วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การศึกษาและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตจากรากพืชในระบบวนเกษตรเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่ง (*Allium fistulosum* L.) และพริกขี้หนูสวน (*Capsicum frutescens* L.)

Isolation and characterization of plant-growth-promoting rhizobacteria from the rhizospheric soil of selected pulses and their effect on *Allium fistulosum* L. and *Capsicum frutescens* L.

อชิรญา ศิริภาพ[1], วันวิสาข์ พิระภาค[2] และ ปริญญา ไกรวุฒินันท์[3]*

Achiraya Siriphap[1], Wanwisa Pirapak[2] and Parinya Kraivuttinun[3]*

[1] *ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา 19 หมู่ 2 ต.แม่กา อ.เมืองพะเยา จ.พะเยา 56000*
[1] *Division of Microbiology, School of Medical Sciences, University of Phayao. 19 Moo 2 T. Maeka A. Muang Phayao, Thailand*
[2] *สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ 27 ถ.อินใจมี ต.ท่าอิฐ อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์ 53000*
[2] *Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University. 27 Injaime Rd., T. Tah-it M.Uttaradit, Uttaradit, Thailand. 53000*
[3] *สาขาวิชาสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ 27 ถ.อินใจมี ต.ท่าอิฐ อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์ 53000*
[3] *Program in Environment, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University. 27 Injaime Rd., T. Tah-it M.Uttaradit, Uttaradit, Thailand. 53000*

บทคัดย่อ: แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโต (Plant growth-promoting bacteria, PGPB) มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยกลไกที่หลากหลายไม่ว่าจะเป็นทางตรงหรือทางอ้อม ในการศึกษาครั้งนี้ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจำนวน 6 ไอโซเลท (L9-05, L45-05, L10-04, L2-03, L2-04 และ L41-01) จากรากพืชในระบบวนเกษตร เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่ง (*Allium fistulosum* L.) และพริกขี้หนูสวน (*Capsicum frutescens* L.) โดยทำการคัดเลือกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระ การผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid (IAA) และการละลายฟอสเฟต จากนั้นทำการศึกษาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการศึกษาลำดับเบส 16S rRNA sequence analysis จากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท L10-04 คือเชื้อสายพันธุ์ *Enterobacter hormaechei* สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกขี้หนูสวนและเพิ่มผลผลิตได้ได้ดีเหมาะกับการนำมาประยุกต์ใช้ในการทำการเกษตรแบบอินทรีย์ และลดการใช้สารเคมีในอนาคต
คำสำคัญ: แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโต; แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ; แบคทีเรียละลายฟอสเฟต; *Enterobacter hormaechei*

ABSTRACT: Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) have various direct and indirect mechanisms of action. In this study, six optimal plant-growth-promoting rhizosphere bacteria (L9-05, L45-05, L10-04, L2-03, L2-04, and L41-01) were isolated from the root zone of healthy, vigorously growing plants from a farm in Uttaradit province, Thailand. All the selected bacterial isolates promoted the growth of *Allium fistulosum* L. and *Capsicum frutescens* L. Moreover, all the isolates were selected based on their ability for nitrogen fixation, indole-3-acetic acid (IAA) production, and phosphate solubilization. Based on the morphological traits and 16S rRNA sequence analysis, we found that bacterial isolate L10-04 a strain of *Enterobacter hormaechei* promoted the growth and increased the yields of *Capsicum frutescens* L. Thus, this strain is suitable for application in organic farming.

* Corresponding author: Kraivuttinun@gmail.com

Received: date; February 15, 2024 Revised: date; October 5, 2024

Accepted: date; October 22, 2024 Published: date; April 2, 2025

Keywords: plant growth-promoting bacteria; nitrogen-fixing bacteria; phosphate solubilizing bacteria; *Enterobacter hormaechei*

บทนำ

ปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ตามธรรมชาติในสิ่งแวดล้อมมีประโยชน์มากมายในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชไม่ว่าจะเป็นทางตรงหรือทางอ้อมด้วยกลไกที่หลากหลาย โดยแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโต หรือ plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์กับพืชเป็นอย่างมาก (Andy et al., 2020) และในปัจจุบันการผลิตสินค้าทางการเกษตรโดยใช้สารเคมีเริ่มมีการถูกกีดกันและมีการปฏิเสธจากผู้บริโภคมากขึ้น เนื่องมาจากผู้บริโภคมีความตื่นตัวทางด้านปัญหาทางสิ่งแวดล้อม และสุขภาพมากยิ่งขึ้น จึงทำให้สินค้าเกษตรอินทรีย์ได้รับความสนใจมากขึ้น โดยการปลูกพืชหรือการทำการเกษตรแบบอินทรีย์นั้นจะทำการงดการใช้ ปุ๋ยเคมี สารกำจัดศัตรูพืช สารป้องกันและกำจัดโรค ในทุกขั้นตอนการผลิต โดยจะเน้นการใช้สารอินทรีย์จากธรรมชาติ หรือสารสกัดจากพืชที่ไม่มีพิษต่อคนหรือไม่มีสารพิษตกค้างปนเปื้อนในผลผลิต ในดินและในน้ำ ในขณะเดียวกันก็เป็นการรักษาสภาพแวดล้อม ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีและปลอดภัย ส่งผลให้ผู้บริโภคมีสุขอนามัยและคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น ซึ่งหนึ่งในกระบวนการผลิตที่หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีคือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในด้านต่างๆ มาใช้ในกระบวนการผลิต เช่น การใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดโรคในพืช การใช้จุลินทรีย์ช่วยในการเจริญเติบโตของพืช เป็นต้น

ในการเจริญเติบโตของพืชต้องใช้ธาตุอาหารที่จำเป็นหลายชนิด โดยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช คือ ไนโตรเจน และฟอสเฟต ซึ่งไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโตทั่ว ๆ ไป ของต้นพืช เช่น ต้น ใบ ราก ดอก เมล็ด เช่นช่วยให้ต้นข้าวสูงขึ้นแตกกอมากขึ้น ช่วยให้เมล็ดข้าวโตเต็มที่และเต็มเมล็ด ช่วยให้จำนวนเมล็ดต่อรวงมากขึ้น และช่วยให้โปรตีนในเมล็ดสูงขึ้น โดยทั่วไปแล้วไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีข้อจำกัด หรืออยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จึงปรากฏการศึกษาแบคทีเรียเพิ่มธาตุอาหารแก่พืชอย่างแพร่หลาย ได้แก่ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ (Free living nitrogen fixing bacteria) เพื่อช่วยส่งเสริมพืชในการดูดซับธาตุไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโต นอกจากนี้แบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชยังสามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เพราะเกิดปฏิกิริยาเคมีในดินอย่างหลากหลาย ซึ่งแบคทีเรียแยกได้จากดินรอบรากพืช พบได้ทั่วไปได้แก่ *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Azospirillum* sp. เป็นต้น (Goswami and Deka, 2020) แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบางสายพันธุ์สามารถผลิตฮอร์โมนได้ โดยฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโต ของพืช ได้แก่ ไซโตไคนิน กรดอินโดลอะซิติก (indole-3-acetci acid - IAA) กรดจิบเบอเรลลิก (Gibberellic acid - GA3) เป็นต้น โดยฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโตมีบทบาทสำคัญต่อการงอกของเมล็ด การยืดยาวของราก การยืดยาวของเซลล์และการแบ่งเซลล์ (จตุพร และคณะ, 2562) สำหรับฟอสเฟตนธรรมชาติส่วนมากจะอยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ คือจะอยู่ในสภาพที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งการใช้ฟอสเฟตในธรรมชาติมีความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีค่อนข้างน้อยในธรรมชาติ ส่งผลให้ในการทำการเกษตรส่วนมากจึงค่อนข้างขาดแคลนธาตุฟอสเฟตจากธรรมชาติ ส่งผลให้เกษตรกรต้องใช้ปุ๋ยเคมีในปริมาณที่มากขึ้นและต่อเนื่อง

จุลินทรีย์ *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีปฏิสัมพันธ์กับรากพืช ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับรากพืช (symbiotic relationship) และจุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตอิสระ (free-living) ซึ่งมักพบบริเวณใกล้ๆ รากพืช โดยจุลินทรีย์ PGPR จะมีลักษณะที่สำคัญได้แก่ สามารถอยู่อาศัยกับรากพืชได้ อยู่รอดและเพิ่มจำนวนบริเวณรากพืช และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายแบบ ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน การละลายธาตุอาหาร การสร้างซิเดอร์โรฟอร์ (siderophore) การสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การสร้างสารปฏิชีวนะ สารยับยั้งเชื้อรา และการป้องกันพืชจากความเครียดต่างๆ เป็นต้น (Goswami and Deka, 2020) ซึ่งการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถนั้น มีความจำเป็นที่จะต้องเก็บตัวอย่างจากหลายๆ ที่ เพื่อที่จะได้มีโอกาสในการค้นพบเชื้อที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด

จากงานวิจัยต่างๆ ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเพื่อศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวน โดยคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพจากสวนวนเกษตร ในจังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตและตรึงไนโตเจนอิสระที่ดีสุด จากนั้นนำ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มาทำการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวน เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดสำหรับการนำไปใช้ในอนาคตต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ในพื้นที่สวนผลไม้แบบวนเกษตร

ทำการเก็บตัวอย่างดินรอบพืชที่ระดับความลึก 15 cm ใส่ในถุงพลาสติกที่ปิดผนึกและติดฉลากโดยกำหนดสถานที่ และรหัสตัวอย่างดิน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ซึ่งพื้นที่เก็บตัวอย่างดินจะเป็นสวนที่มีการทำการเพาะปลูกแบบวนเกษตรในจังหวัดอุตรดิตถ์ (latitude 17°37′33″N และ longitude: 100°5′48″E) จำนวนทั้งสิ้น 48 ตัวอย่าง

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระ

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงบนอาหาร N-free bromothymol blue medium แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร N-free bromothymol blue medium โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการตรึงไนโตรเจนอิสระ จะเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน (Latt et al., 2018)

การทดสอบการผลิตกรดอินโดลอะซีติก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว tryptic soy broth เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อครบระยะเวลานำตัวอย่างมาแยกส่วนของเชื้อแบคทีเรียและสารละลายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที เก็บสารละลายใส ปริมาตร 0.5 ml เติมสาร Salkowski reagent ปริมาตร 0.5 ml ($FeCl_3$ 0.5 M ละลายใน $HClO_4$ เข้มข้นร้อยละ 35) บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 535 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer เปรียบเทียบกับ กราฟค่ามาตรฐาน (สารละลาย IAA มาตรฐาน ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 และ 25 μg/ml) (Chen et al., 2021)

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างมาวางตรงจุดกึ่งกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PVK (Pikovskaya agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดและบันทึกความกว้างของวงใสที่ปรากฏอยู่รอบโคโลนีจุลินทรีย์เมื่อบ่มได้ 7 วัน และคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อขนาดโคโลนี จากสูตร (Nathiya et al., 2020)

$$\text{Solubilization index (SI)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (cm)} + \text{เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (cm)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (cm)}}$$

การประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโต เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวน

การเตรียมดินที่จะปลูกหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวน โดยนำดินมาผึ่งลมให้แห้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ใส่ในกระถางละ 3 kg กระถางที่ใช้เป็นกระถางพลาสติกสีดำมีรูที่ก้นกระถาง ขนาดกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว โดยใส่หินฟอสเฟต ปริมาณ 1.25 g/pot เพื่อเป็นการปรับปรุงธาตุอาหารเบื้องต้นของดิน จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 300 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 10^9 CFU/ml เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เทอาหารเลี้ยงเชื้อออกแล้วเติมน้ำกลั่น 100 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาหยดลงดินในกระถางที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ml/pot

วางแผนการทดสอบแบบสุ่มแบบบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) จำนวน 5 ชุดการทดลอง โดยทำการเพาะหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวนลงในกระถางปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว จำนวน 5 ชุดการทดลอง โดยควบคุมการให้น้ำ และแสงแดดให้เท่ากันทุกชุดการทดลอง เมื่อครบอายุการเจริญเติบโตทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตของหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวน โดยระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตของหอมแบ่งคือ 50 วัน และระยะเวลาการเก็บเกี่ยวผลผลิตของพริกขี้หนูสวนคือ 90 วัน โดยทำการวัดการเจริญเติบโตของหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวนโดยการ วัดความสูง ความยาวราก น้ำหนักแห้ง น้ำหนักเปียก โดยในหอมแบ่งทำการนับปริมาณหัวหอมแบ่ง และในพริกมีการวัดขนาดลำต้นเหนือพื้นดิน 1 cm และจำนวนเมล็ดพริก จากนั้นทำการวัดปริมาณธาตุอาหารในดินเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

โดยทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดเบส ปริมาณอินทรียวัตถุ (OM) (Walkley-Black Method) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) (Kjeldahl Method) (AOAC. 2000) และ ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ ด้วยวิธี Vanadomolybdo phosphoric acid colorimetric (Pradhan and Pokhrel, 2013)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) โดยทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว One-way ANOVA โดยวิธี Tukey's HSD เพื่อการจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มของข้อมูล

ผลการศึกษา

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระ

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชในพื้นที่สวนวนเกษตรในจังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Norris Glucose Nitrogen Free Medium (NFM) จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบๆ รากพืชจำนวน 48 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหาร NFM ได้จำนวนทั้งสิ้น 301 ไอโซเลท จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ NFM ให้เป็นสีน้ำเงินซึ่งพบเชื้อแบคทีเรียพบเชื้อแบคทีเรียจำนวนที่สามารถเปลี่ยนสีอาหารได้จำนวน 35 ไอโซเลท

การศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิต Indole 3-acetic acid (IAA)

การทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA จากเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NFM 35 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อทั้ง 35 ไอโซเลท มาทดสอบการผลิตฮอร์โมนพืช IAA จากการศึกษาทั้ง 35 ไอโซเลท พบว่าการผลิตฮอร์โมนพืช อยู่ระหว่าง 3.13 - 58.12 µg/ml โดยเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้มากที่สุดคือ L2-04 รองลงมาคือ L45-05 และ L2-03 โดยมีปริมาณฮอร์โมนพืช IAA เท่ากับ 58.12, 58.09 และ 51.08 µg/ml ตามลำดับ **(Figure 1)**

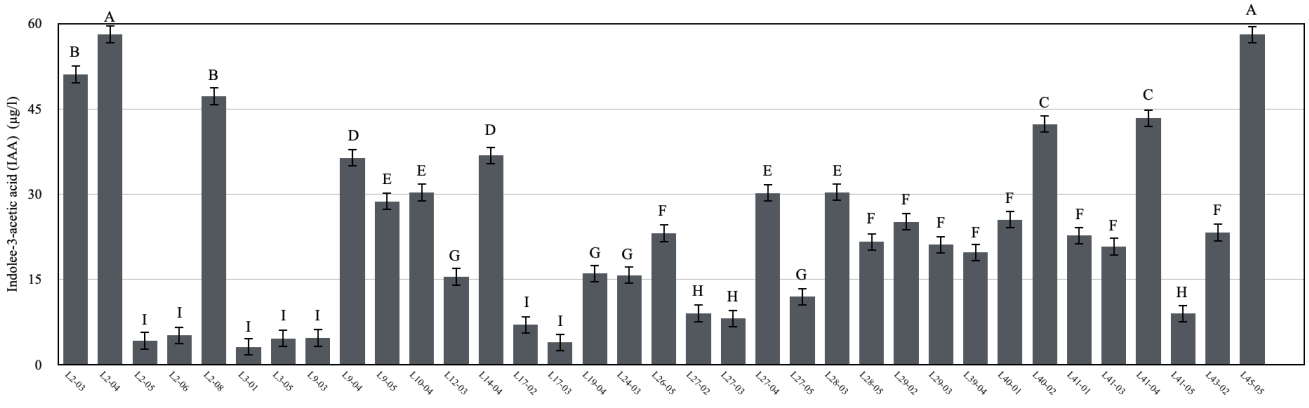

Figure 1 Comparison of IAA production by the bacterial isolates in tryptone yeast (TY) broth (n= 3*). Values displaying different superscript letters are significantly different based on the least significant difference (one-way ANOVA; Tukey's test, P<0.05).

การศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya agar (PVK)

นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 35 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถของเชื้อในการละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya agar (PVK) ที่ระยะเวลา 7 วัน การเกิดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya agar (PVK) **(Figure 2)** สามารถแสดงถึงประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต โดยพิจารณาจากค่า Hydrolysis capacity ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่ดีที่สุดจำนวน 3 ไอโซเลท คือ L41-01, L9-05 และ L10-04 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 4.36, 3.86 และ 3.67 ตามลำดับ

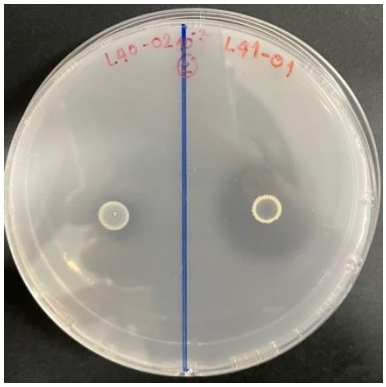

Figure 2 Clear zone of phosphate solubilization of bacterial isolate L41-01 on PVK solid medium after 7 days of incubation.

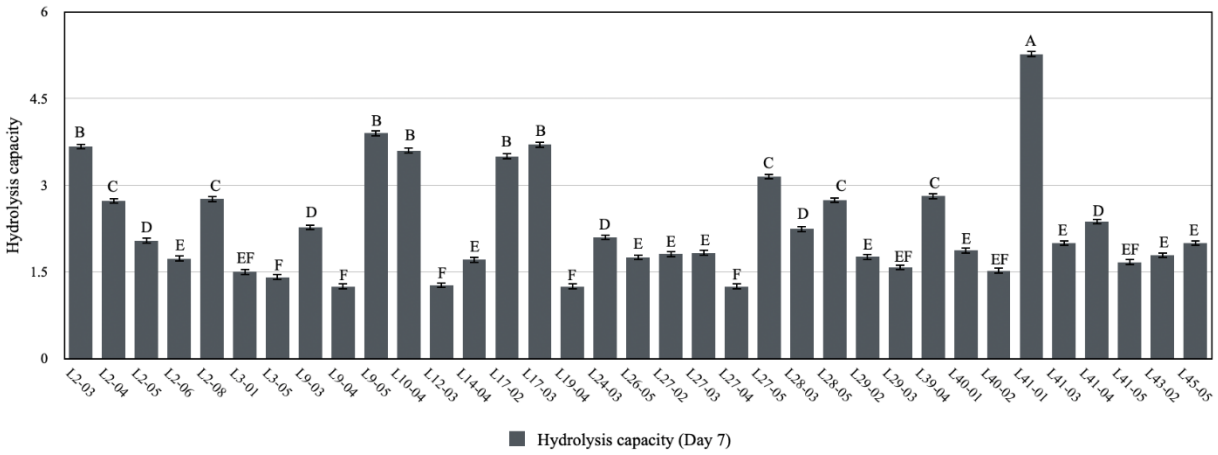

Figure 3 Comparison of phosphate solubilization index (SI) of 35 isolates in Pikovskaya solid medium. Values displaying different superscript letters are significantly different based on the least significant difference (one-way ANOVA; Tukey's test, $P<0.05$).

การประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระและละลายฟอสเฟตในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวน

การประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระและละลายฟอสเฟต เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวนโดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบน อาหารเลี้ยงเชื้อ Norris Glucose Nitrogen Free Medium (NFM) สามารถผลิต Indole 3-acetic acid (IAA) และ การละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PVK ที่ดีที่สุดจำนวน 6 ไอโซเลท คือ L9-05, L45-05, L10-04, L2-03, L2-04 และ L41-01 **(Figure 3)**

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของหอมแบ่ง เมื่อมีอายุครบ 50 วัน จากการศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่ง พบว่าการเจริญเติบโตของหอมแบ่งเมื่อใส่เชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากชุดควบคุมที่ไม่ได้มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย ดัง **Figure 4, 5 และ 6**

การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระและละลายฟอสเฟต

จากการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระและละลายฟอสเฟต เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวนโดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบน อาหารเลี้ยงเชื้อ Norris Glucose Nitrogen Free Medium (NFM) สามารถผลิต Indole 3-acetic acid (IAA) และ การละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PVK ที่ดีที่สุดจำนวน 6 ไอโซเลท คือ- L9-05, L45-05, L10-04, L2-03, L2-04 และ L41-01 โดยทำการส่งไปจำแนกสายพันธุ์ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรม (BIOTEC) โดยวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rRNA จากการศึกษาพบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย ดัง **Table 1**

Table 1 Identification of PGPB based on their 16S rRNA gene sequences

Strains no.	Strains type	Identity (%)
L9-05	*Enterobacter hormaechei*	99
L45-05	*Pantoea dispersa*	99
L10-04	*Enterobacter hormaechei*	99
L2-03	*Klebsiella quasivariicola, Klebsiella variicola*	99
L2-04	*Klebsiella variicola*	99
L41-01	*Burkholderia cepacian* *Burkholderia cenocepacia* *Burkholderia metallica*	99

Figure 4 Effect of PGPB (Control and L41-01) on different aspects of *Capsicum frutescens* L.

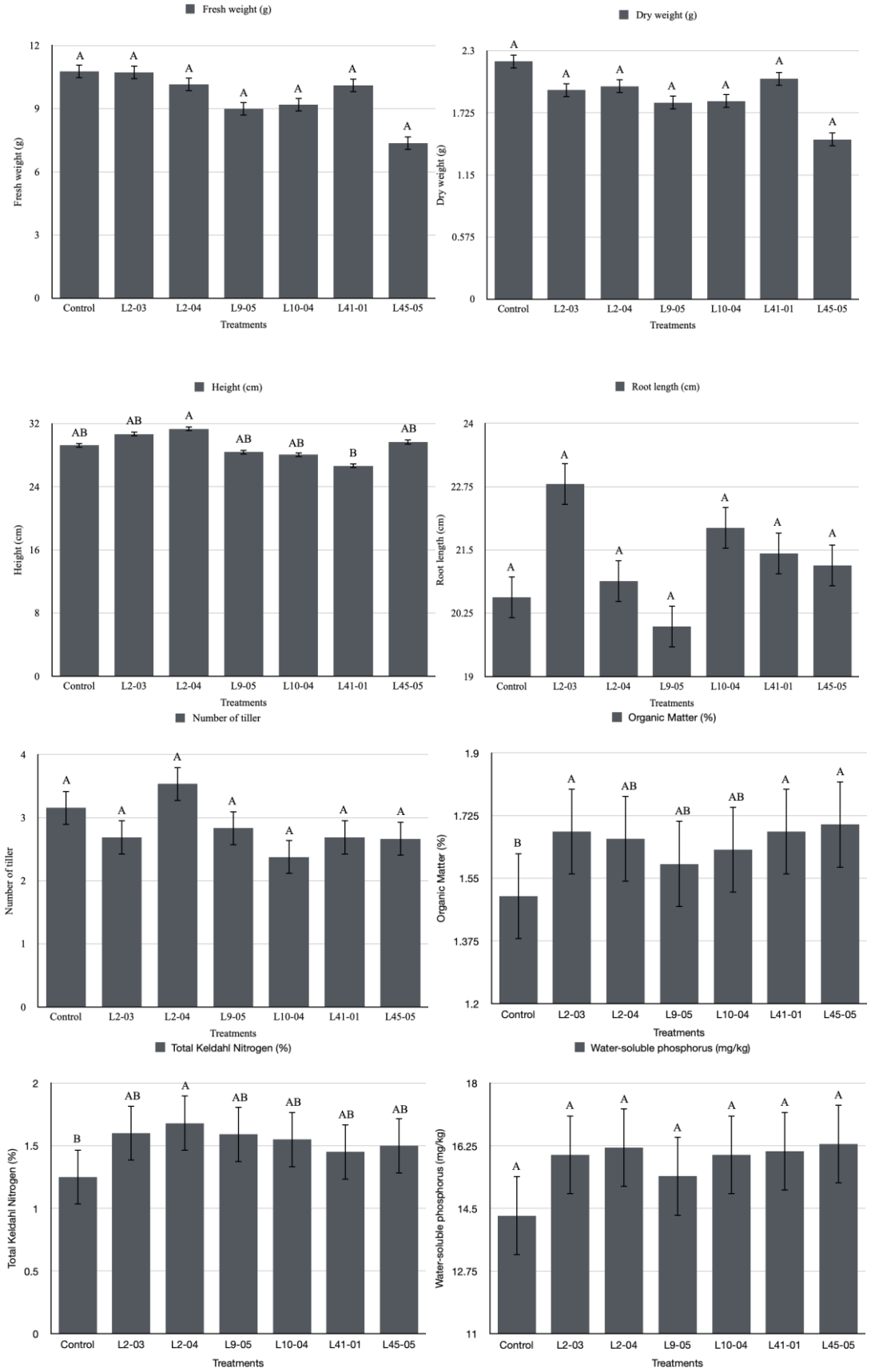

Figure 5 Effect of PGPB on different aspects of *Allium fistulosum* L. Values displaying different superscript letters are significantly different based on the least significant difference (one-way ANOVA; Tukey's test, P<0.05).

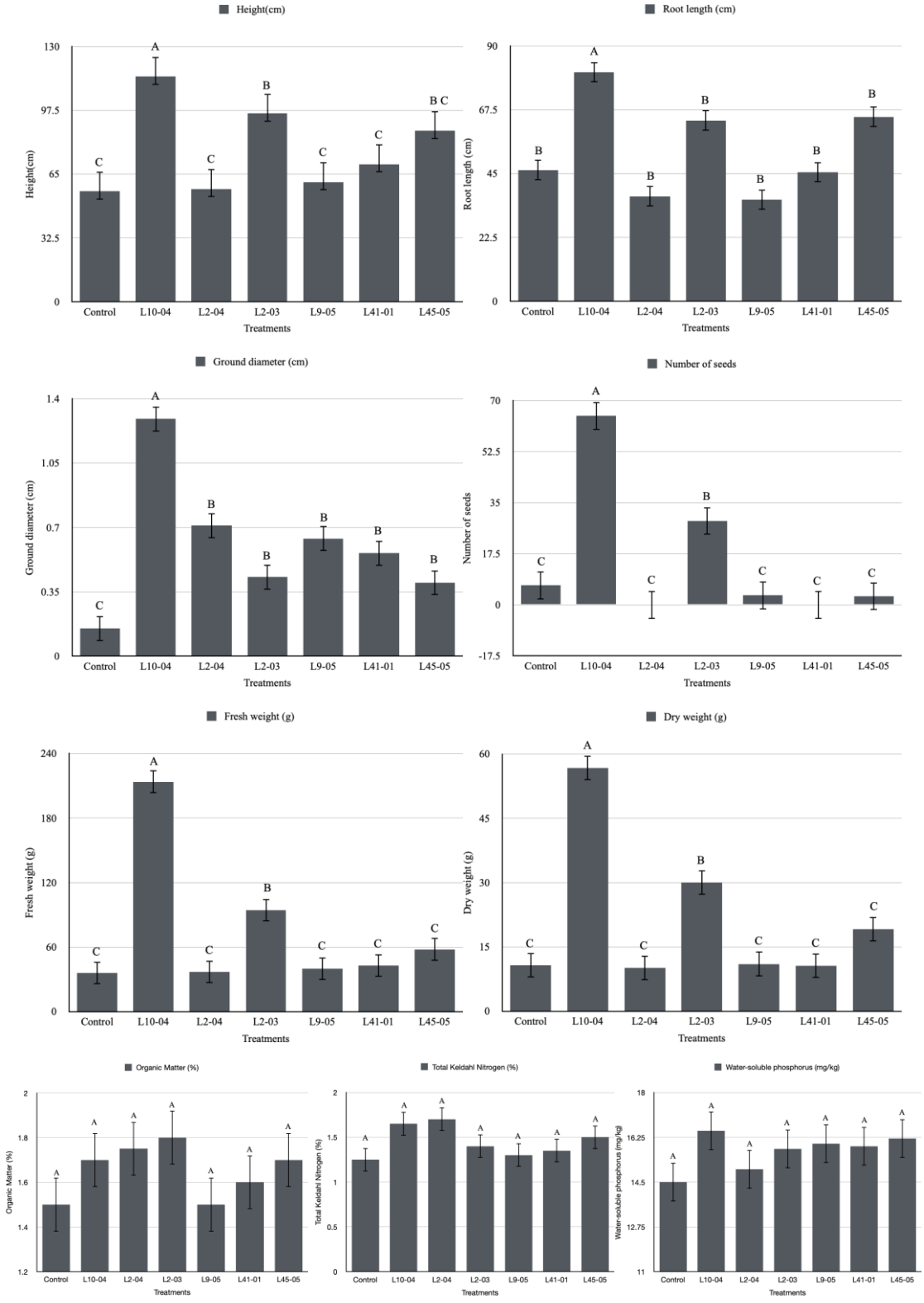

Figure 6 Effect of PGPB on different aspects of *Capsicum frutescens* L. Values displaying different superscript letters are significantly different based on the least significant difference (one-way ANOVA; Tukey's test, P<0.05).

วิจารณ์และสรุป

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชในสวนวนเกษตรในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Norris Glucose Nitrogen Free Medium (NFM) จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบๆ

รากพืชจำนวน 48 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนอาหาร NFM ได้จำนวนทั้งสิ้น 301 ไอโซเลท โดยมีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสีอาหาร NFM ให้เป็นสีน้ำเงินมีจำนวน 35 ไอโซเลท จากนั้นนำทั้ง 35 ไอโซเลทมาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA และทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PVK เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช และความสามารถในการละลายฟอสเฟต จากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 35 ไอโซเลท มีการผลิตฮอร์โมน IAA อยู่ระหว่าง 3.13 - 58.12 µg/ml โดยเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตฮอร์โมนพืช IAA ได้มากที่สุดคือ L2-04 รองลงมาคือ L45-05 และ L2-03 โดยมีปริมาณฮอร์โมนพืช IAA เท่ากับ 58.12, 58.09 และ 51.08 µg/ml ตามลำดับ

จากการผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียทั้ง 35 ไอโซเลทในการละลายฟอสเฟตบนอาหาร PVK จากการศึกษา พบเชื้อที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตจำนวนทั้งหมด 202 ไอโซเลท ที่ระยะเวลา 7 วัน ซึ่งพิจารณาจากค่า Hydrolysis capacity โดยได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่ดีที่สุดจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท L41-01, L9-05 และ L10-04 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 4.36, 3.86 และ 3.67 ตามลำดับ

การประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอิสระและละลายฟอสเฟต เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของหอมแบ่ง และพริกขี้หนูสวนจากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไม่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่งได้แตกต่างจากชุดการทดลอง ซึ่งต่างจากการเจริญเติบโตของพริกขี้หนูสวน ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ เมื่อมีอายุ 90 วัน จากการศึกษาพบว่าต้นพริกขี้หนูสวนมีการเจริญเติบโตแตกต่างจากชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ร้อยละ 95 โดยเชื้อไอโซเลท L10-04 มีความสูงของลำต้น ความยาวราก ขนาดลำต้น จำนวนเมล็ดพริก น้ำหนักแห้ง และน้ำหนักสด แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่จากผลการศึกษาปริมาณธาตุอาหารคือ อินทรียวัตถุ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และปริมาณฟอสฟอรัสละลายน้ำ พบว่าทุกชุดการทดลองมีปริมาณธาตุอาหารไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จาการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของหอมแบ่งและพริกขี้หนูสวนซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและคู่ พบว่าหอมแบ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและมีความต้องการธาตุอาหารไม่เท่ากับต้นพริกขี้หนูสวน ส่งผลให้การประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตเห็นผลไม่ชัดเจนเนื่องจากธาตุอาหารที่มีอยู่ในดินเพียงพอต่อการเจริญเติบโต ส่วนพริกขี้หนูสวนซึ่งจัดเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีความต้องการธาตุอาหาร ฮอร์โมน และแร่ธาตุที่หลากหลายในการออกดอก ออกผลและการเจริญเติบโต (Sage et al., 1987) จึงเห็นการเจริญเติบโตที่แตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อมีการใช้เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโต สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kizhakedathil and Devi (2018) พบว่า ได้มีการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. VITMS22 ในการส่งเสริมการ เจริญเติบโตของต้นมัสตาร์ดในเรือนเพาะชำ จากการศึกษาพบว่าการความสูงของลำต้นรวมกับราก ของชุดควบคุมและชุดที่มีการใช้เชื้อแบคทีเรียมีความสูงแตกต่างกันถึง 16.08 mm ซึ่งสามารถ สรุปได้ว่าจากการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตสามารถส่งเสริมการ เจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าไม่ใช้เชื้อแบคทีเรีย และ Pirapak et al. (2022) ได้ศึกษาและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักชี จากการศึกษาพบว่าการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตที่คัดแยกได้สามารถส่งเสริมให้ผักชีเจริญเติบโตได้ดีกว่าการไม่ใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ซึ่งเมื่อทำการจัดจำแนกสายพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท คือ L9-05, L45-05, L10-04, L2-03, L2-04 และ L41-01 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rRNA จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้คือ *Enterobacter hormaechei, Pantoea dispersa*, *Enterobacter hormaechei, Klebsiella quasivariicola* หรือ *Klebsiella variicola, Klebsiella variicola* และ *Burkholderia cepacian* หรือ *Burkholderia cenocepacia* หรือ *Burkholderia metallica* ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Edith and Garcia (2007) ที่ได้มีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตจากการศึกษาพบเชื้อ *Burkholderia cepacia* ว่ามีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นไม้ได้ จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท L10-04 คือเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter hormaechei* เหมาะสมในการนำมาศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ เพิ่มเติม และควรมีการศึกษาความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช ก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นไม้ในอนาคต

คำขอบคุณ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ และขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ ผ่านกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 รหัสโครงการ 181039 จนโครงการสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จตุพร บุณณดากุล, ศิราภรณ์ ชื่นบาล, ฐปน ชื่นบาล, ศรีกาญจนา คล้ายเรือง และศุภธิดา อ่ำทอง. 2562. การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว. Naresuan Phayao Journal. 12: 32–40.

AOAC. 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington. 17th ed.

Andy, A. K., S. A. Masih, and V. S. Gour. 2020. Isolation, screening and characterization of plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soils of selected pulses. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 27: article ID 101685.

Chen, J., G. Zhao, Y. Wei, Y. Dong, L. Hou, and R. Jiao. 2021. Isolation and screening of multifunctional phosphate solubilizing bacteria and its growth-promoting effect on *Chinese fir* seedlings. Scientific Reports. 11: article ID 9081.

Edith, M., and M. T. Garcia. 2007. Plant growth stimulation by *Burkholderia cepacia*, a native rhizobacteria of acid soils in Venezuelan savannas. Agronomía Tropical. 57: 123-128.

Goswami, M., and S. Deka. 2020. Plant growth-promoting rhizobacteria alleviators of abiotic stresses in soil: A review. Pedosphere. 30: 40-61.

Kizhakedathil, J., and C. Devi. 2018. Rhizospheric bacteria isolated from the agricultural fields of Kolathur, Tamilnadu promotes plant growth in mustard plants. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 16: 293-302.

Latt, Z. K., S. Y. San, E. P. Kyaw, T. M. Lynn, M. T. Nwe, W. W. Mon, and K. N. Aye. 2018. Using cellulolytic nitrogen-fixing bacterium, *Azomonas agilis* for effective degradation of agricultural residues. Open Microbiology Journal. 12: article ID 154.

Nathiya, S., J. Rajendran, and R. K. Velu. 2020. Potential of plant growth promoting rhizobacteria to overcome the exposure to pesticide in *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek leaves). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 23: article ID 101493.

Pirapak, W., A. Siriphap, T. Inprasit, C. Phuangsri, and P. Kraivuttinun. 2022. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soil of selected pulses and their effect on *Coriandrum sativum* plants. Biodiversitas. 23: 5765-5770.

Pradhan, S., and M. R. Pokhrel. 2013. Spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juice, fertilizer, detergent, and water samples by molybdenum blue method. Scientific World Journal. 11: 58-62.

Sage, R. F., R. W. Pearcy, and J. R. Seemann. 1987. The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants. Plant Physiology. 85: 355-359.