

การคัดแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียผลิตกรดอินโดลอะซิติกและแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากน้ำหมักชีวภาพ Isolation and Identification of Indole-3-Acetic Acid Producing Bacteria and Phosphate Solubilizing Bacteria from Bio-fermented Solution

มลธิรา ศรีถาวร¹ ธนวัฒน์ วิริยะกระชาปณ์² และอรวรรณ ชุนหชาติ^{3*}
Moltira Srithaworn¹ Tanawat Viriyakrasarp² and Orawan Chunhachart^{3*}

^{1,3*} สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

² บริษัท นาโน อินทรีย์ จำกัด 249 หมู่ 4 ต.วังเย็น อ. เมือง กาญจนบุรี 71000

^{1,3*} Division of Microbiology, Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus 73140

² Nano Insee Co., Ltd. 249 Moo 4 Wang Yen District, Mueng, Kanchanaburi 71000

Received :2023-01-13 Revised : 2023-03-20 Accepted :2023-03-23

บทคัดย่อ

น้ำหมักชีวภาพถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรโดยนำมาทำเป็นปุ๋ยทดแทน หรือใช้ผสมอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามคุณภาพของน้ำหมักนั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร และกระบวนการหมักที่เกิดโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชซึ่งผลิต indole-3-acetic acid (IAA) และแบคทีเรียละลายฟอสเฟต เพื่อทำการจัดจำแนกในระดับอนุชีวโมเลกุล จากการทดลองทำการหมักน้ำหมักชีวภาพจากหัวเชื้อที่เตรียมจากถั่วเหลืองบดเป็นผง ที่เติมยีสต์สกัดร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ทำการหมักโดยใช้อาหารประกอบด้วย เปปโตน 10 กรัม ข้าวโพดบด 5 กรัม สารสกัดจากเนื้อ 2.5 กรัม ปลาป่น 1.5 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 3 กรัม น้ำตาลปีบ 2 กรัม เกลือ 1 กรัม รำละเอียด 1 กรัม เลือดหมู 1 กรัม น้ำ 1 ลิตร ทำการหมักจนค่า pH อยู่ระหว่าง 2-3 พบว่าแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลต พบแบคทีเรียที่ผลิต IAA ได้ 8 ไอโซเลตที่สามารถผลิต IAA ได้ (27.5%) ได้แก่ *Lactobacillus casei* NV2203 *Lacticaseibacillus rhamnosus* NV2207 *Bacillus cereus* NV2210 *Bacillus cereus* NV2211 *Lacticaseibacillus rhamnosus* NV2214 *Bacillus* sp. NV2226 *Terribacillus* sp. NV2230 และ *Terribacillus saccharophilus* NV2233 และพบแบคทีเรียละลายฟอสเฟต 2 ไอโซเลต ได้แก่ *Lactobacillus casei* NV2203 และ *Bacillus subtilis* NV2206 ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ : น้ำหมักชีวภาพ, กรดอินโดลอะซิติก, แบคทีเรียละลายฟอสเฟต

Abstract

Bio-fermented water has been widely used in agricultural applications such as bio-fertilizer and animal feed additives. However, the quality of bio-fermented solution depends on formulation of culture media and fermentation process, which is driven by natural microorganisms. Therefore, the objectives of this research were to isolate plant growth promoting bacteria that produce indole-3-acetic acid (IAA) and solubilize phosphate and identify them. The inoculum was prepared from soybean powder supplemented with 2%(w/w) yeast extract. Fermentation broth composes of 10 g of peptone, 5 g of corn powder, 2.5 g of beef extract, 1.5 g of fish powder, 3 g of yeast extract, 2 g of coconut palm sugar, 1 g of salt, 1 g of rice bran, 1 g of pig blood and water added until 1 L. The mixture was incubated until pH value decreased to 2-3. Out of 29 isolates, the results revealed that 8 isolates of bacteria that produce IAA were found (27.5%). The bacteria were identified as *Lactobacillus casei* NV2203 *Lacticaseibacillus rhamnosus* NV2207 *Bacillus cereus* NV2210 *Bacillus cereus* NV2211 *Lacticaseibacillus rhamnosus* NV2214 *Bacillus* sp. NV2226 *Terribacillus* sp. NV2230 and *Terribacillus saccharophilus* NV2233. Whereas 2 isolates were phosphate solubilizing bacteria that identified as *Lactobacillus casei* NV2203

* อรวรรณ ชุนหชาติ

E-mail address: orawan.chu@ku.th

and *Bacillus subtilis* NV2206. These bacteria could be used as starter culture for high quality bio-fermented solution.

Keywords : Bio-fermented solution, indole-3-acetic acid, phosphate solubilizing bacteria

1.บทนำ

น้ำหมักชีวภาพ เป็นของเหลวที่ได้จากการหมักเศษพืช ผลไม้ ผัก หรือเนื้อสัตว์ โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบในการย่อยสลายทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน น้ำหมักชีวภาพสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรกรรมโดยมีการนำมาใช้เป็นปุ๋ยทดแทน หรือลดการใช้ปุ๋ยเคมี ใช้ทดแทนยาฆ่าแมลงในการปราบศัตรูพืชหรือควบคุมโรคพืช ใช้เป็นหัวเชื้อในการทำปุ๋ยหมัก [1] และใช้ผสมอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมสุขภาพสัตว์ เนื่องจากในน้ำหมักชีวภาพนั้น นอกจาก จะมีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ยังมีสารอื่น ๆ ธาตุอาหาร ฮอโมนหรือสารส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น indole-3-acetic acid (IAA) [2] และยังพบว่ามีการผลิตอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดแลคติก เป็นต้น ซึ่งช่วยเร่งการออกของเมล็ด และความยาวของรากพืชได้ [3] การผลิตน้ำหมักชีวภาพในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการผลิตในระดับครัวเรือนและชุมชน มีรูปแบบและสูตรการผลิตที่แตกต่างกันไป นอกจากเศษพืช หรือเนื้อสัตว์แล้วในกระบวนการหมักยังมีการเติมแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น กากน้ำตาล หรือน้ำตาลทรายแดง [4] โดยทั่วไปการผลิตน้ำหมักชีวภาพนั้นใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่สกัดจากกระบวนการหมัก การผลิตที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทราบสายพันธุ์นั้นทำให้การควบคุมคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพให้สม่ำเสมอทำได้ยาก ทำให้ปัจจุบันมีการเติมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพืชลงไปด้วย เช่น แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas putida* [5] และ *Klebsiella* sp. [6] ซึ่งมีรายงานว่ากระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ จุลินทรีย์ที่นิยมใช้อีกชนิดหนึ่งคือ *Lactobacillus* sp. [7] ซึ่งจะช่วยให้พืชมีความต้านทานโรคได้ดีขึ้น เนื่องจากมีการผลิตกรดแลคติก และ แบคทีเรียโอซินที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ ดังนั้นการนำจุลินทรีย์ที่ทราบสายพันธุ์และมีคุณสมบัติที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชมาใช้ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพนั้น จะทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพให้มีความสม่ำเสมอมากขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชเพื่อการเสริมหรือทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีในการทำเกษตรอินทรีย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย จากน้ำหมักชีวภาพที่เตรียมมาจากหัวเชื้อที่ทำจากผงถั่วเหลืองผสมกับสารสกัดจากยีสต์ ทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับอนุชีวโมเลกุล และคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดอินโดลอะซิติก (indole-3-acetic acid; IAA) และแบคทีเรียที่สามารถละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัสได้

2.วิธีทดลอง

2.1การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยเปปโตน 10 กรัม ข้าวโพดบด 5 กรัม สารสกัดจากเนื้อ 2.5 กรัม ปลาป่น 1.5 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 3 กรัม น้ำตาลปีบ 2 กรัม เกลือ 1 กรัม รำละเอียด 1 กรัม น้ำ 1 ลิตร นำส่วนผสมไปให้ความร้อนประมาณ $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$ เมื่อส่วนผสมละลายแล้วไปกรอง ตั้งไว้ให้อุ่นหมักมิลดลงเหลือประมาณ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ใส่เลือดหมู 1 กรัม คนให้ละลายเข้ากัน นำไปกรองตะกอนให้ได้น้ำใส ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ± 2

2.2การเตรียมหัวเชื้อและการหมัก

หัวเชื้อเตรียมโดยนำเมล็ดถั่วเหลืองมาดเป็นผง 50 กรัม เติมน้ำยีสต์สกัดร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 24 ชั่วโมง ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.1 เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิเย็นลงเหลือประมาณ 40 ± 2 องศาเซลเซียส นำหัวเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ เทลงในโหลแก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ 20-25 ลิตร โดยวิธีเทคนิคปราศจากเชื้อ ปรับอุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป่าอากาศบริสุทธิ์ตลอดเวลาเป็นเวลา 5 วัน นำน้ำหมักหัวเชื้อจุลินทรีย์เทใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.1 ในถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร ที่เตรียมไว้ทำน้ำหมักชีวภาพ กวนน้ำหมักทุก ๆ 4 ชั่วโมง วัดค่า pH เมื่อมีค่าได้ประมาณ 2-3 แล้วหยุดการหมักโดยการกรองผ่านผ้าขาวบาง และแช่เย็นที่ $4-8$ องศาเซลเซียส

2.3การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักชีวภาพ

นำน้ำหมักมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยการดัดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร De Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงใน anaerobic jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยของเซลล์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread บนอาหาร MRS agar เลี้ยงใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน และทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยการ streak บนอาหาร MRS agar นำน้ำหมักอีกส่วนมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ประมาณ 7.0 จากนั้นนำน้ำหมักปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread บนอาหาร Nutrient agar (NA) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันและทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยการ streak บนอาหาร NA นำเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการย้อมแกรม และศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.4การจัดจำแนกระดับอนุชีวโมเลกุล

นำเชื้อบริสุทธิ์มาแยกสารพันธุกรรม และทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ GF-Bacterial DNA Extraction kit (Vivantis, Malaysia) และเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ของยีน 16s rRNA โดยใช้ primers fd1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') และ rP2

(5'ACGGCTACCTTGTACGACTT 3') มีผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส วิเคราะห์ผลผลิต PCR ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียที่แยกได้ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ GF-1 PCR Clean-up kit (Vivantis, Malaysia) และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส (1st BASE, Singapore) เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (the US National Center for Biotechnology Information) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย วิเคราะห์ผลลำดับเบสโดยการเปรียบเทียบโดยใช้ BLAST search และจัดทำ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X version 11 โดยใช้วิธี neighbor-joining ที่ค่า Bootstrap 1,000 ครั้ง [8]

2.5 การทดสอบคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืช

2.5.1 การผลิตกรดอินโดลอะซิติก (Indole-3-acetic acid; IAA)

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีคัดแยกได้มาตรวจสอบการผลิต IAA ด้วยวิธี colorimetric assay ตามวิธีการของ [9] โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม L-tryptophan ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน ดูดสารแขวนลอยเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ Salkowski reagent (ผสม 0.5 M FeCl₃ 1 มิลลิลิตร และ 25% HClO₄ 49 มิลลิลิตร) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในจานเซรามิคหลุมทั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที เชื้อที่สามารถสร้าง IAA ได้จะปรากฏเป็นสีชมพูขึ้น

2.5.2 การละลายฟอสเฟต

การวิเคราะห์ปริมาณการละลายฟอสเฟตทำโดยนำเชื้อแบคทีเรียมาตรวจสอบการละลายสารฟอสเฟตในเชิงคุณภาพ โดยทำการทดสอบตามวิธีการของ [10] โดยการจุดเชื้อ (point inoculation) ตรงกลางจานอาหาร Pikovskaya [11] ที่มี Tricalcium phosphate (กลูโคส 10 กรัม Ca₃(PO₄) 5.0 กรัม KCl 0.2 กรัม MgSO₄·7H₂O 0.1 กรัม MnSO₄ 0.0001 กรัม FeSO₄ 0.0001 กรัม สารสกัดยีสต์ 0.5 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบโดยพิจารณาจากโซนใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ

3. ผลการทดลอง

3.1 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำหมักชีวภาพ

จากการทดลองสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้จำนวน 29 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) โดยน้ำหมักชีวภาพมีความเป็นกรดสูง มีค่า pH 3.46 นั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย กรดแลคติกซึ่งเจริญบนอาหาร MRS agar ภายใน anaerobic jar แต่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียชนิดกลุ่มอื่น ๆ บนอาหาร NA ที่บ่มในสภาพมีออกซิเจน ดังนั้นจึงนำน้ำหมักชีวภาพมาปรับค่า pH ให้มีค่าประมาณ 6.5-7.0 แล้วนำไปแยกเชื้อด้วยอาหาร NA พบว่า

มีแบคทีเรียในกลุ่มอื่น ๆ เจริญบนอาหาร NA ได้ ซึ่งในน้ำหมักชีวภาพที่มีค่าความเป็นกรดสูงอาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ทำให้เชื้อแบคทีเรียอาจปรับตัวอยู่ในรูปของเอนโดสปอร์ เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปย้อมแกรม และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่าเป็นเป็นแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ซึ่งจากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าในน้ำหมักชีวภาพนี้มีแบคทีเรียหลายกลุ่มเจริญอยู่ร่วมกัน โดยมีรายงานการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดที่เกิดขึ้นในการหมักน้ำหมักชีวภาพ 3 สูตรจากกล้วยน้ำว้า ถั่วแขก และสาบเสือ พบว่าเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 13 วัน มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้น และค่า pH อยู่ที่ 3-3.5 ซึ่งกระบวนการหมักในช่วงแรกจะมีการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ออกซิเจน จนเมื่อออกซิเจนลดลงจะมีแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียแลคติกเจริญมาแทนที่ ซึ่งจะส่งผลให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงเนื่องจากกรดที่แบคทีเรียผลิตขึ้น [12]

3.2 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากน้ำหมักชีวภาพด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

จากการแยกเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 29 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ของยีน 16s rRNA ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำบริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ด้วยโปรแกรม Nucleotide Blast ของ NCBI ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพบทั้งชนิดที่ไม่ก่อโรค และแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียในน้ำหมักชีวภาพที่ทำการหมักนี้ได้เป็น 14 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีความเหมือนกับเชื้อ *Lentilactobacillus fungorum* ร้อยละ 98.98 จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NV2202 กลุ่มที่ 2 มีความเหมือนกับเชื้อ *Lactobacillus casei* ร้อยละ 99.13 จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NV2203 กลุ่มที่ 3 มีความเหมือนกับเชื้อ *Bacillus cereus* ร้อยละ 90.22-92.63 จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NV2204 NV2210 และ NV2211 กลุ่มที่ 4 มีความเหมือนกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ร้อยละ 100 จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NV2206 กลุ่มที่ 5 มีความเหมือนกับเชื้อ *Lactocaseibacillus rhamnosus* ร้อยละ 99.72-99.93 จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NV227 NV2212 NV2213 NV2214 NV2216 และ NV2218 กลุ่มที่ 6 มีความเหมือนกับเชื้อ *Lactobacillus farraginis* ร้อยละ 99.36-99.82 จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NV2208 NV2209 และ NV2219 กลุ่มที่ 7 มีความเหมือนกับเชื้อ *Gorillibacterium* sp. ร้อยละ 95.25 จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NV2220 กลุ่มที่ 8 มีความเหมือนกับเชื้อ *Paenibacillus* sp. และ *Paenibacillus illinoisensis* ร้อยละ 98.35-99.21 จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NV2221 NV2228 และ NV2231 กลุ่มที่ 9 มีความเหมือนกับเชื้อ *Bacillus aryabhattai* ร้อยละ 99.31-99.91 จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NV2223 และ NV2234 กลุ่มที่ 10 มี

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำหมักชีวภาพ

รหัสไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	พื้นฐานวิทยาของเซลล์/ เอนโดสปอร์	Species	ร้อยละความเหมือน	Accession number
NV2202	กลม ขอบเรียบ แบนราบ	+	รูปท่อน/-	<i>Lentilactobacillus fungorum</i>	98.98	OP941748
NV2203	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบมันวาว	+	รูปท่อน/-	<i>Lactobacillus casei</i>	99.13	OP941749
NV2204	กลม ขอบหยัก ผิวขรุขระด้าน	+	รูปท่อน/+	<i>Bacillus cereus</i>	90.60	OP941750
NV2206	กลม ขอบหยัก ผิวขรุขระด้าน	+	รูปท่อน/+	<i>Bacillus subtilis</i>	100	OP941751
NV2207	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบมันวาว	+	รูปท่อน/-	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.79	OP941752
NV2208	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบด้าน	+	รูปท่อน/-	<i>Lactobacillus farraginis</i>	99.36	OP941753
NV2209	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบ	+	รูปท่อน/-	<i>Lactobacillus farraginis</i>	99.82	OP941754
NV2210	กลม ขอบหยัก ผิวขรุขระด้าน	+	รูปท่อน/+	<i>Bacillus cereus*</i>	92.63	OP941755
NV2211	กลม ขอบหยัก ผิวขรุขระด้าน	+	รูปท่อน/+	<i>Bacillus cereus*</i>	90.22	OP941756
NV2212	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบมันวาว	+	รูปท่อน/-	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.93	OP941757
NV2213	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบมันวาว	+	รูปท่อน/-	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.93	OP941758
NV2214	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบมันวาว	+	รูปท่อน/-	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.86	OP941759
NV2216	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบมันวาว	+	รูปท่อน/-	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.72	OP941760
NV2218	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบมันวาว	+	รูปท่อน/-	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	99.78	OP941761
NV2219	กลม ขอบเรียบ ผิวเรียบด้าน	+	รูปท่อน/-	<i>Lactobacillus farraginis</i>	96.36	OP941762
NV2220	กลม ขอบเรียบ นูน	-	รูปท่อน/-	<i>Gorillibacterium</i> sp.	95.25	OP941763
NV2221	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก	+	รูปท่อน/+	<i>Paenibacillus</i> sp.*	98.35	OP941764
NV2223	กลม ขอบหยัก เย็ม	+	รูปท่อน/+	<i>Bacillus aryabhattai</i>	99.31	OP941765
NV2224	กลม นูน ผิวมันวาว	+	รูปท่อน/+	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	99.37	OP941766
NV2226	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก	+	รูปท่อน/+	<i>Bacillus</i> sp.	98.95	OP941767
NV2227	กลม ขอบหยัก ผิวเย็ม	+	รูปท่อน/+	<i>Bacillus megaterium</i>	99.74	OP941768
NV2228	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก	+	รูปท่อน/+	<i>Paenibacillus</i> sp.*	99.21	OP941769
NV2230	กลม นูน ผิวมันวาว	+	รูปท่อน/+	<i>Terribacillus</i> sp.	98.02	OP941770
NV2231	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก	+	รูปท่อน/+	<i>Paenibacillus illinoisensis*</i>	99.21	OP941771
NV2232	รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก	-	รูปท่อน/-	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	99.73	OP941772
NV2233	กลม นูน ผิวมันวาว	+	รูปท่อน/+	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	95.25	OP941773
NV2234	กลม ขอบหยัก เย็ม	+	รูปท่อน/+	<i>Bacillus aryabhattai</i>	99.91	OP941774
NV2235	กลม ขอบหยัก เย็ม	+	รูปท่อน/+	<i>Bacillus filamentosus</i>	99.09	OP941775
NV2236	กลม นูน ขอบเรียบ	-	รูปท่อน/-	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	99.47	OP941776

* แบคทีเรียก่อโรคตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องรายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต IAA และการละลายอินทรีย์ฟอสเฟต

แบคทีเรีย	การผลิต IAA	การละลายฟอสเฟต
<i>Lactobacillus casei</i> NV2203	++	+++
<i>Bacillus subtilis</i> NV2206	-	+
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> NV2207	++	-
<i>Bacillus cereus</i> NV2210*	+	-
<i>Bacillus cereus</i> NV2211*	+	-
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> NV2214	+	-
<i>Bacillus</i> sp. NV2226	++	-
<i>Terribacillus</i> sp. NV2230	+	-
<i>Terribacillus saccharophilus</i> NV2233	++	-

4.บทสรุป

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิต IAA และแบคทีเรียละลายอินทรีย์ฟอสเฟตจากน้ำหมักชีวภาพที่ใช้ ผงถั่วเหลืองผสมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นหัวเชื้อ พบแบคทีเรียผลิต IAA ที่ไม่ใช่แบคทีเรียก่อโรค ได้จำนวน 7 สายพันธุ์ และมีแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพ ได้แก่ *L. casei* NV2203 *L. rhamnosus* NV2207 *Bacillus* sp. NV2226 และ *T. saccharophilus* NV2233 แบคทีเรียเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตน้ำหมักชีวภาพให้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น

อ้างอิง

[1] P. Pindi and S. Satyanarayana, "Liquid microbial consortium- a potential tool for sustainable soil health", *Journal of Biofertilizers and Biopesticides*, 3(4), 2012, pp. 1-9.

[2] F. Ahmad, I. Ahmad, and M. Khan, "Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities", *Microbiological Research*, 163(2), pp. 173-181, 2008.

[3] ฌานิกา แซ่แง ซุกลิน, เอนก สาระอินทร์ และ สุนัย เคลือหลี, "ผลของน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาเหลือทิ้งด้วยเชื้อ *Lactobacillus casei* ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของผักกวางตุ้งฮ่องเต้", *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*, ฉบับที่ 14(1), 2565, หน้า 253-265.

[4] ศศิธร กู้สุวรรณวิจิตร, สุภารัตน์ ตริเพชรกุล และ แสงชัย เอกประทุมชัย, "การผลิตน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์:อิทธิพลของชนิดน้ำตาล" *วารสารวิจัยและพัฒนา มจร.*, ฉบับที่ 4, 2557, หน้า 447-466.

[5] H. Lu, Z. Wu, W. Wang, X. Xu and X. Liu. "Rs-198 Liquid biofertilizers affect microbial community diversity and enzyme activities and promote *Vitis vinifera* L. growth". *BioMedical Research International*, pp. 1-10, 2020.

[6] N.T.H. Nhu, N. L. Chuen and N. Riddech. "The effects bio-fertilizer and liquid organic fertilizer on the growth of vegetables in the pot experiment". *Chiang Mai Journal of Science*, 45(3), 2018, pp. 1257-1273.

[7] ณัฐภูมิ เพชรนวล, ปฐมาภรณ์ ทิลาภักษ์, พริยาภรณ์ อันอาดมงาม และ อมรรัตน์ สุวรรณโพธิ์ศรี, "ปุ๋ยชีวภาพจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกของพืช" *วารสารเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี*, ปีที่ 1 ฉบับที่ 3, 2563, หน้า 12-21.

[8] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura. MEGA X: Molecular evolutionary genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp. 1547-1549, 2018.

[9] S.A. Gordon and R.P. Weber, "Colorimetric estimation of indoleacetic acid", *Plant Physiology*, 26, 1951, pp. 192-195.

[10] R.E. Pikovsakaya, "Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species", *Microbiologia*. 17,1948 , pp. 362-370.

[11] S. Zaidi, S. Usmani, B.R. Singh and J. Musarrat. "Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*". *Chemosphere*, 64(6), pp. 991-997, 2006.

[12] สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, "น้ำหมักชีวภาพกับงานด้านการเกษตร" *วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้*, ฉบับที่ 3(1), 2552, หน้า 59-65.

[13] R. Hayat, S. Ali, U. Amara, R. Khalid and I. Ahmed, "Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review, *Annual Microbiology*, 60, 2010, pp. 579-598.

[14] S. Anupama, K. Beom Seok and P. Duck Hwan.
 “Biological control of bacterial spot disease
 and plant growth-promoting effects of lactic
 acid bacteria on pepper”. *Biocontrol Science
 and Technology*, 24(7), 2014, pp. 763–779.