



## การคัดแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดินที่ได้รับการปรับปรุงบำรุง สำหรับการเพาะปลูกพืช

### Screening of plant growth promoting bacteria from improving soil for growing plants

มานิตา โนนสูง<sup>1</sup> ธนภรณ์ พิบูลย์วัฒนวงษ์<sup>2</sup> และ นันทวัน ฤทธิเดช<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

<sup>2</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

\*Corresponding Author, E-mail: nunrid@kku.ac.th

#### บทคัดย่อ

ดินที่ได้รับการปรับปรุงบำรุงสำหรับการเพาะปลูกพืชทั้ง 7 ยี่ห้อ ที่นำมาศึกษามีลักษณะเป็นกลุ่มดินร่วน สีดำและน้ำตาล เมื่อคัดแยกแบคทีเรีย 57 ไอโซเลท ที่มีลักษณะแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาแล้ว จึงคัดแยกต่อเพื่อหาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยกลไกทางตรง คือความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ การละลายฟอสเฟต และโพแทสเซียม โดยการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Ashby's agar Pikovskaya's agar และ Aleksandrov's agar ตามลำดับ พบแบคทีเรีย 23 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ถัดมาคัดแยกต่อเพื่อหาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยกลไกทางอ้อม คือการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุก่อโรครากเน่าในพืชด้วยวิธี Dual culture พบแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคในระดับปานกลาง 2 ไอโซเลท ได้แก่ B-2 และ B-9 และเมื่อศึกษาปัจจัยทางจุลชีววิทยาเคมี และกายภาพ ในดินยี่ห้อ B ซึ่งพบไอโซเลท B-2 และ B-9 พบดินมีประชากรแบคทีเรีย  $7.49 \log \text{CFU/g}$  ความเป็นกรด 7.03 การนำไฟฟ้า  $1.25 \text{ dS/m}$  ร้อยละความชื้น 30.66 และอุณหภูมิ  $23.93^\circ \text{C}$  และผลการวิจัยนี้นับว่าเป็นเพียงข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปวิจัยต่อยอดซึ่งอาจนำไปผลิตดินหรือปุ๋ยที่มีแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตพืช ช่วยเพิ่มผลผลิตและเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน

#### ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria (PGPB) are the soil microbes that directly stimulated growth of a plant by assisting on recycling of nutrients (nitrogen fixation, phosphate and potassium solubilization) and indirect mechanisms by being as bacterial antagonist to fungal pathogens for controlling plant diseases. The aim of this study was to screen PGPB from seven improving soil brands. 23 isolates which had plant growth promoting properties were found in the direct screening mechanism of PGPB by testing on Ashby's agar, Pikovskaya's agar and Aleksandrov's agar. Then indirect screening mechanism of PGPB by dual culture method was made two isolates (B-2 and B-9), they had shown the antagonistic activity to inhibit *Sclerotium* sp. that cause root rot disease. These two antagonist isolates were screened from improving soil B brand. Moreover, microbiological,

chemical and physical property studies of improving soil B brand was found. pH was 7.77. Temperature was 26.03 °C. Moisture content was 14-31%. Electrical conductivity (EC) was 2.47 dS/m. Bacterial population was 7.49 logCFU/g. The texture was black loamy soils. These data were from the preliminary work and two isolates had the great plant growth promoting properties and were able to use for biofertilizer production.

**คำสำคัญ:** แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดินที่ได้รับการปรับปรุงบำรุงสำหรับการเพาะปลูกพืช *Sclerotium* sp.

**Keywords:** Plant growth promoting bacteria (PGPB), Improving soil for plants, *Sclerotium* sp.

## บทนำ

ธาตุอาหารเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณที่สูง เช่น ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) แต่พื้นที่การเกษตรส่วนใหญ่ในประเทศไทย โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าดินมีความอุดมสมบูรณ์และปริมาณอินทรีย์วัตถุในระดับต่ำ เนื่องจากมีธาตุฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมที่อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ พืชจึงไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ส่วนธาตุไนโตรเจนนั้นมีพืชเพียงบางกลุ่มที่มีจุลินทรีย์สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศทำให้พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ยังพบการชะล้างพังทลายของหน้าดินในปริมาณสูงของเขตร้อนทำให้พืชที่อาศัยในบริเวณนั้นได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอ (หนึ่งและคณะ, 2555) และการที่ดินขาดการบำรุงรักษาที่ถูกต้องเป็นเวลานานก็มีผลให้ระดับความอุดมสมบูรณ์ดินต่ำลง ซึ่งพบว่าดินขาดธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสค่อนข้างรุนแรง ส่วนโพแทสเซียมขาดในระดับปานกลางถึงรุนแรง (ประสาธ, 2551) นอกจากธาตุอาหารในดินจะเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชแล้ว ในดินก็มีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria: PGPB) โดยการส่งเสริมนี้จะเกิดกิจกรรมกลไก 2 แบบ ได้แก่ กลไกทางตรง เช่น แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Nitrogen fixing bacteria: NFB) ละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria: PSB) และละลายโพแทสเซียม (Potassium solubilizing bacteria: KSB) จากธาตุอาหารในดินให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง และกลไกทางอ้อม เช่น แบคทีเรียปฏิชีวนะที่สามารถสร้างสารยับยั้ง (Antifungal substances) เชื้อราบางชนิดที่ก่อโรคในพืชได้ (ธนากร, 2557) ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรีย PGPB กลไกทางตรงและกลไกทางอ้อมจากดินที่ได้รับการปรับปรุงบำรุงสำหรับการเพาะปลูกพืช เพื่อ

เป็นฐานข้อมูลและแนวทางการวิจัยสำหรับการผลิตดินที่มีกิจกรรมของแบคทีเรียที่ช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์และปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน การส่งเสริมประโยชน์ให้พืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและมีผลผลิตที่ดีขึ้นได้

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. ตัวอย่างดินที่ศึกษา

ดินที่นำมาศึกษาเป็นดินที่ได้รับการปรับปรุงบำรุงสำหรับการเพาะปลูกพืชต่าง ๆ โดยเป็นดินหมักทางธรรมชาติที่มีส่วนประกอบของเนื้อดินเป็นหลัก ไม่มีการเติมสารเคมีใด ๆ โดยซื้อดินจากร้านที่จัดจำหน่ายในเขตจังหวัดขอนแก่น 7 ยี่ห้อ ได้แก่ ดินยี่ห้อ W G P V C K และ B

### 2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน (ศิริชาติ, 2547)

2.1 การจำแนกลักษณะเนื้อดิน ใช้วิธีการประเมินเนื้อดินเชิงคุณภาพ โดยการสังเกตการเกาะตัวของอนุภาคดิน ดังนี้ ปั้นดินให้มีความชื้นพอที่จะเกาะตัวกันได้ (ดินควรมีความชื้นต่ำ) โดยใช้หัวแม่มือกับนิ้วชี้ปั้นดินให้เป็นแผ่นบาง ซึ่งดินแต่ละประเภทจะให้ลักษณะของแผ่นแตกต่างกัน ดังนี้ 1. กลุ่มดินเหนียว จะเกิดแผ่นได้ง่ายและคงทน 2. กลุ่มดินร่วน จะเกิดเป็นแผ่นและแตกหักง่าย และ 3. กลุ่มดินทราย จะไม่เกิดเป็นแผ่นเนื่องจากการเกาะยึดกันน้อย

2.2 การจำแนกลักษณะสีของดิน ใช้ระบบ Color name โดยอาศัยสีของดินที่ปรากฏให้เห็น ดังนี้ 1. ดินที่มีสีเข้มเป็นสีน้ำตาลถึงดำ 2. ดินที่มีสีขาวถึงสีเทาอ่อน 3. ดินที่มีสีเหลืองถึงสีแดง 4. ดินที่มีสีออกไปทางน้ำเงินจนถึงสีเทา และ 5. ดินที่มีจุดประ

2.3 การนำไฟฟ้า (dS/m) โดยชั่งน้ำหนักดิน 2 กรัม ต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วนดินต่อน้ำเป็น 1/5) ผสมสารละลายดินให้เข้ากัน และวัดค่าด้วยเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (EC meter) ที่อุณหภูมิห้อง

### 3. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของดิน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2553)

3.1 ความเป็นกรด (pH) โดยชั่งน้ำหนักดิน 5 กรัม ต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วนดินต่อน้ำเป็น 1/2) ผสมสารละลายดินให้เข้ากัน และวัดค่าด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด (pH meter) ที่อุณหภูมิห้อง

3.2 ปริมาณความชื้น โดยชั่งน้ำหนักดิน 10 กรัม อบที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักดินหลังอบเสร็จ และวัดค่าโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักดินก่อนอบ} - \text{น้ำหนักดินหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ}}$$

### 4. การศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของดิน (คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2557)

การตรวจนับประชากรแบคทีเรียด้วยวิธี Viable plate count โดยการผสมตัวอย่างดิน 10 กรัม เข้ากับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายดินด้วยวิธี Ten fold dilution series จนถึงระดับความเจือจาง  $10^{-8}$  แล้วทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Soil extract agar แล้วบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังบ่มเสร็จให้ตรวจนับจำนวนประชากรแบคทีเรีย (CFU/กรัม) โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{ประชากรแบคทีเรีย} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี} \times DF}{0.1}$$

เมื่อ CFU คือ Colony forming unit และ Dilution factor (DF) คือค่าความเข้มข้นจริงที่ถูกเจือจาง จากนั้นศึกษาต่อในข้อ 5

5. การคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ (คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2557)

การคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยคัดแยกโคโลนีซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปร่าง (form) ลักษณะผิวหน้า (surface) ริมขอบ (edge) เป็นต้น โดยใช้วิธี Cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Soil extract agar แล้วบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Soil extract agar ชนิดเอียง แล้วบ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาต่อในข้อ 6

### 6. การคัดแยกแบคทีเรีย PGPB โดยทดสอบกลไกทางตรง

6.1 การทดสอบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (NFB: Nitrogen fixing bacteria) โดยการแตะแบคทีเรียและแท่งลง 3 บริเวณ บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nitrogen free culture (Ashby's agar) (Maheshwari and Dubey, 2002) แล้วบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1-7 วัน จากนั้นตรวจสอบแบคทีเรีย NFB โดยนับจำนวนโคโลนีที่สามารถเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้

6.2 การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต (PSB: Phosphate solubilizing bacteria) โดยการแตะแบคทีเรียจำนวน 3 บริเวณ บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Pikovskaya's agar (Dubey et al., 2002) ที่เติม Tricalcium phosphate เป็นแหล่งอินทรีย์ฟอสเฟต แล้วบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นตรวจสอบแบคทีเรีย PSB โดยนับจำนวนโคโลนีที่มีการสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

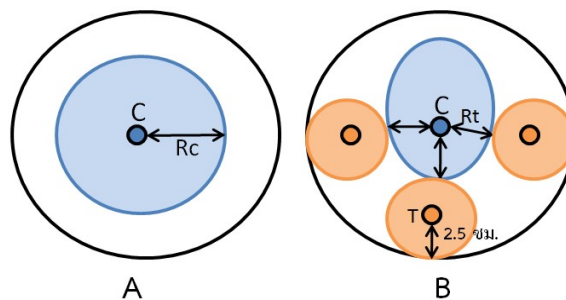
6.3 การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถละลายโพแทสเซียม (KSB: Potassium solubilizing bacteria) โดยการแตะแบคทีเรีย จำนวน 3 บริเวณ บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Aleksandrov's agar (Hu et al., 2006) ที่เติม Potassium aluminium silicate เป็นแหล่งอินทรีย์โพแทสเซียม แล้วบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นตรวจสอบแบคทีเรีย KSB โดยนับจำนวนโคโลนีที่มีการสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 7. การคัดแยกแบคทีเรีย PGPB โดยทดสอบกลไกทางอ้อม

การทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Antagonistic activity test) ต่อเชื้อรา *Sclerotium* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่า (*Sclerotium* root rot disease) (Kator, 2015) ด้วยวิธี Dual culture (Fokkema, 1978) โดยการใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 cm เจาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราแล้ววางตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรผสมระหว่าง Soil extract agar และ Potato dextrose agar (PDA) หรือ NA (Nutrient agar) จำนวน 1 ชื้น แล้วบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญเติบโตระยะหนึ่ง จากนั้นขีดลากไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเป็นทั้ง NFB PSB และ KSB ในข้อ 6 ขนาด 2 เซนติเมตร จำนวน 3 บริเวณ โดยที่เชื้อห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร แล้วบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ

37 °C เป็นเวลา 3 วัน (จานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดสอบ) และทำจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (เพาะเลี้ยงเชื้อราอย่างเดียว) จากนั้นตรวจสอบผลโดยการวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณร้อยละการยับยั้งรัศมีการเจริญของเส้นใย (Percent inhibition radial growth: PIRG) (Tronsmo, 1992) โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{PIRG} = \frac{(\text{Rc} - \text{Rt}) \times 100}{\text{Rc}}$$



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างวิธีการทดลอง Dual culture, A คือจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม และ B คือจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดสอบ

## 8. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Statistix10 ตามแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) แบบ ANOVA และแยกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least significant difference (LSD)

## ผลการวิจัย

### 1. ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน

1.1 ผลการจำแนกลักษณะเนื้อดิน โดยการสังเกตการเกาะตัวของอนุภาคดิน พบดินทั้ง 7 ยี่ห้อ มีลักษณะเนื้อดินเป็นกลุ่มดินร่วนและมีสีเข้ม ได้แก่ สีน้ำตาลและดำ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของดิน 7 ยี่ห้อ ได้แก่ ลักษณะเนื้อดินและสีของดิน (ศิริชาติ, 2547)

| ยี่ห้อดิน | เนื้อดิน     | สีของดิน   |
|-----------|--------------|------------|
| W         | กลุ่มดินร่วน | น้ำตาลเข้ม |
| G         | กลุ่มดินร่วน | น้ำตาล     |
| P         | กลุ่มดินร่วน | น้ำตาล     |
| V         | กลุ่มดินร่วน | ดำเข้ม     |
| C         | กลุ่มดินร่วน | น้ำตาล     |
| K         | กลุ่มดินร่วน | น้ำตาล     |
| B         | กลุ่มดินร่วน | ดำ         |

1.2 ผลจากการวัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง EC meter ที่อุณหภูมิห้อง พบดิน 7 ยี่ห้อ มีค่าอยู่ในช่วง 0.39-2.47 dS/m เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบดินแต่ละยี่ห้อไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value<0.05) (ตารางที่ 2) และเมื่อจำแนกค่าการนำไฟฟ้าในดินที่มีผลต่อระดับความเค็มและมีอิทธิพลต่อพืช พบดินทุกยี่ห้อที่มีคุณสมบัติไม่เค็ม ยกเว้นยี่ห้อ P มี

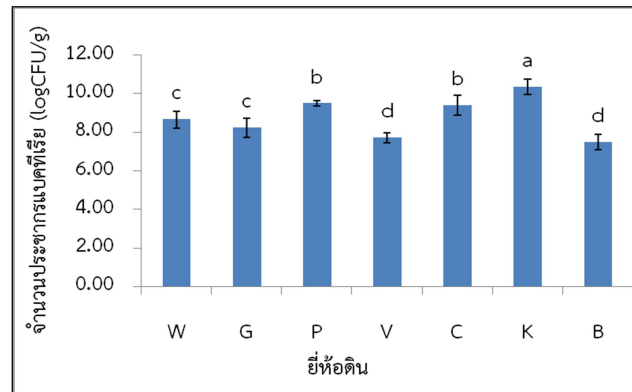
คุณสมบัติเค็มเล็กน้อยและมีผลต่อพืชไม่ทนเค็ม เมื่อเทียบกับค่าความเค็มที่ระดับต่าง ๆ (U.S salinity laboratory staff, 1954)

1.3 ผลการวัดอุณหภูมิในดิน 7 ยี่ห้อ อยู่ในช่วง 23.78-26.09 °C เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบดินแต่ละยี่ห้อไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value<0.05) (ตารางที่ 2)

## 2. ผลการศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของดิน

จากการตรวจนับประชากรแบคทีเรียด้วยวิธี Viable plate count และเจือจางสารละลายดินถึงระดับความเจือจาง

$10^{-8}$  พบดิน 7 ยี่ห้อ มีประชากรแบคทีเรียอยู่ในช่วง 7.73-10.73 logCFU/g เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบดินแต่ละยี่ห้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p\text{-value}<0.05$ ) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงจำนวนประชากรแบคทีเรีย (logCFU/g) ในดิน 7 ยี่ห้อ

## 3. ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของดิน

3.1 ผลการวัดค่าความเป็นกรด (pH) ด้วยเครื่อง pH meter ที่อุณหภูมิห้อง พบดินทั้ง 7 ยี่ห้อ มีค่าอยู่ในช่วง 5.37-7.77 เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบดินแต่ละยี่ห้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p\text{-value}<0.05$ ) (ตารางที่ 2)

3.2 ผลการวัดค่าความชื้น พบดิน 7 ยี่ห้อ มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 7.09-41.83 เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบดินแต่ละยี่ห้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p\text{-value}<0.05$ ) (ตารางที่ 2)

## 4. ผลการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์

จากการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยใช้วิธี Cross streak พบว่าสามารถคัดแยกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาได้ 57 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นดินยี่ห้อ W, G, P, V, C, K และ B พบมีจำนวน 8, 6, 9, 9, 4, 8 และ 13 ตามลำดับ

## 5. ผลการคัดแยกแบคทีเรีย PGPB โดยการทดสอบกลไกทางตรง

จากการนำแบคทีเรียบริสุทธิ์มาทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ การละลายฟอสเฟต และละลายโพแทสเซียมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Ashby's agar Pikovskaya's agar และ Aleksandrov's agar ตามลำดับ พบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติครบทั้งสามด้าน โดยเป็นทั้ง NFB PSB และ KSB จำนวน 23 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นพบในดินยี่ห้อ W, G, P, V, C, K และ B ซึ่งมีจำนวน 1, 4, 3, 4, 1, 3 และ 7 ไอโซเลท (ตารางที่ 3 และรูปที่ 3)

## 6. ผลการคัดแยกแบคทีเรีย PGPB โดยการทดสอบกลไกทางอ้อม

จากการทดสอบการมีปฏิสัมพันธ์ในแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Sclerotium* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าด้วยวิธี Dual culture และประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งรื้อมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (PIRG) พบแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ได้แก่ B-2 (PIRG = 54.13) และ B-9 (PIRG = 51.05) ที่มีประสิทธิภาพในระดับปานกลาง (รูปที่ 4 และ 5, ตารางที่ 4) และอีก 21 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในระดับต่ำ

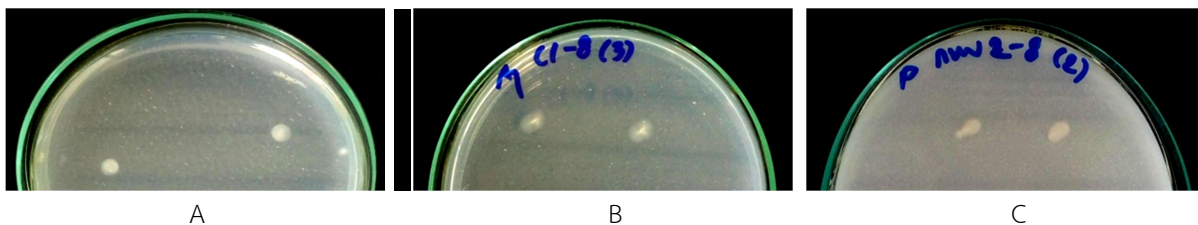
**ตารางที่ 2** แสดงคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของดิน ได้แก่ ความเป็นกรด ความชื้น การนำไฟฟ้า และอุณหภูมิ

| ยี่ห้อดิน | ความเป็นกรด (pH) | การนำไฟฟ้า (dS/m) | ความชื้น (%) | อุณหภูมิ (°C) |
|-----------|------------------|-------------------|--------------|---------------|
| W         | 7.44±0.06 b      | 0.99±0.05 c       | 26.42±1.79 c | 25.70±0.20 b  |
| G         | 5.37±0.04 e      | 0.50±0.03 d       | 18.77±0.15 d | 25.97±0.06 a  |
| P         | 7.77±0.20 a      | 2.47±0.24 a       | 8.83±0.96 f  | 26.03±0.06 a  |
| V         | 7.12±0.02 c      | 0.52±0.02 d       | 41.83±1.15 a | 25.77±0.06 b  |
| C         | 6.75±0.01 d      | 0.94±0.01 c       | 14.03±0.29 e | 23.90±0.00 c  |
| K         | 7.21±0.05 b      | 0.39±0.00 d       | 7.09±0.26 f  | 23.50±0.00 d  |
| B         | 7.03±0.01 c      | 1.25±0.01 b       | 30.66±1.55 b | 23.93±0.15 c  |
| F-test    | *                | **                | *            | *             |

หมายเหตุ : \* คือมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยวิธี LSD (p-value<0.05)

\*\* คือมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ด้วยวิธี LSD (p-value<0.01)

± คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: SD)



**รูปที่ 3** แสดงตัวอย่างผลการคัดแยกแบคทีเรีย PGPB โดยทดสอบกลไกทางตรง, A แสดงไอโซเลท B-6 ที่โคโลนีสามารถเจริญบนจานอาหาร Ashby's agar ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้, B แสดงไอโซเลท K-6 ที่มีวงใสรอบโคโลนีบนจานอาหาร Pikovskaya's agar ซึ่งสามารถละลายฟอสเฟตได้ และ C แสดงไอโซเลท C-3 ที่มีวงใสรอบโคโลนีบนจานอาหาร Aleksandrov's agar ซึ่งสามารถละลายโพแทสเซียมได้

**ตารางที่ 3** แสดงผลการคัดแยกแบคทีเรีย PGPB กลไกทางตรง โดยทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียต่อการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ การละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม

| จำนวนไอโซเลท       | ไอโซเลท                                                                                           | NFB | PSB | KSB |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 23                 | W-8 G-1 G-2 G-4 G-6 P-1 P-5P-9 V-2 V-4 V-5 V-7 C-5K-4 K-6 K-7<br>B-2 B-3 B-4 B-6 B-8 B-9 และ B-11 | +   | +   | +   |
| 7                  | W-1 W-3 W-4 B-1 B-5 และ B-13                                                                      | +   | +   | -   |
| 9                  | W-6 P-7 V-3 C-1 C-2 K-1 K-2 K-3 และ B-7                                                           | +   | -   | +   |
| 8                  | W-2 W-7 P-3 V-8 C-4 K-5 K-8 และ B-10                                                              | +   | -   | -   |
| 4                  | G-3 G-5 V-6 และ B-12                                                                              | -   | +   | -   |
| 6                  | W-5 P-2 P-4 P-8 V-1 และ V-9                                                                       | -   | -   | -   |
| ทั้งหมด 57 ไอโซเลท |                                                                                                   |     |     |     |

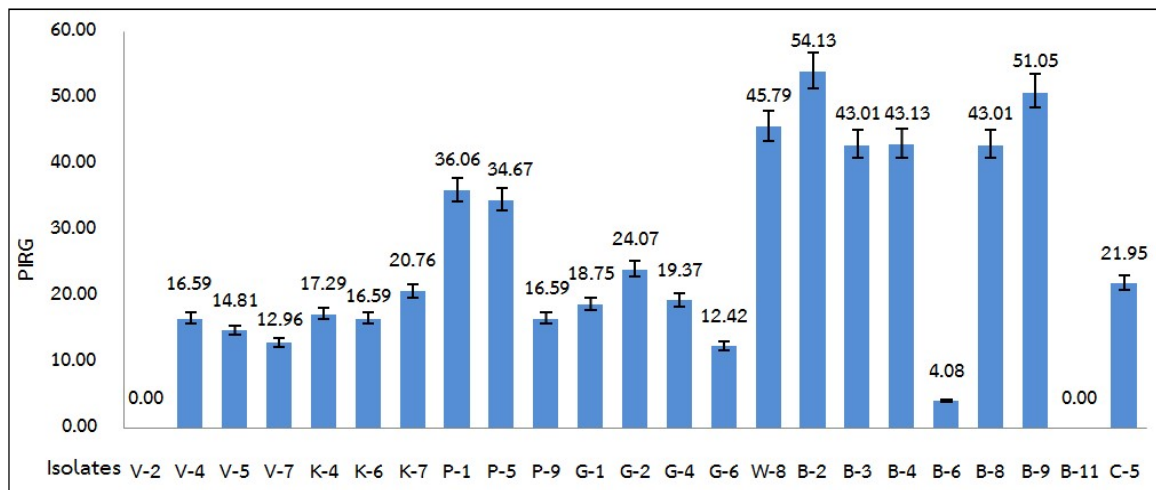
NFB คือ แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ

PSB คือ แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต

KSB คือ แบคทีเรียที่สามารถละลายโพแทสเซียม

+ คือ Positive test ใน NFB คือโคโลนีที่สามารถเจริญบนจานอาหารได้ ส่วน PSB และ KSB คือมีวงใสรอบโคโลนี

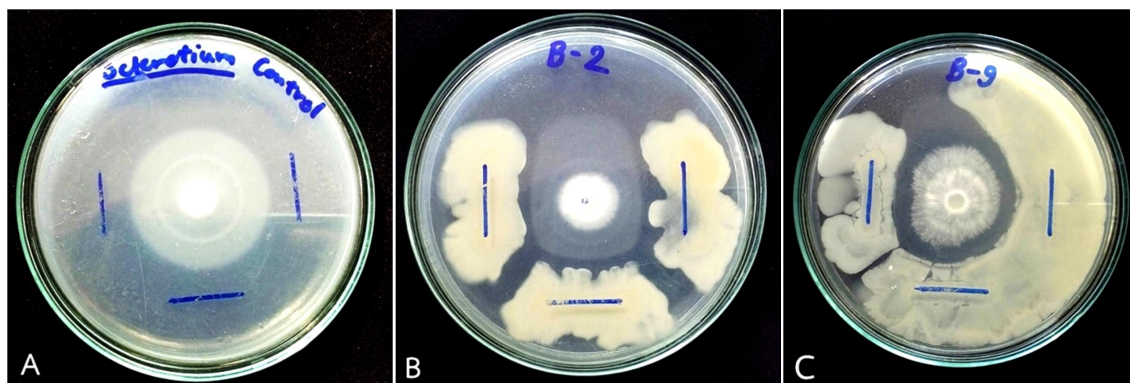
- คือ Negative test ใน NFB คือไม่ปรากฏโคโลนีที่เจริญบนจานอาหาร ส่วน PSB และ KSB คือไม่มีวงใสรอบโคโลนี



รูปที่ 4 ร้อยละการยับยั้งรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium* sp.

ตารางที่ 4 แสดงการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium* sp. ในแบคทีเรีย 23 ไอโซเลท

| ไอโซเลท                                                                                  | ค่า PIRG | ประสิทธิภาพในการยับยั้ง |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------|
| ไม่พบไอโซเลท                                                                             | >75      | สูงมาก                  |
| ไม่พบไอโซเลท                                                                             | 61-75    | สูง                     |
| B-2 และ B-9                                                                              | 51-60    | ปานกลาง                 |
| W-8 G-1 G-2 G-4 G-6 P-1 P-5 P-9 V-2 V-4 V-5 V-7 C-5 K-4 K-6 K-7 B-3 B-4 B-6 B-8 และ B-11 | <50      | ต่ำ                     |
| ทั้งหมด 23 ไอโซเลท                                                                       |          |                         |



รูปที่ 5 ตัวอย่างผลการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ในวิธี Dual culture, A คือจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมโดยเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Sclerotium* sp., B และ C คือจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดสอบระหว่างเชื้อรา *Sclerotium* sp. กับแบคทีเรียปฏิปักษ์ B-2 และ B-9 ตามลำดับ

### สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ดินแต่ละยี่ห้อที่นำมาศึกษาเป็นดินที่มีสารปรับปรุงทางธรรมชาติและกระบวนการหมักแตกต่างกัน จึงทำให้ดินมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีต่างกัน เช่น ความเป็นกรด ความชื้น อุณหภูมิ และการนำไฟฟ้าซึ่งส่งผลต่อความเค็มของดิน เป็นต้น คุณสมบัติเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อกิจกรรมของแบคทีเรียทำ

ให้มีปริมาณประชากรและชนิดแบคทีเรียที่หลากหลาย ในการทดลองนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียจากดินที่ได้รับการปรับปรุงบำรุงสำหรับการเพาะปลูกพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Soil extract agar เนื่องจากในสูตรอาหารดังกล่าวมีส่วนผสมของธาตุอาหารของสารสกัดจากดินจากแหล่งดินเดิมซึ่งจะตรงตามความต้องการของแบคทีเรียมากกว่าธาตุอาหารจากแหล่งอื่น โดยสามารถคัด

แยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้งหมด 57 ไอโซเลท ต่อมาคัดแยกหาแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ การละลายฟอสเฟต และโพแทสเซียม พบแบคทีเรีย 23 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันและมีคุณสมบัติดังกล่าว จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 23 ไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติในการเป็นแบคทีเรียปฏิบั้กซ์ที่มีความสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่า ด้วยวิธี Dual culture พบแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ได้แก่ B-2 และ B-9 ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราระดับปานกลาง ซึ่งในขั้นตอนนี้เป็นการเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรียบนจานอาหารเดียวกันจึงใช้อาหารผสมระหว่าง PDA และ Soil extract agar หรือ NA เพื่อช่วยให้แบคทีเรียและเชื้อราเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และการพบไอโซเลท B-2 และ B-9 ที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดินยี่ห้อ B ซึ่งมีประชากรแบคทีเรีย  $7.49 \log \text{CFU/g}$  ความเป็นกรด 7.03 การนำไฟฟ้า 1.25 dS/m ความชื้น 30.66% และอุณหภูมิ 23.93 °C จากคุณสมบัติที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเชื้อทั้งสองไอโซเลทซึ่งได้จากการทำการทดสอบเบื้องต้นจากการทดลองในครั้งนี้ การศึกษาครั้งนี้จำเป็นต้องเป็นฐานข้อมูลเพื่อการศึกษาต่อยอดในอนาคต เช่น การทดสอบคุณสมบัติอื่น ๆ ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การระบุสกุลและสปีชีส์ของแบคทีเรียในงานวิจัยนี้จำเป็นต้องศึกษาในขั้นถัดไปและอาจนำไปผลิตดินหรือปุ๋ยที่มีจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืชและเพิ่มผลผลิตให้ดีขึ้นทางด้านการเกษตรและช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน การควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าในพืชได้ เป็นต้น ดังในรายงานของ Brzeski และ Szececs (1999) ซึ่งพบว่าหลังจากเติมสารปรับปรุงดิน ซึ่งได้แก่ ซีลี้อยและไบตันสนลงในดินทรายสารปรับปรุงดินนี้จะไปช่วยเพิ่มจำนวนของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเพิ่มความหนาแน่นของไส้เดือนดินที่อยู่ในดิน ทั้งนี้ จิราพร (2556) ได้รายงานว่าทีมวิจัย มข. ได้กำลังพัฒนาเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกที่จะช่วยลดต้นทุน ลดการใช้สารเคมี เพิ่มผลผลิตของอ้อยที่เป็นพืชเศรษฐกิจของไทย และการรักษาสังแวดล้อมในให้ยั่งยืนต่อไปได้ และรายงานของปราณี และ ชนิดาภา (2555) ที่พบเชื้อแอคติโนมัยซีทจาก

ตัวอย่างดินรอบรากพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสเพื่อยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium Rolfsii* ซึ่งลดการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าของพริกได้ถึงร้อยละ 90

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้เนื่องจากความช่วยเหลือคำแนะนำและกำลังใจจากอาจารย์ที่ปรึกษา รุ่นพี่นักศึกษาทุกท่าน พร้อมทั้งสถานที่ทำงานวิจัยในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรา *Sclerotium* sp. ขอขอบทุกท่านทั้งที่ได้กล่าวนามและไม่ได้กล่าวนาม

### เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน. (2553). คู่มือการปฏิบัติงานกระบวนการวิเคราะห์ตรวจสอบดินทางเคมี. กรุงเทพฯ: กรมพัฒนาที่ดิน. หน้า 13-16 และ 48-49.
- คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา. (2557). คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. (พิมพ์ครั้งที่ 5). ขอนแก่น. ขอนแก่นการพิมพ์. หน้า 33-40.
- จิราพร ประทุมชัย. (2556). มข.วิจัยพบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ลดต้นทุนเพิ่มผลผลิตเกษตรปลูกอ้อย, แหล่งข้อมูล: <https://www.kku.ac.th/news/v.php?q=0003717&l=th>. ค้นเมื่อวันที่ 25 ตุลาคม 2560.
- ธนากร แสงสง่า. (2557). พีจีอาร์: บทบาทในการส่งเสริมและป้องกันพืชภายใต้สภาวะเครียด. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(4): หน้า 559-560.
- ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล และ ชนิดาภา นวะพัฒน์. (2555). การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium Rolfsii* ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 14(1): 10-22.
- ศิริชาติ ศรีวงษา. (2547). ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. สกลนคร: คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏสกลนคร. หน้า 38-39 และ 47-48.
- หนึ่ง เตียอึ้ง, สมปอง หมั่นแจ้ง และ สมพร ชุมพลีชานนท์. (2555). การรวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์ Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). ใน: รายงานวิจัยรหัสโครงการ SUT3-304-49-12-17. หน่วยงานคลังปัญญา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- Brzeski, M.W. and Szececs, M. (1999) Effect of continuous amendment with coniferous sawdust on nematodes and microorganisms. Nematol. Medit (27): 159-166.

- Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K. (2002). Practical microbiology. (1<sup>st</sup> ed). New Delhi: S. Chand & Co. P Ltd. pp. 366 and 373.
- Fokkema, N.J. (1978). Fungal antagonism in the Phyllosphere. Ann. Appl. Biol. (89): 115-117.
- Hu, X., Chen, J. and Guo, J. (2006). Two phosphate and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu mountain, Zhejiang, China. World journal of microbiology and biotechnology 22: 983-990.
- Kator, L., Hosea, Z.Y. and Oche, O.D. (2015). *Sclerotium rolfsii*; Causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease. Scholars research library 78-89.
- Tronsmo, A. (1992). Leaf and blossom epiphytes and endophytes as biological agents of plant diseases. A life sciences (230): 43-54.
- United States salinity laboratory staff. (1954). Agriculture handbook No. 60. Washington, D.C.: Government printing office.

