

จุลินทรีย์ดินเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพสำหรับข้าว

Soil Microorganisms for Utilization of Biofertilizer Production for Rice

อริษา จิตกรกุล^{1)*} พยอมน โคเบลล์²⁾ ไอลดา ชูมแสง²⁾ วริยา ชุนจัตรัส³⁾ ธีรดา หวังสมบุญรัตน์⁴⁾

Arisa Jittikornkul^{1)*} Payorm Cobelli²⁾ Ilada Choomsang²⁾

Wariya Chunjaturas³⁾ Teerada Wangsomboondee⁴⁾

Abstract

Utilization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in rice fields is one approach to enhancing soil fertility and benefiting the plants sustainably. This study aimed to select and identify plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from soil, rhizosphere, and roots of rice in both irrigated and rainfed lowland ecosystems for potential development into a biofertilizer. The research evaluated twenty-eight bacterial isolates that exhibited at least two beneficial traits related to plant growth promotion, including nitrogen fixation, indole-3-acetic acid production, or phosphate solubilization. These isolates were isolated from soil, rhizosphere soil, and rice roots collected in 2023. Additionally, we assessed their capacity to produce gibberellins and siderophores, as well as the enhancement of germination in the 7-day-old Khao Dok Mali 105 (KDML105) rice variety in petri dishes. As a result, 11 representative bacterial isolates that exhibited at least three beneficial traits were selected and tested on the KDML105 rice variety under greenhouse conditions at Division of Rice Research and Development, Rice Department in 2024. The shoot length, root length, and dry weight of rice plants that are 30 days old were measured. The results revealed that nine bacterial isolates promoted both shoot and root growth of rice as well as dry biomass. So, the nine bacterial isolates were identified based on morphological and biochemical characteristics, 16S-23S rDNA nucleotide sequence analysis, and multilocus sequence analysis by using housekeeping genes. They were classified as *Burkholderia vietnamiensis* (1 isolate), *Burkholderia diffusa* (1 isolate), *Ralstonia mannitolilytica* (2 isolates), *Bacillus cabrialesii* (2 isolates), *Bacillus subtilis* (2 isolates), and *Brucella* sp. (1 isolate). The results of this study indicate that two isolates of *B. cabrialesii*: NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023 and SRI-ORG1-RS-06_Bc_2023, along with two isolates of *B. subtilis*: NMA-CHEM2-11_Bc_2023 and SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023, have been chosen for further field trials and for further development as a rice biofertilizer. These bacterial isolates demonstrate significant potential as PGPR and are safe for use, as they are not pathogenic to humans, animals, or plants.

Keywords: KDML105 rice, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), soil microorganism, identification, morphological characteristics, biochemical characteristics, nucleotide sequence analysis

Received: September 24, 2025/ Revised: October 16, 2025/ Accepted: October 27, 2025

* corresponding author E-mail: arisa.j@rice.mail.go.th

¹⁾ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี อ.เมืองอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34000 โทร. 0-4534-4104

Ubon Ratchathani Rice Research Center, Mueang, Ubon Ratchathani 34000 Tel. 0-4534-4104

²⁾ กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 0-2579-7892

Division of Rice Research and Development, Rice Department, Chatuchak, Bangkok 10900 Tel. 0-2579-7892

³⁾ ศูนย์วิจัยข้าวหนองคาย อ.รัตนวาปี จ.หนองคาย 43120 โทร. 0-4208-9752

Nong Khai Rice Research Center, Rattanawapi, Nong Khai 43120 Tel. 0-4208-9752

⁴⁾ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2218-5476

Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330 Tel. 0-2218-5476

บทคัดย่อ

การนำแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (พีจีพีอาร์) มาใช้ในนาข้าวเป็นแนวทางหนึ่งในการช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินและเป็นประโยชน์ต่อพืชอย่างยั่งยืน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและจำแนกชนิดแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่แยกได้จากดิน ดินรอบรากข้าว และรากข้าวจากระบบการปลูกข้าวทั้งในนิเวศนาข้าวอาศัยน้ำฝนและนิเวศนาชลประทาน สำหรับนำไปพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพ โดยการประเมินศักยภาพของแบคทีเรีย 28 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ตรึงไนโตรเจน การผลิต indole-3-acetic acid หรือการละลายฟอสเฟต อย่างน้อย 2 คุณสมบัติ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกจากดิน ดินรอบรากข้าว และรากข้าว พ.ศ. 2566 โดยนำมาศึกษาคุณสมบัติเพิ่มเติม ได้แก่ การผลิตฮอริโมนจิบเบอเรลลินและสารซีเดอรโรฟอรัส รวมทั้งการส่งเสริมการงอกของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในระยะ 7 วัน ในจานเพาะเลี้ยง เพื่อคัดเลือกตัวแทนเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท ที่มีอย่างน้อย 3 คุณสมบัติ นำไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพโรงเรือน ทดลอง ผลการวัดความสูง ความยาวราก และน้ำหนักแห้ง เมื่อข้าวอายุ 30 วัน พบว่า มีแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท ที่ส่งเสริมให้ข้าวเจริญเติบโตทั้งด้านลำต้น ราก และมวลน้ำหนักแห้ง จากนั้นจำแนกชนิดแบคทีเรีย ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA และการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของ housekeeping genes แบบ multilocus sequence analysis พบเป็นแบคทีเรีย *Burkholderia vietnamiensis* จำนวน 1 ไอโซเลท *Burkholderia diffusa* จำนวน 1 ไอโซเลท *Ralstonia mannitolilytica* จำนวน 2 ไอโซเลท *Bacillus cabrialesii* จำนวน 2 ไอโซเลท *Bacillus subtilis* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *Brucella* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท จึงคัดเลือกเชื้อ *B. cabrialesii* ไอโซเลท NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023 และ SRI-ORG1-RS-06_Bc_2023 และเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท NMA-CHEM2-11_Bc_2023 และ SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023 ซึ่งมีศักยภาพสูงในการเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ที่มีความปลอดภัย ไม่เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ หรือพืช เหมาะสำหรับนำไปทดสอบในสภาพแปลงนาและพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับข้าวต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวขาวดอกมะลิ 105 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (พีจีพีอาร์) จุลินทรีย์ดิน การจำแนกชนิด ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

คำนำ

ความอุดมสมบูรณ์ของดินเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการปลูกข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของหลายประเทศ ดินที่มีโครงสร้างดี มีธาตุอาหารเพียงพอจะช่วยให้ข้าวเจริญเติบโตและให้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตาม การใช้ปุ๋ยเคมีต่อเนื่องเป็นเวลานานส่งผลให้ดินเสื่อมโทรม สูญเสียอินทรีย์วัตถุ และลดความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน (Tilman *et al.*, 2002) ดังนั้น การใช้จุลินทรีย์ดิน โดยเฉพาะแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือ พีจีพีอาร์ (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) จึงเป็นทางเลือกที่ยั่งยืนในการฟื้นฟูความอุดมสมบูรณ์ของดินและเพิ่มผลผลิตข้าว โดยจุลินทรีย์ดินมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแปรสภาพอินทรีย์วัตถุในดินให้กลายเป็นธาตุอาหารของพืช (สุวรรณี, 2560)

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ กลุ่ม

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืชหรือในดิน มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผ่านกลไกทางตรงและทางอ้อม ดังนี้ กลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตทางตรง เช่น การตรึงไนโตรเจน การละลายธาตุฟอสเฟต การละลายธาตุโพแทสเซียม การละลายธาตุสังกะสี การผลิตฮอริโมนพืช และการเจริญของรากพืช และกลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตทางอ้อม เช่น การผลิตสารซีเดอรโรฟอรัสที่ช่วยให้พืชสามารถดึงดูดธาตุเหล็กไปใช้ได้ ผลิตเอนไซม์หรือสารปฏิชีวนะเพื่อทำหน้าที่เป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช ให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมและโรคพืช เป็นต้น (ศุภชาติ, 2564; Vessey, 2003; Shah *et al.*, 2021; Hasan *et al.*, 2024) ด้วยสมบัติที่เป็นประโยชน์ดังกล่าว พีจีพีอาร์จึงถูกนำมาพัฒนาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพสำหรับพืช (ศุภชาติ, 2564)

การนำพีจีพีอาร์มาใช้ในนาข้าวเป็นแนวทางหนึ่งใน

การช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินและเป็นประโยชน์ต่อข้าว เช่น การใช้ *Azospirillum* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. เป็นต้น สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของข้าว และทำให้ผลผลิตสูงขึ้นเมื่อเทียบกับแปลงที่ไม่ได้ใช้ฟิสิกซ์อาร์ (Rana et al., 2012; Bhardwaj et al., 2014)

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ได้วิจัยและพัฒนาปุ๋ยชีวภาพฟิสิกซ์อาร์-ทู เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว ในรูปแบบเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย *Azospirillum brasilense* และ *Burkholderia vietnamiensis* (กรมวิชาการเกษตร, 2564) ที่สามารถช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมีลงได้อย่างน้อยร้อยละ 25 ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มปริมาณรากได้อย่างน้อยร้อยละ 20 เพิ่มประสิทธิภาพการดูดน้ำและปุ๋ยอย่างน้อยร้อยละ 15 และช่วยเพิ่มผลผลิตได้อย่างน้อยร้อยละ 10 (กัลยกร และภัสชญภณ, 2560) อย่างไรก็ตาม ปุ๋ยชีวภาพฟิสิกซ์อาร์-ทู ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *B. vietnamiensis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561 (2561)

การใช้จุลินทรีย์ดินกลุ่มฟิสิกซ์อาร์เป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินและส่งเสริมผลผลิตข้าวได้อย่างยั่งยืน นอกจากช่วยฟื้นฟูปุ๋ยเคมีในดินแล้ว ยังลดการฟุ้งกระจายปุ๋ยเคมีและลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว การศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ฟิสิกซ์อาร์ที่เหมาะสมกับสภาพดินและชนิดพืช โดยเฉพาะประเทศไทยซึ่งมีระบบการผลิตข้าวที่หลากหลายและแตกต่างกันไปตามสภาพพื้นที่ รวมทั้งคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์เชื้อที่มีความปลอดภัย ไม่ก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ หรือพืช เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการนำความหลากหลายของฟิสิกซ์อาร์มาใช้ประโยชน์ อริษา และคณะ (2567) ได้จำแนกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน ดินรอบรากข้าว และรากข้าว จากสภาพพื้นที่ผลิตข้าวที่หลากหลายของประเทศไทย ทั้งในนาข้าวอาศัยน้ำฝนและนาชลประทานที่มีรูปแบบการทำนาแบบอินทรีย์ นาที่ใช้สารเคมี และนาที่มีการผลิตข้าวดีที่เหมาะสม (Good Agricultural Practice) จากทุกภูมิภาคของประเทศ และนำมาทดสอบสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 3 สมบัติ ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน *nifH* ที่

เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน การผลิต indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน และการละลายฟอสเฟต พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลท ที่มีอย่างน้อย 2 สมบัติ งานวิจัยนี้จึงนำแบคทีเรียทั้ง 28 ไอโซเลท ดังกล่าวมาทดสอบสมบัติเพิ่มเติม คือ การผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลินและสารซีเคอร์โรฟอรัส ทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของข้าว และจำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำไปผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับข้าวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาสมบัติของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

นำแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ที่แยกเชื้อได้จากตัวอย่างดิน ดินรอบรากข้าว และรากข้าว จากพื้นที่นาข้าวอาศัยน้ำฝนและนาชลประทานที่มีรูปแบบการทำนาแบบอินทรีย์ นาที่ใช้สารเคมี และนาที่มีการผลิตข้าวดีที่เหมาะสม (Good Agricultural Practice) จากทุกภูมิภาคของประเทศ จากการศึกษาของอริษา และคณะ (2567) ในปี พ.ศ. 2566 จำนวน 28 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มียีน *nifH* เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน การผลิต IAA และการละลายฟอสเฟต อย่างน้อย 2 สมบัติ (Table 1) มาศึกษาสมบัติเพิ่มเติม ดังนี้

1.1 การผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 48 ชั่วโมง เติมน้ำสารทริปโตเฟนความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำในหลอดทดลองที่มี 0.5 M zinc acetate 0.2 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เติมน้ำ 0.5 M potassium ferrocyanide 0.2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บสารละลายส่วนใส และเติมน้ำ 5% HCl อัตราส่วน 1:1 (Fig. 1A) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 75 นาที

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง

spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้ 5% HCl เป็น blank คำนวณปริมาณฮอร์โมน จิบเบอเรลลินที่แบคทีเรียสร้างเปรียบเทียบกับกราฟ มาตรฐาน (Paleg, 1965) โดยทำการทดลองไอโซเลท ละ 3 ซ้ำ

1.2 การผลิตสารซีเดอริฟอรัส

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้เข็มเย็บหลอดเชื้อ แต่ละโคโลนีของแบคทีเรียจำนวน 1 โคโลนี แยกเชื้อลงบน อาหารแข็ง chrome azurol sulphonate (CAS) บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งแบคทีเรียที่ ผลิตสารซีเดอริฟอรัสได้จะมีวงใสรอบโคโลนี (Fig. 1B) (Alexander and Zuberer, 1991) โดยทำการทดลอง ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการส่งเสริมการออกของต้นกล้าข้าวในสภาพห้องปฏิบัติการ

เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลท บนอาหาร Luria-Bertani (LB) agar ที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส (ให้ได้รับแสง 12 ชั่วโมง สลับกับ ความมืด 12 ชั่วโมง) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย 1 full loop ลงบนอาหาร LB Broth เขย่าด้วยเครื่อง incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ให้ ได้รับแสง 25 ± 1 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง สลับกับความ มืด 30 ± 1 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง) บั่นตกตะกอนเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน เซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ละลายตะกอน เซลล์ด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ

วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย

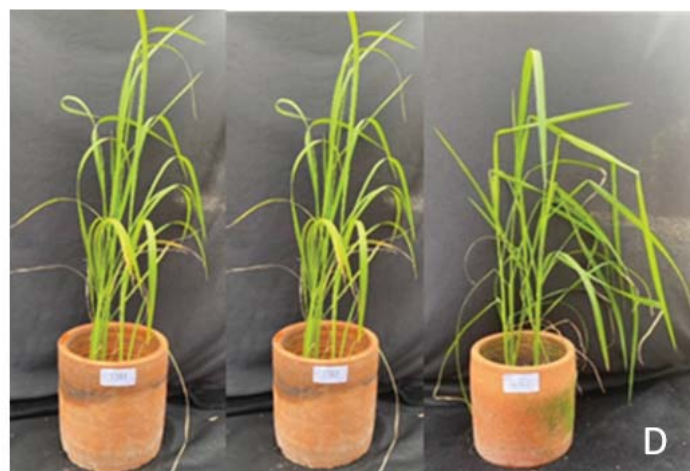
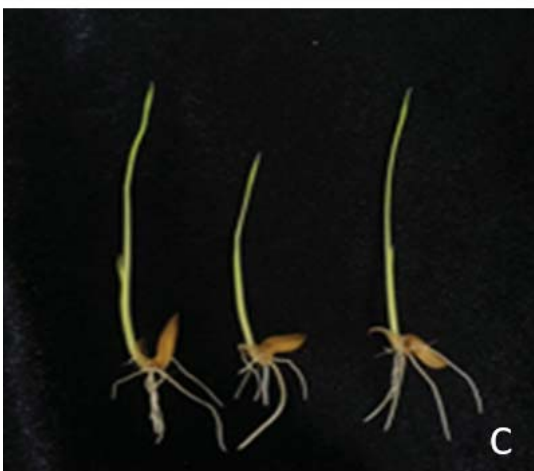
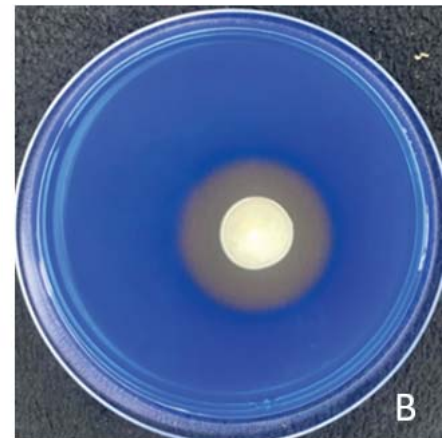
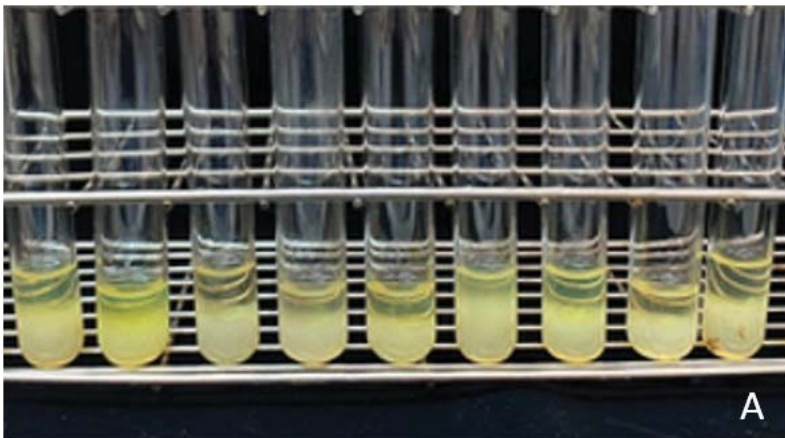


Fig. 1 The potential assignment of bacteria to promote plant growth includes: *in vitro* production of gibberellin (A); siderophore production (B); treatment of 7-day-old plants in the laboratory (C); and treatment of 30-day-old plants in the greenhouse (D) of *Oryza sativa* L. variety KDML105 with bacterial cell suspensions

ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความเข้มข้นให้ได้ $OD_{260\text{ nm}} = 0.3$ (ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร) (Ayyaz *et al.*, 2021)

ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วย 1% (v/v) sodium hypochlorite เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย 70% ethanol เป็นเวลา 2 นาที และล้างเมล็ดด้วยน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง (จิรพันธ์ และคณะ, 2560) แชนเมล็ดในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Ayyaz *et al.*, 2021)

นำไปเพาะบนกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตามแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 29 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 เมล็ดต่อจานเพาะเชื้อ โดยกรรมวิธีควบคุม แชนเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เติมน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อให้กระดาษชุ่มน้ำตลอดการทดลอง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดความยาวลำต้น และความยาวราก (Fig. 1C)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพโรงเรือนทดลอง

คัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลท มาทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพโรงเรือนทดลอง โดยพิจารณาคัดเลือกตัวแทนไอโซเลทเชื้อที่แยกได้จากกระบวนการปลูกข้าวที่แตกต่างกัน ดังนั้น แบคทีเรียที่แยกได้จากนาชลประทานที่มีการปลูกข้าวแบบนาอินทรีย์ จำนวน 2 ไอโซเลท และนาที่ใช้สารเคมี 3 ไอโซเลท แบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวอาศัยน้ำฝนที่มีการปลูกข้าวแบบนาอินทรีย์ จำนวน 1 ไอโซเลท นาที่ใช้สารเคมี จำนวน 3 ไอโซเลท และนาที่มีการผลิตข้าวที่เหมาะสม จำนวน 2 ไอโซเลท และเป็นแบคทีเรียที่มีอย่างน้อย 3 สมบัติ ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน การผลิต IAA ฮอโมนิบบีเบอเรลลิน และสารซีเคอร์โรฟอรัส การละลายฟอสเฟต และส่งเสริมการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวในสภาพห้องปฏิบัติการ (Table 1)

วางแผนการทดลอง randomized complete block design (RCBD) จำนวน 14 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย และฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดพันธุ์ข้าวดังวิธีการในข้อ 2 และแชนเมล็ดในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย

($OD_{260\text{ nm}} = 0.3$) โดย

กรรมวิธีที่ 1-11 แชนเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียกรรมวิธีละ 1 ไอโซเลท

กรรมวิธีที่ 12 แชนเมล็ดพันธุ์ด้วยสารผสมของเชื้อในกรรมวิธีที่ 1-4

กรรมวิธีที่ 13 แชนเมล็ดพันธุ์ด้วยสารผสมของเชื้อในกรรมวิธีที่ 5-8

กรรมวิธีที่ 14 แชนเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม (Table 2)

เพาะเมล็ดบนกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 5 เมล็ดต่อจานเพาะเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน

ปลูกข้าวในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ซึ่งบรรจุดินที่หนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Ahmad *et al.*, 2020) กระถางละ 500 กรัม จำนวน 5 เมล็ดต่อกระถาง เมื่อข้าวอายุ 30 วัน (Fig. 1D) บันทึกผลการทดลองโดยวัดความยาวของราก วัดความยาวของต้น และชั่งน้ำหนักแห้ง โดยล้างดินออกแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (จิรพันธ์ และคณะ, 2560)

4. การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

ผลจากการทดลองในโรงเรือนทดลอง สามารถคัดเลือกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้จำนวน 9 ไอโซเลท (Table 2) และเพื่อให้การนำแบคทีเรียไปพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปลอดภัย ไม่เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ หรือพืช จึงต้องจำแนกชนิดและคัดกรองเชื้อแบคทีเรีย ดังนี้

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย เป็นวิธีการจำแนกชนิดแบคทีเรียเบื้องต้นในระดับแฟมิลี (family) หรือจีนัส (genus) เพื่อเลือกวิธีการหรือตำแหน่งดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์ (species) ซึ่งจากการศึกษาของอริซา และคณะ (2567) ได้จำแนกชนิดแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลท ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ด้วยลักษณะ

Table 1 Plant growth-promoting properties and rice seedling growth in the laboratory of twenty-eight bacterial isolates

No.	Bacterial isolates	Plant growth-promoting properties					Rice seedling growth ^{2/} (cm)	
		nifH gene ^{1/}	Phosphate solubilization ^{1/} (cm)	IAA ^{1/} (ppm)	Gibberellin (ppm)	Siderophore (cm)	Shoot length	Root length
Bacterial isolates collected from organic farming in irrigated lowland rice ecosystem								
1	KRI-ORG2-02_Bc_2023	-	1.28	92.14	2,401	-	0.40 bc	0.33 cd
2	SRI-ORG1-RS-06_Bc_2023	-	1.25	96.00	3,725	-	0.67 bc	0.61 cd
3	SRI-ORG3-RP-04_Bu_2023	-	1.66	88.29	258	-	0.49 bc	0.30 cd
4	SRI-ORG3-RP-05_Bu_2023	+	1.91	81.29	2,176	-	0.90 bc	0.64 cd
5	SRI-ORG3-RP-06_Bu_2023	+	-	82.14	4,014	-	0.17 bc	0.33 d
6	SRI-ORG3-RP-08_Bu_2023	+	-	90.00	3,961	-	0.30 bc	0.18 cd
Bacterial isolates collected from inorganic farming in irrigated lowland rice ecosystem								
7	NMA-CHEM2-02_Bc_2023	-	1.13	86.57	369	-	1.08 bc	1.01 b
8	NMA-CHEM2-05_Bc_2023	-	1.23	101.71	-	-	0.96 bc	0.68 cd
9	NMA-CHEM2-11_Bc_2023	-	1.17	107.29	2,421	-	0.31 bc	0.30 cd
10	NMA-CHEM2-12_Bc_2023	-	1.16	83.86	432	-	0.18 bc	0.13 c
11	SMKPT1-01-CHEM_Az_2023	-	1.20	84.16	-	-	0.61 bc	0.42 cd
12	SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023	+	-	124.64	2,509	-	0.00 d	0.00 e
13	SMKPT1-06-CHEM_Bc_2023	-	1.45	77.17	3,552	-	0.44 bc	0.32 cd
Bacterial isolates collected from GAP farming in irrigated lowland rice ecosystem								
14	AYA-GAP1-2.2_Bu_2023	+	1.42	-	-	-	0.46 bc	0.27 cd
15	LRI-GAP3-3.1_Bu_2023	-	1.52	105.29	2,641	-	3.08 a	2.26 a

Table 1 (cont.)

No.	Bacterial isolates	nifH gene ^{1/}	Plant growth-promoting properties					Rice seedling growth ^{2/} (cm)	
			Phosphate solubilization ^{1/} (cm)	IAA ^{1/} (ppm)	Gibberellin (ppm)	Siderophore (cm)	Shoot length	Root length	
Bacterial isolates collected from organic farming in rainfed lowland rice ecosystem									
16	SMRET1-02-ORG_Az_2023	-	1.42	86.97	-	-	0.00 d	0.00 e	
17	SMRET1-03-ORG_Br_2023	+	-	107.53	3,607	-	0.94 bc	0.78 cd	
18	SMRET1-04-ORG_Az_2023	-	-	1.24	77.89	-	0.00 d	0.00 e	
Bacterial isolates collected from inorganic farming in rainfed lowland rice ecosystem									
19	AYA-CHEM1-01_Bu_2023	+	1.43	-	4,058	-	0.57 bc	0.32 cd	
20	NPT-CHEM1-RP-01_Bc_2023	-	1.30	101.86	2,534	1.48	0.66 bc	0.60 cd	
21	NPT-CHEM1-RP-02_Bu_2023	-	1.39	98.57	275	-	0.32 bc	0.18 cd	
22	NPT-CHEM1-RS-05_Bc_2023	-	1.17	95.57	3,785	-	0.62 bc	0.47 cd	
23	NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023	+	1.14	94.57	2,915	2.82	0.70 bc	0.47 cd	
24	SMUBN5-02-CHEM_Az_2023	+	-	92.16	-	-	0.00 d	0.00 e	
25	SMUBN8-03-CHEM_Ra_2023	-	1.26	80.47	3,573	-	0.64 bc	0.45 cd	
26	SMUBN12-02-CHEM_Az_2023	-	1.10	190.31	-	-	0.00 d	0.00 e	
Bacterial isolates collected from GAP farming in rainfed lowland rice ecosystem									
27	AYA-GAP1-5.1_Bu_2023	-	1.52	110.29	925	1.60	0.38 bc	0.19 cd	
28	SMUBN7-03-GAP_Ra_2023	-	1.39	143.36	3,976	-	0.00 d	0.00 e	
29	H ₂ O	-	-	-	-	-	0.24 bc	0.21 cd	

^{1/} อุริษา เตชะคณะ (2567)^{2/} Means within a column followed by the same letter are not significantly different at $p \leq 0.05$ by DMRT.

Table 2 The average growth rate of PGPR-treated rice variety Khao Dok Mali 105, 30 days old, in the greenhouse at Rice Research and Development (combined data from 3 repeated experiments)

No.	Treatment	Average growth per rice plant		
		Shoot length ^{1/} (cm)	Roots length ^{1/} (cm)	Dry weight ^{1/} (g)
1	AYA-CHEM1-01_Bu_2023	45.27 abc	9.88 a-e	0.43 b-e
2	AYA-GAP1-5.1_Bu_2023	47.47 abc	8.96 cde	0.43 b-e
3	NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023	49.27 ab	12.61 a-e	0.56 a-e
4	SRI-ORG3-RP-05_Bu_2023	30.42 e	4.64 e	0.27 e
5	SMKPT1-01-CHEM_Az_2023	32.93 cd	6.98 de	0.34 de
6	SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023	53.94 a	16.88 a-c	0.73 ab
7	SMRET1-03-ORG_Br_2023	50.17 ab	13.13 a-e	0.61 a-d
8	SMUBN8-03-CHEM_Ra_2023	49.74 ab	18.40 a	0.70 abc
9	SMUBN7-03-GAP_Ra_2023	51.99 a	17.89 ab	0.81 a
10	NMA-CHEM2-11_Bc_2023	48.45 abc	13.94 a-d	0.64 a-d
11	SRI-ORG1-RS-06_Bc_2023	49.04 abc	13.70 a-d	0.60 a-e
12	Mix no. 1-4	49.51 ab	13.54 a-d	0.59 a-e
13	Mix no. 5-8	49.05 abc	12.69 a-e	0.47 a-e
14	H ₂ O (control)	39.01 bc	7.39 de	0.38 cde
CV (%)		20.9	38.8	34.4

^{1/} Means within a column followed by the same letter are not significantly different at $p \leq 0.05$ by DMRT

ทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผนังเซลล์แบคทีเรียด้วยการย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) และทดสอบสมบัติการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส เพื่อเลือกใช้ชุดทดสอบสมบัติทางชีวเคมีได้อย่างเหมาะสมกับกลุ่มของแบคทีเรีย โดยกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบจะใช้ชุดทดสอบ API® 20 NE กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดสไม่ได้และมีลักษณะโคโลนีเหมือนจีนัส *Bacillus* จะใช้ชุดทดสอบ API® 50 CHB

4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S ribosomal DNA (16S-23S rDNA)

อริษา และคณะ (2567) ได้จำแนกชนิดแบคทีเรียเบื้องต้นระดับแฟมิลีหรือจีนัส ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA จำนวน 5 ไอโซเลท ในการ

ศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์เพิ่มเติมอีกจำนวน 4 ไอโซเลท (Table 3) โดยการ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่มือไพรเมอร์ fD1/rP2 สำหรับไอโซเลท SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023, SMUBN7-03-GAP_Ra_2023 และ SMUBN8-03-CHEM_Ra_2023

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่มือไพรเมอร์ fD2/rP1 สำหรับไอโซเลท AYA-CHEM1-01_Bu_2023 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing นำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information; Madison, USA) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยโมเดล Kimura 2-parameter ด้วยโปรแกรม MEGA 11

Table 3 Primers and PCR conditions used in this study

Loci	Gene function	Primer name	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
16S-23S rDNA					
		fD1	ccgaattcgcgacacacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1,500	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
		fD2	ccgaattcgcgacacacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1,500	
		rP1	cccggtatccaagcttACGGTTACCTTGTACGACTT	1,500	
		rP2	cccggtatccaagcttACGGCTACCTTGTACGACTT	1,500	
Burkholderiaceae					
<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta	atpDwp-F	AGTACTACTCTTTGGTAGAAGGC	443	วันวิสาห์ และคณะ (2560)
		atpDwp-RC	AGTTCGTCCATGCCCCAG		
<i>lepA</i>	GTP-binding elongation factor	lepA-F2	TGGTTCGACAACTACGTCGG	397	Santos <i>et al.</i> (2013)
		lepA-R	ATCAGCATGTCGACCTTCAC		
<i>recA</i>	DNA recombination and repair protein	BUR1	GATCGARAAAGCAGTTCGGCAA	393	Payne <i>et al.</i> (2005)
		BUR2	TTGTCCTTGCCCTGRCCGAT		
Bacillaceae					
<i>pta</i>	phosphate acetyltransferase	pta-F	ATACATAYGAAGGVAITGGAAGA	960	Le <i>et al.</i> (2019)
		pta-R	TAGCCGATRTTYCCYGGT		
<i>pycA</i>	biotin carboxylase	pycA-F	AAATCAGARGCGAAAGC	720	Le <i>et al.</i> (2019)
		pycA-R	CCTGAGCGGTAAAGCCAT		
<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor	rpoD-F	GCYGAAGAAGAAATTTGACCTBAA	1,100	Le <i>et al.</i> (2019)
		rpoD-R	CGTTTRCTTCTGCTHGGATGCT		
<i>glpF</i>	glycerol uptake facilitator protein	glpF-F	WTGACAGCATTTTGGGG	820	Le <i>et al.</i> (2019)
		glpF-R	GTAAAAATACRCCGCCGA		
<i>purH</i>	bifunctional purine biosynthesis protein	purH-F	YATTCACGGMGGNCTBCT	1,200	Le <i>et al.</i> (2019)
		purH-R	TGYTKBTKCGGYTCYCTTTT		

4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี multilocus sequence analysis (MLSA)

จำแนกแบคทีเรียระดับสปีชีส์ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ housekeeping genes ของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียแฟมิลี Bacillaceae จำนวน 4 ไอโซเลท จำแนกด้วย 5 ยีน ได้แก่ *pta*, *pycA*, *rpoD*, *glpF* และ *purH* และกลุ่มที่ 2 แบคทีเรียแฟมิลี Burkholderiaceae จำนวน 4 ไอโซเลท จำแนกด้วย 3 ยีน ได้แก่ *atpD*, *lepA* และ *recA* (Table 3)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี MLSA สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยโมเดล Kimura 2-parameter ด้วยโปรแกรม MEGA 11

ดำเนินการทดลองที่กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กรุงเทพฯ ปี พ.ศ. 2567

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาสมบัติของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

1.1 การผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน

ผลการศึกษาแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลท ในการผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน พบแบคทีเรียจำนวน 21 ไอโซเลท สามารถผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลินได้ 258-4,058 ppm โดยไอโซเลทที่สามารถผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลินได้มากที่สุด คือ AYA-CHEM1-01_Bu_2023 (Table 1) ซึ่งฮอร์โมนจิบเบอเรลลินที่ผลิตโดยพีจีฟิอาร์เหล่านี้จะช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวและการยืดตัวของเซลล์ เพิ่มความยาวของลำต้นและราก ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้ดี เช่น ฮอร์โมนจิบเบอเรลลินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Promicromonospora* sp. SE188 นอกจากกระตุ้นความสูงของมะเขือเทศแล้ว ยังช่วยเสริมความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ด้วย (Kang *et al.*, 2012)

1.2 การผลิตสารซีเดอร์โรฟอรัส

ผลการศึกษาแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลท ในการผลิตสารซีเดอร์โรฟอรัส พบแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท สามารถผลิตสารซีเดอร์โรฟอรัสได้ มีวงไฮดรอกซิโคลินบนอาหาร CAS ระหว่าง 1.48-2.82 เซนติเมตร โดยไอโซเลทที่ผลิตสารซีเดอร์โรฟอรัสได้มากที่สุด คือ NPT-CHEM2-

RS-02_Bc_2023 (Table 1)

สารซีเดอร์โรฟอรัสเป็นสารชีวเคมีขนาดเล็กที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเพื่อจับและละลายธาตุเหล็ก (Fe^{3+}) ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซับนำไปใช้ได้ จึงมีบทบาทสำคัญมากในทางการเกษตร และยังช่วยต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชในดิน เช่น เชื้อรา *Fusarium* spp. *Pythium* spp. เป็นต้น ให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากขาดธาตุเหล็กที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (Ahmed and Holmström, 2014)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการส่งเสริมการออกของข้าวในสภาพห้องปฏิบัติการ

การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท LRI-GAP3-3.1_Bu_2023 ทำให้ต้นกล้าข้าวมีลำต้นสูงและรากยาวมากที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกรรมวิธีอื่นๆ และกรรมวิธีควบคุม ส่วนแบคทีเรียจำนวน 18 ไอโซเลท ทำให้ต้นกล้าข้าวมีลำต้นสูงและรากยาวมากกว่า แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (Table 1)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพโรงเรือนทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของตัวแทนแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลท จาก 28 ไอโซเลท พบว่า ทุกไอโซเลท ยกเว้น SRI-ORG3-RP-05_Bu_2023 และ SMKPT1-01-CHEM_Az_2023 รวมทั้งกรรมวิธีที่ใส่เชื้อผสมหลายไอโซเลท สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว ทั้งความสูงของลำต้น ความยาวราก และน้ำหนักแห้งมากกว่ากรรมวิธีควบคุม (Table 2)

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีทั้งสมบัติของพีจีฟิอาร์ (Table 1) และส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้มากกว่ากรรมวิธีควบคุม (Table 2) ได้จำนวน 9 ไอโซเลท โดยไอโซเลท NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023 มีครบทั้ง 5 สมบัติ คือ มียีน *nifH* ละลายฟอสเฟต ผลิต IAA ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน และสารซีเดอร์โรฟอรัส ไอโซเลท SRI-ORG3-RP-05_Bu_2023 และ AYA-GAP1-5.1_Bu_2023 มี 4 สมบัติ ซึ่งสมบัติเหล่านี้เป็นปัจจัยช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Hasan *et al.*, 2024)

เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีสมบัติการเป็น

พีจีพีอาร์ที่แตกต่างกัน ในการศึกษาค้างนี้ได้ทดลองใช้พีจีพีอาร์แบบผสมเชื้อหลายไอโซเลทที่มีสมบัติแตกต่างกัน ดังกรรมวิธีที่ 12 ใช้เชื้อผสมของไอโซเลท AYA-CHEM1-01_Bu_2023, AYA-GAP1-5.1_Bu_2023, NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023 และ SRI-ORG3-RP-05_Bu_2023 และที่กรรมวิธีที่ 13 ใช้เชื้อผสมของไอโซเลท SMKPT1-01-CHEM_Az_2023, SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023, SMRET1-03-ORG_Br_2023 และ SMUBN8-03-CHEM_Ra_2023 ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างระหว่างสองกลุ่ม แต่พบว่า ทั้งสองกรรมวิธีทำให้ความสูงของลำต้น ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของข้าวขาวดอกมะลิ 105 อายุ 30 วัน มากกว่ากรรมวิธีควบคุม จึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีการใช้แบคทีเรียผสมหลายไอโซเลทเพื่อให้มีสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่หลากหลาย ดังผลงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตร ได้พัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วัน ซึ่งประกอบด้วย แบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *A. brasilense*, *Azotobacter vinelandii* และ *Beijerinckia mobilis* ใช้สำหรับข้าวโพด และข้าวฟ่าง ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-ทู ประกอบด้วย แบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *A. brasilense* และ *B. vietnamiensis* ใช้สำหรับข้าว และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-ทรี ประกอบด้วย แบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *A. brasilense* และ *Gluconacetobacter diazotrophicus* ใช้สำหรับอ้อย และมันสำปะหลัง (กรมวิชาการเกษตร, 2564)

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า กรรมวิธีใช้เชื้อผสมหลายไอโซเลทในกรรมวิธีที่ 12 ไม่แตกต่างกับการใช้ NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023 เพียงไอโซเลทเดียว ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้มากที่สุดในกลุ่มนี้ (Table 2) แสดงให้เห็นว่าเชื้อไอโซเลท NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023 มีความสามารถในการเจริญแข่งขันกับเชื้อไอโซเลทอื่นได้ดี และมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ทั้งในรูปแบบเชื้อไอโซเลทเดียวหรือใช้ร่วมกับเชื้อไอโซเลทอื่น ในขณะที่กรรมวิธีใช้เชื้อผสมหลายไอโซเลทในกรรมวิธีที่ 13 มีประสิทธิภาพลดลงกว่าการใช้เชื้อไอโซเลท SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023, SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023 หรือ SMUBN8-03-CHEM_Ra_2023 เพียงไอโซเลทใดไอโซเลทหนึ่ง (Table 2) ดังนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการใช้แบคทีเรียแต่ละไอโซเลทร่วมกันเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพมากที่สุด

4. การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย จำนวน 9 ไอโซเลท ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบแบคทีเรียแกรมลบ (Fig. 2A) 5 ไอโซเลท และแบคทีเรียแกรมบวก (Fig. 2B) 4 ไอโซเลท ดังนี้

แบคทีเรียแกรมลบ

ผลการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API® 20 NE (Fig. 2C) ร่วมกับการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ของแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า เป็นจีโนส *Burkholderia* จำนวน 2 ไอโซเลท เมื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี MLSA จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *atpD*, *lepA* และ *recA* จำแนกไอโซเลท AYA-GAP1-5.1_Bu_2023 เป็นเชื้อ *B. vietnamiensis* และจำแนกไอโซเลท AYA-CHEM1-01_Bu_2023 เป็นเชื้อ *B. diffusa* (Fig. 3A)

แบคทีเรียแกรมลบอีก 2 ไอโซเลท คือ SMUBN7-03-GAP_Ra_2023 และ SMUBN8-03-CHEM_Ra_2023 จำแนกด้วยการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA และวิธี MLSA จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *atpD*, *lepA* และ *recA* พบว่า ทั้ง 2 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *Ralstonia mannitolilytica* (Fig. 3B) ซึ่งเชื้อ *B. vietnamiensis*, *B. diffusa* และ *R. mannitolilytica* เป็นเชื้อโรคควบคุม กลุ่มที่ 2 ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (2561) เนื่องจากเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์และสัตว์

ผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ยังพบแบคทีเรียในจีโนส *Brucella* อีก 1 ไอโซเลท คือ SMRET1-03-ORG_Br_2023 โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *B. pecoris* และ *B. daejeonensis* ซึ่งเคยรายงานว่าพบเชื้อ *B. pecoris* ในต่อมน้ำเหลืองของระบบทางเดินปัสสาวะของแกะ (Hördt et al., 2020) ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 5 ไอโซเลทนี้จึงไม่สามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพ

แบคทีเรียแกรมบวก

ผลการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API® 50 CHB (Fig. 2D) ร่วมกับการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ยังพบแบคทีเรียในจีโนส *Brucella* อีก 1 ไอโซเลท คือ SMRET1-03-ORG_Br_2023 โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *B. pecoris* และ *B. daejeonensis* ซึ่งเคยรายงานว่าพบเชื้อ *B. pecoris* ในต่อมน้ำเหลืองของระบบทางเดินปัสสาวะของแกะ (Hördt et al., 2020) ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 5 ไอโซเลทนี้จึงไม่สามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพ

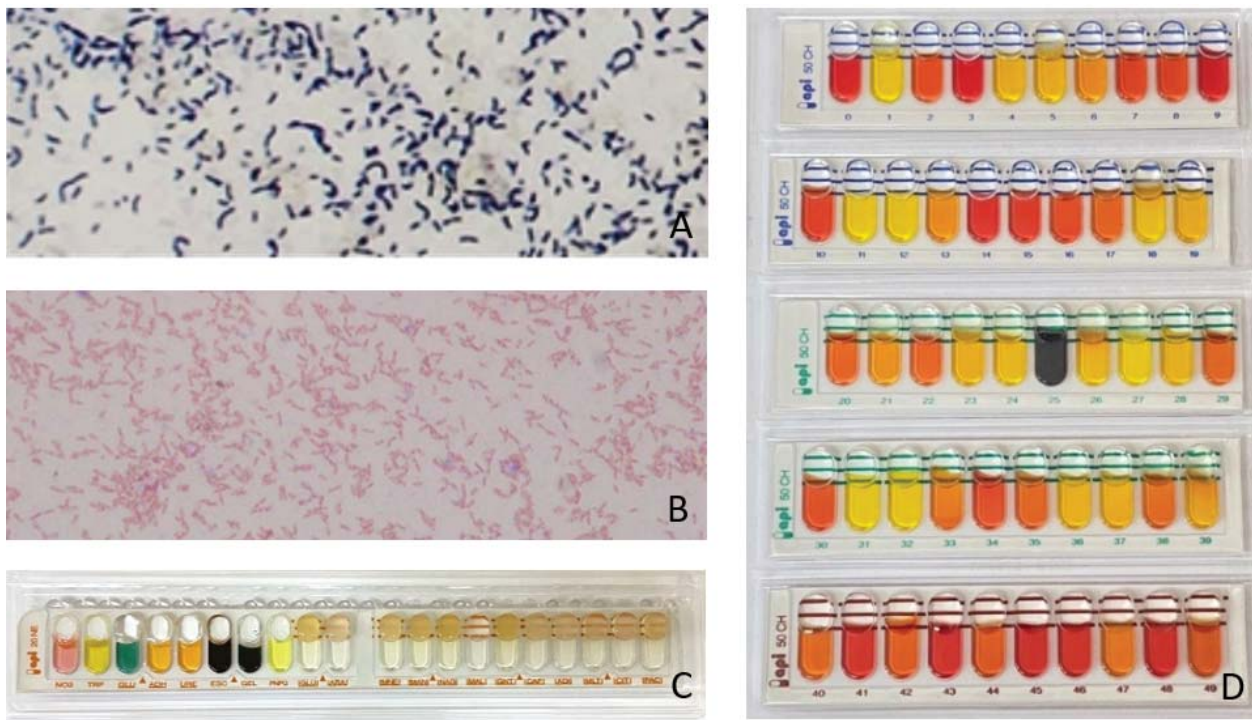


Fig. 2 Morphological and Biochemical characteristics of Bacteria: cell morphology of gram-negative (A) and gram-positive (B) bacteria; biochemical reactions on API® 20 NE (C) API® 50 CHB (D) test kits

สัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ของแบคทีเรียแกรมบวก จำแนกเป็นเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 4 ไอโซเลท เมื่อจำแนกด้วยวิธี MLSA จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *pta*, *pycA*, *rpoD*, *glpF* และ *purH* จำแนกชนิดเป็น *B. cabrialesii* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023 และ SRI-ORG1-RS-06_Bc_2023 และเป็น *B. subtilis* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ NMA-CHEM2-11_Bc_2023 และ SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023 (Fig. 4) ซึ่งเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สปีชีส์ไม่จัดเป็นเชื้อโรคควบคุม ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (2561) ดังนั้น จึงเป็นตัวเลือกที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับข้าวได้ในอนาคต

แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท แยกมาจากนิเวศการปลูกข้าวที่แตกต่างกัน คือ เชื้อ *B. cabrialesii* ไอโซเลท NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023 เป็นแบคทีเรียที่แยกจากดินรอบรากข้าวหลังเก็บเกี่ยว จากแปลงนาที่ใช้สารเคมี ในนาอาศัยน้ำฝน จังหวัดนครปฐม ไอโซเลท SRI-ORG1-RS-06_Bc_2023 แยกจากดินนาอินทรีย์ ในนาอาศัยน้ำฝน จังหวัดสระบุรี ช่วงพักแปลงก่อนถึงฤดูการปลูกข้าว

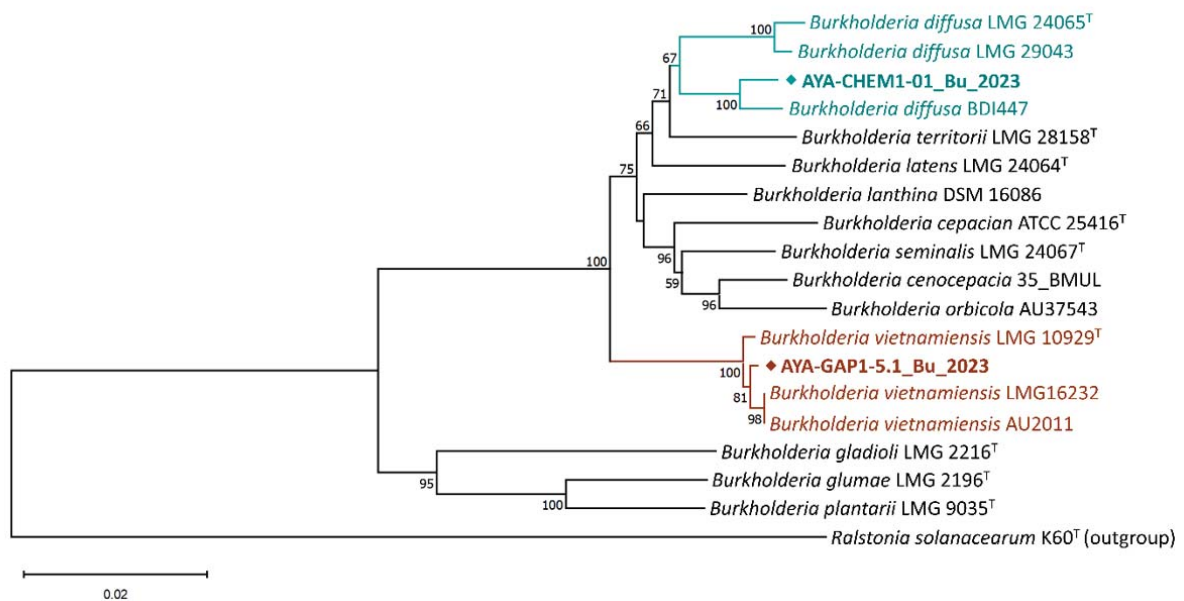
รอบถัดไป

เชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท NMA-CHEM2-11_Bc_2023 แยกจากดินนาชลประทานที่ใช้สารเคมี ช่วงพักแปลงก่อนถึงฤดูการปลูกข้าวรอบถัดไป จังหวัดนครราชสีมา และ SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023 แยกจากดินนาชลประทานที่ใช้สารเคมี ช่วงพักแปลงก่อนถึงฤดูการปลูกข้าวรอบถัดไป จังหวัดกำแพงเพชร

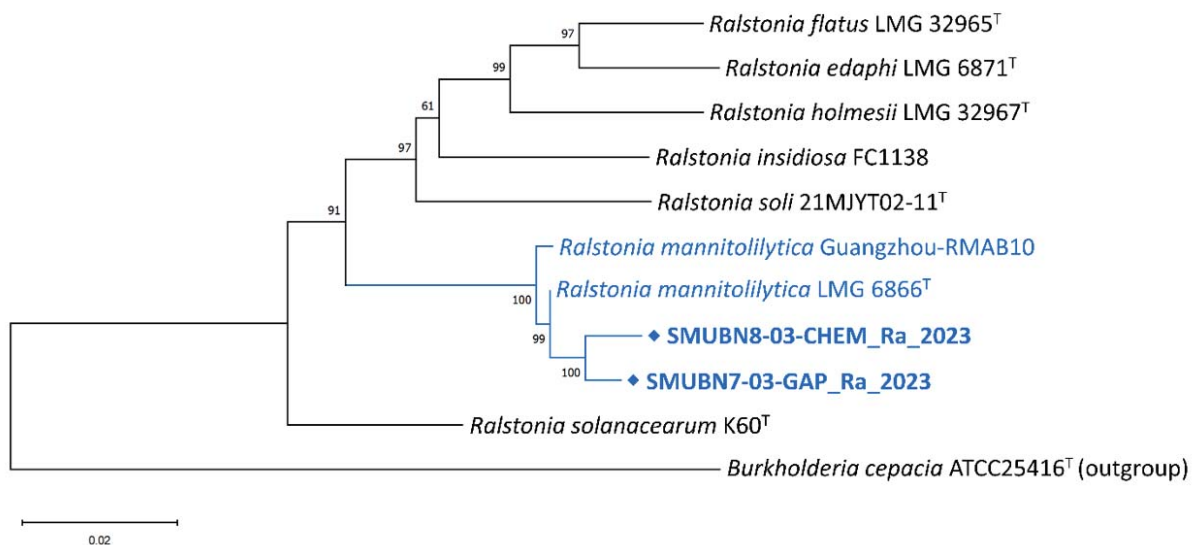
Bacillus spp. เป็นพืชฟิโอรที่มีกลไกสำคัญสองประการในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ การทำให้ธาตุอาหารมีความพร้อมต่อการใช้ประโยชน์ เช่น การตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต การผลิตสารซีเดอรโรฟอรัส เป็นต้น รวมทั้งการผลิตฮอร์โมนพืชที่สำคัญ เช่น IAA ฮอรโมนจิบเบอเรลลิน เป็นต้น นอกจากนี้ *Bacillus* spp. ยังมีบทบาทในการควบคุมศัตรูพืช โดยการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ เอนไซม์ไลติก และซีเดอรโรฟอรัส (Sun et al, 2025)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลท ทั้งการตรึงไนโตรเจน



(A)



(B)

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Burkholderia* spp. (2,552 positions) (A) and *Ralstonia* pp. (2,302 positions) (B) based on comparative analysis with multilocus sequences of the concatenated sequences of *atpD*, *lepA* and *recA* genes by the neighbor-joining method. The numbers above and under lines represent bootstrap values from 1,000 replicates with MEGA 11 software.

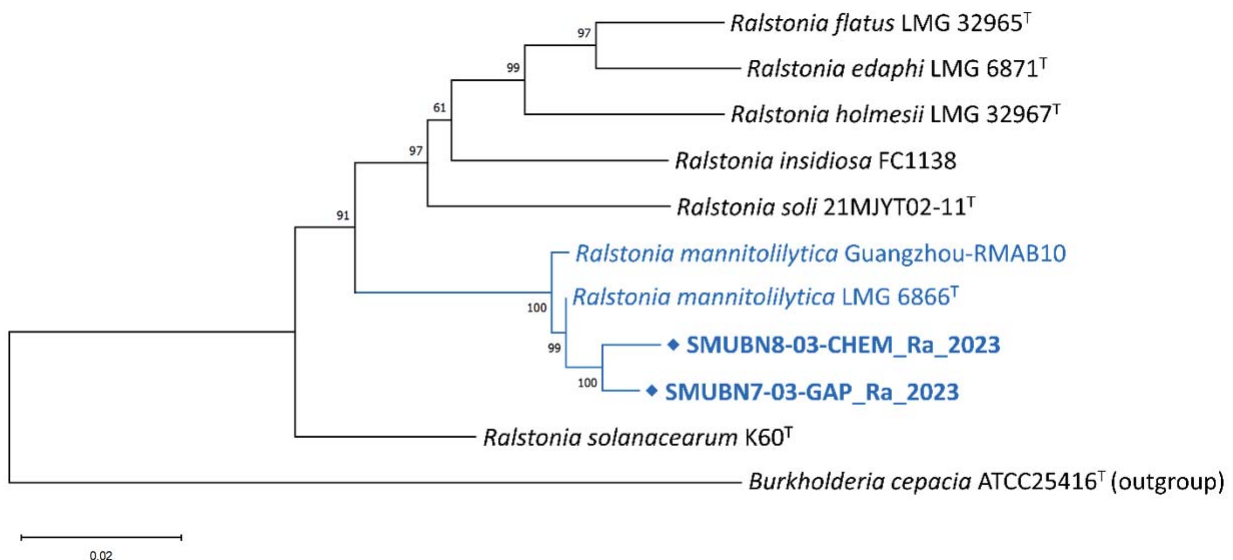


Fig. 4 Phylogenetic tree of *Bacillus* spp. based on comparative analysis with multilocus sequences of the concatenated sequences of *pta*, *pycA*, *rpoD*, *glpF* and *purH* genes (3,666 positions) by the neighbor-joining method. The numbers above and under lines represent bootstrap values from 1,000 replicates with MEGA 11 software.

การผลิต IAA และการละลายฟอสเฟต ของอริซา และคณะ (2567) ร่วมกับการศึกษาสมบัติการผลิตฮอร์โมน จิบเบอเรลลินและสารซีเคอร์โรฟอรัสผลการศึกษครั้งนี้พบ แบคทีเรียที่มีสมบัติครบทั้ง 5 สมบัติ คือ ไอโซเลท NPT-CHEM2-RS-02_Bc_2023 เชื้อแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลท มี 3-4 สมบัติ เชื้อแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวขาวดอก มะลิ 105 ได้ โดยเฉพาะไอโซเลท SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023 และ SMUBN7-03-GAP_Ra_2023 มี ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญได้ทั้งด้านความสูง ความยาวราก และน้ำหนักแห้ง มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม

ตัวแทนแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นพืชีพยาธิจำนวน 9 ไอโซเลท จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ สมบัติทางชีวเคมี ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S-23S rDNA และ housekeeping genes ด้วย วิธี MLSA พบเป็นเชื้อ *B. vietnamiensis* จำนวน 1 ไอโซเลท เชื้อ *B. diffusa* จำนวน 1 ไอโซเลท เชื้อ *R. mannitolilytica* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *Brucella* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท แต่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์

แบคทีเรียไอโซเลท NPT-CHEM2-RS-02-Bc_2023 แยกได้จากดินรอบรากข้าวหลังเก็บเกี่ยว จากนาข้าวที่ใช้ สารเคมี ในนิเวศนาข้าวอาศัยน้ำฝน จังหวัดนครปฐม และ SRI-ORG1-RS-06_Bc_2023 แยกได้จากดินนาอินทรีย์ ในนิเวศนาข้าวอาศัยน้ำฝน จังหวัดสระบุรี ช่วงพักแปลง ก่อนถึงฤดูการปลูกข้าวรอบถัดไป จำแนกชนิดเป็นเชื้อ *B. cabrialesii* และแบคทีเรียไอโซเลท NMA-CHEM2-11_Bc_2023 แยกได้จากดินนาชลประทานที่ใช้สารเคมี ช่วง พักแปลงก่อนถึงฤดูการปลูกข้าวรอบถัดไป จังหวัด นครราชสีมา และ SMKPT1-02-CHEM_Bc_2023 แยก จากดินนาชลประทานที่ใช้สารเคมี ช่วงพักแปลงก่อนถึง ฤดูการปลูกข้าวรอบถัดไป จังหวัดกำแพงเพชร จำแนกชนิด เป็นเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ ไม่เป็นเชื้อก่อโรค ในมนุษย์ สัตว์ หรือพืช ดังนั้น เมื่อพิจารณาทั้งสมบัติ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว ประสิทธิภาพในการ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในห้องปฏิบัติการและ โรงเรือนทดลอง และผลการจำแนกชนิดเชื้อ เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทนี้ จึงเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพแปลงนา และพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับข้าวต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากเงินกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566-2568 โครงการวิจัย “การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ดินในระบบการผลิตข้าวและการใช้ประโยชน์” ภายใต้แผนงานวิจัย ระบบการผลิตข้าวแบบอาหารปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ระยะที่ 2

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2564. ปุ๋ยชีวภาพ. กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร, กรุงเทพมหานคร. 20 หน้า.

กัลยกร โปร่งจันทิก และภัสชญภณ หมื่นแจ้ง. 2560. การใช้ปุ๋ยชีวภาพฟอสฟอรัสเพื่อลดต้นทุนการผลิตพืช. หน้า 99-105. ใน: ผลงานวิจัยเด่น/ผลงานเด่น ปี 2558-2559. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 150 หน้า.

จิรพันธ์ เปรมสุริยา, วราภรณ์ ปานอยู่, สุจินต์ ภัทรภูวดล และ วิชัย ไชยสิทธิ์. 2560. การพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วในการคัดเลือกเชื้อไรโซแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 48(1): 12-23.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2561. เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 139 ตอนพิเศษ 177 ง (ประกาศเมื่อ 27 พฤศจิกายน 2561). 6-125.

วันวิสาข์ เพ็ชรอำไพ, จุฑาทพ วัชรไชยคุปต์, สุจินต์ ภัทรภูวดล และ วิชัย ไชยสิทธิ์. 2560. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครวงไหม้ และเมล็ดต่างของข้าวโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของกลูเม็น. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 48(2): 297-311.

ศุภชาติ ธรรมนิติเวทย์. 2564. ไรโซแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช: หลักการและการใช้ประโยชน์. วารสารเกษตรนเรศวร 18: e0180190.

สุวรรณ เทนธานี. 2560. จุลินทรีย์...เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงบำรุงดิน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ 60 (190): 36-39.

อริสา จิตตติกรกุล, ไอลดา ชุมแสง, จิรนนท์ นิติเศรษฐ์, ชีรดา หวังสมบุญดี และพยอม โคเบลล์. 2567. ชนิดและประชากรของจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรในระบบการผลิตข้าวของประเทศไทย. หน้า 99-116. ใน: เอกสารสืบเนื่องการประชุมทางวิชาการ ดินและปุ๋ยแห่งชาติ ครั้งที่ 8. วันที่ 11-12 กรกฎาคม 2567.

มหาวิทยาลัยนเรศวร, จ.พิษณุโลก. 311 หน้า.

Ahmed, E. and S.J.M. Holmström. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microbial Biotechnology 7(3): 196-208.

Ahmed, I., M. del Mar Jiménez-Gascob, D.S. Luthe, S.N. Shakeel and M.E. Barbercheck. 2020. Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. Biological Control 144: 104167.

Alexander, D.B. and D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils 12: 39-45.

Ayyaz, M., Z. Khan, N. Tabbasam, T. Sultan, A. Saeed and M. Shan. 2021. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria for growth promotion of rice (*Oryza sativa* L.) and wheat (*Triticum aestivum*). Pakistan Journal of Biochemistry and Biotechnology 2(2): 177-194.

Bhardwaj, D., M.W. Ansari, R.K. Sahoo and N. Tuteja. 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. Microbial Cell Factories 13(1): 66.

Hasan, A., B. Tabassum, M. Hashim and N. Khan. 2024. Role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as a plant growth enhancer for sustainable agriculture: A review. Bacteria 3: 59-75.

Hördt, A., M.G. López, J.P. Meier-Kolthoff, M. Schleuning, L.M. Weinhold, B.J. Tindall, S. Gronow, N.C. Kyrpides, T. Woyke and M. Göker. 2020. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. Frontiers in Microbiology 11: 468.

Kang, S.M., A.L. Khan, M. Hamayun, J. Hussain, G.J. Joo, Y.H. You, J.G. Kim and I.J. Lee. 2012. Gibberellin-producing *Promicromonospora* sp. SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and influences endogenous plant

- hormones. *Journal of Microbiology* 50: 902-909.
- Le, X.T., D.T. Pham, T.A. Pham, T.T. Tran, T.H. Khuat, H.Q. Le and U.N. Vu. 2019. Exploration of genetic diversity of *Bacillus* spp. from industrial shrimp ponds in Vietnam by multi-locus sequence typing. *Fisheries and Aquatic Sciences* 22(17): 1-9.
- Paleg, L.G. 1965. Physiological effects of gibberellins. *Annual Review of Plant Biology* 16: 291-322.
- Payne, G.W., P. Vandamme, S.H. Morgan, J.J. LiPuma, T. Coenye, A.J. Weightman, T.H. Jones and E. Mahenthiralingam. 2005. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3917-3972.
- Rana, A., M. Joshi, S. Yadav and B. Saharan. 2012. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of Microbiology* 62(3): 1241-1250.
- Santos, P.E. de los, P. Vinuesa, L. Martínez-Aguilar, A.M. Hirsch and J. Caballero-Mellado. 2013. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Current Microbiology* 67: 51-60.
- Shah, A., M. Nazari, M. Antar, L.A. Msimbira, J. Naamala, D. Lyu, M. Rabileh, J. Zajonc and D.L. Smith. 2021. PGPR in agriculture: A sustainable approach to increasing climate change resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5: 1-22.
- Sun, W., and M.H. Shahrajabian. 2025. Biostimulant and beyond: *Bacillus* spp., the important plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)-based biostimulant for sustainable agriculture. *Earth Systems and Environment* 9: 1465-1498.
- Tilman, D., K.G. Cassman, P.A. Matson, R. Naylor and S. Polasky. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671-677.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2): 697-703.