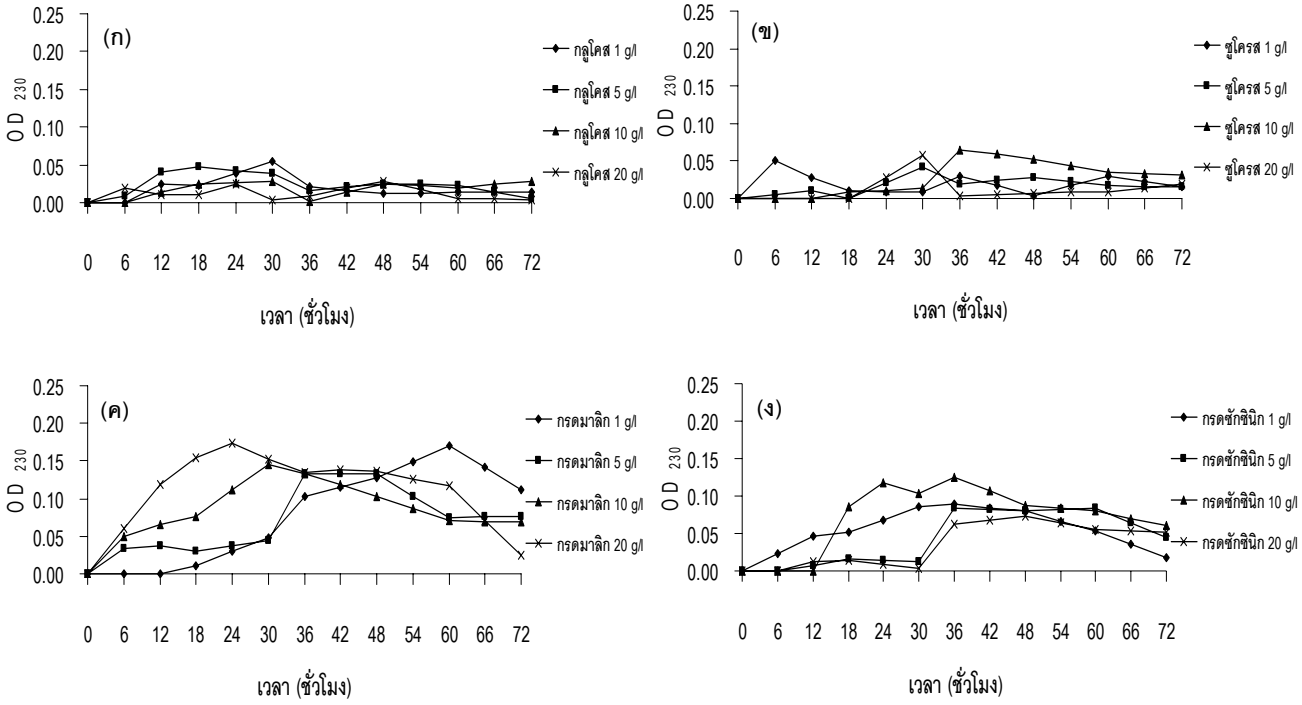
ตารางที่ 2 ค่า $\log_{10}$ ของปริมาณเซลล์ของเชื้อ *A. brasilense* และ *A. lipoferum* ในอาหารเหลวดัดแปลงที่อายุ 24 ชั่วโมง

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (C)	*A. brasilense*				เฉลี่ย	*A. lipoferum*				เฉลี่ย
	ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V กรัม/ลิตร)					ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (V กรัม/ลิตร)				
	1	5	10	20		1	5	10	20	
กรดมาลิก	8.32*a*	5.59*c*	8.29*a*	8.14*a*	7.66a	8.41	9.88	9.36	9.52	9.29a
กรดซักซินิก	7.14*b*	5.90*c*	5.80*c*	5.90*c*	6.20a	8.32	8.43	7.37	7.41	7.88b
กลูโคส	0.60*d*	0.30*d*	0.30*d*	0.554*d*	0.49b	6.41	6.41	6.28	7.27	6.59b
ซูโครส	0.54*d*	0.50*d*	0.78*d*	0.74*d*	0.34b	1.39	1.43	1.10	1.39	1.32c
เฉลี่ย	4.15a	3.84b	3.79b	3.21c		6.13	6.53	6.02	6.39	
F-test ; C	*					*				
; V	*					ns				
; C x V	*					ns				
% CV	15.72					25.67				

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

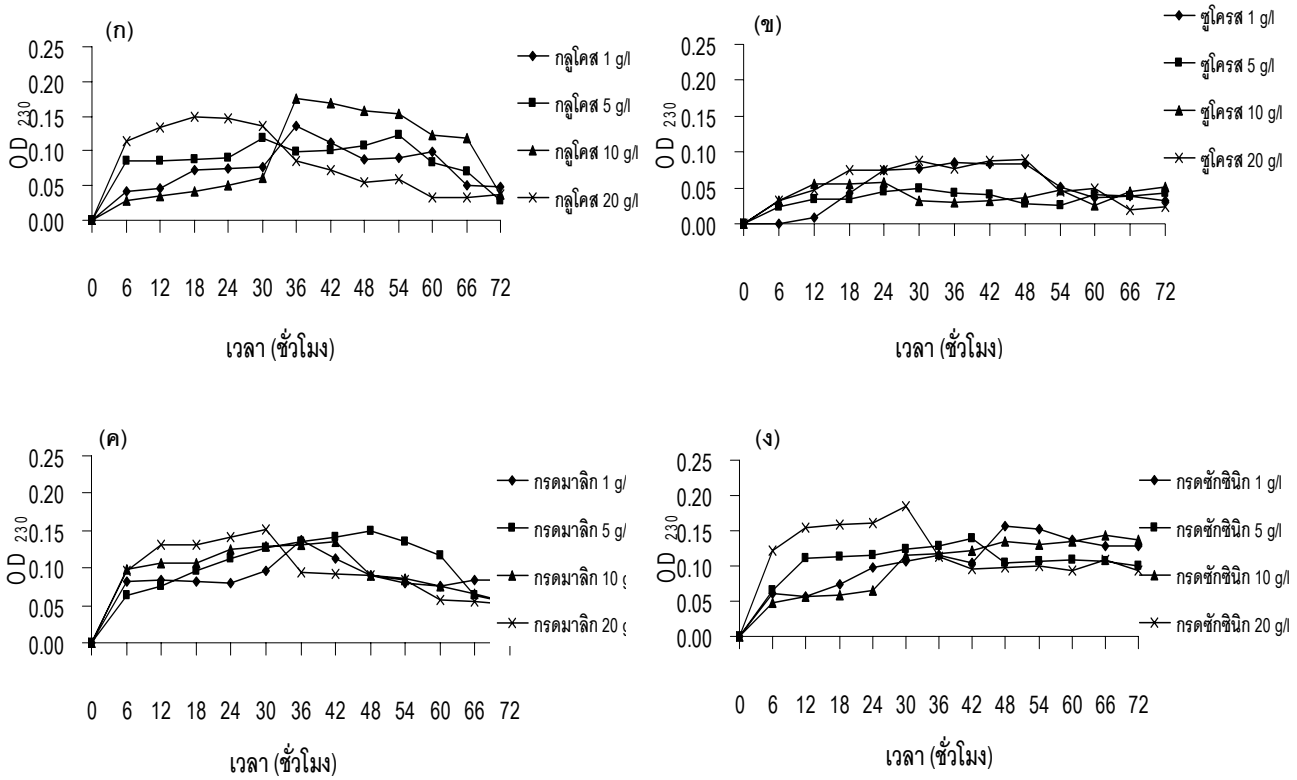
* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

_/ หมายถึง การเปรียบเทียบความแตกต่างในกลุ่มข้อมูลที่มีปฏิสัมพันธ์กัน



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brasilense* ในอาหารดัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกลูโคส (ก) ซูโครส (ข) กรดมาลิก (ค) และ กรดซักซินิก (ง) เป็นแหล่งคาร์บอน

การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารเหลวเจริญเติบโตได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดซักซินิก ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในอาหาร ที่มีกลูโคส และซูโครส ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังเห็นได้ชัดเจนว่าในอาหารสูตรที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อค่อนข้างต่ำ (ภาพที่ 4) แต่เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่อายุ 24 ชั่วโมง จะเห็นว่า กรดมาลิก 1,10 และ 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lipoferum* ในอาหารดัดแปลงสูตรต่าง ๆ ที่มีกลูโคส (ก) ซูโครส (ข) กรดมาลิก (ค) และกรดซักซินิก (ง) เป็นแหล่งคาร์บอน

สรุปและเสนอแนะ

การเจริญเติบโตของเชื้อ *A.brasilense* ในอาหารเหลวดัดแปลง พบว่าการใช้กรดมาลิก 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเติบโตดีที่สุด แต่เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่อายุ 24 ชั่วโมง จะเห็นว่า กรดมาลิก 1,10 และ 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างกัน ส่วนเชื้อ *A.lipoferum* สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดในอาหารเหลวที่มีกรดซักซินิก 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในอาหาร ที่มีกลูโคส และซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่อายุ 24 ชั่วโมง ก็ให้ผลไปในแนวทางเดียวกับการเจริญเติบโตในอาหารเหลว การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารปลอดไนโตรเจน อาจใช้เป็นเครื่องมือในการแยกเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้ เนื่องจาก *A. brasilense* มีการเจริญเติบโตในกลูโคสได้ต่ำมาก ตรงข้ามกับ *A. lipoferum* ที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้รวดเร็ว อย่างไรก็ตามงานทดลองนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาสูตรอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดได้อย่างชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

Akbari, A. G., S. M. Arab, H. A. Alikhani, I. Allahdadi and M.H. Arzanesh. 2007. **Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots**. World J. Agri. Sci. 3 (4): 523-529.

Alef K. and P. Nanninpieri. 1995. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. Harcourt Brace & Cimpany. 576 p.

Anthony, E. E. Jr. 1931. **A note on capsule staining**. Science (New Series) 73(1890):319–320.

Brenner D. J. and J. T. Staley. 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer. Vol. 2. 1390 p.

Davies, J.A., G.K. Anderson, T.J. Beveridge and H.C. Clark. 1983. **Chemical mechanism of the Gram stain and synthesis of a new electron-opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain**. J. Bacteriol. 156 (2): 837–845.

Guixiang, P., H. Wang, G. Zhang, W. Hou, Y. Liu,E.T. Wang and Z. Tan. 2006. ***Azospirillum mmelinis* sp.nov., agroup of diazotrophs isolated from tropical molasses grass**. J. Sys. Evol. Microbiol. 56:1263-1271.

Loh, W. H.-T., C. I. Randles, W. R. Sharp, and R. H. Miller. 1984. **Intermediary carbon metabolism of *Azospirillum brasilense***. J. Bacteriol. 264-268.

Maria, I. S, N. Fatta and A. J. Barneix. 2002. **The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants**. Plant and Soil 245: 215–222.

Martinez-Drets, G., M. del Gallo, C. L. Burpee, and R. H. Burris. 1984. **Catabolism of carbohydrates and organic acids by the azospirilla**. J. Bacteriol. 159:80-85.

Martin, D., S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleife and E. Stackebrandt. 2006. **The Prokaryotes: Proteobacteria: alpha and beta subclasses**. Springer. 919 p.

Mulyukin, A. L., N. E. Suzina, A. Yu. Pogorelova, L. P. Antonyuk, V. I. Duda and G. I. El-Registan. 2009. **Diverse Morphological Types of Dormant Cells and Conditions for Their Formation in *Azospirillum brasilense***. Microbiolo. 78(1) : 33-41.

Okon Y. 1993. **Azospirillum/plant associations**. CRC Press. 175 p.

Washington C. W., E. W. Koneman, S D. Allen, W M. Janda, P C. Schreckenberger, G. W. Procop and G. L. Woods. 2005. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Lippincott Williams & Wilkins. 1,565 p.