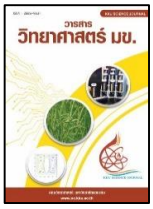
KKU SCIENCE JOURNAL

Journal Home Page : https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ

Published by the Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand



การคัดแยกแบคทีเรียผลิตวิตามินบีหกที่สามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

Screening of Vitamin B-6 Producing Bacteria Capable of Producing Plant Growth Promoting Substance

กัญจน์พล สระประทุม[1] กานต์ณภัทศรา สุดสี[1] จิรายุส แก้วหมอ[1] เจนิตา โกศัลวิตร์[1] ชฎารัตน์ ใจดี[1] ชมพูนุท บุตรนนท์[1] ธีรพัฒน์ วงค์คะสุ่ม[1] นนทนันท์ บุญจรัส[1] พิชิตชัย บัวศรี[1] แพรไหม จำปาทอง[1] วรรณรัตน์ แนบกลาง[1] ศิรประภา หงส์ชัยภูมิ[1] สุทธิดา คำแดง[1] อภิสิทธิ์ เหล่านภากุล[1] ศกุลตลา นิลแก้ว[2] และ ยานี ตรองพาณิชย์[1*]

Kanjaphon Sraprathum[1], Kannapatsara Sudsee[1], Jirayut Kaewmor[1], Jenita Kosanlawit[1], Chadarat Jaidee[1], Chompoonut Butnon[1], Teerapat Wongkasum[1], Nonthanan Buncharat[1], Pichitchai Buasri[1], Praemai Chumpathong[1], Wannarat Naebklang[1], Siraprapha Hongchaiyaphum[1], Sutthida Kamdang[1], Apisit Laonapakul[1], Sakuntala Ninkaew[2] and Yanee Trongpanich[1*]

[1]สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[2]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบีหกออกภายนอกเซลล์และสามารถสร้างสารเสริมการเจริญของพืช โดยคัดเลือกจากแหล่งดินบริเวณรอบรากของพืชวงศ์ถั่วในพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น แยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 932 ไอโซเลท โดยใช้คุณสมบัติการผลิตวิตามินบีหกออกภายนอกเซลล์ จากนั้นคัดเลือก 50 ไอโซเลท มาศึกษาการสร้างสารเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ การละลายฟอสเฟต การละลายโพแทสเซียม และการสร้าง indole-3-acetic acid (IAA) พบมีจำนวน 48 ไอโซเลท ที่ละลายฟอสเฟตได้ จำนวน 45 ไอโซเลท ที่ละลายโพแทสเซียมได้ และทั้ง 50 ไอโซเลท ผลิต IAA ได้ จากนั้นตรวจสอบปริมาณการผลิตวิตามินบีหกทุก ๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง และนำมาจัดอันดับตามปริมาณการผลิตวิตามินบีหกพบเชื้อ 5 ไอโซเลท ที่ผลิตวิตามินบีหกได้สูงที่สุดอยู่ที่ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปจำแนกเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี พบมีความใกล้เคียงกับ *Brevibacillus laterosporus* *Acinetobacter baumannii* complex *Bacillus thuringiensis* และ 2 ไอโซเลท มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus cereus* ทั้ง 5 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช ในอดีตเคยมีรายงานเกี่ยวกับการผลิตวิตามินบีหกโดยเชื้อ *Ba. cereus* แต่ไม่พบรายงานเกี่ยวกับการผลิตวิตามินบีหกโดยเชื้อ

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

Received: date: 13 June 2024 | Revised date: 19 September 2024 | Accepted date: 20 September 2024

Ba. thuringiensis *B. laterosporus* และ *A. baumannii* complex อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญของพืชต่อไป

ABSTRACT

The objectives of this research were to isolate plant growth promoting rhizobacteria that can produce extracellular vitamin B-6 from rhizospheric soil of legume plants in Khon Kaen University and test their plant growth promoting properties. A total of 932 isolates were pick up by using extracellular vitamin B-6 producing property. Then, 50 isolates were selected to study plant growth promoting properties such as phosphate solubilization, potassium solubilization and Indole-3-acetic acid (IAA) production. Forty-eight isolates showed phosphate solubilizing property; forty-five isolates could solubilize insoluble potassium; and all 50 isolates showed IAA production. Then, the amount of vitamin B-6 production was examined every 6 hours until the end of 24 hours. Five isolates had the highest amount of produced vitamin B-6 at 6 hours and then were identified by biochemical test. Among them, three isolates were related to *Brevibacillus laterosporus*, *Acinetobacter baumannii* complex, *Bacillus thuringiensis*, and two isolates were related to *Bacillus cereus*. All 5 isolates were in plant growth promoting group. Previous report showed *Ba. cereus* could produce vitamin B-6, but there are no reports on the production of vitamin B-6 by *Ba. thuringiensis*, *B. laterosporus* and *A. baumannii* complex. However, further studies are needed to obtain their utility to promote plant growth.

คำสำคัญ: ไรโซแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช วงศ์ถั่ว *Brevibacillus laterosporus* *Acinetobacter baumannii* complex *Bacillus thuringiensis*

Keywords: Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), Fabaceae, *Brevibacillus laterosporus*, *Acinetobacter baumannii* complex, *Bacillus thuringiensis*

บทนำ

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อคุณภาพของดินและมีประโยชน์ต่อพืช เรียกว่า ไรโซแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) (ศุภชาติ, 2564) แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม PGPR ได้แก่ สกุล *Acinetobacter Alcaligenes Agrobacterium Arthrobacter Azospirillum Azotobacter Bacillus Burkholderia Enterobacter Erwinia Flavobacterium Klebsiella Micrococcus Mycobacterium Pontoea Pseudomonas Rhizobium* และ *Serratia* ประโยชน์ของ PGPR ในพืช เช่น การกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มการดูดซึมธาตุอาหาร เป็นปฏิปักษ์กับจุลินทรีย์ก่อโรคพืช และเพิ่มความทนต่อภาวะความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic stress) (Lahsini *et al*., 2022) PGPR สามารถผลิตสารได้หลายชนิดที่สัมพันธ์กับพืช ได้แก่ ฮอร์โมนพืช (phytohormone) สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ไซเดอร์โรฟอร์ (siderophore) โพลีเอมีน (polyamine) และวิตามิน (ศุภชาติ, 2564; Palacios *et al*., 2014)

วิตามินบีหก เป็นสารประกอบ 2-methyl-3-hydroxyl-pyridine ที่สามารถแปลงสภาพได้หกรูปแบบ ได้แก่ pyridoxal (PL) pyridoxine (PN) pyridoxamine (PM) pyridoxal 5′-phosphate (PLP) pyridoxine 5′ -phosphate (PNP) และ pyridoxamine 5′ -phosphate (PMP) (Roychoudhury, 2021) วิตามินบีหกมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพ ทั้งในปฏิกิริยาแบบผ่านเอนไซม์ (Enzymatic reaction) และไม่ผ่านเอนไซม์ (Non-enzymatic reaction) ในกระบวนการที่ผ่านเอนไซม์ วิตามินบีหกในรูป PLP เป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญในปฏิกิริยามากกว่า 200 ปฏิกิริยาในเซลล์

โดยเฉพาะในเมแทบอลิซึมของกลูโคส กรดอะมิโนและกรดไขมัน ส่วนในกระบวนการที่ไม่ผ่านเอนไซม์ พบว่าวิตามินบีหกทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ตัวแย่งจับหมู่คาร์บอนิล (carbonyl scavenger) และตัวจับโลหะ (metal chelator) ในมนุษย์ไม่สามารถผลิตวิตามินบีหกได้ แต่ในจุลินทรีย์และพืชบางชนิด สามารถผลิตวิตามินบีหกได้ (Mangel *et al*., 2019; Da'dara *et al*., 2021)

แบคทีเรียในกลุ่ม PGPR สามารถผลิตวิตามินได้หลายชนิด แต่ PGPR ที่ผลิตวิตามินบีหกพบเป็นส่วนน้อย ได้แก่ *Bacillus subtilis Pseudomonas fluorescens Mesorhizobium loti* และ *Sinorhizobium meliloti* (Palacios *et al*., 2014) นักวิจัยได้ค้นพบบทบาทสำคัญของวิตามินบีหกในพืช ซึ่งสัมพันธ์กับเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน โดยพบว่าวิตามินบีหกช่วยบรรเทาความเป็นพิษของแอมโมเนียมในพืชได้จากการใส่ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนอนินทรีย์ในปริมาณสูง โดยแอมโมเนียมที่มีมากเกินไปในดิน ส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของรากพืช และทำให้พืชมีอาการใบเหลือง (leaf chlorosis) จากนั้นจะเหี่ยวและร่วง (Liu *et al*., 2022) นอกจากนั้น ยังพบว่าวิตามินบีหก ทำให้พืชมีความทนทานต่อความเครียดจากความเค็ม โดยการควบคุมสภาวะสมดุลของ Na^+ และ K^+ โดยการปรับกิจกรรมในการขนส่งไอออนในเซลล์พืช (Palacios *et al*., 2014)

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตวิตามินบีหกออกภายนอกเซลล์ โดยคัดเลือกจากแหล่งดินบริเวณรอบรากของพืชวงศ์ถั่วในพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ ตลอดจนทดสอบคุณสมบัติสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ การละลายฟอสเฟต การละลายโพแทสเซียม และการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บดินจากบริเวณรอบรากพืชในวงศ์ถั่ว ในพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพืชวงศ์ถั่ว จำนวน 12 ชนิด ดังนี้ แดง (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) W.Theob.) จามจุรี (*Albizia saman* (Jacq.) F.Muell.) กระถิน (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) อยู่ในวงศ์ย่อย Mimosoideae กัลปพฤกษ์ (*Cassia bakeriana* Craib) ราชพฤกษ์ (*Cassia fistula* L.) มะขาม (*Tamarindus indica* L.) นนทรี (*Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K.Heyne) ขี้เหล็ก (*Senna siamea* (Lam.) H.S.Irwin & Barneby) มะค่าแต้ (*Sindora siamensis* Teijsm. & Miq.) พันชาด (*Erythrophleum succirubrum* Gagnep.) อยู่ในวงศ์ย่อย Caesalpinoideae ทองกวาว (*Butea monosperma* (Lam.) Taub.) และประดู่ป่า (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) อยู่ในวงศ์ย่อย Papilionoideae ตัวอย่างดินถูกเก็บจากบริเวณรากพืชแต่ละชนิด จำนวนชนิดละ 3 ต้น โดยแต่ละต้นตั้งอยู่กันคนละตำแหน่ง จำนวน 36 ต้น ต้นละ 3 จุด ระบุตำแหน่งด้วยละติจูด/ลองจิจูด เก็บมาจาก 5 พื้นที่ที่แตกต่างกัน ดังนี้ ก) บริเวณคณะวิทยาศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และบริเวณหอพักนักศึกษาแพทย์ที่ 4 ข) ป่าบริเวณโรงไฟฟ้ามหาวิทยาลัยขอนแก่น และบริเวณหมู่บ้านศูนย์แพทย์ 4 ค) บริเวณป่าด้านทิศตะวันตกของหอพักนักศึกษาพยาบาลและด้านทิศเหนือของอาคารจตุรมุขสวนเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น ง) บริเวณป่าด้านทิศใต้ของกองอำนวยการกีฬา มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ) บริเวณสวนร่มเกล้ากัลปพฤกษ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เก็บดินประมาณจุดละ 30 กรัม ที่ความลึกประมาณ 0 – 15 เซนติเมตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างดินไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบีหกจากดินบริเวณรอบรากพืชวงศ์ถั่ว

2.1. นำตัวอย่างดินที่เก็บไว้ มาร่อนด้วยตะแกรงขนาด 250 ไมครอน ชั่งตัวอย่างดินปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 180 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เพื่อให้แบคทีเรียหลุดออกจากอนุภาคของดิน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.2. นำของเหลวชั้นบนมาเจือจางเป็นลำดับขั้น โดยวิธี Serial dilution แยกเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค Spread plate บนอาหารแข็ง Pyridoxine Y Medium (PYM; CRITERION™, USA) นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 3 วัน หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3. นำโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน ที่ได้จากอาหารแข็ง PYM มาขีดลาก (cross streak) บนอาหารแข็ง Yeast extract mannitol (YEM) ที่มี Congo red (Himedia, India) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 3 วัน หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดแยกโคโลนีที่มีสีขาว – สีชมพูอ่อน จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว Modified synthetic medium (MSM) (2% glucose, 2% peptone, 0.1% KH_2PO_4, 0.1% $CaCl_2$, 0.05% $MgSO{\bullet}H_2O$, 0.0005% $MnSO_4{\bullet}H_2O$ และ 0.0005% $FeSO_4{\bullet}7H_2O$) pH 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด โดยเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 - 20 ชั่วโมง เพื่อทำ 25% glycerol stock ชื่อของไอโซเลท จะระบุตามชนิดและต้นของต้นไม้ที่แยกได้

3. การทดสอบการผลิตวิตามินบีหก

นำ glycerol stock มาเลี้ยงในอาหารเหลว Synthetic medium (SM) (2% glucose, 2% peptone, 0.1% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO{\bullet}H_2O$, 0.0005% $MnSO_4{\bullet}H_2O$ และ 0.0005% $FeSO_4{\bullet}7H_2O$) pH 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:100 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด โดยเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตกตะกอนเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง Centrifuge series 1010 (Centurion Scientific, UK) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนใส มาผ่านกระบวนการ Dephosphorylation (Sukprasong *et al*., 2018) จากนั้นนำไปหาปริมาณวิตามินบีหกด้วย เทคนิค Agar well diffusion assay (ADA) (Sukprasong *et al*., 2018) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้ pyridoxine (PN) เป็นสารมาตรฐานที่ช่วง 0.2 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับการวัดปริมาณวิตามินบีหกในเชื้อ 50 ไอโซเลท ทำโดยนำ glycerol stock มาเลี้ยงในอาหารเหลว SM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด โดยเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้น นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว SM อีกครั้ง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้ออัตราส่วน 1:100 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด โดยเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตกตะกอนเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง Centrifuge series 1010 (Centurion Scientific, UK) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปผ่านกระบวนการ Dephosphorylation และหาปริมาณวิตามินบีหกด้วย เทคนิค ADA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน pyridoxine (PN) ในช่วง 0.2 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

นำ glycerol stock มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient (0.3% Beef extract, 0.5% peptone) pH 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:100 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยอดบนหน้าอาหารแข็ง Pikovskaya's (Rangel-Montoya *et al*., 2022) จุดละ 5 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสังเกตผลทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งสิ้น 72 ชั่วโมง นำมาวัดขนาดวงใสด้วยดิจิตัลเวอร์เนียคาลิปเปอร์ หน่วยเป็นมิลลิเมตร นำไปคำนวณค่า Phosphate solubilization index (PSI) ตามสูตร ดังนี้ ค่า PSI เท่ากับ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและโคโลนี หารด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

5. การทดสอบความสามารถในการละลายโพแทสเซียม

นำ glycerol stock มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:100 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหยอดบนอาหารแข็ง Modified Pikovskaya's (Rangel-Montoya *et al*., 2022) จุดละ 5 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

และสังเกตผลที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง นำมาวัดขนาดวงสีเหลืองด้วยดิจิตัลเวอร์เนียคาลิปเปอร์ หน่วยเป็น มิลลิเมตร นำไปคำนวณค่า Potassium solubilization index (KSI) ตามสูตร ดังนี้ ค่า KSI เท่ากับ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีเหลืองและโคโลนี หารด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

6. การทดสอบการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA)

นำ glycerol stock มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient ที่เติมทริปโทฟาน 0.102 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:100 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาตกตะกอนเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง Centrifuge series 1010 (Centurion Scientific, UK) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม Salkowski reagent ($FeCl_3$ 12 กรัม ละลายใน 7.9 M H_2SO_4 ปริมาตรรวม 1 ลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเหลว Nutrient ที่เติมทริปโทฟาน 0.102 กรัมต่อลิตร เป็น Blank เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA หน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การสร้างกราฟมาตรฐาน IAA ทำโดยเตรียม 10 mM IAA ใน 50% เมทานอล ในช่วงความเข้มข้น 0 - 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การจำแนกเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี

นำเชื้อ 5 อันดับแรกมาขีดลาก (cross streak) บนอาหารแข็ง Nutrient บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาทั้งสิ้น 18 ชั่วโมง จากนั้นส่งไปจำแนกเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี ที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS for Windows รุ่น 29.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบีหกจากดินบริเวณรอบรากพืชวงศ์ถั่ว

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพืชวงศ์ถั่วเบื้องต้น ได้คัดแยกโคโลนีที่มีสีขาว – สีชมพูอ่อน จำนวนทั้งหมด 932 ไอโซเลท จำแนกไอโซเลทตามชนิดของต้นไม้ ดังนี้ วงศ์ย่อย Caesalpinoideae ได้แก่ ต้นนนทรี 98 ไอโซเลท ต้นขี้เหล็ก 87 ไอโซเลท ต้นพันชาด 80 ไอโซเลท ต้นมะขาม 75 ไอโซเลท ต้นราชพฤกษ์ 71 ไอโซเลท ต้นกัลปพฤกษ์ 60 ไอโซเลท ต้นมะค่าแต้ 23 ไอโซเลท วงศ์ย่อย Mimosoideae ได้แก่ ต้นกระถิน 93 ไอโซเลท ต้นแดง 90 ไอโซเลท ต้นจามจุรี 85 ไอโซเลท วงศ์ย่อย Papilionoideae ได้แก่ ต้นทองกวาว 98 ไอโซเลท ต้นประดู่ป่า 72 ไอโซเลท จากการทดสอบการผลิตวิตามินบีหกเบื้องต้น โดยการเลี้ยงในอาหาร MSM พบว่า ทั้ง 932 ไอโซเลท สามารถวัดปริมาณวิตามินบีหกที่ 24 ชั่วโมงได้ในช่วง 0.0078 – 521 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อที่ผลิตวิตามินบีหกได้สูงสุด 50 อันดับแรกมาทำการศึกษาต่อไป

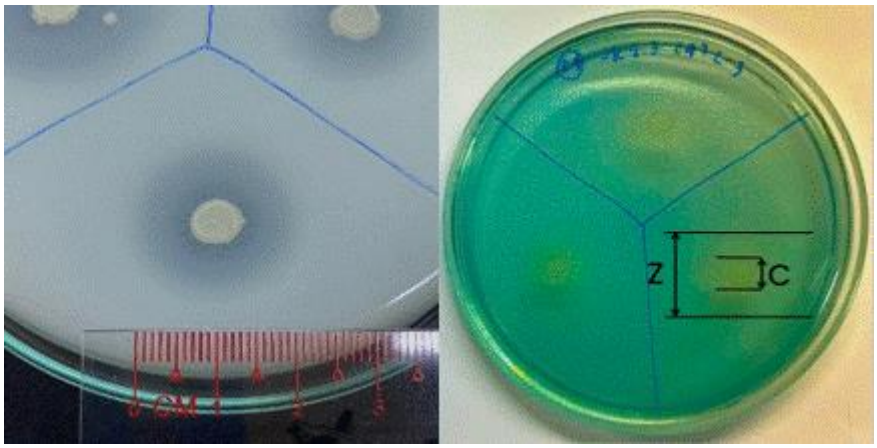
2. การทดสอบความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

ผลการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต ที่เวลาบ่ม 72 ชั่วโมง (รูปที่ 1) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถละลายฟอสเฟตได้จำนวน 48 จาก 50 ไอโซเลท (ดังตารางที่ 1) โดยไอโซเลทที่ละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ PC6.3Tamarindus(7)-C1 (ลำดับที่ 22) PC6.3Tamarindus(12)-C1 (ลำดับที่ 11) และ SH8.3Butea(15)C4 (ลำดับที่ 24) มีค่า PSI เท่ากับ 4.35 ± 0.19 4.30 ± 0.45 และ 4.13 ± 0.40 ตามลำดับ

ผลการทดสอบความสามารถในการละลายโพแทสเซียม ที่เวลาบ่ม 12 ชั่วโมง (รูปที่ 1) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถละลายโพแทสเซียมได้จำนวน 45 จาก 50 ไอโซเลท (ดังตารางที่ 1) โดยไอโซเลทที่ละลายโพแทสเซียมได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก

ได้แก่ JK 2.3 Albizia (4) C-3 (ลำดับที่ 33) JK 1.3 Xylia (5) C-2 (ลำดับที่ 30) และ PC6.3Tamarindus(12)-C2 (ลำดับที่ 34) มีค่า KSI เท่ากับ 3.03 ± 0.24 2.91 ± 0.23 และ 2.83 ± 0.10 ตามลำดับ

ผลการทดสอบความสามารถในการผลิต IAA พบว่าทั้ง 50 ไอโซเลท สามารถผลิต IAA ได้ทุกไอโซเลท (ดังตารางที่ 1) โดยแบคทีเรียที่ผลิต IAA ได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก คือ PC6.3Tamarindus(12)-C1 (ลำดับที่ 11) JK 1.2 Xylia (7) C-3 (ลำดับที่ 10) และ JK 3.2 Leu (8) C-2 (ลำดับที่ 35) มีปริมาณ IAA เท่ากับ 641.86 ± 24.69 326.95 ± 10.27 และ 139.23 ± 30.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 1 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง Pikovskaya's (ซ้าย) และโพแทสเซียมบนอาหารแข็ง Modifed Pikovskaya's (ขวา)

ตารางที่ 1 เชื้อ 50 ไอโซเลทที่ผลิตวิตามินบีหกในแต่ละช่วงเวลา ความสามารถในการละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม และการผลิต IAA

ลำดับ	ไอโซเลท	ปริมาณวิตามินบีหก (mg/L)				ค่า PSI	ค่า KSI	ปริมาณ IAA
		6 h	12 h	18 h	24 h	(72 h)	(12 h)	(µg/ml)
1	SH8.3Butea(9)C4	282.63 ± 6.51^{lmnopqr}	296.07 ± 9.08^{defghijklmn}	296.05 ± 13.32^{jklmn}	521.09 ± 35.37^{a}	2.57 ± 0.13^{efg}	2.69 ± 0.18^{abcdefg}	47.30 ± 7.97^{efghijkl}
2	JK 3.2 Leu (7) C-2	420.37 ± 16.09^{efg}	320.90 ± 3.22^{cdefghi}	360.20 ± 4.72^{efgh}	482.24 ± 43.87^{ab}	2.28 ± 0.13^{efg}	2.31 ± 0.04^{ij}	115.37 ± 21.85^{cd}
3	JK 1.2 Xylia (7) C-4	711.42 ± 37.84^{a}	589.19 ± 34.49^{a}	606.81 ± 32.87^{a}	469.03 ± 3.53^{ab}	2.20 ± 0.07^{fg}	2.62 ± 0.15^{bcdefghij}	44.49 ± 1.10^{fghijkl}
4	JK 3.2 Leu (7) C-4	316.93 ± 16.92^{ijklmnopq}	286.41 ± 10.04^{fghijklmno}	448.20 ± 10.88^{bc}	468.21 ± 29.06^{ab}	2.26 ± 0.08^{fg}	2.56 ± 0.12^{bcdefghij}	44.14 ± 2.41^{fghijkl}
5	JK 3.2 Leu (2) C-4	269.95 ± 5.81^{nopqr}	275.50 ± 18.62^{hijklmnop}	294.24 ± 7.25^{klmn}	464.58 ± 17.24^{abc}	2.65 ± 0.21^{defg}	2.52 ± 0.06^{cdefghij}	59.23 ± 20.28^{efghijkl}
6	SH8.3Butea(8)C1	254.93 ± 6.87^{pqr}	249.26 ± 7.14^{mnop}	342.65 ± 0.97^{fghijk}	454.54 ± 18.34^{bc}	2.11 ± 0.09^{g}	2.82 ± 0.14^{abcd}	45.19 ± 1.90^{fghijkl}
7	JK 1.3 Xylia (7) C-3	365.31 ± 28.57^{ghijk}	243.81 ± 2.50^{op}	372.26 ± 3.39^{efg}	451.25 ± 36.69^{bc}	2.18 ± 0.11^{fg}	2.50 ± 0.18^{cdefghij}	40.28 ± 4.60^{ghijkl}
8	JK 2.3 Albizia (4) C-4	317.60 ± 8.10^{ijklmnopq}	290.19 ± 7.09^{defghijklmno}	342.99 ± 4.37^{fghijk}	437.94 ± 11.65^{bc}	2.45 ± 0.11^{efg}	2.33 ± 0.09^{hij}	69.75 ± 5.11^{defghijk}

ตารางที่ 1 เชื้อ 50 ไอโซเลทที่ผลิตวิตามินบีหกในแต่ละช่วงเวลา ความสามารถในการละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม และการผลิต IAA (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	ปริมาณวิตามินบีหก (mg/L)				ค่า PSI	ค่า KSI	ปริมาณ IAA
		6 h	12 h	18 h	24 h	(72 h)	(12 h)	(µg/ml)
9	JK 3.2 Leu (8) C-3	303.27 ± 27.30^{jklmnopqr}	276.80 ± 10.99^{hijklmnop}	351.02 ± 14.70^{fghi}	430.26 ± 28.43^{bc}	2.22 ± 0.10^{fg}	2.47 ± 0.05^{efghij}	48.35 ± 2.41^{efghijkl}
10	JK 1.2 Xylia (7) C-3	628.62 ± 23.74^{b}	336.64 ± 21.34^{cdef}	355.40 ± 17.03^{efgh}	407.02 ± 20.13^{cd}	2.14 ± 0.02^{g}	2.49 ± 0.09^{cdefghij}	326.95 ± 10.27^{b}
11	PC6.3Tamarindus (12)-C1	633.49 ± 54.29 ^{b}	352.39 ± 13.62^{c}	434.49 ± 25.39^{bc}	367.65 ± 39.77^{de}	4.30 ± 0.45^{a}	2.64 ± 0.20^{bcdefghi}	641.86 ± 24.69^{a}
12	JK 3.2 Leu (4) C-2	302.77 ± 6.71^{jklmnopqr}	338.53 ± 10.00^{cde}	279.08 ± 2.98^{n}	362.09 ± 14.38^{def}	2.83 ± 0.19^{defg}	2.66 ± 0.09^{bcdefghi}	36.42 ± 2.59^{ijkl}
13	JK 2.3 Albizia (4) C-2	633.74 ± 1.05^{b}	467.60 ± 6.60^{b}	562.85 ± 11.78^{a}	360.85 ± 6.30^{defg}	2.25 ± 0.03^{fg}	2.59 ± 0.06^{bcdefghij}	49.93 ± 5.86^{efghijkl}
14	JK 3.2 Leu (4) C-3	442.96 ± 12.70^{def}	308.33 ± 1.34^{cdefghijk}	352.71 ± 24.36^{fghi}	360.43 ± 33.01^{defgh}	2.37 ± 0.19^{efg}	2.38 ± 0.01^{ghij}	95.02 ± 16.60^{cde}
15	PC6.3Tamarindus (15)-C3	488.25 ± 9.57^{cde}	340.16 ± 10.70^{cd}	364.72 ± 10.61^{efgh}	359.53 ± 12.87^{defgh}	2.32 ± 0.04^{efg}	2.79 ± 0.21^{abcde}	28.70 ± 1.10^{kl}
16	JK 2.3 Albizia (10) C-3	311.19 ± 15.66^{ijklmnopq}	340.38 ± 3.49^{cd}	287.13 ± 17.15^{lmn}	349.94 ± 10.68^{defgh}	2.29 ± 0.12^{efg}	2.54 ± 0.13^{cdefghij}	34.14 ± 1.39^{jkl}
17	JK 3.2 Leu (3) C-1	356.08 ± 21.67^{ghijkl}	244.27 ± 0.81^{op}	403.03 ± 25.07^{cde}	337.50 ± 0.58^{efghi}	2.31 ± 0.10^{efg}	2.54 ± 0.09^{cdefghij}	36.25 ± 1.90^{ijkl}
18	PC6.3Tamarindus(2) -C3	285.98 ± 18.86^{lmnopqr}	351.03 ± 12.56^{c}	353.21 ± 9.01^{fgh}	336.50 ± 3.54^{efghij}	3.40 ± 0.11^{bcd}	1.00 ± 0.00^{k}	72.56 ± 6.72^{defghijk}
19	JK 2.3 Albizia (3) C-2	491.08 ± 10.72^{cde}	322.77 ± 6.55^{cdefgh}	327.60 ± 19.87^{ghijklmn}	330.59 ± 9.26^{efghijk}	2.51 ± 0.06^{efg}	2.37 ± 0.12^{ghij}	42.04 ± 1.82^{fghijkl}
20	JK 2.2 Albizia (12) C-4	505.54 ± 85.91^{cd}	330.04 ± 22.39^{cdefg}	324.15 ± 4.31^{ghijklmn}	327.94 ± 7.91^{efghijkl}	3.04 ± 0.20^{cde}	2.74 ± 0.14^{abcdef}	64.49 ± 5.63^{efghijkl}
21	SH8.3Butea(11)C4	349.51 ± 11.52^{ghijklm}	329.99 ± 11.34^{cdefg}	336.71 ± 11.93^{fghijk}	317.70 ± 10.61^{efghijklm}	2.37 ± 0.17^{efg}	2.49 ± 0.19^{cdefghij}	69.23 ± 21.87^{defghijk}
22	PC6.3Tamarindus(7) -C1	303.84 ± 22.16^{jklmnopqr}	261.27 ± 18.53^{klmnop}	379.02 ± 21.42^{def}	315.84 ± 12.14^{efghijklmn}	4.35 ± 0.19^{a}	2.47 ± 0.10^{efghij}	53.96 ± 32.44^{efghijkl}
23	SH8.2Butea(1)C2	264.50 ± 19.08^{opqr}	267.88 ± 3.82^{jklmnop}	464.40 ± 24.10^{b}	307.92 ± 3.50^{fghijklmno}	2.21 ± 0.02^{fg}	2.37 ± 0.05^{ghij}	61.16 ± 7.88^{efghijkl}
24	SH8.3Butea(15)C4	342.52 ± 9.00^{hijklmn}	261.60 ± 4.82^{klmnop}	422.58 ± 18.87^{bcd}	302.57 ± 11.31^{ghijklmnop}	4.13 ± 0.40^{ab}	2.69 ± 0.06^{abcdefg}	29.75 ± 8.23^{jkl}
25	JK 3.2 Leu (5) C-2	329.84 ± 39.28^{ijklmnop}	261.59 ± 4.29^{klmnop}	349.46 ± 17.68^{fghi}	302.49 ± 38.23^{hijklmnop}	2.30 ± 0.09^{efg}	2.27 ± 0.06^{j}	39.40 ± 5.50^{hijkl}
26	JK 2.3 Albizia (1) C-3	303.70 ± 10.15^{jklmnopqr}	315.26 ± 20.07^{cdefghij}	371.27 ± 9.01^{efg}	284.03 ± 3.44^{ijklmnopq}	2.50 ± 0.16^{efg}	2.57 ± 0.07^{bcdefghij}	43.44 ± 5.38^{fghijkl}

ตารางที่ 1 เชื้อ 50 ไอโซเลทที่ผลิตวิตามินบีหกในแต่ละช่วงเวลา ความสามารถในการละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม และการผลิต IAA (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	ปริมาณวิตามินบีหก (mg/L)				ค่า PSI	ค่า KSI	ปริมาณ IAA
		6 h	12 h	18 h	24 h	(72 h)	(12 h)	(µg/ml)
27	PC6.3Tamarindus(3)-C2	336.61 ± 2.79^{ijklmno}	271.50 ± 6.45^{ijklmnop}	324.18 ± 6.97^{ghijklmn}	283.27 ± 9.25^{ijklmnopq}	2.80 ± 0.31^{defg}	2.38 ± 0.05^{ghij}	73.44 ± 38.95^{defghijk}
28	JK 3.2 Leu (8) C-4	548.40 ± 38.57^{c}	312.81 ± 18.25^{cdefghij}	362.62 ± 8.05^{efgh}	282.22 ± 12.42^{ijklmnopq}	2.43 ± 0.10^{efg}	2.48 ± 0.10^{cdefghij}	88.88 ± 5.18^{def}
29	SH8.3Butea(11)C1	373.25 ± 7.09^{fghij}	227.08 ± 13.58^{p}	344.29 ± 4.51^{fghij}	282.05 ± 3.18^{ijklmnopq}	2.27 ± 0.18^{efg}	2.59 ± 0.02^{bcdefghij}	64.14 ± 21.23^{efghijkl}
30	JK 1.3 Xylia (5) C-2	318.19 ± 25.09^{ijklmnopq}	333.10 ± 9.70^{cdef}	282.51 ± 2.56^{mn}	278.49 ± 8.15^{jklmnopq}	2.92 ± 0.08^{cdef}	2.91 ± 0.23^{ab}	69.23 ± 9.19^{defghijk}
31	JK 3.3 Leu (4) C-2	284.13 ± 12.64^{lmnopqr}	319.39 ± 17.52^{cdefghi}	362.06 ± 14.24^{efgh}	274.97 ± 11.04^{klmnopqr}	2.15 ± 0.06^{fg}	2.64 ± 0.02^{bcdefghi}	44.49 ± 7.38^{fghijkl}
32	JK 2.2 Albizia (6) C-1	330.33 ± 20.09^{ijklmnop}	294.99 ± 24.75^{defghijklmn}	335.75 ± 11.20^{ghijkl}	271.57 ± 15.49^{lmnopqr}	2.32 ± 0.12^{efg}	2.56 ± 0.08^{cdefghij}	35.89 ± 8.19^{ijkl}
33	JK 2.3 Albizia (4) C-3	311.54 ± 3.60^{ijklmnopq}	259.35 ± 14.09^{klmnop}	464.38 ± 23.33^{b}	269.04 ± 12.14^{mnopqrs}	2.68 ± 0.07^{defg}	3.03 ± 0.24^{a}	61.68 ± 3.21^{efghijkl}
34	PC6.3Tamarindus (12)-C2	328.56 ± 14.43^{ijklmnop}	474.57 ± 11.56^{b}	359.98 ± 12.36^{efgh}	258.86 ± 0.45^{nopqrst}	2.72 ± 0.21^{defg}	2.83 ± 0.10^{abc}	18.70 ± 2.60^{l}
35	JK 3.2 Leu (8) C-2	284.98 ± 20.93^{lmnopqr}	305.53 ± 10.67^{cdefghijk}	359.93 ± 9.92^{efgh}	250.50 ± 3.83^{opqrstu}	2.13 ± 0.12^{g}	2.54 ± 0.04^{cdefghij}	139.23 ± 30.26^{c}
36	PC6.3Tamarindus(3)-C1	294.91 ± 12.76^{klmnopqr}	273.86 ± 7.92^{hijklmnop}	358.51 ± 5.06^{efgh}	247.79 ± 5.83^{pqrstuv}	2.35 ± 0.11^{efg}	2.47 ± 0.09^{defghij}	68.17 ± 12.90^{defghijk}
37	JK 3.2 Leu (13) C-3	417.79 ± 6.32^{efgh}	300.03 ± 8.83^{defghijkl}	366.01 ± 4.31^{efgh}	246.28 ± 1.95^{pqrstuvw}	2.28 ± 0.02^{efg}	2.63 ± 0.13^{bcdefghi}	83.09 ± 20.06^{defghi}
38	JK 2.2 Albizia (5) C-1	251.38 ± 16.86^{qr}	247.67 ± 9.97^{nop}	340.01 ± 15.78^{fghijk}	241.89 ± 0.72^{qrstuvw}	2.22 ± 0.06^{fg}	2.51 ± 0.10^{cdefghij}	39.76 ± 2.19^{hijkl}
39	JK 2.3 Albizia (10) C-2	244.84 ± 0.41^{qr}	315.51 ± 8.19^{cdefghij}	324.40 ± 16.07^{ghijklmn}	237.35 ± 0.41^{qrstuvwx}	1.00 ± 0.00^{h}	1.00 ± 0.00^{k}	84.14 ± 9.66^{defghi}
40	JK 1.3 Xylia (3) C-4	233.95 ± 7.87^{r}	280.93 ± 5.21^{ghijklmno}	359.94 ± 10.11^{efgh}	229.68 ± 2.61^{qrstuvwxy}	3.65 ± 0.33^{abc}	1.00 ± 0.00^{k}	58.88 ± 21.37^{efghijkl}
41	JK 3.2 Leu (8) C-1	288.62 ± 16.00^{lmnopqr}	334.98 ± 8.07^{cdef}	371.57 ± 4.73^{efg}	219.81 ± 1.74^{rstuvwxy}	2.35 ± 0.13^{efg}	2.52 ± 0.01^{cdefghij}	44.67 ± 6.38^{fghijkl}
42	PC6.2Tamarindus (11)-C3	335.65 ± 6.88^{ijklmno}	480.82 ± 45.88^{b}	354.80 ± 2.89^{efgh}	219.64 ± 26.80^{rstuvwxy}	2.18 ± 1.08^{fg}	1.00 ± 0.00^{k}	85.90 ± 15.47^{defgh}
43	JK 1.1 Xylia (8) C-4	293.32 ± 15.79^{klmnopqr}	298.38 ± 19.55^{defghijklm}	336.75 ± 28.68^{fghijk}	211.65 ± 3.18^{stuvwxyz}	1.34 ± 0.58^{h}	2.58 ± 0.06^{bcdefghij}	78.00 ± 13.83^{defghij}
44	SH9.2Pterocarpus(5) C2	284.51 ± 4.94^{lmnopqr}	242.15 ± 11.76^{op}	328.63 ± 14.07^{ghijklm}	206.06 ± 12.61^{tuvwxyz}	2.30 ± 0.02^{efg}	2.52 ± 0.04^{cdefghij}	40.98 ± 4.59^{fghijkl}

ตารางที่ 1 เชื้อ 50 ไอโซเลทที่ผลิตวิตามินบีหกในแต่ละช่วงเวลา ความสามารถในการละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม และการผลิต IAA (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลท	ปริมาณวิตามินบีหก (mg/L)				ค่า PSI	ค่า KSI	ปริมาณ IAA
		6 h	12 h	18 h	24 h	(72 h)	(12 h)	(µg/ml)
45	JK 2.3 Albizia (12) C-3	380.62 ± 23.77^{fghi}	254.09 ± 9.52^{lmnop}	343.96 ± 4.47^{fghij}	199.77 ± 4.21^{uvwxyz}	2.43 ± 0.13^{efg}	2.43 ± 0.06^{fghij}	33.61 ± 5.27^{jkl}
46	JK 1.2 Xylia (8) C-2	335.76 ± 22.06^{ijklmno}	289.65 ± 17.22^{efghijklmno}	327.33 ± 11.12^{ghijklmn}	191.86 ± 13.35^{vwxyz}	2.34 ± 0.03^{efg}	2.66 ± 0.06^{bcdefgh}	56.77 ± 4.50^{efghijkl}
47	JK 1.3 Xylia (2) C-3	260.58 ± 15.05^{opqr}	266.85 ± 1.75^{jklmnop}	326.91 ± 3.49^{ghijklmn}	189.11 ± 4.37^{wxyz}	2.16 ± 0.07^{fg}	2.51 ± 0.06^{cdefghij}	54.14 ± 27.39^{efghijkl}
48	JK 3.2 Leu (4) C-1	308.27 ± 16.38^{ijklmnopqr}	312.69 ± 28.18^{cdefghij}	368.44 ± 5.94^{efg}	179.20 ± 20.01^{xyz}	2.38 ± 0.08^{efg}	2.51 ± 0.02^{cdefghij}	38.53 ± 5.82^{hijkl}
49	JK 2.2 Albizia (15) C-4	275.52 ± 10.66^{mnopqr}	254.22 ± 1.82^{lmnop}	317.23 ± 6.30^{hijklmn}	172.50 ± 0.52^{yz}	2.13 ± 0.06^{g}	2.69 ± 0.03^{abcdefg}	88.70 ± 26.43^{defg}
50	JK 3.2 Leu (5) C-3	283.88 ± 25.17^{lmnopqr}	241.87 ± 21.19^{op}	303.90 ± 25.67^{ijklmn}	156.49 ± 4.58^{z}	1.00 ± 0.00^{h}	1.00 ± 0.00^{k}	72.56 ± 15.01^{defghijk}

3. การวัดปริมาณวิตามินบีหก

เชื้อทั้ง 50 ไอโซเลท มีความสามารถในการผลิตวิตามินบีหกในปริมาณที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละช่วงเวลา (ดังตารางที่ 1) ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบีหกได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก คือ JK 1.2 Xylia (7) C-4 (ลำดับที่ 3) ผลิตได้ 711.42 ± 37.84 มิลลิกรัมต่อลิตร JK 2.3 Albizia (4) C-2 (ลำดับที่ 13) ผลิตได้ 633.74 ± 1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร PC6.3Tamarindus(12)-C1 (ลำดับที่ 11) ผลิตได้ 633.49 ± 54.29 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบีหกได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก คือ JK 1.2 Xylia (7) C-4 (ลำดับที่ 3) ผลิตได้ 589.19 ± 34.49 มิลลิกรัมต่อลิตร PC6.2Tamarindus(11)-C3 (ลำดับที่ 42) ผลิตได้ 480.82 ± 45.88 มิลลิกรัมต่อลิตร PC6.3Tamarindus(12)-C2 (ลำดับที่ 34) ผลิตได้ 474.57 ± 11.56 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบีหกได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก คือ JK 1.2 Xylia (7) C-4 (ลำดับที่ 3) ผลิตได้ 606.81 ± 32.87 มิลลิกรัมต่อลิตร JK 2.3 Albizia (4) C-2 (ลำดับที่ 13) ผลิตได้ 562.86 ± 11.78 มิลลิกรัมต่อลิตร SH8.2Butea(1)C2 (ลำดับที่ 23) ผลิตได้ 464.40 ± 24.10 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบีหกได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก คือ SH8.3Butea(9)C4 (ลำดับที่ 1) ผลิตได้ 521.09 ± 35.37 มิลลิกรัมต่อลิตร JK 3.2 Leu (7) C-2 (ลำดับที่ 2) ผลิตได้ 482.24 ± 43.87 มิลลิกรัมต่อลิตร JK 1.2 Xylia (7) C-4 (ลำดับที่ 3) ผลิตได้ 469.03 ± 3.53 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากนั้นทำการจัดเรียงเชื้อ 10 อันดับแรก ตามปริมาณวิตามินบีหกที่เชื้อผลิตได้ทุกช่วงเวลา (ดังตารางที่ 2) จากตารางพบว่า เชื้อทุกไอโซเลทมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม รวมถึงการผลิต IAA ยกเว้นเชื้อ PC6.2Tamarindus(11)-C3 (ลำดับที่ 8) ที่ไม่มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียม จากนั้นนำเชื้อ 5 อันดับแรก ส่งไปจำแนกเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี ที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ผลการจำแนกเชื้อทางชีวเคมีโดยการวิเคราะห์ด้วย Vitex 2 compact system แสดงดังตารางที่ 3 ซึ่งเป็นผลการจำแนกเชื้อแกรมบวก จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ JK 1.2 Xylia (7) C-4 JK 2.3 Albizia (4) C-2 JK 1.2 Xylia (7) C-3 และ JK 3.2 Leu (8) C-4 แสดงความใกล้เคียงกับ *Brevibacillus laterosporus* (94%) *Bacillus cereus* (95%) *Ba. cereus* (93%) และ *Ba. thuringiensis* (89%) ตามลำดับ ตารางที่ 4 เป็นผลการจำแนกเชื้อแกรมลบ ได้แก่ ไอโซเลท PC6.3Tamarindus(12)-C1 แสดงความใกล้เคียงกับ *Acinetobacter baumannii* complex (99%)

ตารางที่ 2 เชื้อ 10 ไอโซเลทที่ผลิตวิตามินบีหกปริมาณสูงที่สุดในแต่ละช่วงเวลา

ลำดับ	ช่วงเวลา	ไอโซเลท	ปริมาณวิตามินบีหก (mg/L)	ปริมาณ IAA (µg/ml)	ค่า PSI (72 h)	ค่า KSI (12 h)
1	6h	JK 1.2 Xylia (7) C-4	711.42 ± 37.84^{a}	44.49 ± 1.06^{e}	2.19 ± 0.07^{b}	2.62 ± 0.15^{abc}
2	6h	JK 2.3 Albizia (4) C-2	633.74 ± 1.05^{ab}	49.93 ± 5.86^{de}	2.25 ± 0.03^{b}	2.59 ± 0.06^{abc}
3	6h	PC6.3Tamarindus(12)-C1	633.49 ± 54.29^{ab}	641.86 ± 24.70^{a}	4.30 ± 0.46^{a}	2.64 ± 0.19^{abc}
4	6h	JK 1.2 Xylia (7) C-3	628.62 ± 23.74^{ab}	326.95 ± 10.26^{b}	2.14 ± 0.02^{b}	2.49 ± 0.09^{bc}
5	6h	JK 3.2 Leu (8) C-4	548.40 ± 38.57^{bc}	88.88 ± 5.18^{c}	2.43 ± 0.10^{b}	2.49 ± 0.10^{bc}
6	24h	SH8.3Butea(9)C4	521.09 ± 35.36^{c}	47.30 ± 7.96^{e}	2.57 ± 0.13^{b}	2.69 ± 0.18^{ab}
7	24h	JK 3.2 Leu (7) C-2	482.24 ± 43.87^{c}	115.37 ± 21.84^{c}	2.28 ± 0.02^{b}	2.31 ± 0.04^{c}
8	12h	PC6.2Tamarindus(11)-C3	480.82 ± 45.88^{c}	85.90 ± 15.47^{cd}	2.18 ± 1.08^{b}	1.00 ± 0.00^{d}
9	12h	PC6.3Tamarindus(12)-C2	474.57 ± 11.56^{c}	18.70 ± 2.60^{e}	2.72 ± 0.21^{b}	2.83 ± 0.09^{a}
10	24h	JK 3.2 Leu (7) C-4	468.21 ± 29.06^{c}	44.14 ± 2.41^{e}	2.26 ± 0.08^{b}	2.56 ± 0.12^{abc}

ตารางที่ 3 ผลการจำแนกเชื้อแกรมบวกโดยวิธีทางชีวเคมี โดยใช้การวิเคราะห์ Vitek 2 compact system

Characteristics	JK 1.2 Xylia (7) C-4	JK 2.3 Albizia (4) C-2	JK 1.2 Xylia (7) C-3	JK 3.2 Leu (8) C-4
Gram reaction	+ve	+ve	+ve	+ve
β-xylosidase	-	-	-	-
L-lysine arylamidase	-	-	-	-
L-aspartate arylamidase	-	-	-	-
Leucine arylamidase	(-)	(-)	-	-
Phenylalanine arylamidase	+	+	+	+
L-proline arylamidase	-	-	-	-
β-galactosidase	-	-	-	-
L-pyrrolidonyl arylamidase	+	(+)	+	+
α-galactosidase	-	-	-	-
Alanine arylamidase	-	(-)	+	-
Tyrosine arylamidase	(+)	+	(-)	-
β-N-acetyl-glucosaminidase	+	+	+	+
Ala-Phe-Pro arylamidase	-	-	-	-
Cyclodextrin	-	-	-	-
D-galactose	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	+
Myo-inositol	-	-	-	-
Methyl-α-D-glucopyranoside acidification	-	-	-	-
Ellman	-	(-)	-	+
Methyl-D-xyloside	-	-	-	-
α-mannosidase	-	-	-	-
Maltotriose	-	-	-	-
Glycine arylamidase	-	-	-	-

ตารางที่ 3 ผลการจำแนกเชื้อแกรมบวกโดยวิธีทางชีวเคมี โดยใช้การวิเคราะห์ Vitek 2 compact system (ต่อ)

Characteristics	JK 1.2 Xylia (7) C-4	JK 2.3 Albizia (4) C-2	JK 1.2 Xylia (7) C-3	JK 3.2 Leu (8) C-4
D-mannitol	-	-	-	-
D-mannose	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	+	+	+
Palatinose	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-
β-glucosidase	+	-	+	+
β-mannosidase	-	-	-	-
Phosphoryl choline	-	-	-	-
Pyruvate	-	+	(+)	-
α-glucosidase	-	-	-	-
D-tagatose	-	-	-	-
D-trehalose	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+
D-ribose	+	+	(+)	+
Putrescine assimilation	-	-	-	-
Growth in 6.5% NaCl	-	+	+	+
Result of identification	*Brevibacillus laterosporus*	*Bacillus cereus*	*Bacillus cereus*	*Bacillus thuringiensis*
% Probability	94	95	93	89

Remark (+) = weak-positive reaction (-) = weak-negative reaction Confidence level: 85 - 88% probability = Acceptable 89 - 92% probability = Good 93-95% probability = Very good, 96-99% probability = Excellent

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกเชื้อแกรมลบโดยวิธีทางชีวเคมี โดยใช้การวิเคราะห์ Vitek 2 compact system

Characteristics	PC6.3Tamarindus(12)-C1	Characteristics	PC6.3Tamarindus(12)-C1
Gram reaction	-ve	β-glucuronidase	-
β-xylosidase	-	Lysine decarboxylase	-
L-proline arylamidase	-	L-histidine assimilation	-
β-galactosidase	-	Courmarate	+
L-pyrrolidonyl arylamidase	-	β-N-acetyl-galactosaminidase	-
α-galactosidase	-	H_2S production	-
Tyrosine arylamidase	+	Glutamyl arylamidase pNA	-
β-N-acetyl-glucosaminidase	-	Ala-Phe-Pro arylamidase	-
Adonitol	-	Glu-Gly-Arg-arylamidase	-
D-cellobiose	+	L-malate assimilation	-
L-arabitol	-	L-lactate assimilation	-

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกเชื้อแกรมลบโดยวิธีทางชีวเคมี โดยใช้การวิเคราะห์ Vitek 2 compact system (ต่อ)

Characteristics	PC6.3Tamarindus(12)-C1	Characteristics	PC6.3Tamarindus(12)-C1
Saccharose/sucrose	-	Ellman	-
Citrate (sodium)	+	Glycine arylamidase	-
Malonate	+	D-mannitol	-
5-keto-D-gluconate	-	D-mannose	+
Succinate alkalinization	+	β-glucosidase	-
Phosphatate	-	Palatinose	-
β-alanine arylamidase pNA	-	α-glucosidase	-
γ-glutamyl transferase	-	D-tagatose	-
Fermentation/glucose	-	D-trehalose	-
L-lactate alkalination	+	D-glucose	+
Ornithine decarboxylase	-	D-sorbitol	-
Lipase	-	D-maltose	-
Urease	+		
Result of identification	*Acinetobacter baumannii* complex	% Probability	99

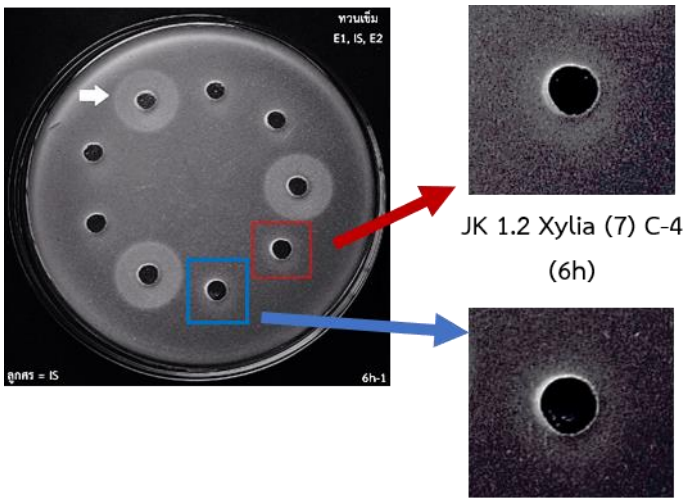
Remark Confidence level: 85 - 88% probability = Acceptable 89 - 92% probability = Good 93 - 95% probability = Very good 96 - 99% probability = Excellent

วิจารณ์ผลการวิจัย

แบคทีเรียในกลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตวิตามินบีหก มีรายงานพบเป็นส่วนน้อยจากการศึกษาในอดีต งานวิจัยนี้ต้องการคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR ที่มีความสามารถในการผลิตวิตามินบีหกเพื่อให้ทราบข้อมูลมากขึ้น ผู้วิจัยเลือกเก็บตัวอย่างดินจากพืชวงศ์ถั่ว เนื่องจากเป็นวงศ์พืชดอกที่มีจำนวนมากและมีความสำคัญทางการเกษตร (Christenhusz and Byng, 2016) การคัดกรองเบื้องต้นโดยใช้อาหาร PYM ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในการหาปริมาณวิตามินบีหกโดยวิธีจุลชีววิทยา (microbiological assay) โดยเชื้อที่สามารถเจริญบนอาหารได้ แสดงถึงการมีความสามารถในการผลิตวิตามินบีหกได้ ทั้งผลิตเพื่อใช้ภายในเซลล์หรือผลิตออกภายนอกเซลล์ อาหาร YEM เป็นอาหารที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เช่น กลุ่มไรโซเบียม เชื้อจำนวน 932 ไอโซเลท ถูกคัดเลือกให้เหลือเพียง 50 ไอโซเลท โดยใช้เกณฑ์การผลิตวิตามินบีหกออกภายนอกเซลล์ได้สูงสุด จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ การละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม โดยใช้อาหารแข็ง Pikovskaya’s และ Modified Pikovskaya’s ตามลำดับ ฟอสเฟตเป็นรูปของฟอสฟอรัสที่พบได้ในดิน ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ โดยสร้างพันธะเป็นสารประกอบฟอสเฟตอนินทรีย์หรือฟอสเฟตอินทรีย์ ทำให้พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ กลไกสำคัญในการละลายฟอสเฟตได้แก่การสร้างกรดอินทรีย์ เพื่อให้ได้ฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตไอออน ซึ่งเป็นรูปที่พืชดูดซึมไปใช้งานได้ (ขนิษฐาและวราภรณ์, 2563) ทำให้เห็นวงใสเกิดขึ้นในอาหารแข็ง Pikovskaya’s (รูปที่ 1) ส่วนการทดสอบการละลายโพแทสเซียมโดยใช้อาหารแข็ง Modified Pikovskaya’s ที่มี Bromocresol green เป็น indicator ที่ pH 7.2 อาหารจะมีสีน้ำเงิน (รูปที่ 1) เมื่อแบคทีเรียผลิตกรดอินทรีย์ออกมาเพื่อละลายโพแทสเซียม ทำให้สีของ Bromocresol green เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนสีเมื่อค่า pH ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 3.8 (Rangel-Montoya *et al*., 2022)

การหาปริมาณวิตามินบีหก โดยวิธี ADA เป็นการวัดปริมาณวิตามินบีหกในอาหารแข็ง ที่ดัดแปลงจากวิธีทางจุลชีววิทยา (microbiological assay) โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR 5345 เป็น indicator ซึ่งยีสต์

จะมีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อมีวิตามินบีหก ทำให้เห็นวงสีขาวขุ่นรอบหลุมที่มีการหยอดตัวอย่างหรือวิตามินบีหกมาตรฐาน (รูปที่ 2) วงการเจริญของยีสต์จะสัมพันธ์กับปริมาณวิตามินบีหก แต่ไม่สัมพันธ์กับปริมาตรของสารที่หยอด ยีสต์จะเจริญเติบโตได้ดีเฉพาะวิตามินบีหกที่อยู่ในรูปอิสระ (PN PL และ PM) ซึ่งการเจริญเติบโตของยีสต์ในวิตามินบีหกอิสระแต่ละรูปจะมีปริมาณที่เท่ากัน และยีสต์ไม่สามารถใช้วิตามินบีหกในรูปฟอสเฟตเอสเทอร์ได้ (Gregory, 1982)



รูปที่ 2 การวัดปริมาณวิตามินบีหกโดยวิธี ADA จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ลูกศรสีขาวแสดงปริมาณวิตามินบีหกมาตรฐานในรูป PN ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกตัวอย่างทำซ้ำ 3 หลุม

วิตามินบีหกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเป็นเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) ซึ่งจะมีการผลิตตามการเจริญเติบโตของเชื้อ การศึกษานี้ มีการวัดปริมาณวิตามินบีหกทุก ๆ 6 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง ในเชื้อทั้ง 50 ไอโซเลท เมื่อนำมาจัดอันดับตามปริมาณวิตามินบีหกที่ผลิตได้ (ตารางที่ 1) พบว่าเชื้อที่ผลิตวิตามินบีหกได้สูง อยู่ในช่วง 6 ชั่วโมงแรก คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ในเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท พบว่า JK 1.2 Xylia (7) C-4 (ลำดับที่ 1) สามารถผลิตวิตามินบีหกได้สูงที่สุด แต่มีการผลิต IAA ได้น้อยที่สุด ในขณะที่ PC6.3Tamarindus(12)-C1 (ลำดับที่ 3) มีความสามารถในการผลิต IAA และการละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด ส่วน PC6.3Tamarindus(12)-C2 (ลำดับที่ 9) มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียมได้สูงที่สุด แต่ผลิต IAA และวิตามินบีหกได้น้อย จากข้อมูลเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการผลิตวิตามินบีหกของเชื้อ น่าจะไม่สัมพันธ์กับความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช

เมื่อนำเชื้อ 5 อันดับแรกไปจำแนกเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี (ตารางที่ 2) พบทั้ง 5 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting properties) เชื้อ *Brevibacillus laterosporus* สามารถหลั่งเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) เพื่อดึงหมู่ฟอสเฟตออกจากฟอสเฟตอินทรีย์ ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานการผลิต IAA จากเชื้อ *B. laterosporus* SVC(II)14 และ *B. laterosporus* K75 ได้ปริมาณ 4.74 และ 13.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และบางสายพันธุ์ของ *B. laterosporus* สามารถผลิต IAA ได้ 45.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีทริปโทฟาน ความสามารถในการผลิต IAA จะแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ (Liu *et al*., 2024) เชื้อ *Bacillus cereus* สามารถผลิต IAA และไซเดอโรฟอร์ และมีความสามารถในการละลายโพแทสเซียมและฟอสเฟต มีรายงานการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยเชื้อ *Ba. cereus* โดยวัดความยาวของต้นและราก น้ำหนักสดและแห้ง และปริมาณคลอโรฟิลล์ ในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง มันฝรั่ง ข้าวโพด (Kulkova *et al*., 2023) Farokh *et al*. (2011) คัดแยกเชื้อ *Acinetobacter* จากดินที่รากต้นข้าวฟ่างมุก (*Pennisetum glaucum*) ผลิต IAA ได้ปริมาณ 10 - 13 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตและสังกะสีออกไซด์ และผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ บางสายพันธุ์ของเชื้อ *Acinetobacter* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรค (fungal phytopathogen) ได้ด้วย เชื้อ *Bacillus thuringiensis* ถูกรู้จักกันในบทบาทสารกำจัดแมลง (insecticide) มีรายงานเชื้อ *Ba. thuringiensis* C25 ที่ผลิต IAA ได้ สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) ในโรงเรือน 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) เป็นสารตั้งต้นในวิถีการสังเคราะห์เอทิลีน การมีเอทิลีนในปริมาณสูง จะทำให้พืชเกิดความเครียดและเป็นอันตรายต่อการเจริญเติบโตของพืช เอนไซม์ ACC deaminase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในวิถีการสังเคราะห์เอทิลีน ให้เป็น α-ketobutyrate และแอมโมเนียม ทำให้ระดับของเอทิลีนลดลง เชื้อ *Ba. thuringiensis* SNKr10 ที่ผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ช่วยเร่งการงอกรากของเมล็ดถั่วเขียว (*Vigna radiata*) (ธนากร, 2557; Azizoglu, 2019)

หน้าที่ของวิตามินบีหกในพืช นอกจากทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่าง ๆ โดยเฉพาะในเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน วิตามินบีหกยังทำหน้าที่เป็น reactive oxygen species (ROS) scavengers และสามารถเพิ่มความต้านทานต่อความเครียดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stress) และความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic stress) (Huang *et al*., 2019) มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตวิตามินบีหกโดยเชื้อ *Ba. cereus* (Powell, 1958) แต่ไม่พบรายงานเกี่ยวกับการผลิตวิตามินบีหกโดยเชื้อ *Ba. thuringiensis* *B. laterosporus* และ *A. baumannii* complex

Liu *et al*. (2022) ศึกษาความเป็นพิษของแอมโมเนียมต่อพืชที่ปลูกในดินมีไนโตรเจนอนินทรีย์สูง พบว่าการเติมวิตามินบีหกช่วยบรรเทาความเป็นพิษจากแอมโมเนียมได้ ส่งผลให้รากมีการเจริญได้ดี โดยวิตามินบีหกทำหน้าที่เป็น สารต้านอนุมูลอิสระ และวิตามินบีหกในรูปอิสระ (PN และ PL) ลดการสะสม H_2O_2 ที่บริเวณปลายรากได้ดีกว่ารูป PLP ส่งผลให้ปริมาณการเกิด ROS ลดลง การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติผลิตวิตามินบีหกได้สูงและมีคุณสมบัติสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช คุณสมบัติทั้งสองนี้จะช่วยส่งเสริมการทำงานในด้านการเจริญเติบโตของพืช จากสารส่งเสริมที่แบคทีเรียสร้างขึ้น และลดความเครียดของพืช จากวิตามินบีหกที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติทั้งสองที่สอดคล้องกันจะทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีเพิ่มความต้านทางต่อความเครียดจากสิ่งมีชีวิต และความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิตได้

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นการคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติผลิตวิตามินบีหกออกภายนอกเซลล์รวมถึงมีคุณสมบัติสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ การละลายฟอสเฟต การละลายโพแทสเซียม และการผลิต IAA จากแหล่งดินบริเวณรอบรากของพืชวงศ์ถั่วในพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น เชื้อที่คัดแยกออกมา 5 ไอโซเลท สามารถผลิตวิตามินบีหกได้สูงและมีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม และผลิต IAA ผลการจำแนกเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่าอยู่ในกลุ่มที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช และบางสายพันธุ์ ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับการผลิตวิตามินบีหกมาก่อน งานวิจัยที่จะทำต่อ ได้แก่ การนำเอาเชื้อ 5 ไอโซเลท ไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเมล็ดพืชในสภาวะเครียดต่าง ๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนอุปกรณ์ สารเคมี และทุนในการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ ขอขอบคุณ รศ.ดร.นันทวัน ฤทธิ์เดช สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับการแนะนำการตรวจสอบคุณสมบัติในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา สมตระกูล และวราภรณ์ ฉุยฉาย. (2563). การขาดฟอสฟอรัสในพืชกับบทบาทของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 38(3): 39 - 49.

ธนากร แสงสง่า. (2557). พีจีพีอาร์ : บทบาทในการส่งเสริมและป้องกันพืชภายใต้สภาวะเครียด. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(4): 553 - 570.

ศุภชาติ ธรรมนิติเวทย์. (2564). ไรโซแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช: หลักการและการใช้ประโยชน์. วารสารเกษตรนเรศวร 18(1): e0180109.

Azizoglu, U. (2019). *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. Current Microbiology 76: 1379 – 1385. doi: 10.1007/s00284-019-01705-9.

Christenhusz, M.J.M. and Byng, J.W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. Phytotaxa 261(3): 201 – 17. doi: 10.11646/phytotaxa.261.3.1.

Da'dara, A. A., Elzoheiry, M., El-Beshbishi, S.N. and Skelly, P.J. (2021). Vitamin B6 acquisition and metabolism in *Schistosoma Mansoni*. Frontiers in Immunology 11: 622162. doi: 10.3389/fimmu.2020.622162.

Farokh, R.Z., Sachdev, D., Kazemi-Pour, N., Engineer, A., Pardesi, K.R., Zinjarde, S., Dhakephalkar, P.K. and Chopade, B.A. (2011). Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. Journal of Microbiology and Biotechnology 21(6): 556 – 566. doi: 10.4014/jmb.1012.12006.

Gregory, J.F. (1982). Relative activity of the nonphosphorylated B-6 vitamers for *Saccharaomyces uvarum* and *Kloeckera brevis* in vitamin B-6 microbiological assays. The Journal of Nutrition 112(8): 1643 - 1647. doi: 10.1093/jn/112.8.1643.

Huang, S.H., Liu, J., Zhou, J., Zhang, J.Y. and Huang, L.Q. (2019). Identification and characterization of a pyridoxal 5′-phosphate phosphatase in tobacco plants. Plant Science 278: 88 - 95. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.10.014.

Kulkova, I., Dobrzynski, J. Kowalczyk, P., Bełzecki, G. and Kramkowski, K. (2023). Plant growth promotion using *Bacillus cereus*. International Journal of Molecular Sciences 24(11): 9759. doi: 10.3390/ijms 24119759.

Lahsini, A.I., Sallami, A., Ait-Ouakrim, E.H., El Khedri, H., Obtel, M., Douira, A., Modafar, C.E., Benkerroum, N., Talbi, C., Chakhchar, A. and Filali-Maltouf, A. (2022). Isolation and molecular identification of an indigenous abiotic stress-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria from the rhizosphere of the olive tree in southern Morocco. Rhizosphere 23: 100554. doi: 10.1016/j.rhisph.2022.100554.

Liu, Y., Maniero, R.A., Giehl, R.F.H., Melzer, M., Steensma, P., Krouk, G., Fitzpatrick, T.B. and von Wirén, N. (2022). PDX1.1-dependent biosynthesis of vitamin B6 protects roots from ammonium-Induced oxidative stress. Molecular Plant 15(5): 820 – 39. doi: 10.1016/j.molp.2022.01.012.

Liu, Y., Zai, X., Weng, G., Ma, X. and Deng, D. (2024). *Brevibacillus laterosporus*: a probiotic with important applications in crop and animal production. Microorganisms 12(3): 564. doi: 10.3390/microorganisms 12030564.

Mangel, N., Fudge, J.B., Li, K-T., Wu, T-Y., Tohge, T., Fernie, A.R., Szurek, B., Fitzpatrick, T.B., Gruissem, W. and Vanderschuren, H. (2019). Enhancement of vitamin B6 levels in rice expressing Arabidopsis vitamin B6 biosynthesis *de novo* genes. The Plant Journal 99(6): 1047 – 65. doi: 10.1111/tpj.14379.

Palacios, O.A., Bashan, Y. and de-Bashan, L.E. (2014). Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria—an overview. Biology and Fertility of Soils 50(3): 415 – 432. doi: 10.1007/s00374-013-0894-3.

Powell J.F. (1958). The changes in the total vitamin B6 and the pyridoxal phosphate content of cells of *Bacillus sphaericus* during growth and sporulation: their possible relationships with - alphaepsilon-diaminopimelic acid metabolism. The Biochemical journal 70(1): 91 - 6. doi: 10.1042/bj0700091.

Rangel-Montoya, E.A., Delgado-Ramírez, C.S., Sepulveda, E. and Hernández-Martínez, R. (2022). Biocontrol of *Macrophomina Phaseolina* using *Bacillus Amyloliquefaciens* strains in cowpea (*Vigna Unguiculata* L.). Agronomy 12(3): 676. doi: 10.3390/agronomy12030676.

Roychoudhury, A. (2021). Metabolic engineering of water-soluble vitamins in plants for enhanced nutrition. International Journal on Recent Advancement in Biotechnology & Nanotechnology 4(1): 1 – 10.

Sukprasong, R., Tongpim, S. and Trongpanich, Y. (2018). Production of pyridoxal 5′-phosphate and pyridoxine by *Lactobacillus Pentosus* L47I-A. Research Journal of Biotechnology 13(7): 16 – 23.

❑❑❑❑❑