Journal of Science, Technology and Agriculture Research (JSTAR)
Year: 2026 Volume: 7 Issue: 3 Page: 164-177

JSTAR

Research Article

Screening and Evaluation of Plant-Beneficial Endospore-Forming Bacteria in the *Bacillus* Group for Plant Growth Promotion and Biocontrol

Premsuda Saman[1]* and Srikanjana Klayraung[2]

[1] *Biodiversity Research Center, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand*
[2] *Department of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Thailand*

(*Corresponding author's e-mail: premsuda@tistr.or.th)

Received: 22 June, 2026; Revised: 10 August, 2026; Accepted: 21 August, 2026

Abstract

The objective of this research was to select and evaluate the properties of plant growth-promoting bacteria. Preliminary safety, phosphate solubilization, nitrogen fixation, enzyme production, phytohormone production, and antagonistic activity against plant pathogens were evaluated. The results revealed that 17 bacterial isolates demonstrated preliminary safety with no hemolytic activity. Most isolates were capable of solubilizing phosphate, with the exception of isolate L2-9, whereas nitrogen fixation was not detected in any of the isolates. Regarding enzyme production, almost all isolates produced protease and amylase, except for H2-2 and L2-9, which lacked amylase production. Lipase activity was detected in four isolates, namely C4-2, C6-2, E2-1, and L2-9, while cellulase activity was observed in various isolates. For plant pathogen inhibition, isolates G4-1 and K2-5 exhibited effective antagonistic activity against several fungal pathogens as well as the bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis*. In addition, isolate J2-3 demonstrated the highest production of gibberellic acid (GA_3) at 19.49 µg/ml, and B2-2.2 produced the highest concentration of indole-3-acetic acid (IAA) at 8.83 µg/ml. Based on the comprehensive evaluation, eight high-potential isolates were selected, including B2-2.2, C6-2, E2-1, G4-1, I2-3.1, J2-3, K2-5, and P2-2.2, which were identified as *Priestia aryabhattai*, *Bacillus licheniformis*, *B. haynesii*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. sonorensis*, *B. velezensis*, and *B. licheniformis*, respectively. These findings suggest that these bacterial isolates hold strong potential for development as bio-inoculants to promote plant growth and control plant diseases, thereby contributing to sustainable agricultural systems in the future.

Keywords: *Bacillus*; Plant growth-promoting bacteria; Phosphate solubilization; Enzyme; Antagonistic activity

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและประเมินคุณสมบัติของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้น ความสามารถในการละลายฟอสเฟต การตรึงไนโตรเจน การสร้างเอนไซม์ การผลิตฮอร์โมนพืช และการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ผลการทดลองพบแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลต มีความปลอดภัยเบื้องต้นเนื่องจากไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถละลายฟอสเฟตได้ ยกเว้นไอโซเลต L2-9 และไม่พบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในทุกไอโซเลต สำหรับการสร้างเอนไซม์ พบว่าเกือบทุกไอโซเลตสามารถผลิตโปรตีเอส (protease) และอะไมเลส (amylase) ยกเว้น H2-2 และ L2-9 ที่ไม่สร้างอะไมเลส ส่วนไลเปส (lipase) ตรวจพบใน 4 ไอโซเลต ได้แก่ C4-2, C6-2, E2-1 และ L2-9 ในขณะที่เซลลูเลส (cellulase) พบได้ในหลายไอโซเลต ด้านการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช พบว่าไอโซเลต G4-1 และ K2-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิด รวมถึงแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* นอกจากนี้ ไอโซเลต J2-3 มีความสามารถในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) สูงสุด (19.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ B2-2.2 ผลิตอินโดล-3-อะซีติกแอซิด (IAA) ได้สูงสุด (8.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากผลการทดสอบทั้งหมด สามารถคัดเลือกไอโซเลตที่มีศักยภาพสูงได้ 8 ไอโซเลต ได้แก่ B2-2.2 C6-2 E2-1 G4-1 I2-3.1 J2-3 K2-5 และ P2-2.2 ซึ่งจัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Priestia aryabhattai, Bacillus licheniformis, B. haynesii, B. subtilis, B. licheniformis, B. sonorensis, B. velezensis* และ *B. licheniformis* ตามลำดับ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลตดังกล่าวมีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาเป็น ชีวภัณฑ์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคพืช ซึ่งจะช่วยส่งเสริมระบบเกษตรกรรมยั่งยืนต่อไป

คำสำคัญ: บาซิลลัส; แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช; การละลายฟอสเฟต; เอนไซม์; กิจกรรมการยับยั้ง

บทนำ

แนวโน้มการผลิตทางการเกษตรที่ไม่พึ่งพาสารเคมีเริ่มได้รับความสนใจจากผู้บริโภคมากขึ้น การทำเกษตรอินทรีย์จึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย โดยมีหลักการสำคัญคือการหลีกเลี่ยงการใช้ปุ๋ยเคมี สารกำจัดศัตรูพืช และสารป้องกันโรคพืช พร้อมทั้งหันมาใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในผลผลิต ดิน และน้ำ แนวทางดังกล่าวไม่เพียงช่วยสร้างผลผลิตที่มีคุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค แต่ยังมีส่วนสำคัญในการรักษาสมดุลของระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย หนึ่งในวิธีการที่ได้รับความสนใจในการลดการใช้สารเคมี คือการนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติพิเศษมาใช้ในกระบวนการผลิตทางการเกษตร เช่น การใช้จุลินทรีย์เพื่อควบคุมโรคพืช และการใช้จุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ปัจจุบันจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติในสิ่งแวดล้อมได้รับการยอมรับว่ามีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชทั้งในเชิงตรงและเชิงอ้อม ผ่านกลไกที่หลากหลาย เช่น การตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต การผลิตฮอร์โมนพืช และการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยเฉพาะแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม plant growth-promoting bacteria (PGPB) ซึ่งถือเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณค่าต่อการเกษตรอย่างยิ่ง (Andy et al., 2020) นอกจากการจัดการธาตุอาหารแล้ว PGPB ยังโดดเด่นในด้านการผลิตไฟโตฮอร์โมน (Phytohormones) ที่สำคัญ เช่น ออกซิน (Auxin/IAA) ซึ่งกระตุ้นการขยายตัวของเซลล์และการพัฒนาของรากฝอย รวมถึง จิบเบอเรลลิน (Gibberellin/GA_3) ที่ส่งผลต่อการยืดตัวของลำต้นและการงอกของเมล็ด (Dobrzynski et al., 2022) นอกจากนี้ PGPB ยังมีกลไกการป้องกันพืชทางอ้อมผ่านการผลิตสาร สิเดอโรฟอร์ (Siderophores) เพื่อแก่งแย่งธาตุเหล็กจากเชื้อก่อโรค และการสร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ เช่น โปรตีเอส เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชในดิน (Bianco, 2024; Fanai et al, 2024; Poria et al., 2022) PGPB ที่สำคัญ ได้แก่ *Azospirillum, Azotobacter, Rhizobium*, *Pseudomonas* และ *Bacillus* (Ajijah et al., 2023; Kong et al., 2025)

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นกลุ่มที่น่าสนใจอย่างมากในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เนื่องจากความสามารถในการสร้างสปอร์ (Endospore) ทำให้ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่แปรปรวน ทั้งความร้อน ความแห้งแล้ง และสารเคมี งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *Bacillus* หลายสายพันธุ์ เช่น *B. subtilis B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. pumilus* และ *B. licheniformis* รวมถึง *B. thuringiensis* ไม่เพียงแต่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต แต่ยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในพืช มีการผลิตสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิและสารระเหย การสร้างไบโอฟิล์ม การเข้ายึดครองไรโซสเฟียร์ และการกระตุ้นการตอบสนองด้านการป้องกันของพืชที่เป็นประโยชน์ (Delkus et al., 2026; Nandana & Anith, 2025) อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกอนุกรมวิธานของ *Bacillus* ได้รับการปรับปรุงใหม่โดย Gupta et al. (2020) ผ่านการวิเคราะห์

phylogenomics และ comparative genomics ซึ่งนำไปสู่การแยกออกเป็น 17 สกุลใหม่ ได้แก่ *Alkalihalobacillus, Viridibacillus, Robertmurraya, Metabacillus, Solibacillus, Ectobacillus, Neobacillus, Priestia, Mesobacillus, Peribacillus, Cytobacillus, Lysinibacillus, Simibacillus, Fictibacillus, Rossellomorea, Bhargavaea* และ *Sutcliffiella* การเปลี่ยนแปลงนี้สะท้อนให้เห็นถึงความซับซ้อนและความหลากหลายของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ที่ต้องการการศึกษาเชิงลึกเพื่อใช้ประโยชน์อย่างเหมาะสม ในเชิงการประยุกต์การพัฒนาสารชีวภัณฑ์จากสายพันธุ์เดียวที่มีคุณสมบัติหลายด้าน (multifunctional traits) ถือเป็นแนวทางสำคัญ เนื่องจากช่วยลดต้นทุน เพิ่มประสิทธิภาพ และลดปัญหาการแข่งขันกันเองระหว่างสายพันธุ์ในผลิตภัณฑ์ผสม อีกทั้งยังเพิ่มความเสถียรและความทนทานต่อสภาพแวดล้อมจริงในแปลงเกษตร ส่งผลให้เกษตรกรได้รับความสะดวกและคุ้มค่าในการใช้ผลิตภัณฑ์เดียวที่สามารถบำรุงและป้องกันโรคพืชได้พร้อมกัน

ดังนั้น เพื่อสนับสนุนการพัฒนาเกษตรกรรมที่ยั่งยืน ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม คณะวิจัยจึงมีแนวคิดในการคัดเลือกและประเมินจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จากธรรมชาติ โดยมุ่งเน้นไปที่แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่มีศักยภาพสูง ผ่านการประเมินความปลอดภัยเบื้องต้น การคัดกรองคุณสมบัติ PGPB และ antagonism ในหลอดทดลอง การผลิตฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3 รวมถึงการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการต่อยอดเป็นนวัตกรรมชีวภัณฑ์ทางการเกษตรของไทยในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยก *Bacillus* จากตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่นา และสวนผลไม้ในพื้นที่จังหวัดปทุมธานี ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 20 ตัวอย่าง นำตัวอย่างดินที่ชั่งได้ 5 กรัม มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ทำลายเซลล์ (vegetative cell) ด้วยวิธี heat shock โดยแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำเย็นจัดเป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดินที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเจืองจางที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA อย่างน้อย 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะของเซลล์โดยการย้อมแกรม และสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* spp. จะมีรูปร่างเป็นท่อน (rod) แกรมบวกติดสีน้ำเงินอมม่วงและสร้างเอนโดสปอร์

การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

นำเชื้อที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง Blood Agar Base ที่เติมเลือดแกะ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง การเกิด hemolysis มี 3 ลักษณะ คือ β-hemolysis (ยอยสลายแบบสมบูรณซึ่งจะพบบริเวณใส (clear zone) รอบๆ รอยขีดเชื้อ α-hemolysis (ย่อยสลายบางส่วน) และ γ-hemolysis (ไมยอยสลายเม็ดเลือดแดง) หากเกิดบริเวณใสให้ผลเป็นบวก (+) หากไม่เกิดบริเวณใสให้ผลเป็นลบ (-) โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง (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% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจผลการย่อยฟอสเฟตโดยสังเกตบริเวณใส (Clear zone) รอบ ๆ โคโลนี (Nautiyal, 1999)

การทดสอบการตรึงไนโตรเจนอิสระ

นำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหาร N-free bromothymol blue medium แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร N-free bromothymol blue medium โดยเชื้อที่มีการตรึงไนโตรเจนอิสระ จะเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน (Latt et al., 2018)

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เลี้ยงในอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ ดังนี้

การทดสอบการสร้างโปรตีเอส (protease)

นำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร Skim milk agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการดูบริเวณใสรอบ ๆ ของโคโลนี (Sebastian et al., 2025)

การทดสอบการสร้างอะไมเลส (amylase)

นำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร Starch agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยหยดสารละลายไอโอดีน 10 เปอร์เซ็นต์ ลงบนโคโลนีแบคทีเรีย ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นสังเกตการณ์เกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนี (Rawat et al., 2025)

การทดสอบการสร้างเซลลูเลส (cellulase)

นำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร CMC agar (carboxymethyl cellulose agar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยหยดสารละลาย Congo red และ 1M NaCl สังเกตุการเกิดสีเหลืองรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย (Roy et al., 2024)

การทดสอบการสร้างไลเปส (Lipase)

นำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร Tween 80 agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยสังเกตจากตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนี (Gurjar et al., 2025)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช (Antimicrobial activity)

การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Dual culture (Shirke et al., 2025) โดยทดสอบกับเชื้อราก่อโรคพืชจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Rhizoctonia solani, Colletotrichum gloeosporioides, Aspergillus flavus, Fusarium moniliforme, F. oxysporum* และ *F. Solani* นำเชื้อราเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำ Cork borer no.2 มาเจาะแผ่นวุ้นที่เลี้ยงเชื้อราแล้วนำไปวางตรงกลางบนจานอาหาร PDA บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียมาขีดบนจานเพาะเชื้อข้างละไอโซเลตทั้งสองข้าง โดยมีระยะห่างจากรา 2.5 เซนติเมตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจวัดโซนการยับยั้งทุกวันจนครบ 7 วัน

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช

ทำการทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion method (Balouiri et al., 2016) โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืชจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ralstonia solanacearum* TISTR 2069, *Xanthomonas axonopodis* TISTR 2066 และ *Erwinia carotovora* นำเชื้อก่อโรคมาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบแต่ละเชื้อลงบนอาหาร NA ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร เจาะหลุมโดยใช้ Cork borer no.3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 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 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยสังเกตบริเวณใส (inhibition zone) รอบๆ หลุมที่เจาะ

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) ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (LC 20A, Shimadzu, ญี่ปุ่น) (Keswani et al., 2022)

การวิเคราะห์ปริมาณออกซิน

นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ IAA ด้วย HPLC โดยมีสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ คือ ใช้คอลัมน์ C18 (4.6 mm x 250 mm. I.D, 5 μm, ODS-3, GL Sciences) ที่ 30 องศาเซลเซียส ใช้ UV detector ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ตัวทำละลายเคลื่อนที่อัตราส่วนระหว่าง 0.8 % acetic acid/acetonitrile เท่ากับ 55:45 (v/v) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีดสาร 20 ไมโครลิตร และมีระยะเวลาการฉีดแต่ละครั้ง (run time) เท่ากับ 12 min ซึ่งจะวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน IAA ที่ช่วงความเข้มข้น 10 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน

นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ GA3 ด้วยเครื่อง HPLC เช่นเดียวกัน โดยใช้คอลัมน์ C18 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส UV detector ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ตัวทำละลายเคลื่อนที่อัตราส่วนระหว่าง น้ำกลั่น/30 mM phosphoric acid เท่ากับ 70:30 (v/v) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีดสาร 20 ไมโครลิตร และมีระยะเวลาการฉีดแต่ละครั้ง เท่ากับ 12 min ซึ่งจะวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน GA3 ที่ช่วงความเข้มข้น 50 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การจัดจำแนกสารพันธุ์แบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการจำแนกในอาหารเหลว Tryptone soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เก็บตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป TIANamp Bacteria DNA kit (TIANGEN Biotech (Beijing) Co.,Ltd., China) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ด้วยเครื่อง PCR Major cycler CYCLER-25 (Major Science, Co. Ltd, Taiwan) โดยใช้ primer คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') หรือ 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCRCCGC A-3') นำ PCR Product มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด TIANquick Midi Purification Kit (TIANGEN Biotech(Beijing) Co.,Ltd., China) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ PCR Product ด้วย Agarose gel electrophoresis หาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nlh.gov) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย (Vásquez & Millones, 2023)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way Analysis of Variance: ANOVA) เพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในภาพรวมระหว่างชุดทดลอง (Treatments) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (P= 0.05)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่แยกได้จากดิน

ได้ทำการแยก *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดิน 20 ตัวอย่าง โดยเป็นดินที่เก็บจากพื้นที่นา และสวนผลไม้ในจังหวัดปทุมธานี สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 149 ไอโซเลต ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยการศึกษาลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และการตรวจดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ การติดสีแกรมของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญได้ดีบนผิวหน้าอาหาร NA ติดสีแกรมเป็นแกรมบวก รูปร่างท่อนและ สร้างสปอร์ มาทำการทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นโดยการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง (Figure 1) การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดนี้เป็นการบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการที่จะเป็นเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียที่แยกได้ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยจึงได้คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (γ-hemolysis) จำนวน 17 ไอโซเลต ในการนำไปทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย PGPB

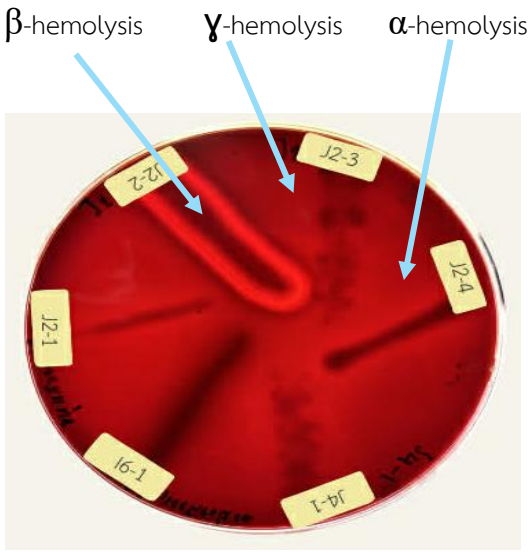
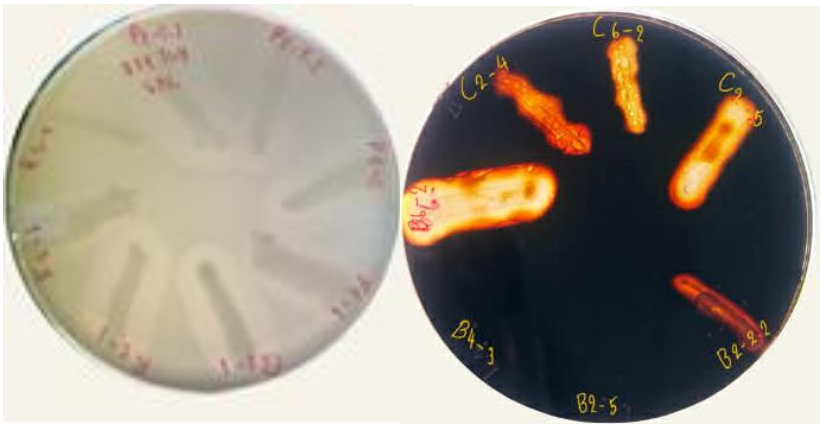
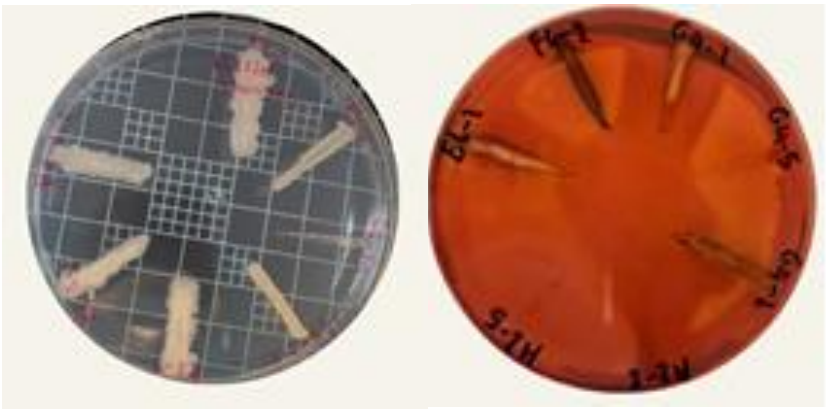


Figure 1 Determination of hemolytic activity



(a) (b)



(c) (d)

Figure 2 Enzyme production assay of the selected bacterial isolates
(a) protese (b) amylase (c) lipase (d) cellulase



(a) (b)

Figure 3 Antimicrobial activity of the selected isolates against
(a) *Colletotrichum gloeosporioides*; (b) *Xanthomonas axonopodis*

Table 1 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลต ไม่แสดงกิจกรรมการย่อยเม็ดเลือดแดง ซึ่งบ่งชี้ถึงความปลอดภัยเบื้องต้นในการนำไปใช้ทางการเกษตร กิจกรรมการละลายฟอสเฟตตรวจพบในเกือบทุกไอโซเลต ยกเว้น L2-9 โดยแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำในดินให้กลายเป็นรูปที่พืชสามารถดูดใช้ได้ ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตดีขึ้น (Wang et al., 2023) ขณะที่กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนไม่พบในทุกไอโซเลตที่ทำการทดสอบ ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ (Figure 2) พบว่าทุกไอโซเลตสร้าง protease และ amylase ยกเว้นไอโซเลต H2-2 และ L2-9 ไม่สร้าง amylase ขณะที่มีเพียง 4 ไอโซเลตที่ผลิต lipase ได้แก่ C4-2 C6-2 E2-1 และ L2-9 ส่วนการสร้าง cellulase ตรวจพบได้หลายสายพันธุ์ ยกเว้นไอโซเลต A2-3 G4-1 H2-2 K2-5 N2-4 และ Q2-1 เอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น นี้ มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน การย่อยสลายสารอินทรีย์ และการป้องกันโรคพืชซึ่งช่วยให้พืช ดูดซึมธาตุอาหารได้ดีขึ้นและมีการเจริญเติบโตที่แข็งแรง (Galani et al., 2024) จากการทดสอบความสามารถในการยั้บยั้งเชื้อก่อโรคในพืช (Figure 3) พบว่าไอโซเลต C6-2 E2-1 และ J2-3 สามารถยั้บยั้งเชื้อราก่อโรคได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus, F. moniliforme* และ *F. Solani* ส่วน G4-1 K2-5 และ P2-2.2 สามารถยั้บยั้งเชื้อราก่อโรคได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ ยกเว้น P2-2.2 ที่ไม่ยั้บยั้ง *R. solani* และสามารถยั้บยั้งแบคทีเรียก่อโรคพืชได้ 1 สายพันธุ์ คือ *X. axonopodisi* ส่วน I2-3.1 สามารถยั้บยั้งเชื้อราได้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. oxysporum A. flavus F. moniliforme* และ *F. solani* ซึ่งความสามารถในการยั้บยั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด จะแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการป้องกันโรคพืชได้เป็นอย่างดี (Cao et al., 2018)

คุณสมบัติในการสร้างฮอร์โมนพืชที่แสดงใน Table 1 พบว่าเชื้อ B2-2.2 มีการผลิต IAA สูงที่สุด (8.83 ± 0.33) และแตกต่างจากสายพันธุ์ A2-3 (0.77 ± 0.16) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่สายพันธุ์อื่นๆ ไม่ผลิต IAA สำหรับการผลิต GA_3 พบว่าเชื้อ J2-3 มีการผลิต GA_3 สูงที่สุด (19.49 ± 0.78) และแตกต่างจากทุกสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนสายพันธุ์ C4-2 และ H2-2 มีค่า GA_3 ปานกลาง ขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ อยู่ในระดับต่ำ นอกจากนี้ การผลิต IAA และ GA_3 ที่ปริมาณสูงในบางสายพันธุ์ แสดงให้เห็นถึงถึงศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดย IAA มีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ การสร้างอวัยวะ การตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วง การพัฒนาของเมล็ด การคงอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิด การพัฒนาราก การสร้างปากใบ และการพัฒนาดอกและผลไม้ (Singh et al., 2026) ส่วน GA_3 เป็นฮอร์โมนพืชที่ควบคุมกระบวนการสำคัญหลายอย่าง เช่น การงอกของเมล็ด การยืดตัวของเซลล์ การออกดอก และการสร้างผลไม้ (Cano-Macías et al., 2025)

จากผลการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ใน Table 1 สามารถคัดเลือกไอโซเลตที่มีศักยภาพเป็น PGPB ได้แก่

B2-2.2 เนื่องจากความสามารถละลายฟอสเฟต ผลิตเอนไซม์หลายชนิด ผลิต IAA สูงสุด เท่ากับ 8.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลิต GA_3 เท่ากับ 4.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

C6-2 มีความสามารถละลายฟอสเฟต ผลิตเอนไซม์หลายชนิด สามารถยั้บยั้งเชื้อรา *A. flavus F. moniliforme* และ *F. Solani* และผลิต GA_3 เท่ากับ 4.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

E2-1 มีความสามารถละลายฟอสเฟต ผลิตเอนไซม์หลายชนิด สามารถยั้บยั้งเชื้อรา *A. flavus F. moniliforme* และ *F. Solani* และผลิต GA_3 เท่ากับ 3.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

G4-1 มีความสามารถละลายฟอสเฟต ผลิตเอนไซม์หลายชนิด สามารถยั้บยั้งเชื้อรา *R. solani F. oxysporum C. gloeosporioides A. flavus F. moniliforme F. Solani* และแบคทีเรีย *X. axonopodisi* และผลิต GA_3 เท่ากับ 4.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

I2-3.1 มีความสามารถละลายฟอสเฟต ผลิตเอนไซม์หลายชนิด สามารถยั้บยั้งเชื้อราได้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. Oxysporum*, *A. flavus*, *F. moniliforme* และ *F. solani* และผลิต GA_3 เท่ากับ 4.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

J2-3 มีความสามารถละลายฟอสเฟต ผลิตเอนไซม์หลายชนิด สามารถยั้บยั้งเชื้อรา *A. flavus, F. moniliforme* และ *F. Solani* และผลิต GA_3 ได้สูงสุด เท่ากับ19.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

K2-5 มีความสามารถละลายฟอสเฟต ผลิตเอนไซม์หลายชนิด สามารถยั้บยั้งเชื้อรา *R. solani, F. Oxysporum, C. gloeosporioides, A. flavus*, *F. moniliforme, F. Solani* และแบคทีเรีย *X. axonopodisi* และผลิต GA_3 เท่ากับ 4.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

P2-2.2 มีความสามารถละลายฟอสเฟต ผลิตเอนไซม์หลายชนิด สามารถยั้บยั้งเชื้อรา *F. Oxysporum, C. gloeosporioides, A. flavus, F. moniliforme, F. Solani* และแบคทีเรีย *X. axonopodisi* และผลิต GA_3 เท่ากับ 2.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Table 1 Determination of Plant Growth-Promoting Bacteria

Isolates	Hemolytic activity	Phosphate solubilization activity	Nitrogen fixation	Enzyme production				Antimicrobial activity									Plant hormones production (ug/ml)	
				protease	amylase	Lipase	cellulase	RS	FO	CG	AF	FM	FS	RaS	XA	EC	IAA	GA_3
A2-3	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.77±0.16^{b}	4.66±0.61^{cde}
B2-2.2	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.83±0.33^{a}	4.87±0.12^{cd}
C4-2	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	9.51±0.64^{b}
C6-2	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	ND	4.85±0.20^{cd}
D2-2	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
E2-1	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	ND	3.03±0.58^{ef}
G4-1	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	ND	4.94±0.12^{cd}
H2-2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	6.83±0.11^{bc}
H4-4	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	2.94±0.08^{ef}
I2-3.1	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	ND	4.22±0.04^{de}
J2-3	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	ND	19.49±0.78^{a}
K2-5	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	ND	4.74±0.50^{cd}
L2-9	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
N2-4	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
P2-2.2	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	ND	2.48±0.14^{f}
Q2-1	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	3.51±0.31^{ef}
R2-6	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND

+= positive; - = negative; ND = Not detected

RS = *R. solani*, FO = *F. oxysporum,* CG = *C. gloeosporioides*, AF = *A. flavus*, FM = *F. moniliforme*, , FS = *F. Solani*, RaS = *R. Solanacearum,* XA = *X. axonopodisi*, EC = *E. carotovora*

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

ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

จากการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ B2-2.2, C6-2, E2-1, G4-1, I2-3.1, J2-3, K2-5 และ P2-2.2 ไปจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA ผลการจัดจำแนกแสดงใน Table 2

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

Isolate	Bacterial description	Identities	% Identities	Primers
B2-2.2	*Priestia aryabhattai*	763/768	99.35	27F/1492R
C6-2	*Bacillus licheniformis*	779/787	98.98	8F/1492R
E2-1	*Bacillus haynesii*	784/790	99.24	8F/1492R
G4-1	*Bacillus subtilis*	778/783	99.36	8F/1492R
I2-3.1	*Bacillus licheniformis*	778/787	98.86	8F/1492R
J2-3	*Bacillus sonorensis*	777/785	98.98	8F/1492R
K2-5	*Bacillus velezensis*	745/747	99.73	8F/1492R
P2-2.2	*Bacillus licheniformis*	786/789	99.62	8F/1492R

B2-2.2 สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Priestia aryabhattai* แบคทีเรียสายพันธุ์นี้จัดว่าเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อพืชเป็นอย่างมาก โดย Woo et al. (2026) รายงานว่า *P. aryabhattai* มีคุณสมบัติเด่นในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต exopolysaccharide การละลายฟอสเฟต siderophore biosynthesis และการควบคุม Na^+/K^+ transport ที่ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวสาลีภายใต้สภาวะเค็ม โดยเพิ่มอัตราการงอก 13.1 เปอร์เซนต์ และน้ำหนักสด 53.2 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

C6-2 I2-3.1 และ P2-2.2 สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *B. licheniformis* สายพันธุ์นี้มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่มีศักยภาพ Bansal & Vyas (2026) รายงานว่า *B. licheniformis* PRPSB10 สามารถทนต่อความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ทั่วไปในมันฝรั่ง และสามารถละลายฟอสเฟตในสภาวะที่มีสารกำจัดศัตรูพืช นอกจากนี้ยังสามารถละลายสังกะสีและโพแทสเซียม สร้าง biofilm และผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโต เช่น auxins siderophores ammonia รวมถึงเอนไซม์ lipase amylase protease และ phytase

E2-1 จัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *B. haynesii* สายพันธุ์นี้มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีรายงานการศึกษายืนยันว่ามีการผลิต IAA exopolysaccharide และ ACC deaminase ซึ่งช่วยลดระดับเอทิลีนและเพิ่มความทนทานต่อสภาวะเครียด เช่น ความแห้งแล้งและโลหะหนัก (Andy et al., 2023)

G4-1_สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่มีบทบาทหลายด้าน ทั้งการสร้าง biofilm การตรึงราก การผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโต และการยับยั้งเชื้อโรคพืช จึงถูกใช้เป็นชีวภัณฑ์ทางการเกษตรอย่างแพร่หลาย (Adjei et al., 2025)

J2-3 สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *B. sonorensis* สายพันธุ์นี้มีรายงานชัดเจนว่ามีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น การละลายฟอสเฟต การผลิต IAA siderophore chitinase hydrogen cyanide และการสร้าง biofilm ซึ่งช่วยเพิ่มผลผลิตและความทนทานของพืชต่อโรคและสภาวะเครียด (Thilagar et al., 2018)

K2-5 สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *B. velezensis* โดย Borriss et al. (2026) ได้รายงานว่า *B. velezensis* จัดเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่ดี มีความโดดเด่นด้านการผลิตสารต้านเชื้อโรคและการสร้างความสัมพันธ์แบบภาวะพึ่งพากับพืช ทำให้มีบทบาททั้งในเชิงชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืช และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

B. velezensis และ *B. subtilis* สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้กว้างขวาง (Broad-spectrum) เนื่องจากมีกลไกการทำงานร่วมกันแบบทวีคูณ โดยหลั่งสารลิโพเพปไทด์สำคัญ 3 ชนิดหลัก ได้แก่ Surfactin, Iturin และ Fengycin ที่ช่วยเจาะทำลายเสถียรภาพ และสร้างรูรั่วบนเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อราจนเซลล์แตกตาย (Ongena & Jacques, 2008; Rabbee et al., 2019) ควบคู่กับการปล่อยสารระเหยง่าย (VOCs) ยับยั้งสปอร์ระยะไกล (Rabbee et al., 2019) อีกทั้งยังสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อราโดยตรงอย่าง Chitinase และ β-1,3-Glucanase (Fira et al., 2018) ร่วมกับการแย่งชิงพื้นที่และธาตุ

เหล็กด้วยการสร้างไบโอฟิล์มและสาร Bacillibactin (Fan et al., 2018; Fira et al., 2018) รวมถึงช่วยส่งสารสัญญาณกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต้านทานโรคแบบ ISR ให้แก่ต้นพืชไปพร้อมกัน (Ongena & Jacques, 2008; Rabbee et al., 2019)

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ส่วนใหญ่ไม่ตรึงไนโตรเจน (Table 1) เนื่องจากขาดกลุ่มยีน *nif* (เช่น *nifH*, *nifD*, *nifK*) ที่ใช้ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Nitrogenase สำหรับเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย (Kim & Rees, 1992; Ding et al., 2005) อีกทั้งเอนไซม์ Nitrogenase ยังถูกทำลายได้ง่ายด้วยออกซิเจน ซึ่งขัดกับธรรมชาติของ *Bacillus* ที่เป็นแบคทีเรียต้องการออกซิเจน แม้จะมีข้อยกเว้นในบางสายพันธุ์จำเพาะที่ตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะออกซิเจนต่ำ เช่น *Paenibacillus polymyxa* แต่โดยทั่วไปบทบาทหลักของ *Bacillus* ในการส่งเสริมพืชคือการละลายฟอสเฟต การยึดจับธาตุเหล็ก และการสร้างฮอร์โมนพืช ไม่ใช่การตรึงไนโตรเจน (Ding et al., 2005)

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกและประเมินคุณสมบัติของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบแบคทีเรียที่มีความปลอดภัยเบื้องต้นจำนวน 17 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตและสร้างเอนไซม์โปรตีเอส และอะไมเลสได้ดี แต่ไม่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน สำหรับคุณสมบัติเด่นเฉพาะด้าน พบว่าไอโซเลต G4-1 และ K2-5 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *R. solani, F. Oxysporum, C. gloeosporioides, A. flavus*, *F. moniliforme, F. Solani* และแบคทีเรีย *X. axonopodis* ขณะที่ไอโซเลต J2-3 สามารถผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้สูงสุดเท่ากับ 19.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ B2-2.2 ผลิตอินโดล-3-อะซีติกแอซิดได้สูงสุด เท่ากับ 8.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากคุณสมบัติทั้งหมด สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงได้จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ B2-2.2 C6-2 E2-1 G4-1 I2-3.1 J2-3 K2-5 และ P2-2.2 ซึ่งจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA ตาม % Identity ได้เป็น *Priestia aryabhattai* (99.35%), *Bacillus licheniformis* (99.98%), *B. haynesii* (98.24%), *B. subtilis* (99.36%), *B. licheniformis* (99.86%), *B. sonorensis* (99.98%), *B. velezensis* (99.73%) และ *B. licheniformis* (99.62%) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต มีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคพืช โดยควรนำไปทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการควบคุมโรคในพืชในแปลงทดลองจริง รวมถึงทดสอบความเป็นไปได้ในการผสมรวมเป็นสูตรผสม (Consortium bio-inoculant) ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

เอกสารอ้างอิง

Adjei, M. O., Yu, R., Cao, X., & Fan, B. (2025). The mechanisms of *Bacillus subtilis* as a plant-beneficial rhizobacterium in plant–microbe interactions. *Microorganisms*, *13*(12), 2823. https://doi.org/10.3390/microorganisms13122823

Ajijah, N., Fiodor, A., Pandey, A. K., Rana, A., & Pranaw, K. (2023). Plant growth-promoting bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability: A multifaceted agent for sustainable agriculture. *Diversity*, *15*(1), 112. https://doi.org/10.3390/d15010112

Andy, A. K., Masih, S. A., & Gour, V. S. (2020). Isolation, screening and characterization of plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soils of selected pulses. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *27*, 101685. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101685

Andy, A. K., Rajput, V. D., Burachevskaya, M., & Gour, V. S. (2023). Exploring the Identity and Properties of two *Bacilli* strains and their potential to alleviate drought and heavy metal stress. *Horticulturae*, *9*(1), 46. https://doi.org/10.3390/horticulturae9010046

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis, 6*(2), 71–79. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Bansal, R., & Vyas, P. (2026). Functional and genomic analysis uncovers the broad-spectrum plant growth-

promoting potential of *Bacillus licheniformis* PRPSB10. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 73*, 103981. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2026.103981

Bianco, C. (2024). Plant-growth-promoting bacteria. *Plants*, *13*(10), 1323. https://doi.org/10.3390/plants13101323

Borriss, R., Gao, X., & Fan, B. (2026). *Bacillus velezensis* as a model for plant-associated beneficial bacilli. *Journal of Bacteriology, 208*(3), e00519-25. https://doi.org/10.1128/jb.00519-25

Cano-Macías, F., Vélez-Chávez, J., Vélez-Chávez, A., & Alvarado-Salvador, R. (2025). Effect of gibberellic acid on seed germination and plant development: A systematic review (2001–2025). *Revista Verde de Agroecologiae Desenvolvimento Sustentável, 20*(2), 11213. https://doi.org/10.18378/rvads.v20i2.11213

Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J. D., & Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports, 8*, 4360. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z

Delkus, M., Ivanauskas, A., Žižyte-Eidetiene, M., Lukša-Žebelovič, J., Vepštaite-Monstaviče, I., Brokevičiute, S., & Šimkute, N. (2026). *Bacillus* species in agriculture: Functional traits, biocontrol performance, and regulatory safety assessment. *Agriculture*, *16*(4), 413. https://doi.org/10.3390/agriculture16040413

Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., & Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(5), 1271–1281. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02738.x

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

Fanai, A., Bohia, B., Lalremruati, F., Lalhriatpuii, N., Lalrokimi, Lalmuanpuii, R., Singh, P. K., & Zothanpuia (2024). Plant growth promoting bacteria (PGPB)-induced plant adaptations to stresses: an updated review. *PeerJ, 12*, e17882. https://doi.org/10.7717/peerj.17882

Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: he Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2491. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, *285*, 44–55. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044

Galani, B., Chauhan, J., & Gohel, S. (2024). Role of rhizospheric microbial enzymes in plant growth promotion, antagonism, and sustainable agriculture: A review. *Trends in Horticulture, 7*(2), 4902. https://doi.org/10.24294/th.v7i2.4902

Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(11), 5753–5798. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475

Gurjar, M., Kaswan, V., Kaushik, N. K., Trivedi, U. B., Patel, H., & Kaushik, A. (2025). Isolation, purification and characterization of lipase-producing microorganism and lipase production. *International Journal of Applied Biology and Research, 9*(1), 86–92. https://doi.org/10.33545/26174693.2025.v9.i1Sb.3425

Keswani, C., Singh, S. P., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Rajput, V. D., Minkina, T. M., Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2022). Biosynthesis and beneficial effects of microbial gibberellins on crops for sustainable agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(3), 1597–1615. https://doi.org/10.1111/jam.15348

Kim, J., & Rees, D. C. (1992). Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science*, *257*(5077), 1677–1682. https://doi.org/10.1126/science.1529354

Kong, Z., He, Y., Xue, J., Chen, Z., Gui, Y., Wu, J., & Chen, X. (2025) Plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculants enhance the bacterial network connectivity more than non-PGPB in heavy metal-contaminated soil. *Front. Plant Sci. 16*,1717976. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1717976

Latt, Z. K., Yu, S. S., Kyaw, E. P., Lynn, T. M., Nwe, M. T., & Mon, W. W. (2018). Isolation, evaluation and characterization of free living nitrogen fixing bacteria from agricultural soils in Myanmar for biofertilizer formulation. *International Journal of Plant Biology & Research, 6*(3), 1087. https://doi.org/10.47739/2333-6668/1092

Mogrovejo, D. C., Perini, L., Gostinčar, C., Sepčić, K., Turk, M., Ambrožič-Avguštin, J., Brill, F. H. H., & Gunde-Cimerman, N. (2020). Prevalence of antimicrobial resistance and hemolytic phenotypes in culturable arctic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 570. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00570.

Nandana, M. S., & Anith, K. N. (2025). Endospore-producing endophytes: Structural adaptations, functional roles, and their significance in plant growth and stress management. *International Journal of Plant & Soil Science, 37* (8), 298-312. https://doi.org/10.9734/ijpss/2025/v37i85631

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

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, *16*(3), 115–125. https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009

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*, 999866. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.999866

Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. H. (2019). *Bacillus velezensis:* A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, *24*(6), 1046. https://doi.org/10.3390/molecules24061046

Rawat, R., Thapak, S., Gaur, S., Tiwari, A., Marskole, P., Gupta, V., & Uikey, R. (2025). Isolation, screening and optimization of amylase-producing *Bacillus cereus* from soil samples. *SSR Institute of International Journal of Life Sciences, 11*(5), 8496–8504. https://doi.org/10.21276/SSR-IIJLS.2025.11.5.43

Roy, D., Gunri, S.K. & Pal, K.K. (2024). Isolation, screening and characterization of efficient cellulose-degrading fungal and bacterial strains and preparation of their consortium under in vitro studies. *3 Biotech, 14*(5), 131. https://doi.org/10.1007/s13205-024-03974-z

Sebastian, P. M., Sanjana, G., Mundrikeri, D., & Rao, K. V. B. (2025). Optimization and purification of protease produced by *Rossellomorea aquimaris* isolated from marine sediments and exploring their diverse biological applications. *Applied Biochemistry and Microbiology, 61*(4), 680–690. https://doi.org/10.1134/S0003683824607352

Shirke, M. A., Zope, A. V., More, S. W., & Gaikwad, M. (2025). Antifungal activity of different *Trichoderma* spp. against soil borne plant pathogens. *International Journal of Advanced Biochemistry Research, 9*(1S), 1037–1040. https://doi.org/10.33545/26174693.2025.v9.i1Sn.3676

Singh, P., Mishra, S., Singh, S., Zheng, B. S., Tripathi, D. K., Gupta, R., & Singh, V. P. (2026). Regulating plant growth and defense: Multifaceted roles of auxin in plants. *Journal of Plant Growth Regulation, 45*(3), 1697–1723. https://doi.org/10.1007/s00344-025-12019-5

Thilagar, G., Bagyaraj, D. J., Podile, A. R., & Vaikuntapu, P. R. (2018). *Bacillus sonorensis*, a novel plant growth-promoting rhizobacterium in improving growth, nutrition and yield of chilly (*Capsicum annuum* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 88*, 813–818. https://doi.org/10.1007/s40011-016-0822-z

Vásquez, E., & Millones, C. (2023). Isolation and identification of bacteria of genus *Bacillus* from composting urban solid waste and palm forest in Northern Peru. *Microorganisms, 11(3)*, 751. https://doi.org/10.3390/microorganisms11030751

Wang, C., Pan, G., Lu, X., & Qi, W. (2023). Phosphorus solubilizing microorganisms: potential promoters of agricultural and environmental engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *11*, 1181078. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1181078