การเจริญเติบโตของผักกาดหอมที่ถูกกระตุ้นด้วยสารอินโดล-3-แอซีติกแอซิด จากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินแปลงนา

Growth of Lettuce Stimulated by Indole-3-Acetic Acid (IAA) from Cyanobacteria Isolated from Paddy Field Soil

วิภาพร ยงสุวัฒนะ[1] สิรินภา ช่วงโอภาส[1*] และเดือนรัตน์ ชลอุดมกุล[2]

Wipaporn Yongsuwattana[1], Sirinapa Chungopast[1*] and Duenrut Chonudomkul[2]

Received: October 17, 2023
Revised: December 15, 2023
Accepted: December 26, 2023

Abstract: Cyanobacteria possess high capability on producing indole-3-acetic acid (IAA), can be serve as a biostimulant for promoting plant growth. The objective of this research was to isolate and identify cyanobacteria that are effective in producing IAA, as well as to investigate the impact of cyanobacteria on the growth of lettuce. The experiment was started from 1) The isolation of cyanobacteria from 5 paddy fields located in Nakhon Pathom, Kanchanaburi, and Suphanburi Province using a blue-green algae nitrogen-free medium (BGA). 2) Morphological study and identification of cyanobacteria was conducted through molecular biological methods utilizing the 16S rRNA gene and the phylogenic tree. 3) The efficiency on IAA production of cyanobacteria was assessed in BGA medium with and without tryptophan for 7, 14, 21, and 28 days. 4) The efficiency of cyanobacteria on growth promoting of lettuce was evaluated in greenhouse. The most effective IAA producer was selected for pot experiment. The experiment was completely randomize design (CRD) consisted of 4 treatments with 5 replicates each: T1 control with no fertilizer, T2 100% chemical fertilizer, T3 50% chemical fertilizer and cyanobacteria, and T4 only cyanobacteria. The results revealed that a total of 10 cyanobacteria isolates produced IAA in the range of 0.57 to 1.55 μg/ml. The *Nostoc* sp. (TL02) exhibited the highest IAA production of 1.55 μg/ml at 21 days in BGA with tryptophan. In the greenhouse experiment, using a 50% chemical fertilizer and cyanobacteria (TL02), there were no significant differences in plant height, fresh weight, and dry weight among the 3 lettuce varieties. However, the root length of the Green Cos variety showed a statistically significant difference at 11.00 cm. The highest dry weights for green oak, Green Cos, and Butterhead roots were 3.44 g, 10.64 g, and 3.84 g, respectively. This indicated that *Nostoc* sp. effectively enhanced the growth of lettuce roots, likely through IAA production. It can be used as a biofertilizer together with chemical fertilizers.

Keywords: cyanobacteria, indole-3-acetic acid, lettuce

---

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

[1] Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

[2] Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bang Khen Campus, Bangkok, 10900, Thailand

*Corresponding author: agrsrnp@ku.ac.th

บทคัดย่อ: ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกและจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตฮอร์โมน IAA รวมทั้งศึกษาผลของไซยาโนแบคทีเรียที่มีต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม การศึกษาเริ่มจาก 1) คัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากดินแปลงนาจำนวน 5 แปลง ในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรีและสุพรรณบุรี โดยใช้อาหาร blue-green algae nitrogen-free medium (BGA) 2) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจัดจำแนกชนิดไซยาโนแบคทีเรีย ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยใช้ยีน 16S rRNA และการทำแผนภูมิต้นไม้ 3) ทดสอบประสิทธิภาพการผลิต IAA ในอาหาร BGA ที่มีการเติมและไม่เติมกรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วยเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต 4) ทดสอบประสิทธิภาพของไซยาโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ประสิทธิภาพการผลิต IAA ที่สูง ถูกคัดเลือกมาทดสอบในกระถาง มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 4 ตำรับการทดลอง จำนวน 5 ซ้ำ คือ ตำรับที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย (control), ตำรับที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมี 100 เปอร์เซ็นต์ ตำรับที่ 3 ใส่ปุ๋ยเคมี 50 เปอร์เซ็นต์ และไซยาโนแบคทีเรีย และตำรับที่ 4 ใส่เฉพาะไซยาโนแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตสามารถผลิต IAA ได้แตกต่างกัน (0.57 - 1.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดย *Nostoc* sp. มีการผลิต IAA สูงสุดเท่ากับ 1.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 21 วัน เมื่อเลี้ยงในอาหาร BGA ที่ใส่กรดอะมิโนทริปโตเฟน การใส่ปุ๋ยเคมี 50 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. (TL02) ไม่มีผลทำให้ความสูงต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นในผักกาดหอมทั้ง 3 สายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ ความยาวรากของสายพันธุ์กรีนคอสมีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ (11.00 เซนติเมตร) ขณะที่ น้ำหนักแห้งของรากกรีนโอ๊ค กรีนคอส และบัตเตอร์เฮดมีค่าสูงที่สุดเช่นกัน (3.44, 10.64 และ 3.84 กรัม ตามลำดับ) ดังนั้น *Nostoc* sp. (TL02) ที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมให้รากผักสลัดเจริญเติบโตได้ดีขึ้นโดยกลไกของการผลิตฮอร์โมนพืชและอาจพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพทางเลือกร่วมกับปุ๋ยเคมีได้

คำสำคัญ: ไซยาโนแบคทีเรีย, อินโดล-3-แอซีติก แอซิด, ผักกาดหอม

คำนำ

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เป็นโพรคาริโอตเซลล์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ มีความหลากหลายและกระจายตัวอยู่บนโลกมากที่สุดชนิดหนึ่ง (Stanier and Cohen-Bazire, 1977) มีการนำมาใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น เป็นอาหารคน อาหารสัตว์ การบำบัดน้ำเสีย การผลิตสารสี (pigment) และทางด้านการเกษตรนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ (วิภา, 2561) เนื่องจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น Indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งจัดเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน ซึ่งมีบทบาทส่งเสริมให้รากพืชยืดยาวขึ้น และยังเพิ่มจำนวนขนราก รวมทั้งทำให้พืชมีความสามารถในการดูดใช้ธาตุอาหารได้ดีอีกด้วย (Datta and Basu, 2000) เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์ IAA ของเซลล์นั้นต้องใช้กรดอะมิโนทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น เพื่อควบคุมการสร้างเอ็มบริโอของพืชชั้นสูง (Wang *et al*., 2015) ดังนั้นจึงมีการเติมกรดอะมิโนทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพกับการปลูกข้าวหลายงานวิจัย อานนท์ (2558) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างเฮทเทอโรซีสต์เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับปลูกข้าวพันธุ์ กข 31 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabeana siamensis* S11, *Anabeana volzii* S5, *Calothix* sp. S3 ทำให้ไนโตรเจนในตอซังเพิ่มขึ้น ส่งผลให้

ข้าวแตกกอเพิ่มขึ้น น้ำหนักแห้งในตอซังเพิ่มขึ้น Song *et al.* (2021) ศึกษาการแทนที่ปุ๋ยไนโตรเจนด้วยไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนเพื่อลดการชะล้างไนโตรเจนในนาข้าว พบว่าไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena azotica* (FACHB-119) สามารถลดการใช้ปุ๋ยยูเรียได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และยังช่วยลดการชะล้างไนโตรเจนในดินได้ พืชชนิดอื่นยังมีการศึกษาน้อย โดยเฉพาะในผักกาดหอม ซึ่งมีอายุการเก็บเกี่ยวไม่นาน และมีรายงานว่า มีแคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส ที่เป็นแร่ธาตุส่งเสริมสุขภาพของกระดูก นอกจากนี้ยังมีสารแคโรทีนอยด์ แอนโทไซยานิน ที่มีผลต้านสารอนุมูลอิสระ (Kim *et al.*, 2016) ข้อมูลการผลิตผักกาดหอมของประเทศไทยพบว่าเพิ่มขึ้นจาก 210 ตัน ในปี 2515 เป็น 31,115.63 ตัน ในปี 2564 มีอัตราเติบโตเฉลี่ย 13.50% ต่อปี (Knema team, 2021) ทำให้ผักกาดหอมมีมูลค่าทางเศรษฐกิจมากขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการนำไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช มาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อการผลิตผักกาดหอม

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียจากดินแปลงนา

สุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0-5 เซนติเมตร บริเวณแปลงนาจำนวน 5 แปลง ซึ่งเป็นชุดดินกำแพงแสน ในพื้นที่ของจังหวัดนครปฐม (13.915660 °N, 99.981523 °E) และ จังหวัดกาญจนบุรี (14.057157°N, 99.685750°E) ส่วนชุดดินชัยนาทอยู่ในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี (14.634404°N, 100.085703°E) โดยทำการศึกษา ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2564 -พฤศจิกายน 2565 นำตัวอย่างดินที่เก็บมาทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน (serial dilution) แล้วนำมาแยกเชื้อโดยเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง blue-green algae nitrogen-free medium (BGA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องและมีแสงสว่าง เป็นเวลา 28 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อที่พบทั้งหมดมาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการ streak plate method ลงบนอาหาร BGA อีกครั้ง

การศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยาและการจัดจำแนกชนิดไซยาโนแบคทีเรีย

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและถ่ายภาพลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาแต่ละพื้นที่ โดยนำลูปเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะอาหารเหลวที่ไซยาโนแบคทีเรียเจริญอยู่ แล้วนำมาวางบนแผ่นสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว จากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Olympus CX31, Philippines) ศึกษารูปร่างและลักษณะของไซยาโนแบคทีเรีย นำมาจัดจำแนกชนิดโดยสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใช้ชุดสกัด NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany) ตามคู่มือคำแนะนำการสกัดดีเอ็นเอ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 2010) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยใช้เจลอากาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพร์เมอร์ของยีน 16S rRNA ในการจัดจำแนกแบคทีเรียคือ forward primer: 5'-AGAGTTTGATC-MTGGCTCAG-3' reverse primer: 5'-TACGGY-TACCTTGTTACGACTT-3' (Chandra and Kumar, 2017) และวิเคราะห์ผลลำดับเบสของดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank จากนั้นนำผลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenic tree) โดยใช้โปรแกรม Maga 11 version 6.0 (Tamura *et al.*, 2013)

การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตสาร Indole-3-acetic acid

เลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง BGA แล้วนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว BGA ที่เติมกรดอะมิโนทริปโตเฟน 0.102 กรัมต่อลิตร และไม่เติมกรดอะมิโนทริปโตเฟน นำเชื้อที่ได้ไปบ่มที่มีแสงสว่าง โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเชื้อที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน จากนั้นนำเชื้อที่เจริญแล้วมาปั่นเหวี่ยง

ที่ 50,000 รอบเป็นเวลา 5-10 นาที นำส่วนละลายใสไปวิเคราะห์หาปริมาณ IAA เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน IAA (MW = 175.19) โดยเตรียม IAA ให้มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock solution (ชั่งสาร indole-3-acetic acid 0.01 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปต 4 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 16 มิลลิลิตร) จากนั้นเตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานให้เป็น 0, 2, 4, 6, 8, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้หรือส่วนใสของตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียมา 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติม Salkowski reagent 2 มิลลิลิตร โดยใช้วิธี Salkowski's method (Ehmann, 1977) เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (UV Spectrophotometer Genesys 20, USA)

การทดสอบประสิทธิภาพของไซยาโนแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดหอม

คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลตที่สามารถผลิต IAA ได้ปริมาณมากที่สุด มาทดสอบกับการปลูกผักกาดหอมร่วมกับปุ๋ยเคมี โดยวางแผนทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) 4 ตำรับการทดลอง จำนวน 5 ซ้ำ คือ ตำรับที่1 ไม่ใส่ปุ๋ย (control) ตำรับที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมี 100 เปอร์เซ็นต์ ตำรับที่ 3 ใส่ปุ๋ยเคมี 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรีย และตำรับที่ 4 ใส่เฉพาะไซยาโนแบคทีเรีย ทำการศึกษาด้วยตำรับทดลองแบบเดียวกัน กับผักกาดหอม 3 สายพันธุ์ได้แก่ กรีนโอ๊ค กรีนคอสและบัตเตอร์เฮด โดยย้ายกล้าผักกาดหอมอายุ 2 สัปดาห์ ปลูกในกระถางที่บรรจุดินกำแพงแสนที่มีค่าวิเคราะห์ปฏิกิริยาดินเป็นด่างปานกลาง (7.93) ค่าการนำไฟฟ้า 6.94 เดซิซีเมนต่อเซนติเมตร ปริมาณอินทรียวัตถุต่ำ (0.89 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่ำ (0.09 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณฟอสฟอรัสสูงมาก (222.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ปริมาณโพแทสเซียมสูงมาก (353.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) น้ำหนัก 4 กิโลกรัมต่อกระถาง

เลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว BGA จนเกิดความขุ่นและมีความเข้มข้นของเชื้อไม่น้อยกว่า 108 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ใส่ลงบริเวณรอบต้นผักกาดหอม ในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อต้น เมื่อต้นกล้ามีอายุ 20 วัน ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินกำแพงแสน โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 สูตร 46-0-0 ปริมาณ 0.21 กรัมต่อกระถาง สูตร 18-46-0 ปริมาณ 0.14 กรัมต่อกระถาง สูตร 0-0-60 ปริมาณ 0.10 กรัมต่อกระถาง ครั้งที่ 2 ใส่หลังจากครั้งแรกประมาณ 15 วัน สูตร 46-0-0 ปริมาณ 0.28 กรัมต่อกระถาง (กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2564) ให้น้ำวันละ 2 ครั้ง เก็บข้อมูลความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดต้นและราก น้ำหนักแห้งต้นและรากของผักกาดหอมแต่ละสายพันธุ์ที่ช่วงอายุ 45 วัน หลังย้ายปลูก (อริสรา, 2562)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ตามแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ เมื่อพบความแตกต่างกันในทางสถิติจึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม R version 2.9.1 (R Core Team, 2018)

ผลการทดลอง

ไซยาโนแบคทีเรียที่พบจากดินแปลงนาและสายพันธุ์ที่จัดจำแนกได้

จากการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างดินแปลงนาในระยะ 0-5 เซนติเมตร จำนวน 5 แปลง ในพื้นที่ของจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 10 ไอโซเลต โดยจากพื้นที่ จ.นครปฐม คัดเลือก 6 ไอโซเลต ได้แก่รหัส TN01, TN02, TL01, TL02, FL01 และ FL02 จ.กาญจนบุรี 2 ไอโซเลต ได้แก่รหัส DJ01 และ DJ02 จ.สุพรรณบุรี 2 ไอโซลเลต ได้แก่รหัส BW01 และ BW02 ตามลำดับ แต่ละไอโซเลตมีลักษณะเป็นเส้นสาย (filament) ที่แตกต่างกัน ดังแสดงใน (Table 1 และ Figure 1)

การจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย 10 ไอโซเลตโดยการหาลำดับเบส 16S rRNA พบว่ามีสายพันธุ์ *Prochlorococcus* sp., *Pseudanabena* sp., *Nostoc* sp., *Calothrix parietina*, *Pseudanabena suomiensis*, *Cyanothece* sp. และ *Westiellopsis* sp. และแผนภูมิต้นไม้ของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลต TL02 พบว่าจัดอยู่ในสายพันธุ์ *Nostoc* sp. ด้วยค่า bootstrap 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงใน (Figure 2) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้

Table 1 Some characteristics and identification of cyanobacteria by DNA sequencing 16S rRNA

Isolate	Charaecteristics			Identified bacteria	% Similarity
	Color	Shape	Heterocyst		
TN01	Green	Filament	+	*Prochlorococcus* sp.	82.66
TN02	Green	Filament	+	*Prochlorococcus* sp.	84.73
TL01	Blue green	Filament	+	*Pseudanabena* sp.	82.99
TL02	Green brown	Filament	+	*Nostoc* sp.	92.57
FL01	Blue green	Filament	+	*Calothrix parietina*	84.21
FL02	Green brown	Filament	+	*Nostoc* sp.	97.7
DJ01	Green	Filament	+	*Pseudanabena suomiensis*	82.96
DJ02	Blue green	Filament	+	*Nostoc* sp.	98.19
BW01	Green	Filament	+	*Cyanothece* sp.	88.32
BW02	Brown	Filament	+	*Westiellopsis* sp.	79.84

Note: + found heterocyst

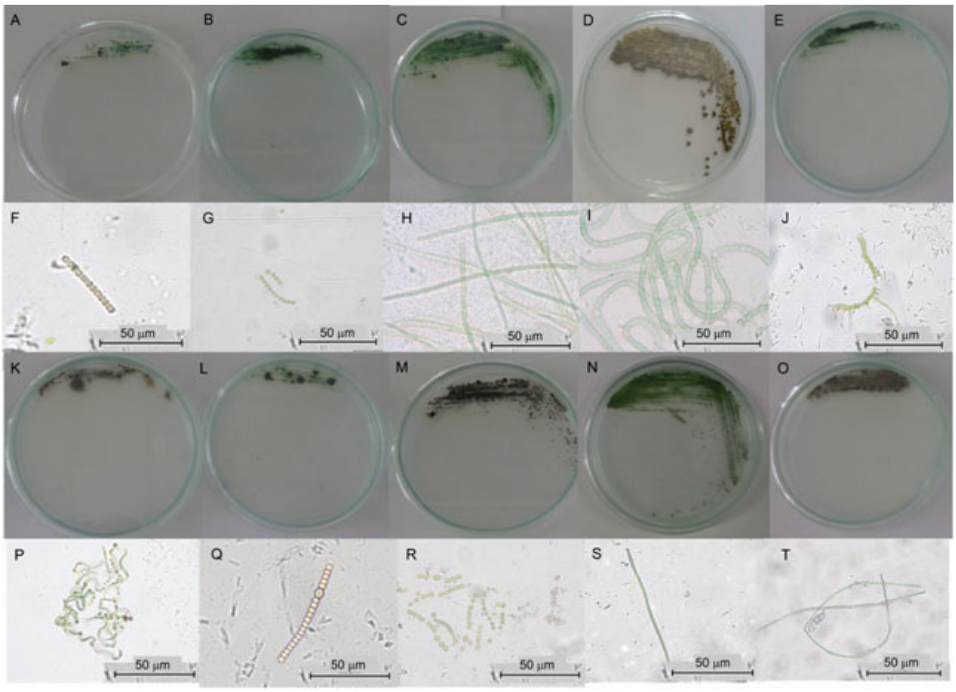

Figure 1 Morphological characteristics of cyanobacteria on BGA medium and shape under the microscope at magnification 400X: TL01(A, F), TL02 (B, G), TN01 (C, H), TN02 (D, I), FL01 (E, J), FL02 (K, P), DJ01 (L, Q), DJ02 (M, R), BW01 (N, S), and BW02 (O, T)

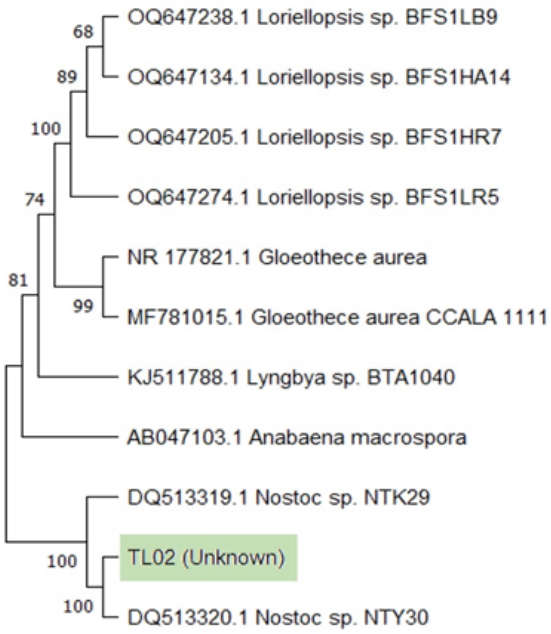

Figure 2 Classification of cyanobacteria isolate TL02 and their growth promoting effects on lettuce. Phylogenic tree of isolate TL02.

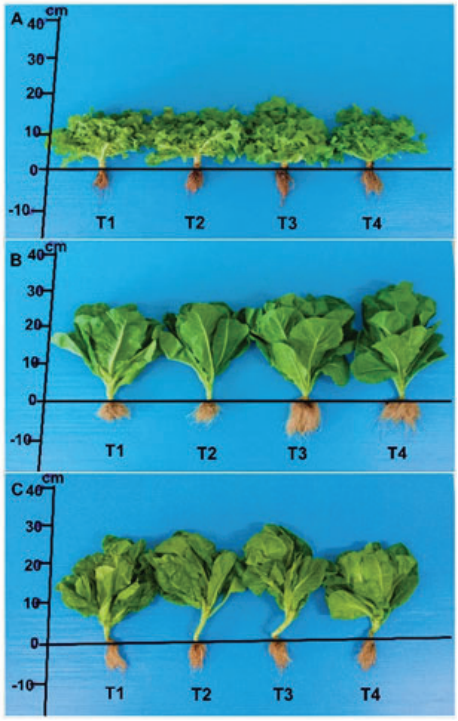

Figure 3 Growth of Green Oak (A), Green Cos (B), and Butterhead (C), T1: control with no fertilizer, T2:100% chemical fertilizer, T3: 50% chemical fertilizer and cyanobacteria, and T4: only cyanobacteria at 45 days after planting.

ปริมาณ Indole-3-Acetic Acid (IAA) ที่ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดผลิตได้

ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Table 2) โดยไอโซเลต TL02 สามารถผลิต IAA ได้มากที่สุดเท่ากับ 1.19, 1.19, 1.52 และ 1.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 7, 14, 21 และ 28 วันของการบ่ม ตามลำดับ และพบในทำนองเดียวกันว่าเมื่อเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

ในอาหารเหลวที่มีการเติมกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Table 3) แต่ละไอโซเลต สามารถผลิต IAA ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไอโซเลต TL02 ผลิตได้มากที่สุดเท่ากับ 1.32, 1.25, 1.55 และ 1.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 7, 14, 21 และ 28 วันของการบ่ม ตามลำดับ และไอโซเลตที่ผลิตได้รองลงมาคือ ไอโซเลต TL01 และ DJ02 ที่ 21 วันของการบ่ม

ผลการใช้ไซยาโนแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม

ในการทดลองนี้เลือก *Nostoc* sp. (TL02) ทดสอบร่วมกับปุ๋ยเคมี ผลการทดลองพบว่าในตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยเคมี 50 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรีย ทำให้ความสูงต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น ในผักกาดหอมทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตำรับการทดลองมีผลทำให้ความยาวรากของผักกาดหอมสายพันธุ์กรีนคอส แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยตำรับ T3 มีความยาวสูงสุด (11.00 เซนติเมตร) แต่ไม่มีผลต่อความยาวรากของสายพันธุ์กรีนโอ๊ค และบัตเตอร์เฮด ในขณะที่น้ำหนักของรากแห้งของผักกาดหอมทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้รับผลกระทบจากแต่ละตำรับการทดลอง โดย T3 มีผลให้น้ำหนักแห้งของรากสูงสุดที่ 3.44, 10.64 และ 3.84 กรัมต่อต้นของผักกาดหอมสายพันธุ์กรีนโอ๊ค กรีนคอส และบัสเตอร์เฮด ตามลำดับ (Table 4)

Table 2 The quantity of indole-3-acetic acid (IAA) produced by various isolates of cyanobacteria in blue green algae nitrogen-free medium without tryptophan

Isolate	Indole-3-acetic acid (μg/ml)			
	7Day	14Day	21Day	28Day
TN01	0.60^{d}	0.60^{d}	0.73^{d}	0.57^{e}
TN02	0.67^{c-d}	0.67^{c-d}	0.78^{c-d}	0.68^{c-e}
TL01	0.64^{d}	0.64^{c-d}	0.85^{b-d}	0.82^{b}
TL02	1.19^{a}	1.19^{a}	1.52^{a}	1.33^{a}
FL01	0.62^{d}	0.62^{d}	0.77^{c-d}	0.65^{d-e}
FL02	0.65^{d}	0.65^{d}	0.77^{c-d}	0.67^{d-e}
DJ01	0.82^{b}	0.82^{b}	0.90^{b-c}	0.79^{b-c}
DJ02	0.81^{b-c}	0.81^{b-c}	0.90^{b-c}	0.81^{b}
BW01	0.64^{d}	0.64^{d}	0.83^{b-d}	0.71^{b-d}
BW02	0.67^{c-d}	0.67^{c-d}	0.90^{b-c}	0.76^{b-d}
F-test	*	*	*	*
CV (%)	8.2	8.32	6.42	6.29

Note: Means in the same column followed by different letters are different significantly by DMRT, * = P<0.05

Table 3 The quantity of indole-3-acetic acid (IAA) produced by various isolates of cyanobacteria in blue green algae nitrogen-free medium with tryptophan

Isolate	Indole-3-acetic acid concentration (μg/ml)			
	7Day	14Day	21Day	28Day
TN01	0.82^{c-d}	0.85^{c}	0.88^{c}	0.79^{c}
TN02	0.75^{c-d}	0.79^{c-d}	0.75^{d}	0.73^{c}
TL01	1.03^{b}	0.95^{b}	1.12^{b}	1.00^{b}
TL02	1.32^{a}	1.25^{a}	1.55^{a}	1.38^{a}
FL01	0.69^{d}	0.69^{d-e}	0.82^{c-d}	0.74^{c}
FL02	0.79^{c-d}	0.67^{e}	0.77^{d}	0.69^{c}
DJ01	0.88^{c}	0.83^{c}	0.83^{c-d}	0.79^{c}
DJ02	1.03^{b}	0.99^{b}	1.05^{b}	0.92^{b}
BW01	0.74^{d}	0.71^{d-e}	0.85^{c-d}	0.76^{c}
BW02	0.77^{c-d}	0.75^{c-e}	0.88^{c}	0.76^{c}
F-test	*	*	*	*
CV (%)	6.1	6.73	5.77	5.1

Note: Means in the same column followed by different letters are different significantly by DMRT, * = P<0.05

Table 4 Effects of cyanobacteria and chemical fertilizers on plant height, fresh weight, plant dry weight, root length and root dry weight of 3 lettuce cultivars at 45 days after planting.

Treatment	Plant heigh (cm)	Plant fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)	Root length (cm)	Root dry weight (g/plant)
			Green Oak cultivar		
T1	17.00	85.76	2.89	6.17	0.74^{b}
T2	17.17	134.38	4.15	8.17	2.12^{a-b}
T3	18.30	146.93	4.52	10.33	3.44^{a}
T4	17.17	134.35	4.50	8.60	2.04^{a-b}
F-test	ns	ns	ns	ns	*
CV%	8.75	2.1	24.76	20.10	46.93
			Green Cos cultivar		
T1	21.67	137.11	4.38	8.23^{b}	1.73^{b}
T2	23.90	147.80	4.60	8.17^{b}	3.37^{b}
T3	27.40	210.06	9.48	11.00^{a}	10.64^{a}
T4	24.50	127.56	4.59	9.60^{ab}	3.95^{b}
F-test	ns	ns	ns	*	*
CV%	11.89	22.78	22.33	9.78	33.94

Table 4 (continued).

Treatment	Plantheigh (cm)	Plant fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)	Root length (cm)	Root dry weight (g/plant)
			Butterhead cultivar		
T1	21.67	127.25	14.68	11.00	1.51[b]
T2	23.90	147.21	16.78	10.33	2.33[a-b]
T3	27.40	152.29	22.28	12.17	3.84[a]
T4	24.50	125.59	16.40	10.17	1.86[b]
F-test	ns	ns	ns	ns	*
CV%	11.89	18.75	4.77	14.72	35.06

Note: T1: without fertilizer (control), T2: 100% chemical fertilizer, T3: 50% chemical fertilizer together with cyanobacteria and T4: only cyanobacteria.
* = $p < 0.05$, ns = non different significantly.

วิจารณ์

สายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีลักษณะเซลล์ที่เป็นเส้นสาย และสามารถผลิต IAA ได้ โดยสายพันธุ์ที่ผลิตได้มากที่สุดคือ *Nostoc* sp.ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sergeeva *et al.* (2002) ที่พบการผลิตฮอร์โมนพืชกรดอินโดล-3-อะซิติกโดยไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Calothrix* 2 สายพันธุ์และ *Nostoc* 2 สายพันธุ์ แต่ตรวจไม่พบในสกุล *Fischerella* และ *Scytonema* เนื่องจากมีการตอบสนองต่อทริปโตเฟนที่ต่างกัน ไอโซเลต TL02 (*Nostoc* sp.) สามารถผลิตฮอร์โมน IAA ในอาหาร BGA ที่ไม่ใส่กรดอะมิโนทริปโตเฟนได้ 1.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 21 วันของการบ่มและมีค่าสูงกว่าการผลิตสาร IAA ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc* OS-1 ในหลอดทดลองที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโนทริปโตเฟน ซึ่งมีการผลิต IAA ประมาณ 2.1x10-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 21 วัน (Hussain *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการเติมกรดอะมิโนทริปโตเฟน ไอโซเลต TL02 (*Nostoc* sp.) ผลิต IAA ได้ 1.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 21 วันของการบ่ม ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการศึกษาสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียในดินเขตปกครอง Kafr El-Sheikh และ El-Dakahlia ของอียิปต์ และประเมินการผลิตสารทางชีวภาพ พบว่าไซโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. พบมากที่สุด เมื่อนำมาวิเคราะห์การผลิต IAA สายพันธุ์ *Nostoc calcicola* D และ *Anabaena cylindrica* D ผลิตได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 5.99x104 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3.93x104 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเติมกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Randa *et al.*, 2021) ไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. ร่วมกับปุ๋ยเคมี 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้น้ำหนักแห้งของรากผักสลัดทั้งสามสายพันธุ์ (กรีนโอ๊ค กรีนคอสและบัตเตอร์เฮด) มีค่าสูงสุด การใส่เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยเคมีที่มีธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ในดินเพิ่มขึ้น ผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตที่พืชดูดซึมไปใช้ได้มากขึ้น (Angulo *et al.*, 2020) ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตฮอร์โมนพืชได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Mohsen *et al.* (2016) ที่ศึกษาผลของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc muscorum* SOS14 และ *Anabaena oryzae* SOS13 ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของผักกาดหอม ช่วยทำให้ความสูงของต้น จำนวนใบ/ต้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ น้ำหนักและผลผลิตรวมของต้นผักกาดหอมเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับควบคุม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ศรัญญา และคณะ (2559) พบว่าผักกาดหอมสายพันธุ์กรีนโอ๊คในทรีตเมนต์ที่รากได้ผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลา 300 วินาที และเลี้ยงต่อในอาหาร BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

สรุป

ไซยาโนแบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากดินแปลงนา มีประสิทธิภาพในการผลิตฮอร์โมน IAA แตกต่างกัน โดยไอโซเลต TL02 ซึ่งจัดจำแนกได้เป็น *Nostoc* sp. มีการผลิต IAA สูงสุด การใช้ *Nostoc* sp. ร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมี 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากและน้ำหนักแห้งของผักกาดหอม ได้สูงกว่าการใส่ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2564. การใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินในการผลิตพืชผักที่ปลูกเพื่อรับประทานต้นและใบ. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: www.doa.go.th/ac/phetchaburi/wp-content/uploads/2023/02 (15 เมษายน 2566).

วิภา จึงจตุพรชัย. 2561. ไซยาโนแบคทีเรียและจุลสาหร่าย: พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), กรุงเทพมหานคร. 160 หน้า.

ศรัญญา บัวกระสินธุ์, นวลกมล อำนวยสิน, สุธีรา ลิมปิพิชัย และสุเปญญา จิตตพันธ์. 2559. การชักนำการเจริญเติบโตของกรีนโอ๊ค (*Lactuca sativa* var. *crispa* L.) ด้วยไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยใช้คลื่นความถี่สูง. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 39(2): 171-182.

อริสรา ผาสุข. 2562. การเจริญเติบโต การสะสมและการลดปริมาณไนเตรทในผักสลัดที่ปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิกส์แบบ DRFT. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม. 107 หน้า.

อานนท์ ทัศนานนท์ชัย. 2558. การใช้ประโยชน์ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างเฮทเทอโรซีสต์เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับปลูกข้าวพันธุ์ กข 31. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 85 หน้า.

Angulo, J., M. M. Martínez-Salgado, R. Ortega-Blu and P. Fincheira. 2020. Combined effects of chemical fertilization and microbial inoculant on nutrient use efficiency and soil quality indicators. Scientia Agropecuaria 11(3): 375-380.

Chandra, R. and V. Kumar. 2017. Phytoremediation: A Green sustainable technology for industrial waste management. pp 1-42. *In*: R. Chandra, N.K. Dubey and V. Kumar (Eds.). Phytoremediation of environmental pollutants. CRC Press, Boca Raton.

Datta, C. and P.S. Basu. 2000. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. Microbiological Research 155(2): 123-127.

Ehmann, A. 1977. The Van Urk-Salkowski reagent—a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. Journal of Chromatography A 132: 267-276.

Hussain, A., S.T. Shah, H. Rahman, M. Irshad and A. Iqbal. 2015. Effect of IAA on *in vitro* growth and colonization on of *Nostoc* in plant roots. Frontiers in Plant Science 6(46): 1-9.

Kim M. J., Y. Moon, D. A. Kopsell and S. Park. 2016. Nutritional value of Crisphead 'Iceberg' and Romaine lettuces (*Lactuca sativa* L.). Journal of Agricultural Science 8(11): 1.

Knema team. 2021. The production of lettuce and chicory in Thailand. (Online): Available Source: https://knoema.com/data/thailand+agriculture-indicators-production+lettuce-and-chicory (November 9, 2023)

Macherey-Nagel GmbH and Co. KG. 2010. Genomic DNA from tissue user manual. User manual. (Online): Available Source: https://www.mediray.co.nz/media/16169/om_macherey nagel_dna_mn740952_genomicdnatissue_r11.pdf (Apil 2, 2023).

Mohsen, A. A. M., A. S. A. Salama and F. M. A. El-Saadony. 2016. The effect of foliar spray with cyanobacterial extracts on growth, yield and quality of lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). Middle East Journal of Agriculture Research 5(1): 90-96.

Randa, M., Z. Ahlam, A. M. Mehesen, E. H. Ashour and A. H. Afify. 2021. Characterization of soil indigenous cyanobacterial strains and bioactivity assessment. Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology 12 (11):195-199.

R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. (Online): Available Source: https://www.R-project.org (October 2, 2023).

Sergeeva, E., A. Liaimer and B. Bergman. 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. Planta 215: 229-238

Song, X., J. Zhang, C. Peng and D. Li. 2021. Replacing nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing cyanobacteria reduced nitrogen leaching in red soil paddy fields. Agriculture, Ecosystems and Environment 312:107320.

Stanier, R.Y. and G. Cohen-Bazire. 1977. Phototrophic prokaryotes: The Cyanobacteria. Annual Reviews in Microbiology 31: 225-274.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30(12:) 2725-2729.

Wang, B., J. Chu, T. Yu and J. Li. 2015. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in Arabidopsis. Biological Sciences 112 (15): 4821-4826.