การคัดเลือก *Bacillus* sp.ที่เป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช
Screening of *Bacillus* sp. as Plant Growth-Promoting Bacteria

เปรมสุดา สมาน
Premsuda Saman
ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
Biodiversity Research Center, Thailand Institute of Scientific and Technological Research
ผู้นิพนธ์หลัก: premsuda@tistr.or.th
Corresponding author: premsuda@tistr.or.th

Received: 21 March, 2024; Revised: 19 June, 2024; Accepted: 24 June, 2024

Abstract

The effective bacteria were isolated from soil samples in the central and eastern regions of Thailand. A total of 260 bacterial isolates were collected, of which 30 were spore-forming bacteria. These spore-forming bacteria were tested for hemolytic activity to assess preliminary safety and tested further based on plant growth-promoting abilities such as phosphate solubilization, plant pathogen inhibition (against *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, and *X. oryzae* pv. *oryzae*) and plant hormone production (indole acetic acid and gibberellic acid). Results showed that all isolated strains exhibited different abilities of plant growth-promoting traits. Thus, the potential PGPB strains were selected and identified based on 16S rDNA sequence. Nine effective isolated strains consisting of A8, A21, Bb_4.2, Bc_2.1, Bc_6.1, BS2_1.2, BC2_3.2, BZ2_5.1, and BB2_4.3 were identified as *Bacillus zanthoxyli, B. velezensis, B. tequilensis, B. infantis, B. infantis, B. licheniformis, B. wiedmannii, B. altitudinis* and *B. aryabhattai*, respectively.

Keywords: plant growth-promoting bacteria; screening; *Bacillus*

บทคัดย่อ

ทำการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 260 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ 30 ไอโซเลต หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่สร้างสปอร์มาทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเพื่อประเมินความปลอดภัยเบื้องต้น และนำไปทดสอบคุณสมบัติที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น การย่อยสลายฟอสเฟต

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช ได้แก่ *E. carotovora*, *R. solanacearum*, *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* และการสร้างฮอร์โมนพืช เช่น ออกซินและจิบเบอเรอลิน จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตแสดงความสามารถที่แตกต่างกันในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จึงได้คัดเลือกไอโซเลตที่มีคุณสมบัติที่ดีไปจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ด้วยการหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA โดยสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 9 ไอโซเลต ได้แก่ A8, A21, Bb_4.2, Bc_2.1, Bc_6.1, BS2_1.2, BC2_3.2, BZ2_5.1 และ BB2_4.3 เป็นแบคทีเรีย *B. zanthoxyli, B. velezensis, B. tequilensis, B. infantis, B. infantis, B. licheniformis, B. wiedmannii, B. altitudinis* และ *B. aryabhattai* ตามลำดับ

คำสำคัญ: แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช; การคัดเลือก; บาซิลลัส

บทนำ

จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญต่อพืชในหลายด้าน จุลินทรีย์ไม่ได้เป็นแหล่งของธาตุอาหารพืชโดยตรง แต่ทำหน้าที่เป็นผู้สร้างและย่อยสลายธาตุอาหารสำคัญให้แก่พืช รวมทั้งปรับสมดุลและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในดินให้เหมาะสมต่อพืช โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียทีเรียกว่า Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยช่วยในการตรึงไนโตรเจนช่วยละลายธาตุฟอสฟอรัสในดินให้เป็นประโยชน์ต่อพืช สามารถสร้างสารซิเดอร์โรฟอร์ (siderophores) ซึ่งมีสมบัติเพิ่มการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์พืช ตลอดจนการผลิตฮอร์โมนพืช เช่น ไซโตไคนิน (cytokinin) จิบเบอเรลลิน (gibberelin) ออกซิน (auxin) และ เอทีลีน (ethylene) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรคในพืชโดยการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสาเหตุโรคพืช เป็นต้น เชื้อกลุ่ม PGPB มีหลายชนิด ได้แก่ *Agrobacterium*, *Azospirillum. Azotobacter*, *Burkholderia*, *Delfitia*, *Paenobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Rhizobium* และ *Bacillus* (Glick, 2012; Poria et al., 2022) PGPB อาจอาศัยอยู่บริเวณดินรอบ ๆ ราก (Rhizophere) บริเวณผิวราก (Rhizoplane) หรืออยู่ในเซลล์ราก (Endophyte) ดังนั้นจึงอาจเรียกชื่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้อีกชื่อหนึ่งว่า Plant Growth-Promoting Rhizobacteria หรือ PGPR (Gratao et al., 2005; Ambrosini and Passaglia, 2017)

แบคทีเรียกลุ่ม PGPB โดยเฉพาะ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจเนื่องจากมีความสามารถในการสร้างสปอร์ จึงสามารถรอดชีวิตและทนต่อสภาพสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี (Abuhena et al., 2022) จากการวิจัยของ Dobrzynski et al. (2022) ได้รายงานว่า *B. pumilus* สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยสร้างไฟโตฮอร์โมนและสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และงานวิจัยของ Hashem et al. (2019) ได้รายงานว่า *B. subtilis* สามารถละลายฟอสเฟตในดิน เพิ่มการตรึงไนโตรเจน สร้างไฟโตฮอร์โมน และเอนไซม์ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ Jetiyanon and Kloepper (2002) ได้รายงานว่า *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. sphaericus* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น *Ralstonia* sp., *Collectotrichum* sp. และ *Rhizoctonia* sp. โดยกระบวนการสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่พืช จากคุณสมบัติที่ดีดังกล่าวของ *Bacillus* ผู้วิจัยนี้จึงต้องการที่จะคัดเลือก

Bacillus sp. ที่เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย และมีคุณสมบัติเป็น PGPB เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรของไทยในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* จากตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกข้าวในเขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี และนนทบุรี โดยเลือกพื้นที่นาที่มีการเพาะปลูกข้าวเป็นจำนวนมาก เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากจากต้นข้าวที่สมบูรณ์แปลงละ 3 ก่อ และดินจากพื้นที่ป่าในเขตภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี และระยอง โดยเก็บแหล่งละ 3 จุด ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 60 ตัวอย่าง นำตัวอย่างดินที่ได้ 5 กรัม มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ทำลายเซลล์ (vegetative cell) ด้วยวิธี heat shock โดยแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำเย็นจัดเป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดินที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยเลือกใช้ตัวอย่างดินเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} -10^{-6} มาเกลี่ยเชื้อ (spared plate) ลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA อย่างน้อย 2-3 ครั้ง เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบลักษณะของเซลล์โดยการย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Ni-U phase contrast and fluorescence technique, Nikon, ญี่ปุ่น) ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* จะมีรูปร่างเป็นท่อน (rod) แกรมบวกติดสีน้ำเงินอมม่วง และสร้างสปอร์ (Anguiano et al., 2019)

การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

นำเชื้อที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง NA ที่เติมเลือด 1 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง การเกิด hemolysis มี 3 ลักษณะ คือ β-hemolysis (ยอยสลายแบบสมบูรณซึ่งจะพบ clear zone ใสรอบๆรอยขีดเชื้อ), α-hemolysis (ย่อยสลายบางส่วน) และ γ-hemolysis (ไมยอยสลายเม็ดเลือดแดง) หากเกิด clear zone ให้ผลเป็นบวก (+) หากไม่เกิด clear zone ให้ผลเป็นลบ (-) โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง (Figure 1) (Mogrovejo et al., 2020)

การทดสอบการย่อยสลายฟอสเฟต

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงบนอาหาร Institute's phosphate growth medium (NBRIP) ที่มีการเติม Bromocresol purple 0.5% ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจผลการย่อยฟอสเฟตโดยสังเกตโซนใส (Clear zone) รอบๆ โคโลนี (Nautiyal, 1999) หากเกิด clear zone ให้ผลเป็นบวก (+) หากไม่เกิด clear zone ให้ผลเป็นลบ (-)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช (Antimicrobial activity)

ทำการทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion method (Balouiri et al., 2016) โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคพืชจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. carotovora*, *R. solanacearum*, *X. axonopodis* pv. *citri* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* นำเชื้อก่อโรคพืชมาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบแต่ละเชื้อลงบนอาหาร NA ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร เจาะหลุมโดยใช้ Cork borer no.3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร เพื่อเตรียมทำการทดสอบ นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำหัวเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใส จากนั้นกรองสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดที่เจาะหลุมไว้ รอให้สารละลายแพร่เข้าสู่เนื้ออาหารแข็งจนหมด ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยสังเกตบริเวณใส (inhibition zone) (Figure 1) รอบๆ หลุมที่เจาะ หากเกิด inhibition zone ให้ผลเป็นบวก (+) หากไม่เกิด inhibition zone ให้ผลเป็นลบ (-)

การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช (Plant hormones)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินมาเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ ถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหาร TSB ที่มี tryptophan ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ เก็บส่วนสารละลายใสไปวัดปริมาณฮอร์โมนออกซิน (Indole-3-Acetic Acid, IAA) และ จิบเบอเรลลิน (Gibberellic acid, GA_3) โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (LC 20A, Shimadzu, ญี่ปุ่น) (Keswani et al., 2022) นำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์ด้วย One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดทดลองด้วย Least Significant Different ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05)

การจัดจำแนกสารพันธุ์แบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน *16S rDNA*

การสกัด Genomic DNA

เพาะเชื้อแต่ละโคโลนีลงในอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 7,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 2 ครั้ง ทำการสกัด genomic DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, เยอรมนี).

การเพิ่มจำนวน *16S rDNA*

ใช้ genomic DNA ที่สกัดได้เป็น template สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *16S rDNA* เพื่อการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้

Takara Ex *Taq* kit โดยใช้ Primers 27F ($^{5'}$GAGTTTGATCATGGCTCAG$^{3'}$) และ 1492R ($^{5'}$CGGTTACCTTGTTACGACTT$^{3'}$) สำหรับโปรแกรมที่ใช้ทำ PCR ประกอบด้วย

ขั้นตอนที่ 1: Initial denaturation step ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 2: Denaturation step ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 3: Annealing step ใช้อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 4: Extension step ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
ทำขั้นตอนที่ 2-4 ซ้ำอีก 29 รอบ
ขั้นตอนที่ 5: Final extension step ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ นำ PCR product มาวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่ง 16S rDNA มีขนาดประมาณ 1,500 เบส นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit ส่งไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

การวิเคราะห์ผล

ทำการ Cap contig เพื่อต่อสายลำดับเบสและแก้ไขเบสด้วยโปรแกรม BioEdit ก่อนจะนำไปวิเคราะห์หาสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันมากที่สุดในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Vásquez and Carlos, 2023)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่แยกได้จากดิน

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกข้าวในเขตภาคกลางและตัวอย่างดินในพื้นที่ป่าในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 260 ไอโซเลต ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยการศึกษาลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และการตรวจดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ การติดสีแกรมของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญได้ดีบนผิวหน้าอาหาร NA ติดสีแกรมเป็นแกรมบวก รูปร่างท่อน และ สร้างสปอร์ จำนวน 30 ไอโซเลต มาทำการทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นโดยการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดนี้เป็นการบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการที่จะเป็นเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียที่แยกได้ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัย จึงได้คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (γ-hemolysis) ในการนำไปใช้เป็นแบคทีเรีย PGPB ผลการทดสอบได้แสดงใน Figure 1 และ Table 1

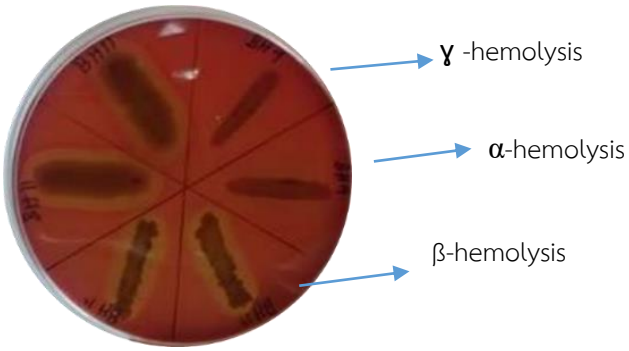


Figure 1 Determination of hemolytic activity

จากผลการทดลอง (Table 1) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ได้จำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ A1, A4, A8, A15, A21, A23, Bb_4.2, Bg_6.3, Bc_2.1, Bc_6.1, BZ2_2.1, BS2_1.2, BC2_3.2, BZ2_5.1 และ BB2_4.3 หลังจากนั้นจึงพิจารณาว่าเชื้อไอโซเลตใดมีการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้หลายด้าน โดยดูจากผลการทดสอบการย่อยสลายฟอสเฟต ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้หลายสายพันธุ์ และการสร้างฮอร์โมน IAA และ GA_3 ได้ในปริมาณสูง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติที่ดีของ PGPB หลายด้านมากที่สุดคือ BZ2_5.1 โดยสามารถย่อยสลายฟอสเฟต ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ถึง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *R. solanacearum X. oryzae* pv *oryzae* และ *X. axonopodis* pv. *citri* และผลิตฮอร์โมน IAA ได้สูง รองลงมาคือไอโซเลต Bb_4.2 สามารถย่อยสลายฟอสเฟต ยับยั้งเชื้อก่อโรค *R. solanacearum* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* และผลิตฮอร์โมน GA_3 ส่วนไอโซเลต Bc_2.1 สามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้มากที่สุด (10.76$\pm$0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *R. solanacearum* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* และไอโซเลต BC2_3.2 ผลิตฮอร์โมน GA_3 ได้มากที่สุด (832.27$\pm$2.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสามารถยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ส่วนไอโซเลตที่เหลือจะมีคุณสมบัติของ PGPB ที่แตกต่างกันไป

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้หลายไอโซเลต ได้แก่ A8, A21, Bb_4.2, Bc_2.1, Bc_6.1, BS2_1.2, BC2_3.2 และ BZ2_5.1 สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคพืชได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhou et al. (2021) ที่ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* จากดิน แล้วนำเชื้อที่ได้มาทดสอบการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช ได้แก่ *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae, Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* และ *Phytophthora infestans* ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเชื้อที่แยกได้ ได้แก่ *B. cabrialesii*, *B. subtilis*, *B. endophyticus* และ *B.velezensis* สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด เช่น fengycin, surfactin, bacillibactin และ subtilin เป็นต้น นอกจากนี้ Saeid et al. (2018) ได้รายงานว่า *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. subtilis* สามารถย่อยสลายฟอสเฟตด้วยการสร้างกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น gluconic, lactic, acetic, succinic และ propionic งานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าไอโซเลต A4, A8, A15, A23, Bb_4.2, BS2_1.2, BZ2_5.1 และ BB2_4.3 สามารถย่อยสลายฟอสเฟตด้วยการผลิตกรดอินทรีย์

Table 1 Determination of Plant Growth-Promoting Bacteria

Isolates	Hemolytic activity	Phosphate solubilization activity	Antimicrobial activity				Plant hormones production (ug/ml)	
			RS	EC	XO	XA	IAA	GA_3
A1	-	-	-	-	-	-	1.23 ± 0.07^{k}	209.97 ± 2.13^{t}
A2	+	+	+	-	+	-	2.77 ± 0.04^{h}	276.83 ± 4.63^{op}
A4	-	+	-	-	-	-		6.32 ± 0.24^{u}
A8	-	+	-	-	+	-	4.83 ± 0.12^{de}	
A12	+	+	+	-	+	-	4.74 ± 0.09^{d}	331.54 ± 0.68^{j}
A15	-	+	-	-	-	-	5.02 ± 0.07^{c}	$347.89+1.30^{i}$
A16	+	-	-	-	-	-		
A21	-	-	+	-	+	-	3.24 ± 0.11^{g}	
A23	-	+	-	-	-	-	4.46 ± 0.12^{f}	
Bk_4.1	+	+	-	-	+	-	2.11 ± 0.03^{ij}	
Bb_4.2	-	+	+	-	+	-		262.57 ± 1.83^{q}
Bg_6.3	-	-	-	-	-	-	5.87 ± 0.13^{b}	279.49 ± 3.36^{o}
Bc_2.1	-	-	+	-	+	-	10.76 ± 0.25^{a}	
Bc_6.1	-	-	+	-	+	-		284.54 ± 0.58^{n}
Bc_4.1	+	-	+	-	+	-	2.23 ± 0.09^{i}	
BZ2_2.1	-	-	-	-	-	-	-	420.08 ± 0.85^{g}
BZ2_1.3	+	-	+	-	+	-	-	
BG2_1.8	+	-	+	-	-	-	-	$327.12+0.30^{k}$
BG2_3.1	+	-	+	-	+	-	-	$412.88+0.78^{h}$
BG2_1.3	+	+	+	-	+	-	-	$456.92+0.30^{f}$
BS2_1.2	-	+	-	-	+	-	-	$301.43+2.06^{m}$
BC2_3.2	-	-	+	-	+	-	-	$832.27+2.78^{a}$
BZ2_5.1	-	+	+	-	+	+	-	$594.73+3.50^{d}$
BF2_1.2	+	+	+	-	+	-	-	$657.47+1.46^{c}$
BB2_4.3	-	+	-	-	-	-	-	$506.75+0.78^{e}$
EE3	+	+	+	-	+	-	-	
NG5	+	-	+	-	+	-	-	$257.62+1.24^{r}$
BE8	+	-	+	-	+	-	-	$215.21+0.23^{s}$
BI22	+	+	+	-	+	-	-	$806.31+0.90^{b}$
BE10	+	+	-	-	-	-	-	$305.29+1.19^{l}$

+= positive - = negative

RS = *R. Solanacearum,* EC = *E. Carotovor*, XO = *X. oryzae* pv. *oryzae,* XA = *X. axonopodis* pv. *citri*

Mean values within a column sharing the same letter are not significantly different at the 0.05 probability level

Tsotets et al. (2022) และ Anguiano et al. (2019) ได้รายงานว่าแบคทีเรีย PGPR ได้แก่ *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* สามารถผลิตฮอร์โมน GA_3 และ IAA ได้ ซึ่งรายงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้รับ โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่จะสร้างฮอร์โมน GA_3 มากกว่า IAA โดยเฉพาะไอโซเลต BC2_3.2 ผลิตฮอร์โมน GA_3 ได้สูงถึง 832.27$\pm$2.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเป็นไอโซเลตที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรีย PGPB สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับพืชได้

ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

จากการนำแบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจำนวน 15 ไอโซเลต ไปจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต ได้แก่ A8, A21, Bb_4.2, Bc_2.1, Bc_6.1, BS2_1.2, BC2_3.2, BZ2_5.1 และ BB2_4.3 ดังแสดงใน Table 2 ส่วนไอโซเลตที่เหลือยังไม่สามารถจำแนกได้ ต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมต่อไป

Table 2 Molecular identification of isolates based on 16S rDNA gene sequencing

Isolate	Closely related species	% Similarity	Length of sequence (bp.)
A8	*Bacillus zanthoxyli*	99.93	1,401
A21	*Bacillus velezensis*	99.85	1,386
Bb_4.2	*Bacillus tequilensis*	99.86	1,395
Bc_2.1	*Bacillus infantis*	99.43	1,408
Bc_6.1	*Bacillus infantis*	99.57	1,401
BS2_1.2	*Bacillus licheniformis*	98.86	1,408
BC2_3.2	*Bacillus wiedmannii*	99.93	1,386
BZ2_5.1	*Bacillus altitudinis*	100	1,395
BB2_4.3	*Bacillus aryabhattai*	99.79	1,412

BZ2_5.1 มีคุณสมบัติที่ดีของ PGPB ในหลายด้านมากที่สุด สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียได้ตรงกับ *B. altitudinis* ซึ่งจากงานวิจัยของ Pranaw et al. (2020) ได้รายงานว่า *B. altitudinis* ช่วยเพิ่มผลผลิตของพืชพลังงานอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพที่มีศักยภาพ นอกจากนี้ Bb_4.2 ที่มีคุณสมบัติที่ดีของ PGPB ในหลายด้านรองลงมา ได้ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ตรงกับ *B. tequilensis* แบคทีเรียนี้สามารถคัดแยกได้จากดินและมีคุณลักษณะเป็น PGPB เช่น การสร้างแอมโมเนีย, การผลิตซิเดอร์โรฟอร์, การละลายฟอสเฟต และการออกฤทธิ์ของ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (Barbaccia et al., 2022)

จากงานวิจัยของ Chowhan et al. (2023) ได้แยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็น PGPB จากตัวอย่างดินในพื้นที่ป่าไม้ และคัดเลือกได้ *B. infantis* ที่สามารถผลิต IAA ได้สูง ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ไอโซเลต Bc_2.1 สามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้มากที่สุด และจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียได้เป็น *B. infantis* ส่วน BC2_3.2 สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *B. wiedmannii* เป็นแบคทีเรียที่ผลิตฮอร์โมน GA_3 ได้มากที่สุด โดยมีรายงานวิจัยว่าแบคทีเรียนี้ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและยับยั้งการติดเชื้อโรคพืช *Rhizoctonia solani* (Saad et al., 2020)

จากงานวิจัยของ Li et al. (2022) ได้คัดเลือก *B. zanthoxyli* และ *B. altitudinis* ที่สามารถเจริญอยู่ในสภาวะที่มีเกลือสูงได้ดี โดย *B. altitudinis* ช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดหญ้า (fescue) ส่วน *B. zanthoxyli* สามารถเพิ่มจำนวนหน่อและความกว้างใบของต้นกล้าได้อย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้จึงสนับสนุนการนำไอโซเลต A8 ที่จัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *B. zanthoxyli* และ BZ2_5.1 (*B. altitudinis*) ไปใช้ประโยชน์เป็น PGPB เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ Balderas-Ruíz et al. (2021) ได้รายงานว่า *B. velezensis* และ *B. licheniformis* ช่วยในการควบคุมเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืช รวมทั้งสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของต้นมะเขือเทศได้ดี ดังนั้นไอโซเลต A21 (*B. velezensis*) และ BS2_1.2 (*B. licheniformis*) จึงมีความเป็นไปได้จะนำไปใช้ประโยชน์กับพืชโดยเฉพาะกับการปลูกมะเขือเทศ

Mun et al. (2024) ได้ประสบความสำเร็จในการแยก *B. aryabhattai* ที่มีคุณสมบัติเป็น PGPB จากดินบริเวณรากของต้นถั่วเหลือง แบคทีเรียนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการผลิตไฟโตฮอร์โมนที่ส่งเสริมการสะสมสารอาหารและความคงตัวของคลอโรฟิลล์ งานวิจัยนี้จึงช่วยสนับสนุนไอโซเลต BB2_4.3 (*B. aryabhattai*) เป็นเชื้อที่มีศักยภาพสามารถพัฒนาเป็น PGPB ได้

สรุปผลการวิจัย

จากการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินทั้งหมด 60 ตัวอย่าง ในพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทย เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* sp.ที่มีคุณสมบัติเป็น PGPB ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช นำเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้จำนวน 30 ไอโซเลต มาทำการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การย่อยสลายฟอสเฟต การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช และการสร้างฮอร์โมนพืช ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติที่ดีของ PGPB หลายด้านมากที่สุดคือ BZ2_5.1 โดยสามารถย่อยสลายฟอสเฟต ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ถึง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *R. solanacearum, X. oryzae* pv *oryzae* และ *X. axonopodis* pv. *citri* และผลิตฮอร์โมน IAA ได้สูง รองลงมาคือไอโซเลต Bb_4.2 สามารถย่อยสลายฟอสเฟต ยับยั้งเชื้อก่อโรค *R. solanacearum* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* และผลิตฮอร์โมน GA_3 ส่วนไอโซเลต Bc_2.1 สามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้มากที่สุด (10.76 ± 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *R. solanacearum* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* และไอโซเลต BC2_3.2 ผลิตฮอร์โมน GA_3 ได้มากที่สุด (832.27 ± 2.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ไอโซเลตเหล่านี้จึงมีศักยภาพเป็น PGPB ที่จะนำไปใช้ประโยชน์กับพืชได้ในอนาคต เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน *16S rDNA* สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต ได้แก่ *B. zanthoxyli, B. velezensis, B. tequilensis, B. infantis, B. licheniformis, B. wiedmannii, B. altitudinis* และ *B. aryabhattai* อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่ได้นี้ควรที่จะทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชเพิ่มเติม เช่น การสร้างเอนไซม์และการสร้างไฟโตฮอร์โมนอื่น ๆ นอกจากนี้ควรที่จะทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกับการปลูกพืชในแต่ละชนิดและในแต่ละพื้นที่ ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียเหล่านี้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Abuhena, M., Al-Rashid, J., Azim, M.F., Khan, M.N.M., Kabir, M.G., Barman, N.C., Rasul, N.M., Akter, S., & Huq, M.A. (2022). Optimization of industrial (3000L) production of *Bacillus subtilis* CW-S and its novel application for minituber and industrial-grade potato cultivation. *Scientific Reports, 12*, 11153. https://doi.org/10.1038/s41598-022-15366-5

Ambrosini, A., & Passaglia, L.M.P. (2017). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB): Isolation and screening of PGP Activities. *Current protocols in plant biology, 2*(3), 190–209. https://doi.org/10.1002/pb.20054

Anguiano, C.J.C., Flores, O.A., Olalde, P.V., Arredondo, V.R., & Laredo, A.E.I. (2019). Evaluation of *Bacillus subtilis* as promoters of plant growth. *Revista Bio Ciencias, 6*, e418. https://doi.org/10.15741/revbio.06.e418

Balderas-Ruíz, K. A., Gómez-Guerrero, C. I., Trujillo-Roldán, M. A., Valdez-Cruz, N. A., Aranda-Ocampo, S., Juárez, A. M., Leyva, E., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2021). *Bacillus velezensis* 83 increases productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Pre and postharvest assessment. *Current research in microbial sciences*, *2*, 100076. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100076

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis, 6*, 71–79. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Barbaccia, P., Gaglio, R., Dazzi, C., Miceli, C., Bella, P., Lo Papa, G., & Settanni, L. (2022). Plant growth-promoting activities of bacteria isolated from an anthropogenic soil located in Agrigento province. *Microorganisms, 10*(11), 2167. https://doi.org/10.3390/microorganisms10112167

Chowhan, L. B., Mir, M. I., Sabra, M. A., El-Habbab, A. A., & Kiran-Kumar, B. (2023). Plant growth promoting and antagonistic traits of bacteria isolated from forest soil samples. *Iranian journal of microbiology*, *15*(2), 278–289. https://doi.org/10.18502/ijm.v15i2.12480

Dobrzynski, J., Jakubowska, Z., & Dybek, B. (2022). Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Frontiers in microbiology*, *13*, 1069053. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1069053

Glick, R.B. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica, 2012*, 963410. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.6064/2012/963401

Gratao, P.L., Prasad, M.N.V., Cardoso, P.F., Lea, P.J., & Azevedo R.A. (2005). Phytoremediation: green technology for the cleanup of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology, 17,* 53-64. https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100005

Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd-Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant growth-promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences, 26*(6), 1291-1297. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004

Jetiyanon, K., & Kloepper, J.W. (2002). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control, 24*, 285-291. http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00022-1

Katsenios, N., Andreou, V., Sparangis, P., Djordjevic, N., Giannoglou, M., Chanioti, S., Stergiou, P., Xanthou, M. Z., Kakabouki, I., Vlachakis, D., Djordjevic, S., Katsaros, G., & Efthimiadou, A. (2021). Evaluation of plant growth promoting bacteria strains on growth, yield and quality of industrial tomato. *Microorganisms*, *9*(10), *2099*. https://doi.org/10.3390/microorganisms9102099

Li, Y., You, X., Tang, Z., Zhu, T., Liu, B., Chen, M.X., Xu, Y., & Liu, T.Y. (2022) Isolation and identification of plant growth-promoting rhizobacteria from tall fescue rhizosphere and their functions under salt stress. *Physiologia Plantarum*, *174*(6), e13817. https://doi.org/10.1111/ppl.13817

Mogrovejo, D.C., Perini, L., Gostincar, C., Sepcic, K., Turk, M., Ambrozic-Avgustin, J., & Brill, F.H.H. (2020). Prevalence of antimicrobial resistance and hemolytic phenotypes in culturable arctic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00570.

Mun, B.G., Hussain, A., Park, Y.G., Kang, S.M., Lee, I.J., & Yun, B.W. (2024). The PGPR *Bacillus aryabhattai* promotes soybean growth via nutrient and chlorophyll maintenance and the production of butanoic acid. *Frontiers in Plant Science, 15*. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1341993

Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, *170*, 265-270. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x

Poria, V., Debiec-Andrzejewska, K., Fiodor, A., Lyzohub, M., Ajijah, N., Singh, S., & Pranaw, K. (2022). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. *Frontiers in Plant Science, 13*. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.999866

Pranaw, K., Pidlisnyuk, V., Trögl, J., & Malinská, H. (2020). Bioprospecting of a novel plant growth-promoting bacterium *Bacillus altitudinis* KP-14 for enhancing *Miscanthus* × *giganteus* growth in metals contaminated soil. *Biology*, *9*(9), 305. https://doi.org/10.3390/biology9090305

Saad, M.M.G., Kandil, M., & Mohammed, Y.M.M. (2020). Isolation and identification of plant growth-promoting bacteria highly effective in suppressing root rot in Fava beans.*Curr Microbiol. 77*, 2155–2165. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02015-1

Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules (Basel, Switzerland), 23*(11), 2897. https://doi.org/10.3390/molecules23112897

Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., & Tugizimana, F. (2022). *Bacillus* for plant growth promotion and stress resilience: What have we learned? *Plants (Basel, Switzerland)*, *11*(19), 2482. https://doi.org/10.3390/plants11192482

Vásquez, E., & Carlos, M. (2023). Isolation and identification of bacteria of genus *Bacillus* from composting urban solid waste and palm forest in Northern Peru. *Microorganisms, 11*, 751. https://doi.org/10.3390/microorganisms1103075

Zhou, L., Song, C., Li, Z., & Kuipers, O.P. (2021). Antimicrobial activity screening of rhizosphere soil bacteria from tomato and genome-based analysis of their antimicrobial biosynthetic potential. *BMC Genomics, 22*. https://doi.org/10.1186/s12864-020-07346-8