



การคัดกรองและการประเมินประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียเพื่อการส่งเสริมการ
เจริญเติบโตของข้าวไร่ในระดับโรงเรียน



คำมูล คำสุข

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การคัดกรองและการประเมินประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียเพื่อการส่งเสริมการ
เจริญเติบโตของข้าวไร้ในระดับโรงเรียน



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การคัดกรองและการประเมินประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียเพื่อการส่งเสริมการ
เจริญเติบโตของข้าวไร่ในระดับโรงเรียน"

ของ คำมูล คำสุข

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มธุรส ชัยหาญ)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จวงจันทร์ จำปาทอง)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิสาข์ ปั่นศักดิ์)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.อนุพงศ์ วงศ์ดามี)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐนิตา บุญสร้างสม)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การคัดกรองและการประเมินประสิทธิภาพของไรโซแบคทีเรียเพื่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ในระดับโรงเรียน
ผู้วิจัย	คำมุล คำสุข
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จวงจันทร์ จำปาทอง
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิสาข์ ปั่นศักดิ์ ดร.อนุพงศ์ วงศ์ตามี
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร, มหาวิทยาลัย นเรศวร, 2565
คำสำคัญ	แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา, ฤทธิ์ต้าน แบคทีเรีย, สารไลโปเปปไทด์, ข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากรากและดินบริเวณรอบรากของข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ จากการศึกษาพบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 315 ไอโซเลต เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิต IAA และกิจกรรมการละลายพอสเฟตพบว่า ไอโซเลต KK074 สามารถผลิต IAA ได้สูงที่สุดได้เท่ากับ 362.59 ± 28.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ศึกษา ไอโซเลต KK007 สามารถละลายพอสเฟตสูงที่สุดได้เท่ากับ 714.25 ± 12.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี dual culture พบว่าไอโซเลต KK024 และ KK281 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Curvularia lunata* ได้ มีค่าเท่ากับ 58.23 ± 0.82 และ 57.91 ± 0.42 ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลต KK269 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สูงที่สุด เท่ากับ 56.01 ± 3.14 จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดไลโปเปปไทด์จากไอโซเลต KK281 ด้วยวิธี paper disc diffusion method พบว่ามีบริเวณวงใสยับยั้งเชื้อรา *C. lunata* มากที่สุดเท่ากับ 39.93 ± 2.14 มิลลิเมตร และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) พบว่า มีค่าเท่ากับ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ด้วย QTOF LC/MS/MS พบว่าสารสกัดไลโปเปปไทด์ ดังกล่าวคือ สาร surfactin A เมื่อนำไอโซเลต KK018 และ KK275 ไปทดสอบการพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates โดยการแช่เมล็ดข้าวในสารแขวนลอยของไอโซเลต KK018 และ KK275 โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า การงอกของเมล็ดข้าว ความยาวรากต้นอ่อน และความสูงต้นอ่อนในทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ

ข้าวไร้สึมฝั้วเพชรบูรณ์ในระดับโรงเรีอน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) พบว่า กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลต KK018 และ KK275 ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนำแบคทีเรียไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่า สามารถระบุจีโนมของแบคทีเรียได้ดังนี้ คือจีโนม *Bacillus* (ไอโซเลต KK281), จีโนม *Priestia* (ไอโซเลต KK018), จีโนม *Enterobacter* (ไอโซเลต KK066), จีโนม *Pantoea* (ไอโซเลต KK007 และ KK269) และจีโนม *Acinetobacter* (ไอโซเลต KK138) จากการศึกษาี้แสดงให้้เห็นว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากรากและดินบริเวณรอบรากของข้าวไร้สึมฝั้วเพชรบูรณ์มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับโรงเรีอน โดยผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นแนวทางในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพอื่นๆ ก่อนนำไปทดสอบในระดับแปลงปลูกต่อไป

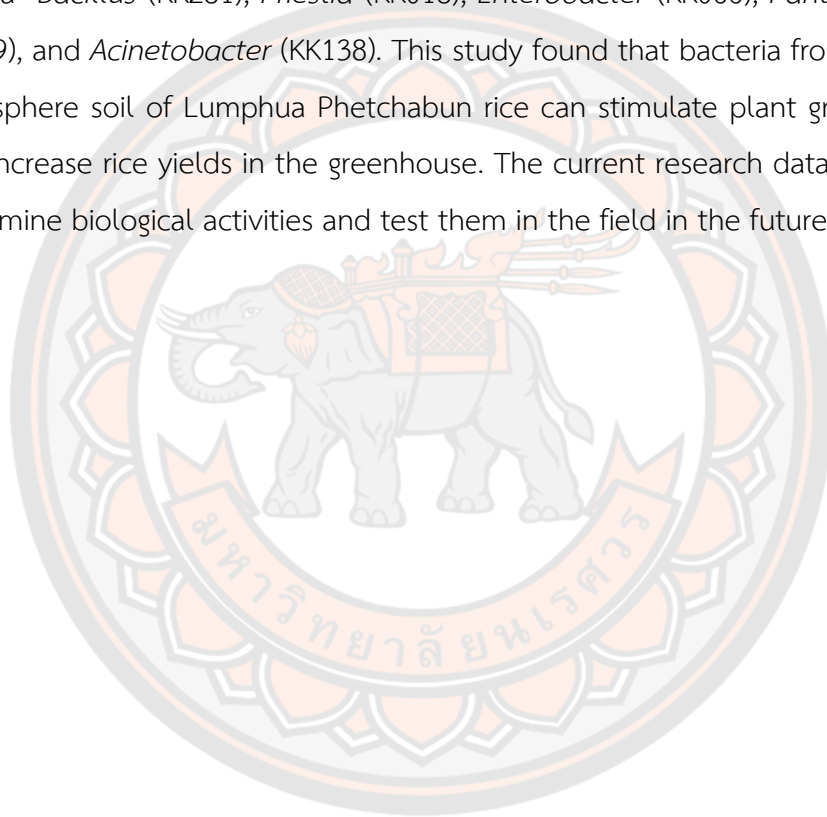


Title	SCREENING AND EFFICIENCY ASSESSMENT OF RHIZOBACTERIA FOR GROWTH ENHANCEMENT OF UPLAND RICE IN GREENHOUSE CULTIVATION
Author	Khammool Khamsuk
Advisor	Assistant Professor Juangjun Jumpathong, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Wanwisa Pansak, Dr. Anupong Wongtamee, Ph.D.
Academic Paper	M.S. Thesis in Agricultural Biotechnology, Naresuan University, 2022
Keywords	Plant growth promoting-bacteria, antifungal activity, antibacterial activity, lipopeptide, Rice

ABSTRACT

This research aimed to isolate and screen for plant growth-promoting bacteria from the roots and rhizosphere soil of Lumphua Phetchabun rice. A total of three hundred and fifteen isolates of bacteria were obtained from this study. The IAA production capacity and phosphate solubility activity were studied. Evaluation of Indole-3-acetic acid (IAA) indicated that KK074 exhibited the highest amount of IAA (362.59 ± 28.62 $\mu\text{g/ml}$). Among 315 isolates, KK007 could solubilize tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) at 714.25 ± 12.14 $\mu\text{g/ml}$. The dual culture assay showed that KK024 and KK281 had high inhibition percentages against *Curvularia lunata* at 58.23 ± 0.82 and 57.91 ± 0.42 , respectively. In contrast, the KK269 isolate had the highest inhibition percentage of *Bipolaris oryzae*, 56.01 ± 3.14 . This study determined the antimicrobial activity using the disc diffusion method. It found that a lipopeptide extract from KK281 inhibited the growth of *C. lunata* with an inhibition zone of 39.93 ± 2.14 mm. Moreover, the result showed the minimum inhibitory concentration (MIC) of lipopeptide extract from KK281 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) was 3.125 mg/ml. The lipopeptide mentioned above extract was identified as surfactin A by LC-MS/MS-quadrupole time of flight (QTOF) analysis. Koch's postulates were conducted by soaking rice seeds in bacterial suspension (KK018, KK275) at a concentration of 10^8

CFU/ml for 24 hrs. According to the results, there were no statistically significant differences between soaking rice seeds in KK018, KK275 and sterilized distilled water (control) for seed germination, root length, or shoot height. The experiment was conducted at the greenhouse level using a Completely Randomized Design (CRD). The results revealed that KK018 and KK275 had no statistically significant effects on observed growth and yield. According to employing the EzBioCloud program to analyze the 16S rRNA gene sequence, the results showed that they belonged to the genera *Bacillus* (KK281), *Priestia* (KK018), *Enterobacter* (KK066), *Pantoea* (KK007 and KK269), and *Acinetobacter* (KK138). This study found that bacteria from the roots and rhizosphere soil of Lumphua Phetchabun rice can stimulate plant growth in the lab and increase rice yields in the greenhouse. The current research data will be used to determine biological activities and test them in the field in the future.



ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จวงจันทร์ จำปาทอง ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิสาข์ ปั่นศักดิ์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อนุพงศ์ วงศ์ตามี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐนิตา บุญสร้างสม กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มธุรส ชัยหาญประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

กราบขอบพระคุณทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้โครงการ “พัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.)” รหัสโครงการวิจัย “6122015” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภททุนผู้ช่วยวิจัย ระดับปริญญาโทเพื่ออุตสาหกรรมและวิสาหกิจชุมชนท่องเที่ยวเชิงเกษตรเขาถั่วซึ่งเป็นผู้ร่วมให้ทุน

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ

คำมุล คำสุข

สารบัญ

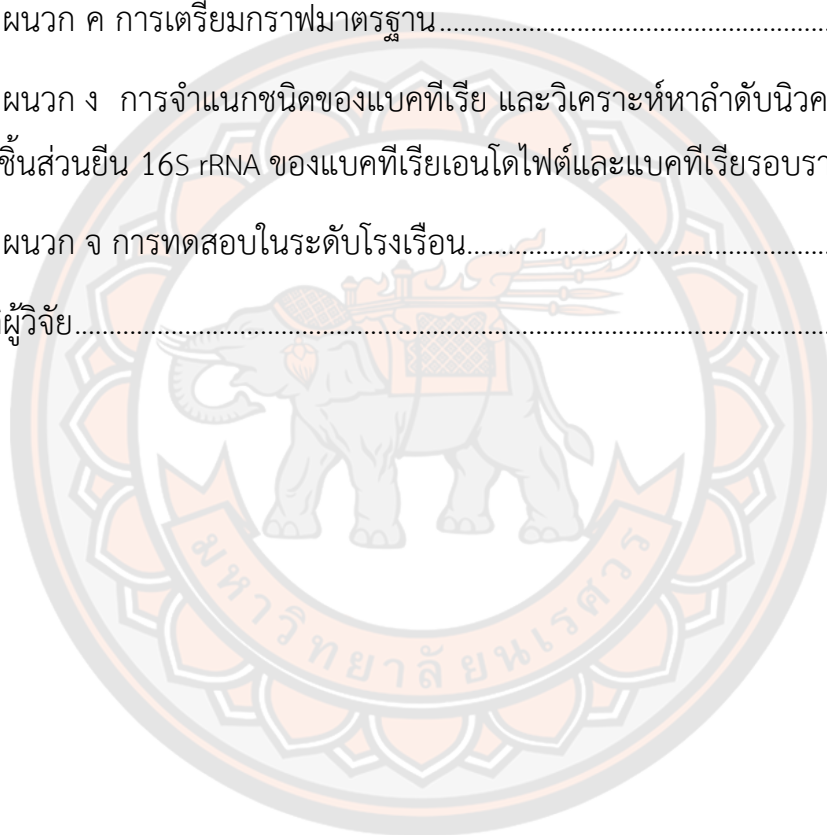
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของปัญหา.....	1
1.2 จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
1.5 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ข้าว (Rice).....	5
2.1.1 ข้าวไร่สีมั่วเพชรบูรณ์.....	5
2.1.2 ลักษณะประจำพันธุ์.....	6
2.1.3 การเพาะปลูกและการเก็บเกี่ยว.....	7
2.1.4 โรคทั่วไปของข้าว.....	7
2.1.4.1 โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown Spot Disease).....	7

2.1.4.2 โรคเมล็ดต่างในข้าว (Dirty Panicle Disease).....	8
2.1.4.3 โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight disease)	8
2.1.5 การควบคุมและป้องกัน	8
2.1.5.1 การควบคุมและป้องกันโดยใช้สารเคมี.....	8
2.1.5.2 การควบคุมและป้องกันโดยวิธีชีวภาพ	9
2.2 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria).....	9
2.2.1 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ (endophytic bacteria)	9
2.2.2 แบคทีเรียรอบราก (Rhizosphere bacteria)	11
2.3 บทบาทของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบราก	12
2.3.1 แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในการละลายฟอสเฟต	12
2.3.2 แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อการผลิต indole-3-acetic acid (IAA)	14
2.3.3 แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรค....	15
2.3.4 วิธีการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช	16
2.3.4.1 การคลุกเมล็ด	17
2.3.4.2 การเติมหัวเชื้อลงในดิน	17
2.3.4.3 การพ่นบนใบพืชหรือการฉีดพ่น	17
2.3.4.4 การผสมกับวัสดุปลูกหรือปุ๋ยอินทรีย์	17
2.3.4.5 การจุ่มหรือการใส่ลงบนส่วนขยายพันธุ์หรือกล้าพืชก่อนการย้ายปลูก	17
2.4 สารกลุ่มไลโปเปปไทด์ (lipopeptides).....	17

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	20
3.1 กลุ่มตัวอย่าง	20
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	20
เครื่องมือ.....	20
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	20
อุปกรณ์เครื่องแก้ว	21
สารเคมี	21
อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	22
3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ และแบคทีเรียรอบรากจากข้าวไร่ล้มฝัวเพชรบูรณ์	22
3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการผลิต indole-3-acetic acid (IAA).....	23
3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง	23
3.6 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว.....	24
3.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay	24
3.8 การผลิตไลโปเปปไทด์จากแบคทีเรียสกุลไอโซเลต KK281 เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช	25
3.9 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี paper disc diffusion method.....	26
3.10 การวิเคราะห์สารไลโปเปปไทด์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).....	28
3.11 การพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates.....	28
3.12 การตรวจนับปริมาณของแบคทีเรีย (Colony Forming Unit; CFU)	29
3.13 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบราก	29

3.14 การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ล้มผั่วเพชรบูรณ์ ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในระดับโรงเรือน	30
3.15 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล.....	33
บทที่ 4 ผลการวิจัย	34
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียรอบรากและแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากและดินบริเวณรอบ รากต้นข้าวไร่ล้มผั่วเพชรบูรณ์.....	34
4.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการผลิต indole-3-acetic acid (IAA).....	35
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งและ ในอาหารเหลว	36
4.4 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Dual culture bioassay.....	38
4.5 การผลิตไลโปเปปไทด์จากแบคทีเรียไอโซเลต KK281 เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค พืช.....	43
4.6 การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) analysis of lipopeptides.....	46
4.7 การพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates	47
4.8 การตรวจนับปริมาณของแบคทีเรีย (Colony Forming Unit; CFU).....	48
4.9 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบราก	48
4.10 การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ล้มผั่วเพชรบูรณ์ ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในระดับโรงเรือน	54
บทที่ 5 บทสรุป.....	60
5.1 สรุปผลการวิจัย	60
5.2 อภิปรายผล	62

5.3 ข้อเสนอแนะ.....	66
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก.....	82
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	83
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....	85
ภาคผนวก ค การเตรียมกราฟมาตรฐาน.....	88
ภาคผนวก ง การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากเพิ่มเติม	92
ภาคผนวก จ การทดสอบในระดับโรงเรียน.....	94
ประวัติผู้วิจัย.....	101



สารบัญตาราง

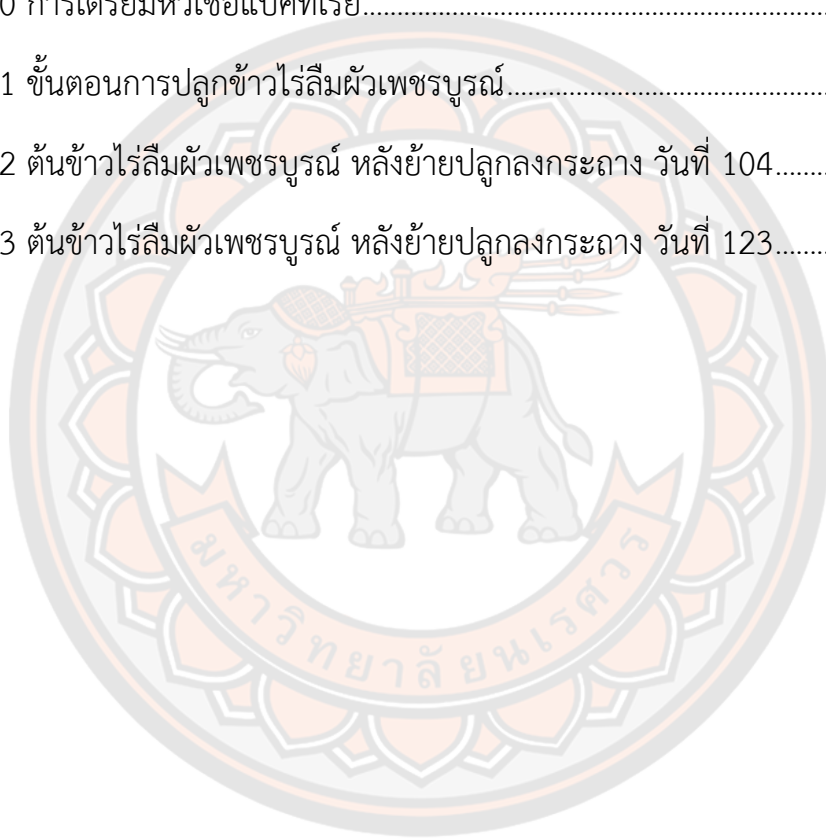
	หน้า
ตาราง 1 กรรมวิธีในการทดลอง (ใช้ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 5 กิโลกรัมต่อไร่).....	31
ตาราง 2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการผลิต IAA จากอาหาร YM ที่มี การเติม L-tryptophan.....	35
ตาราง 3 ผลการทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และ แบคทีเรียรอบรากเป็นเวลา 3 และ 7 วัน.....	36
ตาราง 4 ผลการทดสอบการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และ แบคทีเรียรอบราก.....	37
ตาราง 5 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Curvularia lunata</i> โดยวิธี dual culture bioassay	39
ตาราง 6 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Bipolaris oryzae</i> โดยวิธี dual culture bioassay	41
ตาราง 7 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสยับยั้งเชื้อรา <i>Curvularia lunata</i> ของสารสกัด ไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี paper disc diffusion method ที่ 96 ชั่วโมง.....	43
ตาราง 8 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสยับยั้งแบคทีเรีย <i>Xoo</i> ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี paper disc diffusion method ที่ 72 ชั่วโมง และผลความเข้มข้นของสารใน ระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC).....	45
ตาราง 9 เพอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าว ความยาวราก และความสูงของต้นอ่อน หลังจากการทดสอบ 7 และ 14 วัน.....	47
ตาราง 10 การตรวจนับปริมาณของแบคทีเรีย.....	48
ตาราง 11 ลักษณะรูปร่างโคโลนี และลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย.....	49

ตาราง 12 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับ ฐานข้อมูล EzBioCloud.....	50
ตาราง 13 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลต KK018 ด้วยชุดทดสอบ API 50CH.....	52
ตาราง 14 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลต KK275 ด้วยชุดทดสอบ API 50CH.....	53
ตาราง 15 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อความสูงของข้าวไร่ ลี้มฝัวเพชรบูรณ์.....	55
ตาราง 16 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อจำนวนหน่อตอก ของข้าวไร่ลี้มฝัวเพชรบูรณ์.....	56
ตาราง 17 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อพื้นที่ใบและจำนวน ใบของข้าวไร่ลี้มฝัวเพชรบูรณ์.....	57
ตาราง 18 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อผลผลิตของข้าวไร่ ลี้มฝัวเพชรบูรณ์.....	58
ตาราง 19 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อน้ำหนักสดและ น้ำหนักแห้งของข้าวไร่ลี้มฝัวเพชรบูรณ์.....	59
ตาราง 20 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA.....	88
ตาราง 21 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน KH_2PO_4	90
ตาราง 22 ลักษณะรูปร่างโคโลนี และลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มเติม.....	93

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ลักษณะของข้าวไร้ลี้มฝั้ว	6
ภาพ 2 แสดงการเข้าสู่รากของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ	9
ภาพ 3 แสดงบริเวณแบคทีเรียรอบรากในส่วนต่างๆ ของข้าว	11
ภาพ 4 แผนภาพแสดงความสำคัญของจุลินทรีย์ในการละลายฟอสเฟต	13
ภาพ 5 โครงสร้างโมเลกุลของกรดอินโดล-3-แอซีติก	14
ภาพ 6 แสดงโครงสร้างของสาร surfactin ที่มีจำนวน C เท่ากับ 15 อะตอม	18
ภาพ 7 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดและการทำไลโปเปปไทด์ให้บริสุทธิ์	26
ภาพ 8 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบในระดับโรงเรือน	32
ภาพ 9 ผลการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากรากและดินบริเวณรอบรากข้าวไร้ลี้มฝั้วเพชรบูรณ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	34
ภาพ 10 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>C. lunata</i>	40
ภาพ 11 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>B. oryzae</i>	42
ภาพ 12 แสดงบริเวณวงใสยับยั้งเชื้อรา <i>C. lunata</i> ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี Paper disc diffusion method ที่ 96 ชั่วโมง	44
ภาพ 13 แสดงบริเวณวงใสยับยั้งแบคทีเรีย <i>Xoo</i> ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี Paper disc diffusion method ที่ 72 ชั่วโมง	45
ภาพ 14 แสดงการแตกตัวของอนุพันธ์ของสารที่วิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS	46
ภาพ 15 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต KK281 สร้างด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) โดยกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 replications	51

ภาพ 16 แสดงกราฟมาตรฐานของ IAA เลี้ยงในอาหาร YM ที่มีการเติม L-tryptophan ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร.....	89
ภาพ 17 แสดงกราฟมาตรฐานของ KH_2PO_4 ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร	91
ภาพ 18 การเตรียมดินปลูก	95
ภาพ 19 การฆ่าเชื้อเมล็ดข้าว.....	95
ภาพ 20 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย.....	96
ภาพ 21 ขั้นตอนการปลูกข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์.....	97
ภาพ 22 ต้นข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 104.....	98
ภาพ 23 ต้นข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 123.....	99



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของปัญหา

สืบเนื่องจากยุทธศาสตร์การวิจัยแห่งชาติและนวัตกรรม 20 ปีให้ความสำคัญในการสร้างศักยภาพและความสามารถในการพัฒนาทางเศรษฐกิจที่สอดคล้องกับแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ โดยมีหลักการมุ่งเน้นในกลุ่มพืชไร่ที่เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรม ลดต้นทุนแรงงาน และปัจจัยการผลิต พัฒนาวิสาหกิจให้สามารถสร้างหรือใช้เทคโนโลยีในการเพิ่มมูลค่าสินค้าทางการเกษตรจากการแปรรูป มีความปลอดภัย และการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่าด้วยการวิจัยต้นแบบสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจลักษณะพิเศษ ได้แก่ ทนแล้ง รสชาติดี เก็บรักษาได้ยาวนานเหมาะกับการขนส่ง และมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีมูลค่าสูง ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าเป็นสินค้าหลักของประเทศ อีกทั้งเป็นแนวทางการพัฒนาการผลิตพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศ ข้าวไทยจัดเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นหนึ่งในข้าวที่มีคุณภาพที่ดีที่สุดของโลก ประชากรมากกว่าครึ่งโลกบริโภคข้าวเป็นหลักและข้าวยังสามารถเป็นสินค้าส่งออกเพื่อสร้างมูลค่าให้กับประเทศ ในปี 2557–2561 ปริมาณและมูลค่าส่งออกข้าวในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.83 และร้อยละ 1.19 ต่อปี ตามลำดับ เนื่องจากต่างประเทศยังคงมีความต้องการข้าวคุณภาพดีจากไทยอย่างต่อเนื่อง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562)

ในช่วงเวลาที่ผ่านมา อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ได้รับการส่งเสริมให้เป็นแหล่งท่องเที่ยวเชิงเกษตรที่สำคัญในเขตภาคเหนือตอนล่างมีพืชผลหลายชนิดได้รับการส่งเสริมให้ปลูกในพื้นที่ดังกล่าวเพื่อดึงดูดสนใจให้นักท่องเที่ยวและผู้สนใจบริโภคช่วยกระตุ้นเศรษฐกิจท้องถิ่น โดยเฉพาะข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์เป็นตลาดข้าวเฉพาะกลุ่มซึ่งได้รับการจดทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (GI) และเป็นข้าวไร่ที่สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร โดยนางอัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ นักวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก กรมการข้าวรายงานว่ ข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์เป็นข้าวนาปีพื้นเมืองปลูกในสภาพไร่บนภูเขาที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 400-800 เมตร เป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ มีกลิ่นหอม และรสชาติอร่อยสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย แต่การปลูกข้าวในสภาพที่ดอนหรือพื้นที่ตามไหล่เขาในอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ มักจะประสบกับปัญหาสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ แสง น้ำท่วม โลหะหนัก รังสี ความเค็ม รวมทั้งโรคพืช วัชพืช และแมลงศัตรูพืชที่ทำให้ผลผลิตของข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์ลดลง อีกทั้งปัจจัยด้านธาตุอาหารพืช และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้านอื่นๆ มีความสำคัญเช่นเดียวกันสำหรับการผลิตข้าวเพื่อให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น

จุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับพืชมีความสำคัญ เนื่องจากมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช (Endophytic bacteria) และบริเวณรอบรากพืช (Rhizosphere bacteria) โดยมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม ได้แก่ การผลิตฮอร์โมนออกซิน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญของพืช การละลายธาตุอาหารให้แก่พืชช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ประโยชน์จากฟอสฟอรัสในดิน และการเป็นปฏิปักษ์โดยตรงกับเชื้อสาเหตุโรคพืช รวมถึงการช่วยให้พืชสร้างภูมิคุ้มกันต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม (Kloepper and Schroth, 1978; Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006; Ma et al., 2016; Santoyo et al., 2016; Afzal et al., 2019) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยก และคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากรากและดินบริเวณรอบรากข้าวไร่ล้มหัวเพชรบูรณ์ที่มีความสามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อเพิ่มผลผลิตของข้าวไร่ล้มหัวเพชรบูรณ์ และเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตของข้าวแบบยั่งยืนจนนำไปสู่การพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ผู้ผลิตและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งสามารถเป็นต้นแบบให้แก่สมาชิกวิสาหกิจชุมชนท่องเที่ยวเชิงเกษตรเขาค้อ

1.2 จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากข้าวไร่ล้มหัวเพชรบูรณ์
2. เพื่อคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ล้มหัวเพชรบูรณ์
3. เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคข้าว
4. เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ล้มหัวเพชรบูรณ์ และมีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคข้าว
5. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อการเจริญเติบโตของข้าวไร่ล้มหัวเพชรบูรณ์ในระดับโรงเรือน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษานี้ทำการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากรากและดินบริเวณรอบรากข้าวไร่ล้มหัวเพชรบูรณ์ ทำการคัดกรองและจำแนกชนิดของแบคทีเรียดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ล้มหัวเพชรบูรณ์ และมีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคข้าว ต่อมาศึกษาการผลิตไลโปเปปไทด์จากแบคทีเรียไอโซเลต KK281 เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุ

โรคพืช และวิเคราะห์สารสกัดหยาบไลโปเปปไทด์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) จากนั้นศึกษาการพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates และทดสอบหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวพันธุ์ลิ้มผิวเพชรบูรณ์ในระดับโรงเรือน

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. แบคทีเรียเอนโดไฟต์ (Endophytic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช และให้ประโยชน์แก่พืชอาศัย โดยไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคแก่พืช (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998)
2. แบคทีเรียรอบราก (Rhizosphere bacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชมีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตกับพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม (Kloepper and Schroth, 1978)
3. แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria) เป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีลักษณะสำคัญต่อพืชหลายรูปแบบ เช่น การครอบครองรากพืช การอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยและเพิ่มจำนวนรากพืช และสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถละลายธาตุอาหาร เช่น ฟอสฟอรัส สังกะสี และเหล็ก ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย (Glick, 2012)
4. ปุ๋ยชีวภาพ (Bio-fertilizer) เป็นสารที่มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถสร้างธาตุอาหารหรือช่วยให้ธาตุอาหารเป็นประโยชน์กับพืชมาใช้ในการปรับปรุงบำรุงดินทางชีวภาพ ทางกายภาพ และชีวเคมีและให้ความหมายรวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเมื่อใช้คลุกกับเมล็ดพืชและดินหรือต้นพืช จุลินทรีย์จะไปอาศัยอยู่บริเวณรากพืชหรือในต้นพืช ซึ่งช่วยเพิ่มธาตุอาหารให้กับพืชจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ และการทำให้ฟอสเฟตในดินละลายน้ำได้เพิ่มขึ้นหรือกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (ปัทมา วิทยากร, 2557)

1.5 สมมติฐานของการวิจัย

1. สามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากข้าวไร่ลิ้มผิวเพชรบูรณ์ได้
2. แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่แยกได้จากข้าวไร่ลิ้มผิวเพชรบูรณ์มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ลิ้มผิวเพชรบูรณ์
3. แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่แยกได้จากข้าวไร่ลิ้มผิวเพชรบูรณ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้

4. สามารถจำแนกและระบุชนิดของแบริเออร์ที่เรียเอนโดไฟต์และแบริเออร์ที่เรียรอบรากที่แยกได้จากข้าวไร่สืมฝั้วเพชรบูรณ์ได้
5. แบริเออร์ที่เรียเอนโดไฟต์และแบริเออร์ที่เรียรอบรากที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่สืมฝั้วเพชรบูรณ์ในระดับโรงเรือน



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว (Rice)

ข้าวมี่ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae และสกุล *Oryza* เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมีความหลากหลายทางชีวภาพสามารถปลูกขึ้นได้ง่ายและมีความทนทานต่อทุกสภาพภูมิประเทศ อีกทั้งยังเป็นพืชอาหารหลักของโลก โดยเฉพาะชาวเอเชียบริโภคมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2560) ในประเทศไทยมีการปลูกพันธุ์ข้าวที่หลากหลายแตกต่างกันตามสภาพภูมิศาสตร์ วัฒนธรรม เศรษฐกิจ และวิถีชีวิตของสังคมในพื้นที่นั้นๆ ปัจจุบันความหลากหลายของพันธุ์ข้าวได้ลดลงเป็นอย่างมาก โดยมีสาเหตุจากความเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและโรคพืชส่งผลให้ข้าวมีผลผลิตต่ำและขาดทุน โดยข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ได้รับความสนใจและนิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายในอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์คือ ข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์ ซึ่งเป็นข้าวสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์หรือข้าวจีไอ (geographical indication: GI) ที่ผลิตโดยชุมชนจะอาศัยลักษณะเฉพาะของพื้นที่และได้ขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ตามพระราชบัญญัติคุ้มครองสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ พ.ศ. 2546 ภายใต้การดูแลของกรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ และกรมการข้าว (ทานตะวัน วรธนะวลัญช์, 2556) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มผลผลิตและการป้องกันโรคข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและควรอนุรักษ์ไว้ต่อไป

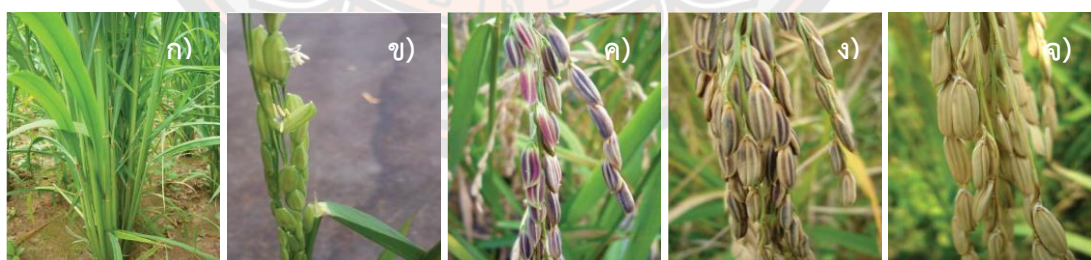
2.1.1 ข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์

ข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์เป็นข้าวนาปีพื้นเมือง ไร่ต่อช่วงแสง ปลูกในสภาพไร่บนภูเขาที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 400-800 เมตรของจังหวัดเพชรบูรณ์เป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำหรือที่เรียกกันว่า “ข้าวเหนียวดำ” มีกลิ่นหอม รสชาติอร่อย เมื่อเคี้ยวจะรู้สึกมันและนุ่มแบบหนุบๆ รสชาติอร่อย สามารถนำมาแปรรูปเป็นอาหารและผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย เช่น ขนมคุกกี้อาหารเสริม ข้าวเหนียวหมูปิ้ง ข้าวเหนียวมูน เครื่องดื่มเย็นๆ และสาโท เป็นต้น ซึ่งสามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรได้ อีกทั้งยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ แอนโทไซยานินและแกมมาออโรซานอล คุณค่าของข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์สัมพันธ์กับสภาพของพื้นที่ของจังหวัด เนื่องจากพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่สูง มีภูเขาสลับกับแอ่งน้ำและดินมีความสมบูรณ์ ทำให้ข้าวที่ปลูกในพื้นที่นี้มีคุณค่าทางโภชนาการ สำนักรวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าวกล่าวว่า นักวิจัยพบข้าวชนิดนี้ครั้งแรกโดยการปลูกของกลุ่มชาวม้ง บ้านรวมไทยพัฒนาที่ 3 ตำบลรวมไทยพัฒนา อำเภอพบพระ จังหวัดตากปลูกใน

สภาพไร่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 650 เมตร อยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า “เบิ้ลฉิ่ง” หรือกลุ่มข้าวเหนียวดำ ซึ่งมีหลายชาติพันธุ์และปลูกเพียงเพื่อใช้ทำขนมพิเศษเนื่องในโอกาสปีใหม่ ต่อมาในปี 2533 มีกลุ่มชาวม้ง จังหวัดพิษณุโลก นำเมล็ดพันธุ์มาปลูกบริเวณรอยต่อระหว่างอำเภอ นครไทยและอำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก และได้มีการคัดเลือกพันธุ์ให้บริสุทธิ์ระหว่างปี พ.ศ. 2534-2538 แต่ด้วยวิธีการปลูกแบบชาวเขาที่มักปลูกข้าวหลายพันธุ์ใกล้กันหรือปลูกด้วยกัน ทำให้มีเมล็ดพันธุ์ของข้าวพันธุ์อื่นปะปนอยู่มาก ในปี 2550 ทีมวิจัยของศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกและศูนย์วิจัยข้าวแพร่จึงได้ทำการคัดเลือกพันธุ์บริสุทธิ์อีกครั้งจนได้พันธุ์ข้าวเหนียวลิ้มผิวบริสุทธิ์และคณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ข้าว กรมการข้าวมีมติรับรองพันธุ์ ในวันที่ 9 มีนาคม 2555 (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2555)

2.1.2 ลักษณะประจำพันธุ์

ข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์เป็นข้าวไร้ลิ้มผิวที่ใช้พันธุ์ข้าวเหนียวดำพันธุ์ลิ้มผิวปลูกเป็นข้าวไร้เฉพาะฤดูนาปี เก็บเกี่ยวประมาณกลางเดือนตุลาคม ลักษณะทรงกอตั้ง ต้นแข็ง ไม่ล้มง่าย กลีบดอกระยะออกทรง 50 เปอร์เซ็นต์ มีสีเขียวอ่อน เมื่อถึงระยะน้ำนมกลีบดอกจะเปลี่ยนสีเป็นแถบสีม่วงบนพื้นสีเขียวอ่อน ต่อมาเมื่อเข้าสู่ระยะแบ่งสีกลีบดอกจะเปลี่ยนเป็นสีฟางแถบม่วงดำและเมื่อข้าวระยะสุกแก่เปลือกเมล็ดเปลี่ยนเป็นสีฟางแถบดำมีความสูงเฉลี่ย 151 เซนติเมตรและมีระยะพักตัว 5 สัปดาห์ ลักษณะเด่น คือ สีเมล็ดจะดำเป็นเงาและมีคุณค่าทางโภชนาการที่เด่นเป็นพิเศษ (ภาพ 1) มีรายงานว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและสีม่วงเข้มมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีปกติ (Suttajit et al., 2006; สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2555)



ภาพ 1 ลักษณะของข้าวไร้ลิ้มผิว

ก) ลักษณะทรงกอตั้ง ข) ระยะออกทรง ค) ระยะน้ำนม ง) ระยะแบ่งสี ข) ระยะสุกแก่

ที่มา: อภิชาติ เนินพลับ และคณะ, 2559

2.1.3 การเพาะปลูกและการเก็บเกี่ยว

พื้นที่ปลูกข้าวไร่ลุ่มน้ำเพชรบูรณ์ที่เหมาะสมคือ สภาพไร่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินดีที่ระดับความสูง 400-800 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง พื้นที่ควรเป็นที่โล่งและมีลมพัดผ่านได้ มีอุณหภูมิเฉลี่ยระหว่างฤดูปลูกไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส ลักษณะดินที่ใช้ปลูกควรเป็นดินร่วนซุยหรือดินร่วนเหนียว ความเป็นกรด-ด่างของดินอยู่ระหว่าง 4.4-6.4 ซึ่งคุณสมบัติของดิน ได้แก่ ค่า pH เนื้อดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ แร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ ธาตุไนโตรเจน (N) ธาตุฟอสฟอรัส (P) และธาตุโพแทสเซียม (K) จะแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่เพาะปลูก และการปลูกข้าวพันธุ์นี้จะปลูกในฤดูนาปีได้ปีละครั้ง การเก็บเกี่ยวหลังออกดอก 50 เปอร์เซ็นต์ได้ประมาณ 30 วัน จะสังเกตได้ว่าเมล็ดข้าวที่ได้จะเป็นสีฟางซีดดำหรือสีฟางทั้งเมล็ด ต่อมาทำการตากเพื่อลดความชื้นให้เหลือประมาณ 12-14 เปอร์เซ็นต์ ถ้าต้องการคงสภาพสารที่มีประโยชน์มากที่สุดและนานที่สุดและถ้าต้องการใช้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพควรเก็บในห้อยเย็น (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2555)

2.1.4 โรคทั่วไปของข้าว

เนื่องจากข้าวไร่ลุ่มน้ำเพชรบูรณ์เป็นข้าวที่มีกลิ่นหอมและอ่อนแอต่อโรค ด้วยเหตุนี้จึงไม่ควรปลูกในพื้นที่ราบลุ่ม เพราะอาจทำให้เกิดการระบาดของโรคได้ง่าย ซึ่งในการระบาดของโรคสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นข้าว โดยโรคที่พบในข้าวส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อราและแบคทีเรีย โรคจากเชื้อรา ได้แก่ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคเมล็ดดำในข้าว และโรคไหม้ข้าว ส่วนโรคจากแบคทีเรีย ได้แก่ โรคขอบใบแห้ง และโรคใบขีดโปร่งแสง

2.1.4.1 โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown Spot Disease)

โรคใบจุดสีน้ำตาลมีความสำคัญอย่างยิ่งในหลายประเทศและได้รับรายงานว่าจะก่อให้เกิดการสูญเสียผลผลิตของเมล็ดพืชมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสาเหตุจากเชื้อรา *Bipolaris oryzae* ซึ่งมีการระบาดขึ้นในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี 1900 และมีรายงานการเกิดโรคนี้นี้ในทุกประเทศที่ปลูกข้าว ได้แก่ ญี่ปุ่น จีน พม่า ศรีลังกา บังกลาเทศ อิหร่าน แอฟริกาอเมริกาใต้ รัสเซีย อเมริกาเหนือ ฟิลิปปินส์ ซาอุดีอาระเบีย ออสเตรเลีย มาเลเซีย และไทย (Ghose et al., 1960; Ou, 1985; Khalili et al., 2012) เชื้อราจะเข้าทำลายตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจนถึงระยะน้ำนม ซึ่งสปอร์ของเชื้อราสามารถปลิวไปกับลมและติดไปกับเมล็ด โดยแผลที่ใบข้าวจะมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กเป็นวงกลมถึงวงรี ซึ่งต้นกล้าที่ติดเชื้อจะแคระแกรนหรือตาย อีกทั้งแผลยังสามารถเกิดบนเมล็ดข้าวเปลือกหรือที่เรียกว่า โรคเมล็ดดำทำให้เมล็ดข้าวเปลือกเกิดสีดำและเสื่อมคุณภาพและเมื่อนำไปสีข้าวสารจะหักง่าย (Elazegui and Islam, 2003; Sunder et al., 2014)

2.1.4.2 โรคเมล็ดต่างในข้าว (Dirty Panicle Disease)

โรคเมล็ดต่างในข้าวเป็นโรคที่มีความรุนแรงและส่งผลต่อความสูญเสียทางเศรษฐกิจของพื้นที่ผลิตข้าวในประเทศไทย โดยเกิดจากเชื้อราหลายชนิด ซึ่งเชื้อรา *Curvularia lunata* (Wakk) Boed เป็นหนึ่งในเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างในข้าวที่พบในประเทศไทย โรคนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการทำลายเมล็ดข้าวและทำให้ผลผลิตเสียหายทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณถึงร้อยละ 80 เปอร์เซนต์ (Dethoup et al., 2018) มีรายงานโรคเมล็ดต่างในข้าวในหลายประเทศที่ข้าวเป็นพืชผลหลัก เช่น อินเดีย ปากีสถาน และบราซิล (Arshad et al., 2009; Prabhu et al., 2012; Balgude and Gaikwad, 2016; Goswami and Thind, 2018) การติดเชื้อจะเริ่มต้นในระยเมล็ดข้าวเริ่มเป็นน้ำนมและเชื้อราสามารถแพร่กระจายไปกับลมหรือติดไปกับเมล็ด ทำให้เกิดแผลจุดสีน้ำตาลหรือดำที่เมล็ด เมื่อเชื้อราเข้าทำลายอาการเมล็ดต่างจะเห็นได้ชัดในระยะเก็บเกี่ยว ส่วนการงอกของเมล็ดข้าวที่ติดเชื่อนั้นไม่ดี และเมื่องอกออกมาจะผิดปกติ เมล็ดข้าวที่ติดเชื้อยังเป็นแหล่งที่มาของหัวเชื้อของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งกระจายผ่านการเก็บเมล็ดไปยังพืชใหม่ (Kongcharoen et al., 2020)

2.1.4.3 โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight disease)

โรคขอบใบแห้งเป็นโรคที่มีความรุนแรงมากในพื้นที่การผลิตข้าวในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเป็นโรคสำคัญที่ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงอย่างมากทั่วโลกทำให้สูญเสียผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญได้ถึง 20–81 เปอร์เซนต์ ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของข้าว ความอ่อนแอของพันธุ์ และสภาพแวดล้อม โดยมีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Feakin, 1971; Srinivasan and Gnanamanickam, 2005) สามารถแพร่ไปกับน้ำในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง ซึ่งเกิดทั้งระยะกล้า ระยะแตกกอจนถึงออกรวง โดยใบที่เป็นโรคขอบใบมีรอยขีดข้ำต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ในกรณีที่ต้นข้าวมีความอ่อนแอต่อโรคและเชื้อโรคมีปริมาณมากจะทำให้ต้นข้าวจะเหี่ยวเฉาและแห้งตายทั้งต้นโดยรวดเร็วเรียกอาการของโรคนี้ว่า ครีเสก (kresek) (Elazegui and Islam, 2003)

2.1.5 การควบคุมและป้องกัน

2.1.5.1 การควบคุมและป้องกันโดยใช้สารเคมี

ส่วนมากเกษตรกรจะแก้ปัญหาโดยใช้พันธุ์ต้านทานโรคที่เหมาะสมเฉพาะท้องถิ่น การใช้สารกำจัดแมลงพาหะ การกำจัดวัชพืช การคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น คาร์เบนดาซิม แมนโคเซบ และโปรคลอลาส เป็นต้น เมื่อพบอาการที่รุนแรงหรือแหล่งที่มีโรคระบาด ควรพ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชอัตราตามคำแนะนำในฉลาก เช่น คาซูกะมัยซัน และอีดีเฟนฟอส เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557)

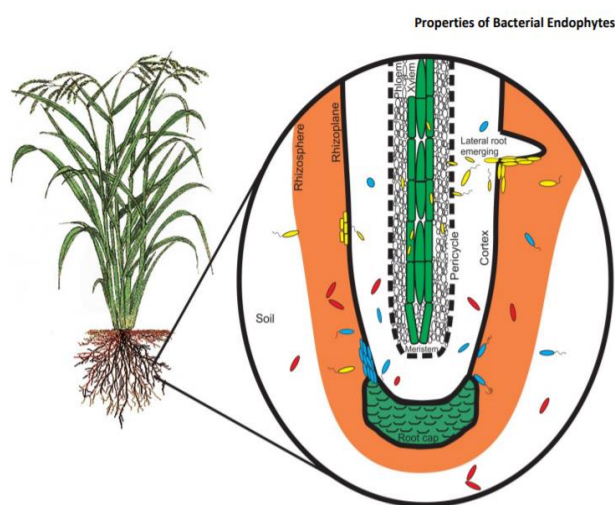
2.1.5.2 การควบคุมและป้องกันโดยวิธีชีวภาพ

เป็นการควบคุมศัตรูพืชวิธีหนึ่งที่น่าความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพมาใช้เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี เช่น จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือพีจีพีอาร์ (PGPR) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินรอบรากพืช (rhizosphere) และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, และ *Rhizobium* เป็นต้น (Vessey, 2003; Glick, 2012) ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่ก่อโรคพืช ได้แก่ *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas* spp. (Velivellil et al., 2014)

2.2 แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria)

2.2.1 แบคทีเรียเอนโดไฟต์ (endophytic bacteria)

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืชนั้นๆ โดยพบได้ทุกส่วนของพืช ได้แก่ ราก ใบ ลำต้น และเมล็ด เป็นต้น ซึ่งรากมีจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์มากที่สุด (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006) (ภาพ 2) โดยมีการรายงานถึงความหนาแน่นของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชโดยเฉพาะส่วนของรากพบว่า มีความหนาแน่นมากถึง 10^5 เซลล์ต่อมิลลิเมตร เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ของลำต้น (Hallmann et al., 1997) และความหลากหลายของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถพบได้ในพืชทุกชนิดที่ศึกษา (Partida-Martinez and Heil, 2011)



ภาพ 2 แสดงการเข้าสู่รากของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ชนิดต่างๆ

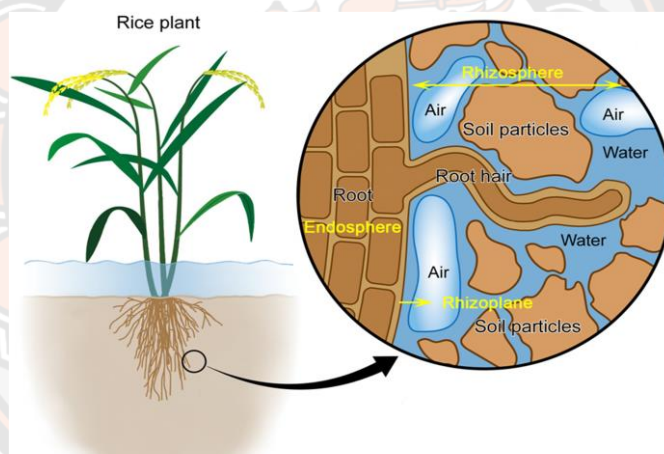
ที่มา: Hardoim, 2008

ในปีที่ผ่านมาได้มีการรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากในพืช เพาะปลูกต่างๆ เป็นจำนวนมาก เช่น ข้าว (Baldani et al., 2000) ถั่วเหลือง (Bai et al., 2002) และ ข้าวโพด (Weilharter et al., 2011) โดยส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรียจีส Bacillus และ Pseudomonas มากที่สุด (Hallmann et al., 1997; Chaturvedi et al., 2016) นอกจากนี้ มี รายงานการศึกษาพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านไวรัส ต้านมะเร็งและอนุมูลอิสระ รวมถึงการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืช (Findlay et al., 1997; Guo et al., 2000; Strobel et al., 2004) Shivas and Hyde (1997) ประมาณการ ว่ามีพืชในเขตร้อนอย่างน้อย 200,000 ชนิด เป็นแหล่งอาศัยของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ซึ่งน่าจะมี จำนวนสูงถึง 270,000 ชนิด อีกทั้งมีรายงานการศึกษาพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ยังสามารถช่วยใน การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม ประโยชน์ในทางตรง ได้แก่ การผลิต ฮอโมนออกซิน ซึ่งมีความสำคัญกับพืช ซึ่งสามารถช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้นภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะเครียด (Ma et al., 2016; Afzal et al., 2019) การละลายธาตุอาหารให้แก่พืช เช่น การ ละลายฟอสเฟตเป็นการนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์มาช่วยย่อยฟอสฟอรัสในดินให้อยู่ในรูปที่เป็น ประโยชน์ (Mehnaz et al., 2011) และยังสามารถตรึงไนโตรเจน ซึ่งมีประสิทธิภาพเท่ากับแบคทีเรีย ไโรโซเบียม (Carrell and Frank, 2014) สำหรับประโยชน์ทางอ้อม ได้แก่ การเป็นปฏิปักษ์โดยตรงต่อ เชื้อสาเหตุโรคพืช รวมถึงการช่วยให้พืชสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม (Glick, 2014; Gamalero and Glick, 2015; Santoyo et al., 2016)

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในข้าว นั้น Ji et al. (2014) ทำการแยก แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากข้าวพันธุ์เกาหลี และศึกษาความสามารถในการผลิตสารที่ส่งเสริมการ เจริญเติบโตของข้าวพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว และทำให้ข้าวเกิดความต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคได้ แบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในจีส Bacillus, Paenibacillus, Microbacterium และ Klebsiella ซึ่งความหลากหลายของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ใน ข้าว นั้นมีศักยภาพที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นปุ๋ยชีวภาพได้ (Raweekul et al., 2016) ใน งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของพืชกับกลุ่มของจุลินทรีย์ เมื่อเทียบกับ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในบริเวณรอบๆ รากของพืช (rhizosphere bacteria) พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์มีข้อได้เปรียบคือ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ช่วยป้องกันพืชจากเชื้อ ก่อโรค และแบคทีเรียเอนโดไฟต์มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืชอาศัยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า แบคทีเรียรอบราก (Ali et al., 2012; Coutinho et al., 2015) อีกทั้งยังช่วยให้พืชทนต่อสภาวะ ความเครียดและการแข่งขันอีกด้วย

2.2.2 แบคทีเรียรอบราก (Rhizosphere bacteria)

แบคทีเรียรอบรากเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม (Kloepper and Schroth, 1978) มีการรายงานถึงความหนาแน่นของแบคทีเรียบริเวณรอบรากพบว่า สามารถอยู่ในช่วงระหว่าง 10^7 - 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในดินรอบรากของพืช (Benizri et al., 2001) ไโรโซสเฟียร์จะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน (ภาพ 3) ได้แก่ endorhizosphere, rhizoplane และ ectorhizosphere (Prashar et al., 2014) โดยบริเวณเหล่านี้เป็นแหล่งสำคัญของจุลินทรีย์และมีกิจกรรมทางชีวภาพรวมถึงอันตรกิริยาระหว่างจุลินทรีย์กับพืช (Lynch, 1990; Gray and Smith, 2005) โดยมีการรายงานพบว่าแบคทีเรีย เช่น *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus* sp. อาศัยอยู่บริเวณรอบรากในพืชต่างๆ รวมถึงข้าวอีกด้วย (John Bullied et al., 2002; Nautiyal et al. 2013; Tamreihao et al., 2018)



ภาพ 3 แสดงบริเวณแบคทีเรียรอบรากในส่วนต่างๆ ของข้าว

ที่มา: Ding et al., 2019

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากพืชได้หลายวิธี เช่น

1) การแยกแบคทีเรียด้วยวิธี surface sterilized เป็นวิธีที่ง่ายทำได้โดยการฆ่าเชื้อบนพื้นผิวของตัวอย่างพืช ได้แก่ ลำต้น ราก และใบของพืช (Compant et al., 2005) ปัจจุบันมีวิธีการฆ่าเชื้อด้วยวิธี surface sterilized มากถึง 100 วิธี ซึ่งขึ้นอยู่กับทางเลือกใช้ความเข้มข้นของสารเคมีและชนิดของเนื้อเยื่อพืช (Sahu et al., 2022)

2) การวิเคราะห์ด้วยยีน 16S rRNA เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียที่แยกได้ ซึ่งเป็นการใช้วิธีการระดับโมเลกุล และเป็นเครื่องมือสำคัญในการกำหนดความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างแบคทีเรีย รวมถึงการระบุลำดับยีนนั้นๆ สำคัญสำหรับแบคทีเรียที่เติบโตช้า ผิดปกติ และเพาะเลี้ยงยาก แต่การระบุลำดับยีนนั้นๆ ยังคงค่อนข้างมีราคาแพง (Patel, 2001)

3) การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical Test) เป็นการระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการทดสอบปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมหรือปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำให้สามารถจัดกลุ่มและจำแนกในระดับสกุลหรือสปีชีส์ได้ (Busch and Nitschko, 1999; Eslava et al., 2010) เนื่องจากแบคทีเรียไม่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงพอที่จะระบุลักษณะเฉพาะได้ ซึ่งวิธีการทดสอบทางชีวเคมีจึงเป็นวิธีการจำแนกแบคทีเรียวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในปัจจุบัน

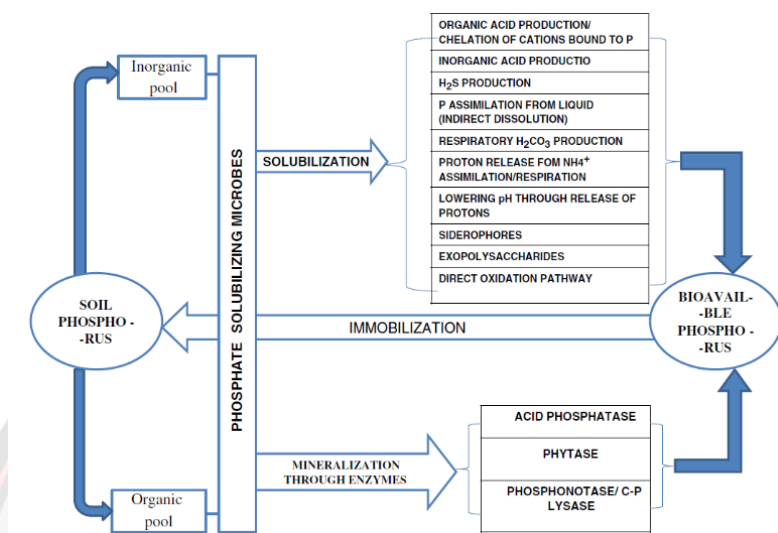
2.3 บทบาทของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบราก

2.3.1 แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในการละลายฟอสเฟต

ฟอสฟอรัส (P) เป็นธาตุอาหารหลักที่พืชใช้ในการเจริญเติบโต เกิดขึ้นจากการสลายตัวผู้พังของแร่บางชนิดในดิน ปริมาณฟอสฟอรัสในดินเฉลี่ย 0.05 เปอร์เซ็นต์ แต่จะพบแค่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของฟอสฟอรัสที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (Sharma et al., 2013) โดยฟอสฟอรัสในดิน สามารถแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีแบ่งได้เป็น 2 แบบคือ อินทรีย์ฟอสเฟต (organic phosphate) เป็นวัสดุอินทรีย์ต่างๆ ที่ร่วงหล่นและทับถมอยู่บนดิน และอนินทรีย์ฟอสเฟต (inorganic phosphate) เป็นพวกหินแร่ต่างๆ เช่น แร่อะพาไทต์ (apatite) เป็นต้น (ปัทมา วิทยากร, 2559) ธาตุฟอสฟอรัสมีความสำคัญในการช่วยให้รากของพืชแข็งแรงและแผ่กระจายได้รวดเร็วขึ้น อย่างไรก็ตามพืชที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสจะทำให้ต้นแคระแกร็น ใบเล็ก เหลือง ลำต้นเล็ก ผลน้อย และรากไม่เจริญ ด้วยปัญหาดังกล่าวจึงมีการนำจุลินทรีย์ในดินที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตมาใช้ประโยชน์ (กฤตย์ สมสาร, 2549)

กลไกการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์เกิดจากการสร้างกรดและปลดปล่อยออกมาละลายฟอสเฟตในดินทั้งสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ด้วยกรดอินทรีย์ (solubilization) กรดอินทรีย์ดังกล่าวจะเปลี่ยนรูปแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO})_2$) ให้อยู่ในรูปไโดและโมโนเบสิกฟอสเฟต กรดต่างๆ ที่เกิดขึ้นส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างลดลงและเกิดการละลายของฟอสฟอรัสมากขึ้น และมีการเปลี่ยนรูปของฟอสฟอรัสในดินด้วยกระบวนการต่างๆ ได้แก่ กระบวนการที่ทำให้ฟอสฟอรัสตกตะกอน (precipitation) กระบวนการที่ละลายฟอสฟอรัสที่ตกตะกอน (dissolution) กระบวนการดูดซับ-ปลดปล่อยฟอสฟอรัส (adsorbed-desorption) และกระบวนการ mineralization-immobilization ของฟอสฟอรัสอินทรีย์ที่เกิดขึ้นพร้อมกัน โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และการ

ตรึงฟอสฟอรัสเข้าสู่ภายในเซลล์ทำให้ฟอสฟอรัสละลายในดินเป็นไอออนฟอสเฟตที่ละลายน้ำพืชสามารถนำไปใช้ได้ การละลายฟอสเฟตจะมีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และอินทรีย์วัตถุที่ใช้เป็นแหล่งน้ำตาลในการผลิตกรดอินทรีย์ (Liu, 2019; ปัทมา วิทยากร, 2559) (ภาพ 4)



ภาพ 4 แผนภาพแสดงความสำคัญของจุลินทรีย์ในการละลายฟอสเฟต

ที่มา: Sharma et al., 2013

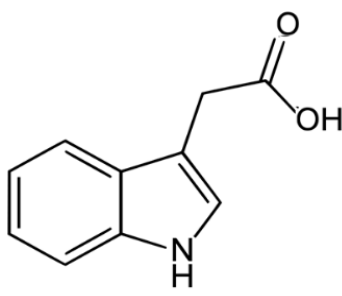
ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟต ได้แก่ สายพันธุ์จากแบคทีเรีย เช่น *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, แอคติโนแบคทีเรีย และเชื้อรา เช่น *Penicillium*, *Aspergillus* และ *Arbuscular mycorrhizal* (AM) (Kalayu, 2019) และมีการรายงานของ Liu et al. (2022) พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* DD-2, *Bacillus aryabhatai* DD-3 และ *Bacillus subtilis* DD-4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากข้าวมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ โดยแบคทีเรียไอโซเลต DD-2 สามารถละลายฟอสเฟตสูงสุด (288.33 มิลลิกรัมต่อลิตร) นอกจากนี้ มีรายงานว่าแบคทีเรียจีโนส *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Citrobacter* และ *Escherichia* ที่แยกได้จากข้าวในไนจีเรียสายพันธุ์ Ofada และ ITA 150 สามารถละลายฟอสเฟตได้ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์เป็นหัวเชื้อในเพิ่มการเจริญและเพิ่มผลผลิตของข้าวได้ (Olayemi and Odedara, 2017)

สำหรับวิธีการตรวจหาปริมาณฟอสเฟตส่วนมากจะใช้วิธี molybdenum blue ในการทดสอบซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้และได้รับการยอมรับอย่างดีในทางวิชาการการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว การตรวจหาปริมาณฟอสเฟตตามที่รายงานโดย Murphy & Riley, (1962) และ Watanabe & Olsen, (1965) จะเกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยาระหว่างของกรดแอมโมเนียมโมลิบเดตกับไอออนของสารอนินทรีย์ฟอสเฟต (Pi) โดยสร้างสารประกอบเชิงซ้อนฟอสโพลีโมลิบดินัมสีเหลืองขึ้น

จากนั้นจะถูกลดขนาดให้เป็นโมลิติน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดแอสคอร์บิกโดยค่าการดูดกลืนแสงของโมลิติน้ำเงินที่ผลิตขึ้นจะถูกวัดทางสเปกโตรโฟโตเมตริกที่ความยาวคลื่นหนึ่งซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และความเข้มของสีน้ำเงินจะแปรผันตามปริมาณฟอสเฟตที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่าง (Pradhan and Pokhrel, 2013)

2.3.2 แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อการผลิต indole-3-acetic acid (IAA)

ออกซินหรือ IAA เป็นอนุพันธ์ของ indole ที่มีหมู่ carboxymethyl group (ภาพ 5) เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชที่สามารถทำให้เกิดการแบ่งตัวและยึดตัวของเซลล์ของพืช กระตุ้นการเกิดรากด้านข้าง (Myo et al., 2019; Wagi and Ahmed, 2019; Kumla et al., 2020) ทั้งนี้มีการศึกษาพบว่า แบคทีเรียประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ที่แยกได้จากรากพืชสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ (Patten and Glick, 1996) นอกจากนี้ IAA ยังสามารถควบคุมการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชชนิดอื่นได้ เช่น เอทิลีน และไซโตไคนิน เป็นต้น ซึ่งสารออกซินบางชนิดเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในพืช และบางชนิดเป็นสารสังเคราะห์ เนื่องจากความสามารถในการควบคุมกระบวนการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้มีการสังเคราะห์สารต่างๆ ที่มีคุณสมบัติคล้ายออกซิน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร (Woodward and Bartel, 2005; Glick, 2012)



ภาพ 5 โครงสร้างโมเลกุลของกรดอินโดล-3-แอซีติก

ที่มา: Simon and Petrásek., 2011

กลไกการสังเคราะห์ indole-3-acetic acid (IAA) ของจุลินทรีย์

การสังเคราะห์ออกซินทั้งในพืชและแบคทีเรียจะมีกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) เป็นสารตั้งต้น โดยเริ่มต้นจากการสังเคราะห์ chorismate ซึ่งเป็นสารประกอบตั้งต้นถูกควบคุมโดย trp genes ในวิถีสังเคราะห์ indole-3-acetic acid (IAA) 5 ขั้นตอน โดยจะถูกสังเคราะห์จาก phosphoenolpyruvate และ erythrose 4-phosphate ในชีววิถี shikimate ซึ่งเป็นชีววิถีทั่วไปในชีวสังเคราะห์ของ aromatic amino acid และสารทุติยภูมิอีกหลายกลุ่ม (Merino et al., 2008) และขั้นตอนสุดท้ายคือ ได้ tryptophan เป็นสารตั้งต้นในวิถีการสังเคราะห์ IAA ต่อไปด้วยวิถีที่แตกต่างกัน (Spaepen and Vanderleyden, 2011) และมีรายงานการผลิต IAA ของแบคทีเรีย

จำนวนมาก พบว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียที่แยกได้จากรากพืชสามารถสังเคราะห์ IAA ได้ (Patten and Glick 1996)

การศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีความสามารถในการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตจากข้าวมีการรายงานจำนวนมาก ในปี 2018 Saengsanga ศึกษาผลของแบคทีเรียรอบรากที่แยกจากบริเวณรอบรากข้าวในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิไทย (KDML105) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต NRRU-N13 ผลิตกรดอินโดลอะซิติก (IAA) ได้สูงที่สุด เท่ากับ 46.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อนำไปจำแนกชนิดโดยการหาลำดับเบสด้วย 16S rDNA จัดอยู่ในสกุล *Enterobacter* sp. และมีการรายงานของ Tamreihao et al. (2018) ศึกษาผลของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. MBRL 576 ที่แยกจากรอบรากข้าวในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าว พบว่า มีความสามารถในการผลิต IAA เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมและมีศักยภาพในการเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวพันธุ์ Jatra

สำหรับวิธีการตรวจหาการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ IAA โดย Gordon & Weber, (1951) เป็นคนแรกที่จัดทำการศึกษาทดสอบการวัดสีโดยใช้ Salkowski reagent ต่อมาวิธีนี้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจหา IAA จากจุลินทรีย์ ซึ่งสาร Salkowski reagent เป็นส่วนผสมของเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.5 M (FeCl_3) และกรดเปอร์คลอริก 35% (HClO_4) เมื่อทำปฏิกิริยากับ IAA จะให้สีชมพู เนื่องจากการก่อตัวของ IAA ที่ซับซ้อนพร้อมกับการลดลงของ Fe_3^+ (Kamnev et al., 2001) สีชมพูที่ปรากฏเมื่อทำปฏิกิริยาและได้ผลเชิงบวกสามารถบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของสารประกอบอินโดลต่างๆ ที่ได้จากเมแทบอลิซึมของสารตั้งต้นทริปโตเฟนและความสามารถในการเผาผลาญ L-tryptophan (TRP) ไปเป็น IAA ของแบคทีเรีย (Rahman et al., 2010; Gang et al., 2019)

2.3.3 แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรค

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) เป็นวิธีที่นิยมมากขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพมีกลไกการควบคุมโรคพืช 5 ลักษณะ ได้แก่

- 1) การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) เช่น แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างสารปฏิชีวนะ อีทูริน (iturin) ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด
- 2) การแข่งขัน (competition) เช่น เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการเจริญเติบโต แข่งขันกับเชื้อก่อโรคพืช ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตและทำลายพืชได้
- 3) การเป็นปรสิต (parasitism) เช่น เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการเข้าไปเจริญอาศัยในเชื้อสาเหตุโรคพืช แล้วคอยดูดกินอาหาร ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชอ่อนแอและตายในที่สุด

4) การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์รากล่อโรคพืช เช่น แบคทีเรียและแอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และปีตา-1,3-กลูแคนเนสที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไคติน (chitin) และปีตา-1,3-กลูแคนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รากล่อส่วนใหญ่

5) การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced host resistance) (Heydari and Pessarakli, 2010; Prajapati et al., 2020)

มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียสกุลที่พบสำหรับผลิตสารฤทธิ์ต้านจุลชีพในการต้านเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Bacillus*, *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* และ *Serratia* (Afzal et al., 2019) และกิจกรรมต้านเชื้อราเกิดจากการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส โปรติเอส และกลูแคนเนสที่ผนังเซลล์ของเชื้อราและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ โดยเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้ (Zarei et al., 2011; Zhang et al., 2012) ในปี 2018 Saechow et al. ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* BAS23 ที่แยกได้จากดินนาข้าวพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดต่างในข้าวได้ โดยมีการผลิตสารประกอบในกลุ่มไลโปเปปไทด์ คือ iturin A และจากการศึกษาของ Dong et al. (2019) ทำการศึกษาแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* Rdx5 ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรจีนต่อการต้านเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* สาเหตุโรคไหม้ในข้าวพบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ โดยมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและโปรติเอส นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาของ Rong et al. (2020) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Bacillus safensis* B21 พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *M. oryzae* สาเหตุของโรคไหม้ในข้าวและมีการผลิตสารประกอบต้านเชื้อราโดย *B. safensis* B21 คือ iturin A2 และ iturin A6 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ *B. safensis* B21 และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคไหม้ของข้าวได้

2.3.4 วิธีการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ปัจจุบันพบว่า มีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรากล่อโรคของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับโรงเรือน และมีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์โดยมุ่งเน้นเรื่องการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและการยับยั้งเชื้อรากล่อโรค วิธีการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชสามารถนำไปใช้ได้ ในลักษณะเช่นเดียวกับการใช้สารเคมีทั่วไป ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ (Prathuangwong et al., 2005)

2.3.4.1 การคลุมเมล็ด

วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย และประหยัดที่สุด เหมาะสำหรับการใช้ควบคุมโรค ในระบบรากและลำต้นใต้ดิน และสามารถควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และเพิ่ม ความแข็งแรงตลอดจนชักนำภูมิต้านทานของต้นกล้าได้ด้วย

2.3.4.2 การเติมหัวเชื้อลงในดิน

เป็นการราดเชื้อลงในดินในรูปแบบเซลล์แขวนลอย ซึ่งเป็นวิธีการที่ช่วยให้จุลินทรีย์มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อโรคในดินและแมลงศัตรูพืชในดินอย่างใกล้ชิด ทำให้เชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชลดลง แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด เนื่องจากค่อนข้างยุ่งยาก และต้องใช้ปริมาณจุลินทรีย์มาก

2.3.4.3 การพ่นบนใบพืชหรือการฉีดพ่น

เป็นวิธีการพ่นจุลินทรีย์ลงบนต้นและใบพืช เพื่อควบคุมโรคพืชที่เกิดกับใบและควบคุมแมลงศัตรูพืช ในลักษณะเช่นเดียวกับการพ่นใบพืชด้วยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

2.3.4.4 การผสมกับวัสดุปลูกหรือปุ๋ยอินทรีย์

วิธีการนี้จะช่วยให้จุลินทรีย์มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช เพราะจะอาศัยอยู่ในส่วนของวัสดุปลูก ซึ่งจะช่วยลดปริมาณเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชในวัสดุปลูกนั้น โดยจุลินทรีย์จะทำหน้าที่ย่อยธาตุอาหารรองหรือจุลธาตุบางชนิดในการส่งเสริมการเจริญของพืช ซึ่งปุ๋ยเคมีไม่สามารถให้ประโยชน์ตรงนี้ได้

2.3.4.5 การจุ่มหรือการใส่ลงบนส่วนขยายพันธุ์หรือกล้าพืชก่อนการย้ายปลูก

เป็นวิธีการที่ช่วยให้จุลินทรีย์ได้สัมผัสกับส่วนของพืชที่จะใช้ขยายพันธุ์ รวมทั้งกล้าพืชก่อนที่เชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชจะเข้าทำลายพืช เป็นวิธีที่ได้ผลดี ประหยัดค่าใช้จ่าย และสะดวกต่อการปฏิบัติ

2.4 สารกลุ่มไลโปเปปไทด์ (lipopeptides)

สารกลุ่ม lipopeptide เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างของไขมันเชื่อมต่อกับเปปไทด์ โดยมีประจุบวกหรือประจุลบ ซึ่ง moiety ของกรดไขมันถูกยึดติดกับโควาเลนต์และปลาย N (N-terminus) โดยสารกลุ่ม lipopeptides เป็นกลุ่มย่อยของสารลดแรงตึงผิวของจุลินทรีย์หรือสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ สารในกลุ่มนี้เกิดจากการสังเคราะห์ของยีนที่ควบคุมการผลิตชื่อว่า non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด (Raaijmakers et al., 2010) ในการศึกษาวิจัยในปัจจุบันรายงานว่า สารกลุ่ม lipopeptide แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่

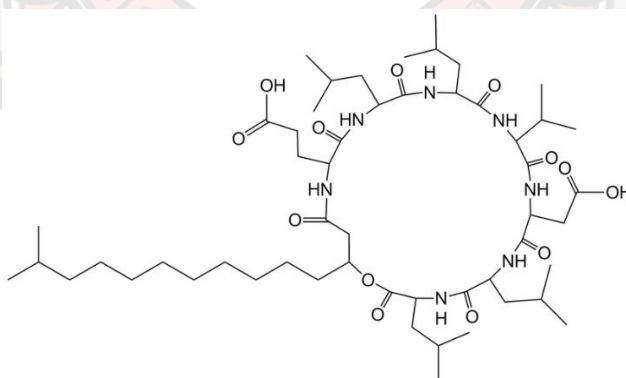
1) iturin เป็น cycle lipopeptide โดยตำแหน่งที่ 7 ของ heptapeptide คือ Ser ที่เชื่อมโยงด้วยกรด β -amino ของสายกรดไขมันที่มีอะตอมของคาร์บอนเท่ากับ 14–17 ทั้งนี้

กรดอะมิโนของ heptapeptideis ประกอบด้วย(L-)Asn-(D-)Tyr-(D-)Asn-(L-)Gln-(L-)Pro-(D)Asn-(L-)Ser

2) fengycin เป็นไลโปเปปไทด์อีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานการออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา และรายงานว่าผลิตได้ในแบคทีเรียจีส *Bacillus* หลายชนิด สารดังกล่าวมีกรดไขมันไฮดรอกซีที่มีอะตอมของคาร์บอนเท่ากับ 15-19 fengycin ประกอบด้วยสายเปปไทด์ (L-)Glu-(D-)Orn-(L-)Tyr-(D-)Thr-(L-) Glu-(D-)Ala(Val)-(L-)Pro-(L-)Gln-(D-)Tyr-(L-)Ile ซึ่ง Tyr ที่ตำแหน่ง 3 ถูกผูกมัดกับ Ile ที่ตำแหน่ง 10 เพื่อก่อรูปไซเคิลเปปไทด์ผ่านทางพันธะแลกโทน

3) surfactin โดยทั่วไปพบว่ามีส่วนประกอบของ heptapeptide มีลำดับกรดอะมิโนคือ (L-)Glu-(L-)Leu-(D-)Leu-(L-)Val-(L-)Asp-(D)Leu-(L-)Leu และมีเปปไทด์เชื่อมโยงผ่านพันธะแลคโทนกับกรดไขมันเบต้าไฮดรอกซีที่มีอะตอมของคาร์บอนเท่ากับ 13–15 (Zhao et al., 2017)

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารไลโปเปปไทด์ มีฤทธิ์เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารต้านจุลชีพและมีคุณสมบัติเป็นสารระเหยอินทรีย์ (Hussain and Khan, 2022) ซึ่งมีผลทำให้เส้นใยของเชื้อราเกิดความผิดปกติ โดยเฉพาะ surfactin (ภาพ 6) (Emmert and Handelsman, 1999; Roongsawang et al., 2010) สาร surfactin ได้มีการค้นพบเป็นครั้งแรกใน *Bacillus subtilis* โดย Arima et al. (1968) และได้รับความสนใจนำมาศึกษาเป็นจำนวนมาก ด้วยคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวระหว่าง biofilms กับบริเวณผิวโดยรวมถึงการรบกวนกิจกรรมของ membrane structure (Zhao et al., 2017)



ภาพ 6 แสดงโครงสร้างของสาร surfactin ที่มีจำนวน C เท่ากับ 15 อะตอม

ที่มา: Liu et al., 2012

surfactin เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ไม่รุนแรง ในขณะที่ Iturin และ fengycin มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่รุนแรงและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคในพืชหลากหลายชนิด (Ongena and Jacques,

2008) อย่างไรก็ตาม พบว่า surfactin ร่วมกับ iturin A ช่วยส่งเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อราให้สูงมากขึ้น (Maget-Dana et al., 1992) จากการรายงานที่ผ่านมาพบว่า ไลโปเปปไทด์มีประสิทธิภาพโดยอาศัยกลไกปกป้องต่อเชื้อโรคพืชและยับยั้งการสังเคราะห์ทางชีวภาพหรือขัดขวางความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่ายาปฏิชีวนะบางชนิด รวมถึงมีความเป็นพิษต่ำ สามารถออกฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ในวงกว้าง และมีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว ในปี 2016 Jiang et al. ได้รายงาน surfactin C15 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรค และมีรายงานถึงกลไกการต้านแบคทีเรียของ surfactin ดังนี้: (1) โจมตีเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรค ทำให้เกิดการแตกตัวของเยื่อหุ้มเซลล์หรือความไม่สมดุลของแรงดันออสโมติก (2) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียก่อโรค เพื่อป้องกันการแพร่พันธุ์ของเซลล์ และ (3) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของแบคทีเรียก่อโรค ส่งผลต่อการเผาผลาญของเซลล์ปกติ (Chen et al., 2022) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า สารกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญและเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชเพื่อลดการใช้สารเคมีบางชนิดในอนาคต



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียจากราก และดินบริเวณรอบรากข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

คัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างรากและดินบริเวณรอบรากข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ จากบ้านไร่ไอน์สตรอบอร์รี่ ตำบลเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ

- 1) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
- 2) เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง (vortex)
- 3) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance)
- 4) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (precision balance)
- 5) ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 6) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 7) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 8) เครื่องกวนสารละลาย (hot plate stirrer)
- 9) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 10) ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow)
- 11) เครื่องเขย่า (shaker)
- 12) กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 13) ไมโครปิเปต (micropipette)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1) หลวงถ่ายเชื้อ (inoculating loop)
- 2) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)
- 3) ไฟแช็ค (lighter)
- 4) ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (rack)

- 5) ถุงพลาสติก (plastic bag)
- 6) หนังสยาง (rubber band)
- 7) ช้อนตักสารเคมี (spatula)
- 8) สำลี (cotton wool)
- 9) โกร่งบดสาร (mortar and pestle)

อุปกรณ์เครื่องแก้ว

- 1) จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 2) หลอดทดลอง (test tube)
- 3) แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader)
- 4) ปิเปต (pipette)
- 5) กระบอบกตวง (cylinder)
- 6) ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- 7) ปีกเกอร์ (beaker)
- 8) แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- 9) ขวดแก้วดูแรน (duran bottle)

สารเคมี

- 1) เอทิล แอลกอฮอล์ 95% (ethyl alcohol 95%), เคมีภัณฑ์
- 2) เอทิล อะซิเตท ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$; commercial), RCI Labscan™
- 3) ทวิน 80 (Tween 80), OmiPur
- 4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; analytical reagent grade), QRëC
- 5) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaClO), Loba Chemie
- 6) ไอเอิร์น (III) คลอไรด์หรือเฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; analytical reagent grade), Loba Chemie
- 7) กรดเปอร์คลอริก (HClO_4 ; analytical reagent grade), Kemaus
- 8) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4 ; analytical reagent grade), J.T.Baker
- 9) กรดไฮโดรคลอริก (HCl : hydrochloric acid), QREC Chemicals
- 10) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH : sodium hydroxide), Kemaus

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) อาหาร Tryptic soya agar (TSA), Himedia
- 2) อาหาร King's Medium B Base, Himedia
- 3) อาหาร Luria-Bertani broth (LB), Himedia
- 4) อาหาร Pikovskaya's medium (PVK), Himedia
- 5) อาหาร Nutrient broth (NB), Himedia
- 6) อาหาร Potato dextrose broth (PDB), Himedia
- 7) อาหาร Peat moss extract agar
- 8) อาหาร Minimum salt liquid medium (MSLM)

3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ และแบคทีเรียรอบรากจากข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์

3.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียรอบรากข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์

เก็บตัวอย่างรากข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ จำนวน 10 ตัวอย่าง ณ บ้านไร่ไอนุ่นสตรอบเบอร์ ตำบลเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยนำรากข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ที่มีความยาวขนาด 2-3 เซนติเมตร มาละลายในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไป sonicate เป็นเวลา 30 วินาที (Liu and Xie, 2015; Defez et al., 2017) จากนั้นเตรียมสารละลายให้ได้ความเจือจางเท่ากับ 10^{-3} , 10^{-5} และ 10^{-7} ทำการดูดสารละลายปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Luria-Bertani agar (LB) (Defez et al., 2017), King's B agar (Etminani and Harighi, 2018), Tryptic soya agar (TSA) (Etesami et al., 2014) และอาหาร Peat moss extract agar (Jumpathong et al., 2019) และเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน ทำการแยกแบคทีเรียจนได้โคโลนีบริสุทธิ์เพื่อเก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์

นำรากข้าวจากขั้นตอน 3.1.1 มาทำการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ โดยนำรากข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์มาล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ทำการฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย 2% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 70% เอทานอล เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 รอบละ 5 นาที จากนั้นนำรากข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาบด โดยมีการเติมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.03 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารละลายด้วยวิธีการทำให้เจือจาง (serial dilution) เท่ากับ 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} หลังจากนั้นทำการดูดสารละลายปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร LB, King's B, TSA และอาหาร Peat moss

extract agar และเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน ทำการแยกแบคทีเรียจนได้โคโลนีบริสุทธิ์เพื่อเก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการผลิต indole-3-acetic acid (IAA)

ทำการทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่สามารถผลิต IAA ตามวิธีที่ได้รับ การพัฒนาขึ้นโดย Rashid et al. (2012) ทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว YM (Himedia, India) ที่มีส่วนประกอบของ L-Tryptophan นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้มาทำการทดสอบโดยดูดตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมด้วย Salkowski's Reagent (2 % 0.5 โมลต่อลิตร เพอร์ ริคคลอไรด์ (FeCl_3) ใน 35% กรดเปอร์คลอริก (HClO_4)) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อสารดังกล่าวทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นจะปรากฏสารละลายสีชมพู จากนั้นนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายมาตรฐาน IAA เป็นชุดควบคุม ทำการ บันทึกรูปผลการทดลอง และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วย โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป (Gordon and Weber, 1951; Mohite, 2013; Afzal et al., 2017)

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Tryptic soya agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวมา ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟอสเฟต โดยการวางชิ้นวุ้นบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium ที่มี tri-calcium phosphate เป็นองค์ประกอบ ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศา เซลเซียส) เป็นเวลา 3-7 วัน เมื่อสังเกตเห็นบริเวณวงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำการวัดเส้น ผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใส และเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าดัชนี การละลายของฟอสเฟต (PSI) ดังสูตรต่อไปนี้ (Pande et al., 2017)

$$\text{ดัชนีการละลายของฟอสเฟต (PSI)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนี} + \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

คำนวณค่า PSI ทุกซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ยสุดท้ายของแต่ละแบบที่เรียงมาเปรียบเทียบกัน บันทึกผลการทดลองแล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป

3.6 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว

นำโคโลนีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีความสามารถในการเกิดบริเวณวงใสรอบโคโลนีมาทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง Tryptic soya agar (TSA) จนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์นำมาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยการเจาะชั้นวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จำนวน 3 ชั้น ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิิตร ที่บรรจุอาหารเหลว Pikovskaya's medium (PVK) ปริมาตร 25 มิลลิิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (มีปริมาณเชื้อโดยประมาณ 10^7 - 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิิตร) จากนั้นเปิดหัวเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว PVK ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 2.5 มิลลิิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิิตร ที่บรรจุอาหารเหลว PVK ปริมาตร 50 มิลลิิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต โดยวิธี molybdenum-blue method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร (Murphy and Riley, 1962) บันทึกค่าที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของฟอสเฟตที่วิเคราะห์ได้เป็นไมโครกรัมฟอสเฟตต่อมิลลิิตร ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิิตร)} = \frac{Z \times \text{ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิิตร)}}{\text{ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิิตร)}}$$

เมื่อ Z คือ ค่าความเข้มข้นของฟอสเฟตในตัวอย่างที่คำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาตรสุดท้าย เท่ากับ 25 มิลลิิตร ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ เท่ากับ 1 มิลลิิตร

3.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่คัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคข้าว ได้แก่ เชื้อรา *Curvularia lunata* ที่แยกได้จากข้าวไร่ สีมัวเพชรบูรณ์ และเชื้อรา *Bipolaris oryzae* ได้รับการอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร ด้วยวิธีการ dual culture technique โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้น

เจาะชั้นวุ้นอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่วางตรงข้ามกับแบคทีเรียบนอาหารแข็ง PDA เป็นระยะ 4.5 เซนติเมตร และใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (inoculating loop) แตะแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบลงบนอาหาร PDA ให้มีระยะห่างจากขอบเป็นระยะ 2 เซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 11 วัน สำหรับเชื้อรา *C. lunata* และ 21 วัน สำหรับเชื้อรา *B. oryzae* บันทึกการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป (Saechow et al., 2018)

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง percent inhibition of radial growth ; PIRG) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(R_1 - R_2) \times 100}{R_1}$$

เมื่อ R_1 คือ รัศมีของโคโลนีเชื้อราในชุดควบคุม

R_2 คือ รัศมีของโคโลนีเชื้อราในชุดทดสอบ

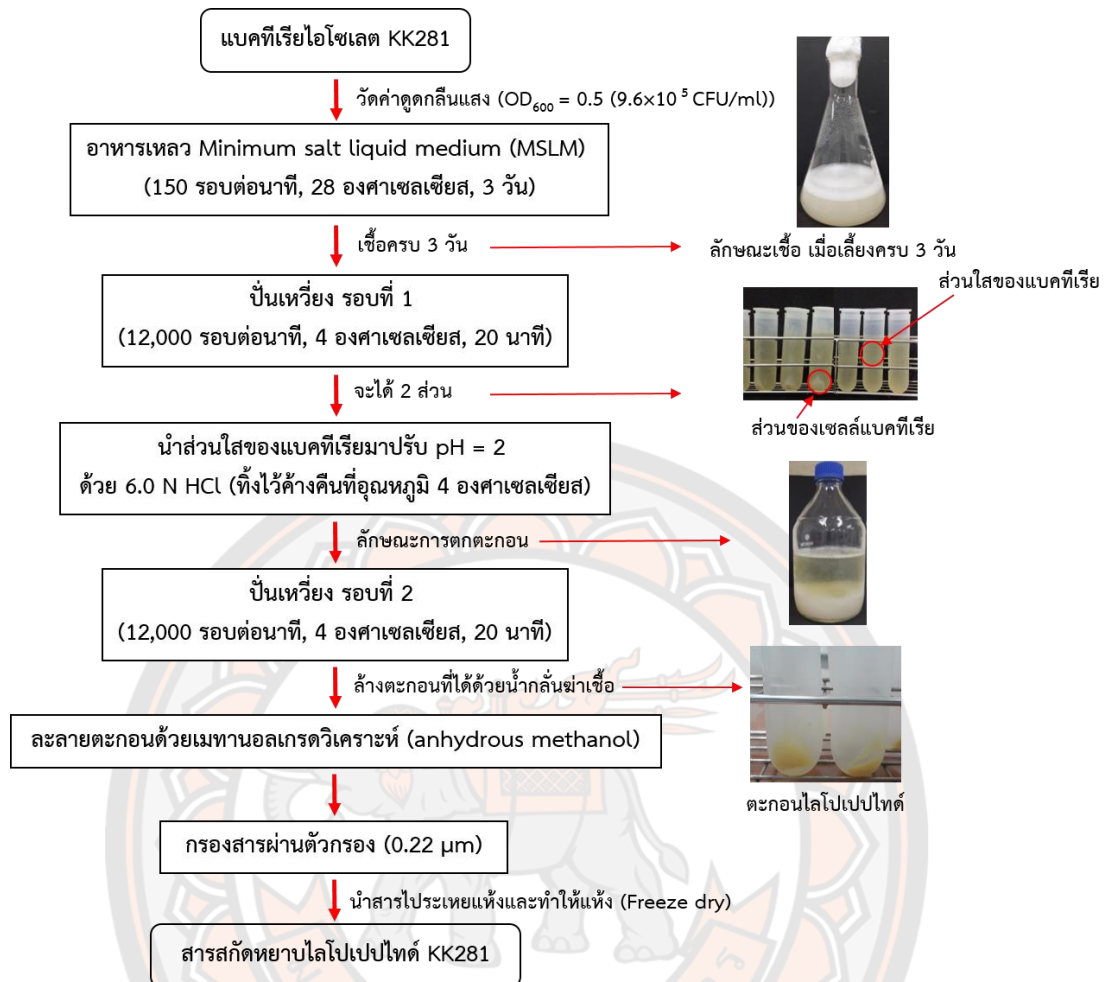
3.8 การผลิตไลโปเปปไทด์จากแบคทีเรียสกุลไฮโซเลต KK281 เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

3.8.1 การผลิตไลโปเปปไทด์

เตรียมแบคทีเรียไฮโซเลต KK281 ให้ได้ค่าความขุ่นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.5 (9.6×10^5 CFU/ml) จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเหลว minimum salt liquid medium (MSLM) (Romano et al., 2011) อย่างละ 1,000 มล. ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Kim et al., 2010; Pathak et al., 2014; Saechow et al. 2018)

3.8.2 การสกัดและการทำไลโปเปปไทด์ให้บริสุทธิ์

หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียไฮโซเลต KK281 เป็นเวลา 3 วัน นำ fermentation broth ที่ได้มาทำการสกัดและทำไลโปเปปไทด์ให้บริสุทธิ์ (Pathak et al. 2012; Pathak et al., 2014) ตามขั้นตอนดังแผนภาพ 7



ภาพ 7 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดและการทำไลโอเปปไทด์ให้บริสุทธิ์

3.9 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี paper disc diffusion method

3.9.1 เตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Curvularia lunata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่ง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีเชื้อราอยู่และหยด Tween 80 ลงไป 1-2 หยด เพื่อช่วยให้สปอร์กระจายตัวและอยู่ในรูปแขวนลอยในน้ำได้ดีขึ้น จากนั้นใช้แท่งแก้วผิวของเชื้อราเบาๆ แล้วเทลงในขวดผ่านผ้ากรองที่ฆ่าเชื้อสองชั้น เพื่อกำจัดเส้นใยและนำไปวัดความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา (1×10^5) โดยใช้ haemocytometer ในการวัดและนับจำนวนสปอร์ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.9.2 เตรียม bioassay plate

ทำการหยดเชื้อรา *C. lunata* ความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็ง PDA 200 ไมโครลิตร แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader) เกลี่ยให้ทั่วจานอาหาร วางทิ้งไว้ 30 นาที

3.9.3 เตรียมสารละลายของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ชั่งสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 25 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วยตัวทำละลาย 70% ethanol เพื่อเตรียมสารละลาย stock 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเตรียมสารสกัดแต่ละตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 500 ไมโครกรัม, 250 ไมโครกรัม และ 125 ไมโครกรัม และใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืชเอ็นทริส (Prochloraz) ความเข้มข้น 500 ppm และใช้สารละลาย 70% ethanol เป็นชุดควบคุม

3.9.4 ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดไลโปเปปไทด์ด้วยวิธี paper disc diffusion method

นำสารสกัด 40 ไมโครลิตร หยดลงบนดิสก์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร (คิดเป็น 40 ไมโครกรัมต่อดิสก์) แล้วรอให้แห้งสนิท คีบด้วยคีม (forceps) ลงในช่องวางลงบน bioassay plate และใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืชเอ็นทริส (Prochloraz) ความเข้มข้น 500 ppm ปริมาณ 20 ไมโครลิตร (คิดเป็น 20 ไมโครกรัมต่อดิสก์) และสารละลาย 70% ethanol เป็นชุดควบคุม หลังจากทำการทดสอบเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จึงทำการสังเกตและบันทึกผลการทดลอง โดยวัดผลบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (inhibition zone) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป

3.9.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดไลโปเปปไทด์ด้วยวิธี Paper disc diffusion method

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) สาเหตุโรคขอบใบแห้ง ที่แยกจากข้าวที่เกิดโรคในอำเภอพรหมพิราม จากโครงการ การปรับปรุงข้าวพันธุ์ กข 47 ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งด้วยวิธีการผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก ลงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมา 2-3 โคโลนีใส่ใน $MgCl_2$ ที่ปลอดเชื้อและปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.2 ทำการปิเปตหัวเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเกลี่ยให้ทั่วอาหาร NA ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นหยดสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 500, 250, 125 และ 62.5 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ลงใน paper disc ที่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วาง paper disc ที่มีสารสกัดดังกล่าวลงบนจานอาหารที่เตรียมไว้ โดยมีสารปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ chloramphenicol ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นชุดควบคุม อ่าน

ผลโดยวัดบริเวณวงใสยับยั้ง (inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป

3.10 การวิเคราะห์สารไลโปเปปไทด์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)

เตรียมสารสกัดหยาบ KK281 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีในเชิงคุณภาพเบื้องต้นด้วยเทคนิค LC-MS/MS สำหรับสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ chemical profile ของตัวอย่าง มีดังนี้

LC conditions:

Column: Phenomenex Luna C-18 (2) column (5 μ m, 150 \times 4.6 mm)

Mobile phase: 0.1% v/v formic acid ในน้ำ (Solvent A)

0.1% v/v formic acid ใน acetonitrile (Solvent B)

Linear gradient elution: เริ่มจาก 10-95% (Solvent B) เป็นเวลา 30 นาที

Injection volume: 100 μ L

Flow rate: 0.5 mL/min

Run time: 30 นาที

MS parameters:

Modes of analysis: positive และ negative

Mass range: m/z 100-1700 amu

Scan rate: 4 spectra/second

Capillary voltage: +3500 V

Dry gas temperature: 325°C

Dry gas flow: 10 L/min

Nebulizer pressure: 30 psig

Collision energies: 100 V.

Collision gas: nitrogen

3.11 การพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates

การพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates โดยในการทดลองนี้ได้มีการนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่ได้รับการคัดเลือกมาทำการพิสูจน์การก่อโรคตามขั้นตอนดังนี้

- 1) เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตเพื่อใช้ในการเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์
- 2) เตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์ให้อยู่ในรูปสารละลายแขวนลอยและปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 - 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- 3) แช่เมล็ดพันธุ์ข้าวไร้สึมัวเพชรบูรณ์ในสารละลายแขวนลอยของแบคทีเรียที่เตรียมไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในที่มีดก่อนนำไปเพาะเมล็ด
- 4) ทำการเพาะเมล็ด โดยตรวจดูร้อยละของการงอก ร้อยละของอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นและร้อยละของอาการของโรคหลังจากกล้างอกแล้วเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน

3.12 การตรวจนับปริมาณของแบคทีเรีย (Colony Forming Unit; CFU)

นำแบคทีเรีย KK018, KK275 และ KK281 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 มาตรวจนับปริมาณของแบคทีเรียด้วยวิธีการทำให้เจือจาง (serial dilution) โดยทำการเกลี่ย (Spread plate) สารละลายที่เจือจางเท่ากับ 10^{-4} - 10^{-6} ลงบนอาหารแข็ง TSA ป่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อจากเพลทที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี และคำนวณเป็น CFU/ml

การคำนวณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในหน่วย CFU/g หรือ CFU/ml

$$\text{จากสูตร } \text{CFU/g หรือ CFU/ml} = \frac{\Sigma C}{(v1n1 + 0.1 n2) d}$$

เมื่อ ΣC = ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจากจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

$v1$ = ปริมาณของ inoculum ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

$n1$ = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนีในระดับความเข้มข้นแรก

$n2$ = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นที่ 2

d = ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับเชื้อได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

3.13 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบราก

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA สังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษา

ลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อมแกรม ศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB และ API 20E (BioMérieux, France) (Sutthisa, 2002) และนำไปแปรผลการทดสอบด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™

จำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากด้วยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA โดยนำแบคทีเรียมาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนของ 16S rRNA จากดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer 1 คู่ (785F :5' GGA TTA GAT ACC CTG GTA 3' และ 907R : 5' CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT 3') กระตุ้น Taq polymerase ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ ชิ้นส่วนที่ได้นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส (ABI PRISM 3730XL DNA analyzer) จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับชิ้นส่วนยีน 16s rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) เพื่อทำการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ศึกษาและนำเสนอตัวอย่างแบคทีเรียเพื่อฝากเก็บรักษาที่ศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย (Thailand Bioresource Research Center; TBRC) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนมาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันด้วยการเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกันแบบหลายตัวอย่าง (multiple alignment) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์แบบออนไลน์ Clastal W แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม MEGA X โดยใช้ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Clastal W มาใช้เป็นข้อมูลเพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแบบจำลองสำหรับสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

3.14 การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร้ลิ้มฟัวเพชรบูรณ์ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในระดับโรงเรือน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ภายใต้สภาพโรงเรือน ระยะเวลาตั้งแต่เดือนมิถุนายน-ตุลาคม 2563 ณ แปลงฝึกงานภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยมีกรรมวิธีในการทดลองทั้งหมด 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังตาราง 1

ตาราง 1 กรรมวิธีในการทดลอง (ใช้ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 5 กิโลกรัมต่อไร่)

กรรมวิธี		การใส่ปุ๋ย ครั้งที่ 1 (กรัม)	การใส่ปุ๋ย ครั้งที่ 2 (กรัม)
กรรมวิธีที่ 1	วัสดุปลูกฆ่าเชื้อ	ไม่ใส่ปุ๋ย	ไม่ใส่ปุ๋ย
กรรมวิธีที่ 2	ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์	0.013	0.013
กรรมวิธีที่ 3	ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์	0.026	0.026
กรรมวิธีที่ 4	แบคทีเรีย KK018 100 มิลลิลิตร	ไม่ใส่ปุ๋ย	ไม่ใส่ปุ๋ย
กรรมวิธีที่ 5	ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแบคทีเรีย KK018 50 มิลลิลิตร	0.013	0.013
กรรมวิธีที่ 6	ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแบคทีเรีย KK018 50 มิลลิลิตร	0.026	0.026
กรรมวิธีที่ 7	แบคทีเรีย KK275 100 มิลลิลิตร	ไม่ใส่ปุ๋ย	ไม่ใส่ปุ๋ย
กรรมวิธีที่ 8	ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแบคทีเรีย KK275 50 มิลลิลิตร	0.013	0.013
กรรมวิธีที่ 9	ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเชื้อ KK275 50 มิลลิลิตร	0.026	0.026
กรรมวิธีที่ 10	แบคทีเรีย KK018 ร่วมกับแบคทีเรีย KK275 (50:50)	ไม่ใส่ปุ๋ย	ไม่ใส่ปุ๋ย
กรรมวิธีที่ 11	ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแบคทีเรีย KK018 25 มิลลิลิตร และแบคทีเรีย KK275 25 มิลลิลิตร	0.013	0.013
กรรมวิธีที่ 12	ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแบคทีเรีย KK018 25 มิลลิลิตร และแบคทีเรีย KK275 25 มิลลิลิตร	0.026	0.026

หมายเหตุ:

1. การใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตรเสมอ (15-15-15) ในอัตราส่วน 20-25 กิโลกรัมต่อไร่ และปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) อัตราส่วน 5-10 กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2555)
2. แบคทีเรีย KK018 คือ *Priestia megaterium* และแบคทีเรีย KK275 คือ *Bacillus sp.* ที่แยกได้จากข้าวไร่ลุ่มผืนเพชรบูรณ์

3.14.1 ขั้นตอนการทดสอบในระดับโรงเรือน ดังแผนภาพ 8



ภาพ 8 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบในระดับโรงเรือน

3.14.2 การบันทึกข้อมูล

เมื่อข้าวอายุครบ 120 วัน ทำการบันทึกผลการทดลองโดยการวัดการเจริญเติบโตของข้าว ได้แก่ ความสูงของต้น (plant height) จำนวนใบ (leaf number) จำนวนหน่อตอก (number of tillers) และ พื้นที่ใบ (leaf Area) จากนั้นทำการประเมินผลผลิตของข้าวหลังการเก็บเกี่ยวโดยทำการเก็บข้อมูลของจำนวนรวงต่อต้น (number of panicles) ความยาวรวง (panicles length) จำนวนระแง้ (number of branches) จำนวนช่อดอก (number of inflorescence) จำนวนเมล็ดต่อรวง (number of grains) น้ำหนักเมล็ด (grain weight) น้ำหนักรากสด (root fresh weight) น้ำหนักรากแห้ง (root dry weight) น้ำหนักต้นสด (shoot fresh weight) และน้ำหนักต้นแห้ง (shoot dry weight)

3.15 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และ Least significant significance (LSD) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป

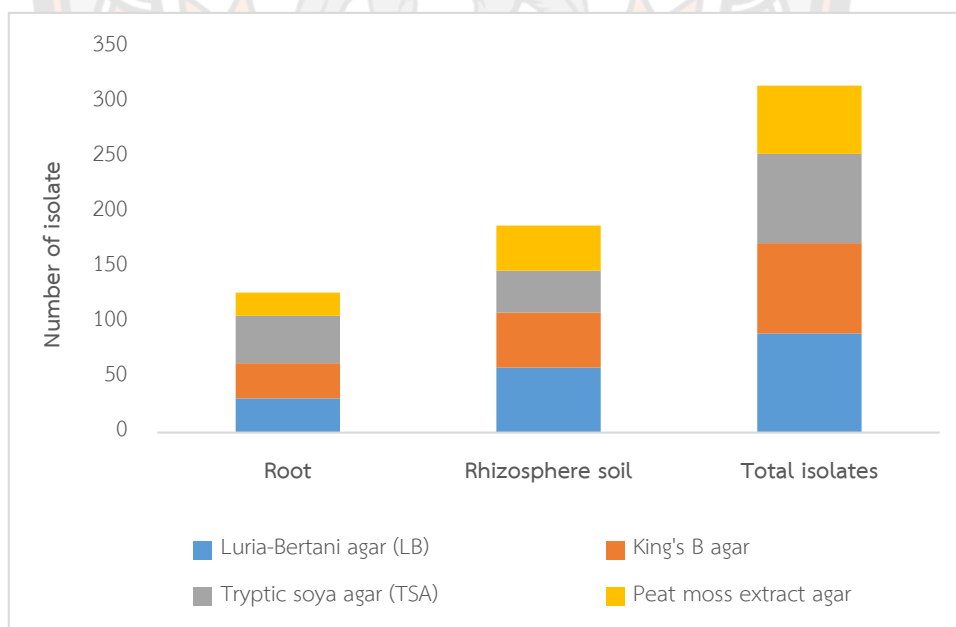


บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียรอบรากและแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากและดินบริเวณรอบรากต้นข้าวไร่ลุ่มฝัวเพชรบูรณ์

จากการแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากส่วนของดินบริเวณรอบรากและรากต้นข้าวไร่ลุ่มฝัวเพชรบูรณ์จำนวน 10 ตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 4 ชนิด พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 315 ไอโซเลต แบ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 127 ไอโซเลต (40.32 เปอร์เซ็นต์) และแบคทีเรียรอบรากจำนวน 188 ไอโซเลต (59.68 เปอร์เซ็นต์) เมื่อสังเกตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ สามารถคัดแยกแบคทีเรียรอบรากและแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้ดังนี้ 1) อาหาร Luria-Bertani agar (LB) แยกได้จำนวน 90 ไอโซเลต 2) อาหาร King's B agar แยกได้จำนวน 82 ไอโซเลต 3) อาหาร Tryptic soya agar (TSA) แยกได้จำนวน 81 ไอโซเลต และ 4) อาหาร Peat moss extract agar แยกได้จำนวน 62 ไอโซเลต (ภาพ 9)



ภาพ 9 ผลการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากรากและดินบริเวณรอบรากต้นข้าวไร่ลุ่มฝัวเพชรบูรณ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

4.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการผลิต indole-3-acetic acid (IAA)

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจำนวน 315 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซีติก โดยนำส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับ Salkowski's Reagent และวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร พบว่า มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีประสิทธิภาพในการผลิต IAA ได้ในปริมาณสูง และอยู่ในช่วงปริมาณ 205.09-362.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งหมด 20 ไอโซเลต (6.35 เปอร์เซ็นต์) โดยไอโซเลต KK074 และ KK077 สามารถผลิต IAA ได้สูงเท่ากับ 362.59 ± 28.02 และ 352.32 ± 13.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 2)

ตาราง 2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการผลิต IAA จากอาหาร YM ที่มีการเติม L-tryptophan

แหล่งอาศัย	ไอโซเลต	ปริมาณ IAA ที่ผลิต* (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
ราก	KK004	265.65 ± 51.07^{de}
	KK005	283.15 ± 13.87^c
	KK006	268.71 ± 13.80^{de}
	KK036	254.82 ± 10.64^{def}
	KK039	278.43 ± 40.18^{cd}
	KK046	263.15 ± 15.90^{de}
	KK047	275.37 ± 8.35^{cd}
	KK049	232.87 ± 9.66^{efgh}
	KK053	277.32 ± 20.46^{cd}
	KK065	273.15 ± 3.00^{cde}
	KK066	328.43 ± 24.10^{ab}
	KK074	362.59 ± 28.02^a
	KK075	330.09 ± 15.28^{ab}
	KK077	352.32 ± 13.72^a
	KK081	348.71 ± 7.74^{ab}
	KK102	309.82 ± 24.55^{bc}
ดินบริเวณรอบราก	KK148	205.09 ± 9.94^h

KK245	208.98±12.68 ^{gh}
KK291	247.04±14.49 ^{degh}
KK292	218.98±19.91 ^{fgh}

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว

4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายฟอสเฟตเบื้องต้นบนอาหารแข็ง PVK ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่แยกได้จากรากและดินบริเวณรอบรากต้นข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์จำนวน 91 ไอโซเลต พบว่ามีไอโซเลตที่ย่อยสลายฟอสเฟตได้รวม 48 ไอโซเลต (52.75 เปอร์เซ็นต์) และมีไอโซเลตที่ให้ค่า PSI เท่ากับ 3-4 ขึ้นไป จำนวน 13 ไอโซเลต (27.08 เปอร์เซ็นต์) โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ จำนวน 5 ไอโซเลต และแบคทีเรียรอบราก จำนวน 8 ไอโซเลต แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่ให้ค่า PSI สูงสุดที่เวลา 3 และ 7 วัน คือ ไอโซเลต KK225 มีค่า PSI เท่ากับ 4.51 และ 7.85 ตามลำดับ (ตาราง 3)

ตาราง 3 ผลการทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากเป็นเวลา 3 และ 7 วัน

แหล่งอาศัย	ไอโซเลต	ค่าดัชนีการละลายของฟอสเฟต (PSI)	
		วันที่ 3	วันที่ 7
ราก	KK007	3.44	4.74
	KK026	3.57	4.27
	KK045	3.00	3.22
	KK067	3.47	4.82
	KK070	4.10	3.49
ดินบริเวณรอบราก	KK129	3.74	3.47
	KK145	3.00	4.30
	KK146	3.42	4.88

KK173	3.34	3.83
KK184	3.87	4.71
KK200	3.03	3.96
KK225	4.51	7.85
KK306	3.71	4.93

4.3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว

จากการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่แยกได้จากรากและดินบริเวณรอบรากต้นข้าวไร่ส้มผิวเพชรบูรณ์ต่อการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว PVK จำนวน 91 ไอโซเลต พบว่ามีไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวได้ในปริมาณสูงและอยู่ในช่วงปริมาณ 303.58-714.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งหมด 23 ไอโซเลต (25.27 เปอร์เซ็นต์) โดยไอโซเลต KK007 ให้ค่าการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดเท่ากับ 714.25 ± 12.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4)

ตาราง 4 ผลการทดสอบการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบราก

แหล่งอาศัย	ไอโซเลต	ค่า pH ของส่วนใส		ปริมาณการละลายฟอสเฟต* (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
		ก่อนการเลี้ยงเชื้อ	หลังการเลี้ยงเชื้อ	
ราก	KK002	7.00	4.35	369.52 ± 2.49^{jkl}
	KK007	7.00	4.06	714.25 ± 12.14^a
	KK018	7.00	4.45	340.77 ± 4.70^{lm}
	KK079	7.00	4.14	648.03 ± 9.04^{cd}
	KK108	7.00	4.40	371.70 ± 10.35^{jk}
ดินบริเวณรอบราก	KK135	7.00	3.94	683.45 ± 13.51^b
	KK137	7.00	3.95	675.01 ± 17.81^{bc}
	KK138	7.00	3.96	694.63 ± 9.12^{ab}
	KK144	7.00	4.03	652.93 ± 4.93^{cd}
	KK146	7.00	4.22	538.75 ± 48.21^g

KK151	7.00	3.99	654.29±17.62 ^{cd}
KK165	7.00	4.59	303.58±2.60 ⁿ
KK177	7.00	4.07	613.15±10.05 ^{ef}
KK180	7.00	3.97	599.52±24.76 ^f
KK191	7.00	4.01	591.35±24.61 ^f
KK199	7.00	3.99	635.49±17.84 ^{de}
KK202	7.00	3.94	358.89±8.17 ^{kl}
KK225	7.00	4.40	389.55±6.39 ^j
KK233	7.00	4.72	476.07±8.66 ⁱ
KK247	7.00	4.02	507.41±20.85 ^h
KK306	7.00	4.12	328.78±7.77 ^{mn}
KK313	7.00	4.05	376.20±11.56 ^{jk}
KK314	7.00	5.41	348.13±8.90 ^{klm}

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test

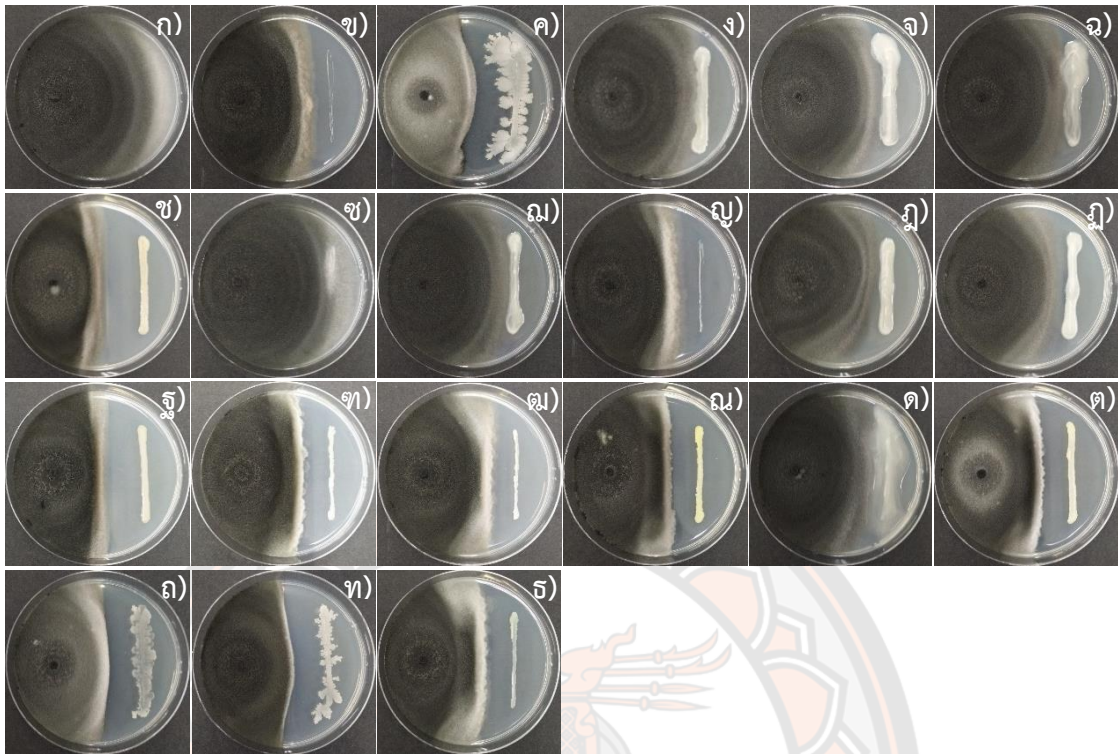
4.4 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Dual culture bioassay

จากการนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีผลการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Curvularia lunata* และ *Bipolaris oryzae* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบด้วยวิธี Dual culture ในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า ไอโซเลต KK024 และ KK281 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *C. lunata* ได้สูง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 58.23 และ 57.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 5, ภาพ 10) ในขณะที่ไอโซเลต KK269 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สูงที่สุด เท่ากับ 56.01 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 6, ภาพ 11) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต มาตรวจสอบการก่อโรคตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561 พบว่า ไอโซเลต KK024, KK269 และ KK281 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งก่อโรคในคนและสัตว์ โดยเป็นเชื้อที่ไม่สามารถวินิจฉัย species ได้

ตาราง 5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Curvularia lunata* โดยวิธี dual culture bioassay

แหล่งอาศัย	ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง*
ราก	KK007	36.59±1.84 ^{defg}
	KK024	58.24±0.82 ^a
	KK039	30.57±2.39 ^{gh}
	KK065	30.78±2.53 ^{gh}
	KK066	30.03±2.41 ^h
	KK067	55.02±1.75 ^{ab}
	KK075	0.80±0.15 ⁱ
	KK077	27.75±0.60 ^h
	KK079	38.99±0.79 ^{cde}
	KK102	30.47±1.80 ^{gh}
ดินบริเวณรอบราก	KK149	32.50±0.84 ^{fgh}
	KK184	53.23±1.64 ^{ab}
	KK225	38.60±11.97 ^{cdef}
	KK231	40.43±0.99 ^{cd}
	KK232	41.83±6.04 ^{cd}
	KK245	33.63±3.65 ^{efgh}
	KK269	50.71±2.68 ^b
	KK275	54.14±1.34 ^{ab}
	KK281	57.91±0.42 ^a
	KK306	44.85±0.94 ^c

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test



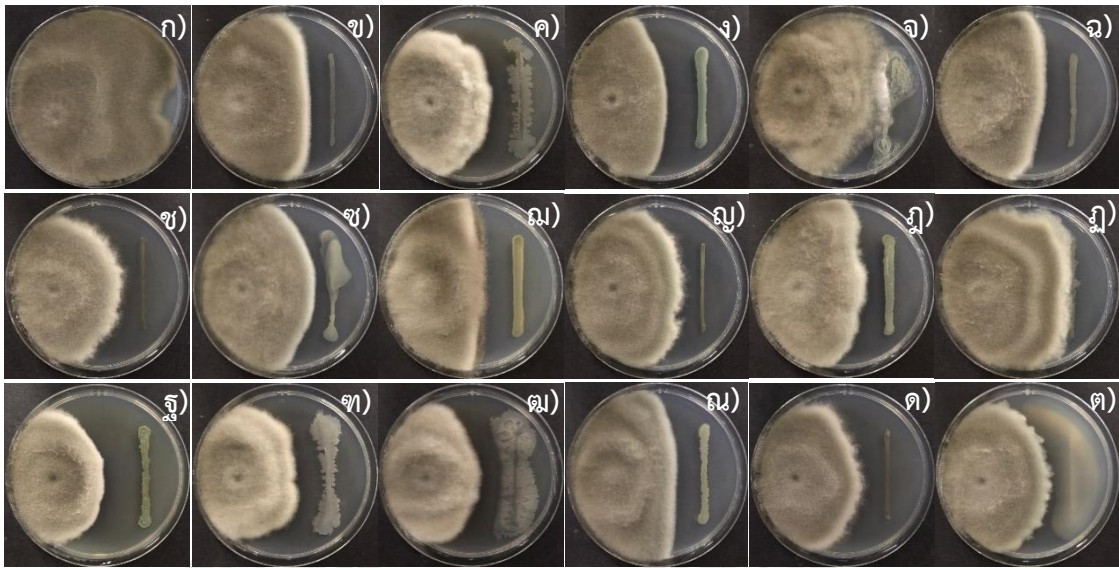
ภาพ 10 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. lunata*

ชุดควบคุม (ก), KK007 (ข), KK024 (ค), KK039 (ง), KK065 (จ), KK066 (ฉ), KK067 (ช),
 KK075 (ซ), KK077 (ฌ), KK079 (ญ), KK102 (ฎ), KK149 (ฏ), KK184 (ฐ), KK225 (ฑ),
 KK231 (ฒ), KK232 (ณ), KK245 (ด), KK269 (ต), KK275 (ถ), KK281 (ท) และ KK306 (ธ)

ตาราง 6 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Bipolaris oryzae* โดยวิธี dual culture bioassay

แหล่งอาศัย	ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง*
ราก	KK007	45.06±2.97 ^{bcde}
	KK024	45.29±2.57 ^{bcd}
	KK067	52.83±1.84 ^{ab}
	KK074	20.49±8.85 ^s
	KK079	48.80±1.81 ^{abc}
ดินบริเวณรอบราก	KK145	40.32±2.61 ^{def}
	KK146	40.55±2.96 ^{def}
	KK184	51.47±1.56 ^{ab}
	KK191	33.59±1.34 ^f
	KK225	37.59±8.13 ^{ef}
	KK243	23.30±1.16 ^s
	KK269	56.01±3.14 ^a
	KK275	47.98±0.47 ^{bcd}
	KK281	46.62±5.36 ^{bcd}
	KK306	43.55±5.82 ^{cde}
	KK313	37.47±2.16 ^{ef}
KK314	46.21±4.44 ^{bcd}	

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test



ภาพ 11 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *B. oryzae*

ชุดควบคุม (ก), KK007 (ข), KK024 (ค), KK067 (ง), KK074 (จ), KK079 (ฉ), KK145 (ช),
 KK146 (ซ), KK184 (ณ), KK191 (ญ), KK225 (ฎ) and KK243 (ฏ), KK269 (ฐ), KK275 (ฑ),
 KK281 (ฒ), KK306 (ณ), KK313 (ด) และ KK314 (ต)

4.5 การผลิตไลโปเปปไทด์จากแบคทีเรียไอโซเลต KK281 เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

4.5.1 การสกัดและการทำไลโปเปปไทด์ให้บริสุทธิ์

จากการสกัดสารไลโปเปปไทด์จากแบคทีเรียไอโซเลต KK281 ในอาหารเหลว MSLM ทั้งหมด 9 ลิตร พบว่า ได้น้ำหนักแห้ง เท่ากับ 514.6 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละผลผลิต (% yield) เท่ากับ 5.72 และสารสกัดหยาบไลโปเปปไทด์มีลักษณะเป็นสีเหลืองและแห้ง

4.5.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี paper disc diffusion method

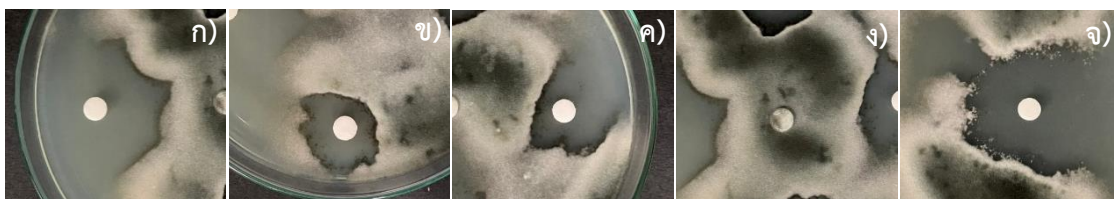
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Curvularia lunata* ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี paper disc diffusion method โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว MSLM ทำการสกัดด้วยเมทานอลและทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า หลังจากทำการทดสอบเป็นเวลา 96 ชั่วโมง สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ มีบริเวณวงใสยับยั้งเชื้อรา (ภาพ 12) และที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณวงใสยับยั้งมากที่สุดเท่ากับ 39.93 ± 2.14 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และชุดควบคุม (Prochoraz) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 7)

ตาราง 7 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสยับยั้งเชื้อรา *Curvularia lunata* ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี paper disc diffusion method ที่ 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสยับยั้งเชื้อรา* (มิลลิเมตร)
3.125	18.10 ± 2.56^c
6.25	17.20 ± 0.87^c
12.5	39.93 ± 2.14^a
70% ethanol	-
Prochoraz 500 ppm	29.65 ± 0.77^b

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test

- ไม่เกิดวงใสยับยั้ง



ภาพ 12 แสดงบริเวณวงใสยับยั้งเชื้อรา *C. lunata* ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี Paper disc diffusion method ที่ 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ก) 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ข) 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค) 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ง) 70% ethanol จ) Prochloraz 500 ppm

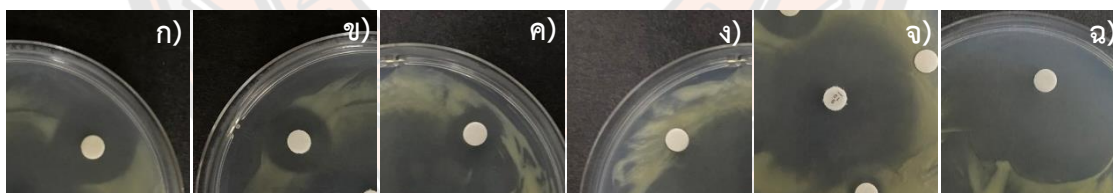
4.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดไลโปเปปไทด์ด้วยวิธี paper disc diffusion method

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี paper disc diffusion method โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว MSLM ทำการสกัดด้วยเมทานอลและนำมาทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า หลังจากทำการทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ มีบริเวณวงใสยับยั้งแบคทีเรีย (ภาพ 13) และที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณวงใสยับยั้งมากที่สุดเท่ากับ 19.33 ± 1.29 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดทดสอบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่า ความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xoo คือ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 8)

ตาราง 8 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสยับยั้งแบคทีเรีย Xoo ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี paper disc diffusion method ที่ 72 ชั่วโมง และผลความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC)

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลาง บริเวณวงใสยับยั้ง* (มิลลิเมตร)	MIC (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)
Crude lipopeptides (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.5625	0.00±0.00 ^f	3.125
	3.125	12.47±1.23 ^e	
	6.25	16.43±0.50 ^d	
	12.5	19.33±1.29 ^c	
Streptomycin (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	1	42.50±0.30 ^b	
Chloramphenicol (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	1	53.20±0.60 ^a	

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์มีอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple's Range Test

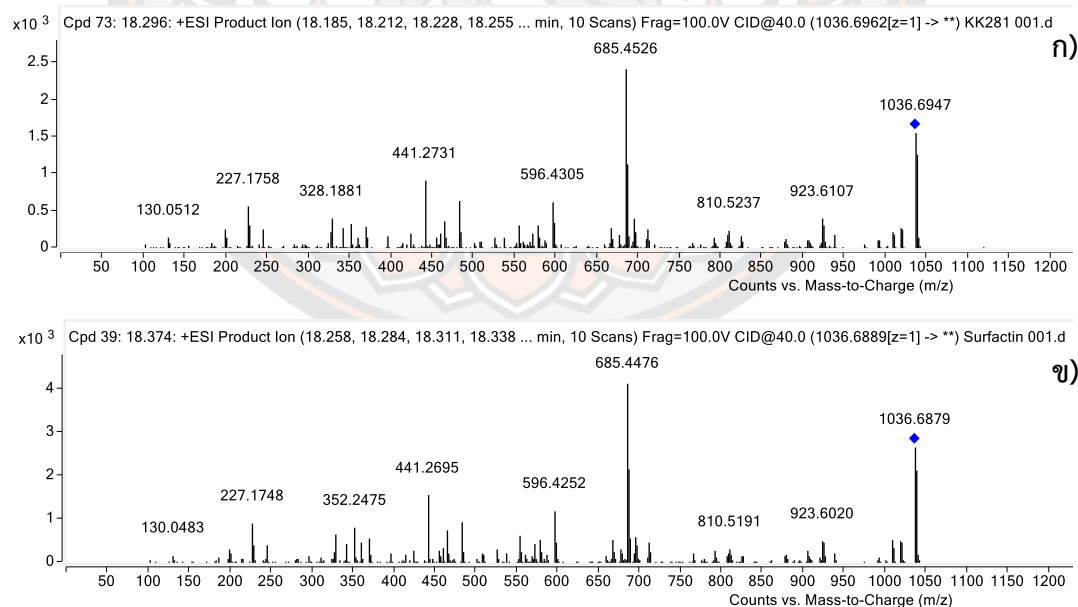


ภาพ 13 แสดงบริเวณวงใสยับยั้งแบคทีเรีย Xoo ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ด้วยวิธี Paper disc diffusion method ที่ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ก) 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ข) 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค) 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ง) 1.5625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จ) Streptomycin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ฉ) Chloramphenicol 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.6 การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) analysis of lipopeptides

จากการนำสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 มาวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีในเชิงคุณภาพเบื้องต้นด้วยเทคนิค Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์แยกตามส่วนผลิตไอออน (ionization source) แบบ electrospray ionization (ESI) ในแบบบวก ESI (+) ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ 0.1% v/v formic acid ในน้ำ (solvent A) และใน acetonitrile (solvent B) โดยในการวิเคราะห์จะใช้วิธีเทียบกับสารมาตรฐาน surfactin จากผลการวิเคราะห์พบอนุพันธ์ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ในนาที่ที่ 18.296 (Retention time = 18.296) ดังภาพ 14 ก พบ target mass (m/z) เท่ากับ 1036.6947 $[M+H]^+$ มีโครมาโทแกรมการแตกตัวของอนุพันธ์ประกอบด้วยพิกที่ m/z 130.0512, 227.1758, 328.1881, 441.2731, 596.4305, 685.4526, 810.5237 และ 923.6107 ซึ่งสอดคล้องกับสารมาตรฐาน surfactin ในนาที่ที่ 18.374 (Retention time = 18.374) ดังภาพ 14 ข พบ target mass (m/z) เท่ากับ 1036.6879 $[M+H]^+$ ซึ่งมีโครมาโทแกรมการแตกตัวของอนุพันธ์ประกอบด้วยพิกที่ m/z 130.0483, 227.1748, 352.2475, 441.2695, 596.4252, 685.4476, 810.5191 และ 923.6020



ภาพ 14 แสดงการแตกตัวของอนุพันธ์ของสารที่วิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS

(ก) สารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 และ (ข) สารมาตรฐาน surfactin

4.7 การพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates

จากผลการทดสอบร้อยละการงอกของเมล็ดข้าว ความยาวรากต้นอ่อน และความสูงต้นอ่อน โดยทำการแช่เมล็ดข้าวในกรรมวิธี ได้แก่ การแช่เมล็ดข้าวด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียไอโซเลต KK018 การแช่ด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียไอโซเลต KK275 การแช่ด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียไอโซเลต KK018 ร่วมกับแบคทีเรียไอโซเลต KK275 และชุดควบคุมคือ น้ำกลั่น ทำการเก็บผลการทดสอบในวันที่ 7 และ 14 พบว่า ทุกกรรมวิธีให้ผลการงอกของเมล็ด ความยาวรากต้นอ่อน และความสูงต้นอ่อนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตาราง 9) และนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต มาตรวจสอบการก่อโรคตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561 พบว่า ไอโซเลต KK018 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งไม่อยู่ในบัญชีรายการเชื้อโรค ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข และได้รับคำแนะนำจากทางคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสถาบัน (IBC) กล่าวว่า ไอโซเลต KK018 ยังไม่พบการก่อโรคในคนและสัตว์จึงให้มีระดับความเสี่ยง (Risk group) อยู่ในระดับที่ 1 และ KK275 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งก่อโรคในคนและสัตว์ โดยเป็นเชื้อที่ไม่สามารถวินิจฉัย species ได้

ตาราง 9 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าว ความยาวราก และความสูงของต้นอ่อนหลังจากการทดสอบ 7 และ 14 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด		ความยาวราก (ซม.)		ความสูงของต้นอ่อน (ซม.)	
	เวลา (วัน)					
	7	14	7	14	7	14
น้ำกลั่น	84.00	84.25	4.15	4.01	3.77	5.01
KK018	84.00	85.25	3.59	3.71	4.08	5.04
KK275	86.00	87.50	4.16	4.78	3.96	5.03
KK018+KK275	84.25	85.25	4.73	4.74	3.72	4.98
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	4.05	3.65	14.13	14.53	7.74	3.43

หมายเหตุ: ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี Least significant significance (LSD)

4.8 การตรวจนับปริมาณของแบคทีเรีย (Colony Forming Unit; CFU)

จากการตรวจนับปริมาณของแบคทีเรียที่เรียกค่าความขุ่นของเชื้อ (OD₆₀₀ เท่ากับ 1) และทำการเจือจางที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-4} - 10^{-6} พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต KK018, KK275 และ KK281 มีปริมาณของแบคทีเรียเท่ากับ 4.73×10^6 , 1.48×10^7 และ 9.6×10^5 CFU/ml ตามลำดับ (ตาราง 10)

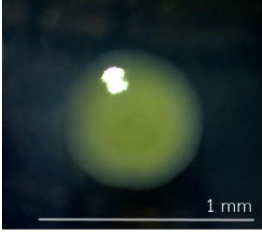

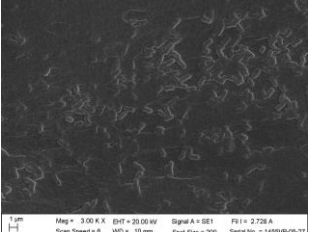


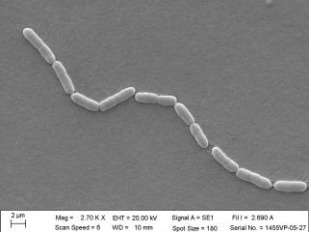


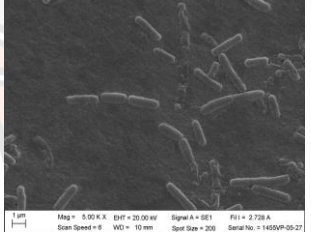
ตาราง 10 การตรวจนับปริมาณของแบคทีเรีย

ไอโซเลต (ระดับความเจือจาง)	ปริมาณของแบคทีเรีย (โคโลนี)			ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร
	1	2	3	
KK018 (10^{-5})	46	59	37	4.73×10^6
KK275 (10^{-5})	160	155	172	1.48×10^7
KK281 (10^{-4})	107	84	108	9.6×10^5

4.9 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบราก

จากการศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวพบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต KK018 และ KK281 และแบคทีเรียแกรมลบ 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต KK007, KK066, KK138 และ KK269 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะรูปร่างโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และศึกษารายละเอียดของโครงสร้างภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่ามีทั้งหมดจำนวน 5 จีโนส ได้แก่ *Bacillus*, *Priestia*, *Enterobacter*, *Pantoea* และ *Acinetobacter* โดยในจีโนส *Bacillus* มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ *Bacillus siamensis* KK281 จีโนส *Priestia* มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ *Priestia megaterium* KK018 จีโนส *Enterobacter* มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ *Enterobacter roggenkampii* KK066 จีโนส *Pantoea* มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ *Pantoea stewartii* KK007 และ *Pantoea allii* KK269 และจีโนส *Acinetobacter* มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ *Acinetobacter soli* KK138 ดังตาราง 11 และตาราง 12

ตาราง 11 ลักษณะรูปร่างโคโลนี และลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	SEM*
KK007			
KK018			
KK281			

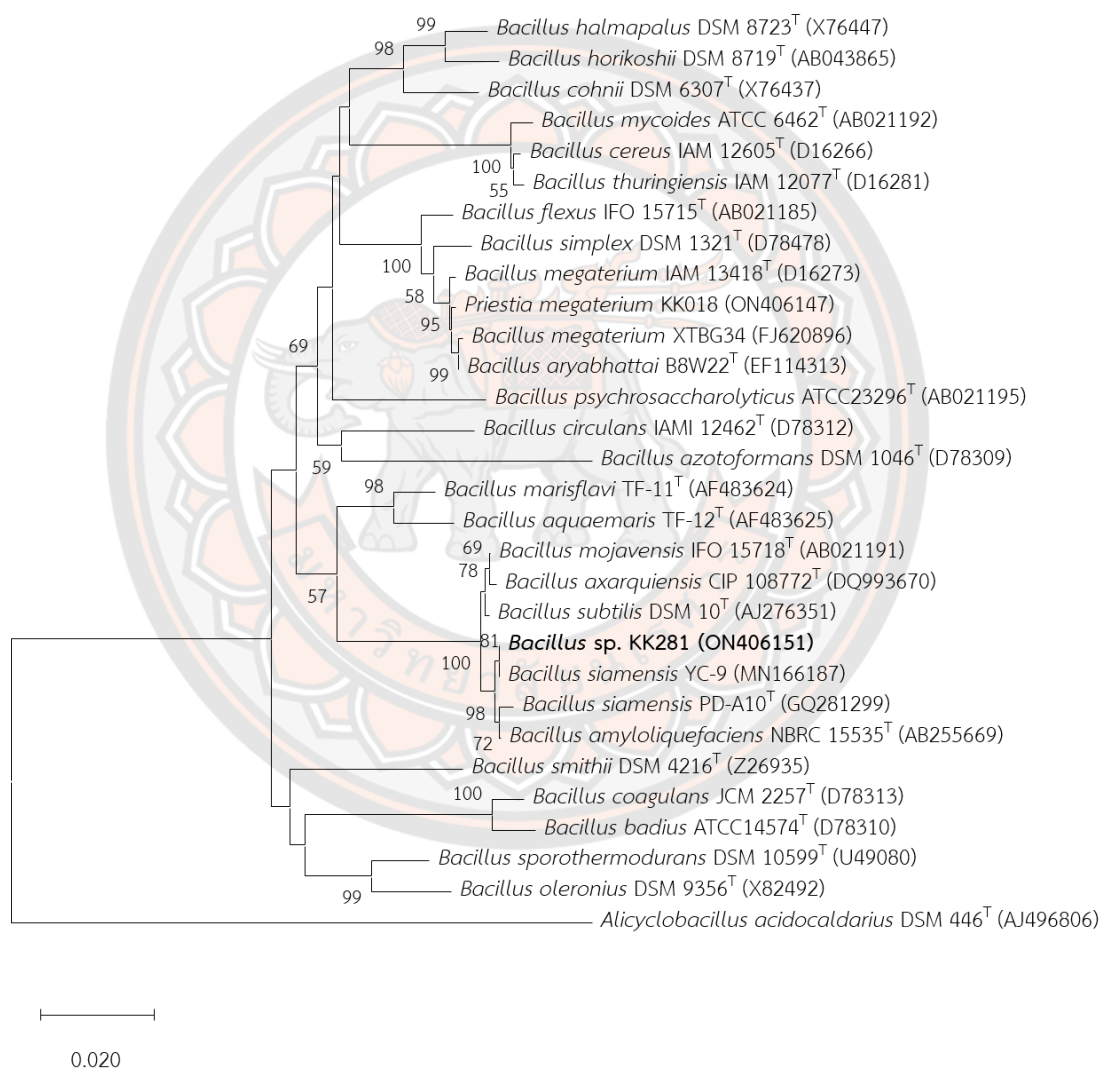
หมายเหตุ: *ศึกษารายละเอียดของโครงสร้างภายนอกของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตาราง 12 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูล EzBioCloud

ไอโซเลต	การเพิ่มปริมาณ	เลขทะเบียน	สายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)*	เลขทะเบียน	แบคทีเรีย
ยีน 16S rRNA (bps)					TBRC	
KK007	1,466	ON406146	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>Indologenes</i> strain LMG 2632	99.45	TBRC 15994	<i>Pantoea stewartii</i>
KK018	1,479	ON406147	<i>Priestia megaterium</i> strain NBRC 15308	99.93	TBRC 15995	<i>Priestia megaterium</i>
KK066	1,400	ON406148	<i>Enterobacter roggenkampii</i> strain EN-117	99.79	TBRC 15999	<i>Enterobacter</i> sp.
KK138	1,464	ON406149	<i>Acinetobacter soli</i> strain CIP 110264	100.00	TBRC 15996	<i>Acinetobacter soli</i>
KK269	1,468	ON406150	<i>Pantoea allii</i> strain strain LMG 24248	99.04	TBRC 15997	<i>Pantoea</i> sp.
KK281	1,473	ON406151	<i>Bacillus siamensis</i> strain KCTC 13613	99.86	TBRC 15998	<i>Bacillus</i> sp.

หมายเหตุ : *คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในการเปรียบเทียบกันโดยใช้ BLASTN

จากผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม MEGA X โดยใช้แบบจำลองแผนภูมิของ neighbor-joining และวิเคราะห์แผนภูมิทางสถิติด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต KK281 มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* YC-9 (MN166187) (ภาพ 15) จึงสามารถระบุแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต KK281 เป็น *B. siamensis*



ภาพ 15 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต KK281 สร้างด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) โดยกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 replications

จากผลการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB และเมื่อนำไปแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป apiweb™ ที่ 24 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์ ไอโซเลต KK018 จัดจำแนกเป็น *Bacillus megaterium* โดยมีเปอร์เซ็นต์การจัดจำแนก (% ID) 99.0 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 13) ส่วนแบคทีเรียรอบราก ไอโซเลต KK275 จัดจำแนกเป็น *Bacillus amyloliquefaciens* โดยมีเปอร์เซ็นต์การจัดจำแนก (% ID) 99.4 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 14)

ตาราง 13 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลต KK018 ด้วยชุดทดสอบ API 50CH

Characteristics	KK018	Characteristics	KK018
Gram Test	Gram +	Amygdaline	-
Straight rod	+	Arbutine	+
Endospore formation	+	Esculine	+
Motility	+	Salicine	-
Facultative anaerobic	+	Cellubiose	-
Glycerol	-	Maltose	+
Erythritol	-	Lactose	-
D-Arabinose	-	Melibiose	+
L-Arabinose	+	Saccharose	+
Ribose	-	Trehalose	+
D-Xylose	+	Inuline	+
L-Xylose	-	Melezitose	-
Adonitol	-	D-Raffinose	+
β -methyl-xyloside	-	Amidon	+
Galactose	+	Glycogene	+
D-Glucose	+	Xylitol	-
D-Fructose	+	β -Gentiobiose	+
D-Manose	-	D- Turanose	-
L-Sorbose	-	D-Lyxose	-
Rhamnose	-	D- Tagatose	-
Dulcitol	-	D-Fucose	-

Characteristics	KK018	Characteristics	KK018
Inosital	-	L-Fucose	-
Manitol	+	D- arabitol	-
Sorbitol	-	L- arabitol	-
α -methyl-D-Mannoside	-	Gluconate	-
α -methyl-D-Glucoside	-	2- ceto-gluconate	-
NAcetyl glucosamine	+	5-ceto-gluconate	-

ตาราง 14 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลต KK275 ด้วยชุดทดสอบ API 50CH

Characteristics	KK275	Characteristics	KK275
Gram Test	Gram +	Amygdaline	+
Straight rod	+	Arbutine	-
Endospore formation	+	Esculine	+
Motility	+	Salicine	+
Facultative anaerobic	+	Cellubiose	+
Glycerol	+	Maltose	+
Erythritol	-	Lactose	+
D-Arabinose	-	Melibiose	+
L-Arabinose	+	Saccharose	+
Ribose	+	Trehalose	+
D-Xylose	+	Inuline	-
L-Xylose	-	Melezitose	-
Adonitol	-	D-Raffinose	+
β -methyl-xyloside	-	Amidon	+
Galactose	-	Glycogene	+
D-Glucose	+	Xylitol	-
D-Fructose	+	β -Gentiobiose	-
D-Manose	+	D- Turanose	-
L-Sorbose	-	D-Lyxose	-

Characteristics	KK275	Characteristics	KK275
Rhamnose	-	D- Tagatose	-
Dulcitol	-	D-Fucose	-
Inosital	+	L-Fucose	-
Manitol	+	D- arabitol	-
Sorbitol	+	L- arabitol	-
α -methyl-D-Mannoside	-	Gluconate	-
α -methyl-D-Glucoside	+	2- ceto-gluconate	-
NAcetyl glucosamine	-	5-ceto-gluconate	-

4.10 การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร้ลิมฟ์วเพชชบูรณ์ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในระดับโรงเรือน

4.10.1 การเจริญเติบโตของข้าว

จากการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวไร้ลิมฟ์วเพชชบูรณ์ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในระดับโรงเรือน เมื่อพิจารณาจากค่าความสูงของต้นข้าวทุกๆ 2 สัปดาห์จนถึงระยะเก็บเกี่ยว ผลการทดลองพบว่า ปัจจัยที่ใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบราก ปัจจัยการใส่ปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ และปัจจัยการใช้แบคทีเรียร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ส่งผลให้ความสูง (ตาราง 15) จำนวนหน่อตอก (ตาราง 16) พื้นที่ใบ และจำนวนใบ (ตาราง 17) ของข้าวไร้ลิมฟ์วเพชชบูรณ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.10.2 การประเมินผลผลิตของข้าวไร้ลิมฟ์วเพชชบูรณ์หลังเก็บเกี่ยว

จากการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวไร้ลิมฟ์วเพชชบูรณ์ด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในระดับโรงเรือนต่อผลผลิตของข้าวไร้ลิมฟ์วเพชชบูรณ์หลังเก็บเกี่ยวพบว่า ปัจจัยการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบราก ปัจจัยด้านการใส่ปุ๋ยและปัจจัยการใช้แบคทีเรียร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ส่งผลให้ผลผลิตหลังเก็บเกี่ยว ได้แก่ จำนวนรวงต่อต้น ความยาวรวง จำนวนระแง้ จำนวนช่อดอก %เมล็ดร่วง %เมล็ดลีบ %เมล็ดดี จำนวนเมล็ดทั้งหมดต่อรวง น้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด (กรัม) น้ำหนักข้าวต่อต้น (ตาราง 18) น้ำหนักต้นสด น้ำหนักต้นแห้ง น้ำหนักรากสด และน้ำหนักรากแห้ง (ตาราง 19) ของข้าวไร้ลิมฟ์วเพชชบูรณ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 15 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอรากต่อความสูงของข้าวไร้มันม่วงเพชรบูรณ์

กรรมวิธี	สัปดาห์ที่ 2	4	6	8	10	12	14	16	18	เก็บเกี่ยว
1	35.42	52.40	73.40	96.80	108.20	113.20	116.80	116.80	100.20	101.30
2	38.50	55.80	75.20	98.60	110.60	117.20	121.80	122.20	99.40	102.90
3	36.34	55.80	73.40	98.20	107.60	111.80	120.20	120.80	104.40	102.80
4	38.22	55.00	75.60	103.40	112.00	119.20	127.40	128.00	106.40	104.10
5	37.34	54.40	72.80	101.40	113.60	116.20	123.60	125.20	102.00	102.60
6	37.56	53.20	74.00	103.40	111.80	115.40	126.00	126.00	107.80	99.60
7	36.62	53.20	71.40	99.40	108.80	115.00	121.80	122.60	104.00	100.68
8	37.02	58.20	79.60	102.90	112.80	112.60	122.80	122.40	101.20	101.00
9	36.22	53.20	69.48	99.80	110.00	114.60	113.80	113.80	102.60	100.80
10	35.58	51.00	73.20	94.00	108.20	111.00	118.00	117.80	103.20	96.63
11	37.64	55.80	76.80	99.60	110.40	114.00	122.80	122.00	100.40	99.80
12	33.74	53.20	73.40	97.20	109.40	111.40	110.00	110.40	93.00	90.00
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	8.91	9.67	8.58	7.48	6.25	6.70	9.09	8.83	9.35	9.59

หมายเหตุ: ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 16 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอรากต่อจำนวนหน่อตอกของข้าวไร้มิวพชรบูรณ์

กรรมวิธี	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 10	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 14	สัปดาห์ที่ 16	สัปดาห์ที่ 18
1	1.00	3.20	7.60	9.20	9.00	8.80	8.80	6.40
2	1.00	4.40	8.00	8.80	7.60	7.40	7.40	6.80
3	0.40	3.60	7.80	9.20	8.80	7.80	7.00	6.40
4	0.80	3.80	7.40	8.60	8.00	7.80	7.80	5.60
5	0.60	3.40	7.80	9.80	7.60	7.40	7.00	6.80
6	0.80	3.40	8.40	9.20	8.80	8.40	8.20	7.20
7	0.80	3.20	7.20	8.80	8.20	8.20	8.20	7.40
8	1.40	4.00	8.20	9.60	9.20	8.80	8.80	7.00
9	0.80	3.60	7.60	9.00	8.00	7.60	7.00	6.40
10	0.80	3.80	7.20	10.20	9.40	9.20	8.80	6.60
11	1.00	4.20	8.20	9.00	6.80	6.60	6.20	5.80
12	0.80	3.00	8.40	9.00	7.80	7.00	7.00	6.60
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	72.84	25.12	20.30	19.47	19.32	19.70	21.15	18.81

หมายเหตุ: ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 17 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอรากต่อพื้นที่ใบและจำนวนใบของข้าวไร้ลิ้มผัวเพชรบูรณ์

กรรมวิธี	พื้นที่ใบ	จำนวนใบ
1	80.57	31.40
2	85.78	28.20
3	90.72	28.80
4	88.08	27.00
5	78.00	25.80
6	89.93	31.60
7	92.63	33.00
8	90.68	32.80
9	82.85	30.80
10	89.14	31.60
11	87.31	27.40
12	85.51	25.40
F-test	ns	ns
CV (%)	14.01	20.18

หมายเหตุ: ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 18 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอรากต่อผลผลิตของข้าวไร่ลิ้มวัวเพชรบูรณ์

กรรมวิธี	จำนวนรวง	ความยาว รวง (ซม.)	จำนวน ระแงะ	จำนวน ช่อดอก	%เมล็ด ร่วง	%เมล็ดลีบ	%เมล็ดดี	จำนวนเมล็ด ทั้งหมดต่อรวง	น้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด (กรัม)	น้ำหนักข้าว ต่อต้น
1	4.40	24.00	9.80	89.50	1.70	31.13	48.90	71.20	3.27	6.90
2	4.40	23.25	9.10	82.80	1.49	38.35	43.00	69.60	2.81	6.21
3	3.60	22.50	9.70	84.20	0.39	39.72	43.40	71.40	2.32	3.63
4	3.60	23.91	10.40	109.68	1.31	41.01	51.58	92.20	2.64	5.65
5	5.20	24.30	10.10	93.90	0.76	30.41	53.40	76.60	2.77	7.90
6	4.80	24.30	9.90	79.00	0.26	41.70	42.30	71.30	2.38	5.74
7	4.80	23.60	9.30	87.00	0.54	36.29	44.30	69.80	2.73	5.79
8	3.60	22.17	9.67	86.77	0.56	32.87	47.80	71.57	2.16	4.08
9	4.40	23.00	10.10	88.10	0.86	42.71	43.70	77.70	2.55	5.07
10	5.00	22.25	9.38	83.63	0.53	32.76	45.50	68.13	2.88	6.77
11	4.40	23.80	9.90	93.50	1.89	43.98	43.10	75.03	2.06	4.55
12	3.20	24.80	9.20	72.00	0.48	34.51	44.40	68.50	2.70	4.17
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	38.06	9.00	11.50	18.02	133.38	35.41	24.51	18.53	20.92	54.65

หมายเหตุ: ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 19 ผลของการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของข้าวไร้ลิ้มฟัวเพชรบูรณ์

กรรมวิธี	น้ำหนักต้นสด (กรัม)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม)	น้ำหนักรากสด (กรัม)	น้ำหนักรากแห้ง (กรัม)
1	91.40	34.29	77.20	17.91
2	96.80	37.55	92.80	22.84
3	82.20	30.86	99.20	15.89
4	82.80	33.62	76.60	16.97
5	94.00	36.11	90.00	17.59
6	93.40	34.90	122.20	23.00
7	98.20	37.16	120.00	25.61
8	93.40	35.42	100.80	18.35
9	92.80	33.53	107.40	18.19
10	82.60	33.53	101.60	19.31
11	92.40	35.42	116.40	22.47
12	76.60	29.94	109.80	22.70
F-test	ns	ns	ns	ns
CV (%)	17.91	16.80	28.49	33.91

หมายเหตุ: ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5

บทสรุป

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการแยก คัดกรอง และใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากเพื่อเพิ่มผลผลิตของข้าวไร่ลิ้มฟัวเพชรบูรณ์ สามารถสรุปผลการศึกษาดังนี้

1. ในการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากข้าวไร่ลิ้มฟัวเพชรบูรณ์จำนวน 315 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 127 ไอโซเลต และแบคทีเรียรอบรากจำนวน 188 ไอโซเลต และแบ่งตามอาหารได้ดังนี้ 1) อาหาร Luria-Bertani agar (LB) จำนวน 90 ไอโซเลต 2) อาหาร King's B agar จำนวน 82 ไอโซเลต 3) อาหาร Tryptic soya agar (TSA) จำนวน 81 ไอโซเลต และ 4) อาหาร Peat moss extract agar จำนวน 62 ไอโซเลต ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*, *Priestia*, *Enterobacter*, *Pantoea* และ *Acinetobacter*

2. เมื่อทำการคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ลิ้มฟัวเพชรบูรณ์พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต KK074 และ KK077 สามารถผลิต IAA ได้สูง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 362.59 ± 28.02 และ 352.32 ± 13.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3. แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่ให้ค่าดัชนีการละลายของฟอสเฟต (PSI) สูงสุดบนอาหารแข็ง Pikovskaya's medium (PSI) ที่เวลา 3 และ 7 วัน คือ ไอโซเลต KK225 มีค่า PSI เท่ากับ 4.51 และ 7.85 ตามลำดับ และแบคทีเรียไอโซเลต KK007 ให้ค่าการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวเท่ากับ 714.25 ± 12.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. จากการนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีผลการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Curvularia lunata* และ *Bipolaris oryzae* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบด้วยวิธี Dual culture พบว่าไอโซเลต KK024 และ KK281 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *C. lunata* ได้สูง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 58.23 ± 0.82 และ 57.91 ± 0.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลต KK269 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *B. oryzae* สูงที่สุด เท่ากับ 56.01 ± 3.14 เปอร์เซ็นต์

5. จากการนำแบคทีเรียไอโซเลต KK281 ที่ได้จากการคัดกรองแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต IAA การละลาย

ฟอสเฟตในอาหารเหลว และการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค มาทำการผลิตไลโปเปปไทด์และศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion method พบว่าที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณวงใสยับยั้งเชื้อรา *C. lunata* มากที่สุด เท่ากับ 39.93 ± 2.14 มิลลิเมตร และที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณวงใสยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) มากที่สุดเท่ากับ 19.33 ± 1.29 มิลลิเมตร และพบว่า ความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xoo ได้คือ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6. จากการนำสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเชิงคุณภาพเบื้องต้นด้วยเทคนิค Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) พบว่าสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 มีอนุพันธ์และการแตกตัวของอนุพันธ์ สอดคล้องกับสารมาตรฐาน surfactin โดยพบ target mass (m/z) ของสารสกัดหยาบไลโปเปปไทด์ KK281 เท่ากับ 1036.6947 [M+H]⁺ และของสารมาตรฐาน surfactin เท่ากับ 1036.6879 [M+H]⁺ ซึ่งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นนี้ คาดว่าสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 ที่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม surfactin A

7. จากการทดสอบการพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates โดยการแช่เมล็ดข้าวในสารแขวนลอยของไอโซเลต KK018, KK275 และน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการงอกของเมล็ดข้าว ความยาวรากต้นอ่อน และความสูงต้นอ่อนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการแช่เมล็ดข้าวในสารแขวนลอย KK018, KK275 และน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

8. เมื่อนำแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม EzBioCloud พบว่า สามารถระบุจีโนมของแบคทีเรียได้ดังนี้ คือ จีโนม *Bacillus* (ไอโซเลต KK281), จีโนม *Priestia* (ไอโซเลต KK018), จีโนม *Enterobacter* (ไอโซเลต KK066), จีโนม *Pantoea* (ไอโซเลต KK007 และ KK269) และจีโนม *Acinetobacter* (ไอโซเลต KK138) ซึ่งแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลตนี้มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต IAA การละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว และความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคในระดับห้องทดลองและในระดับโรงเรือน

9. จากการศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ล้มผั่วเพชรบูรณ์ในระดับโรงเรือน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) พบว่า กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลต KK018 และ KK275 ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวไร่ล้มผั่วเพชรบูรณ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

5.2 อภิปรายผล

จากการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจากรากและดินบริเวณรอบรากข้าวไร่ล้มผิวเพชรบูรณ์ การคัดกรองแบคทีเรียดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ล้มผิวเพชรบูรณ์ การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค การผลิตไลโปเปปไทด์จากแบคทีเรียไอโซเลต KK281 เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช การวิเคราะห์สารไลโปเปปไทด์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) การพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates และทดสอบหัวเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวพันธุ์ล้มผิวเพชรบูรณ์ในระดับโรงเรือน สามารถอภิปรายผลการวิจัยได้ดังนี้

1. แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่แยกได้จากรากและดินบริเวณรอบรากต้นข้าวไร่ล้มผิวเพชรบูรณ์จำนวน 315 ไอโซเลต โดยสามารถแยกแบคทีเรียรอบรากจากส่วนดินบริเวณรอบรากได้มากกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ เนื่องจากบริเวณรอบรากรวมถึงดินที่อยู่รอบรากพืชเป็นสภาพแวดล้อมที่ซับซ้อนและมีประชากรแบคทีเรียที่หลากหลายทำให้มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์ ซึ่งมีผลดีต่อพืชที่อาศัยทั้งทางตรงและทางอ้อม (Lynch, 1990; Gray and Smith, 2005; Gupta et al., 2015) จากการรายงานพบว่า ความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อต่างๆ และดินบริเวณรอบรากข้าวมีแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่ค่อนข้างหลากหลายอาศัยอยู่ (Kumar et al., 2020) อีกทั้งมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและยังสามารถปกป้องพืชจากเชื้อโรคในดินได้ (Saengsanga, 2018; Afzal et al., 2019) ในการศึกษาพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์ และแบคทีเรียรอบรากที่แยกได้ส่วนมากจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* อย่างไรก็ตาม Sengupta et al. (2017) รายงานว่า แบคทีเรียจีนัส *Bacillus* จะพบมากในตัวอย่างรากในข้าว นอกจากนี้ยังมีการรายงานแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* มีข้อได้เปรียบกว่าแบคทีเรียจีนัสอื่นๆ เนื่องจากมีการสร้างเอนโดสปอร์ ซึ่งสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่พึงประสงค์ได้ และยังมีการนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพและสารควบคุมทางชีวภาพ สำหรับควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (Raaijmakers and Mazzola, 2012)

2. จากการคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) ที่มีการเติม 0.1% L-tryptophan เมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต KK074 และ KK077 ที่สามารถผลิต IAA ได้สูงที่สุด มีความคล้ายคลึงกันสูงกับแบคทีเรียสกุล *Enterobacter* 99.86 % ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bose et al. (2016) รายงานว่า แบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* SN19 ที่แยกได้จากรอบรากพืชตระกูลถั่ว (*Teramnus*

labialis (L. f.)) มีการผลิต IAA สูงสุด เท่ากับ 382.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีการเติม 0.1 % L-tryptophan และจากการศึกษาของ Liu et al. (2020) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus methylotrophicus* DD-1 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากของต้นข้าวมีการผลิต IAA สูงสุดเท่ากับ 87.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม tryptophan ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบทบาทของสารตั้งต้นทริปโตเฟนมีความสำคัญ เนื่องจากมีการผลิต IAA เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติม tryptophan (Patten et al., 2013) จากการศึกษาสามารถนำไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าระดับของ IAA ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ สารอาหาร สภาพการเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อม และความชอบของสารตั้งต้น เป็นต้น (Spaepen et al., 2007; Mandal et al., 2007)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากต่อการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง ซึ่งเป็นวิธีการคัดกรองเบื้องต้นพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง PVK มีค่า Halo: colony ratio อยู่ในช่วง 2.00-6.85 มีการรายงานของ Kumar (2012) อธิบายว่า โซนบริเวณวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียสามารถเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเตสที่เกิดขึ้นโดยแบคทีเรีย สำหรับวิธี molybdate blue color method เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว ในการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย *Pantoea stewartii* KK007 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hu et al. (2010) ซึ่งรายงานว่า แบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *Stewartii* g6 ที่แยกได้จากดินที่มีการเลี้ยงปลาสลับกับการทำนาข้าว (rice-fish pond ecosystem) มีประสิทธิภาพในการละลายของฟอสเฟตสูงเท่ากับ 543.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า pH เท่ากับ 4.84 นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียจีส *Bacillus* ที่แยกได้จากดินบริเวณของต้นข้าวสาลีและมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตสูงเท่ากับ 153.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Kumar et al., 2014) และจากการรายงานของ Borah et al. (2017) ทำการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa*) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (LP31 L03) ให้ค่าการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดเท่ากับ 57.58 ± 0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปกติฟอสฟอรัสที่อยู่ในดินจะมีมาก แต่ไม่เคลื่อนที่ในดินและไม่ละลายน้ำทำให้พืชดูดน้ำไปใช้ได้ยาก โดยธาตุฟอสฟอรัสในดินที่จะเป็นประโยชน์ต่อพืชได้จะต้องอยู่ในรูปของอนุมูลของสารประกอบที่เรียกว่า ฟอสเฟตไอออน คือ $H_2PO_4^-$ และ HPO_4^{2-} และจะต้องละลายได้ทั้งในน้ำและในดิน ซึ่งกลไกหลักในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียมาจากความสามารถของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในการลดค่า pH โดยการปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาจากเซลล์ (Hariprasad and Niranjana, 2009) เช่น กรดกลูโคนิก กรดฟอร์มิก กรดออกซาลิก และกรดซิตริก ซึ่งกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียปล่อยออกมาจะเข้าทำลายโครงสร้างของฟอสเฟตที่ถูกต้อง โดยสามารถละลายแร่ฟอสเฟตได้โดยตรงจาก

การแลกเปลี่ยนประจุลบหรือคีเลตทั้งไอออน Fe และ Al ที่เกี่ยวข้องกับฟอสเฟตทางอ้อมและในที่สุด จะเพิ่มการดูดซึมฟอสฟอรัสของพืช ทำให้ฟอสเฟตเปลี่ยนรูปอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ ได้ โดยในการศึกษานี้ได้ทำการบันทึกค่า pH ของส่วนใบทั้งก่อนและหลังจากการบ่มเชื้อในอาหาร เหลว PVK เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ค่า pH ลดลงหลังจากการบ่มเชื้อในอาหารเหลว แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียอาจผลิตกรดและเกิดการละลายฟอสฟอรัสมากขึ้น อีกทั้งปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการละลาย ฟอสเฟตของแบคทีเรีย เช่น สภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการละลายฟอสเฟต อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน (สมคิด และวิชญา พร, 2560)

4. จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี dual culture bioassay พบว่า *Bacillus* sp. KK024 และ KK281 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia lunata* ได้ดีที่สุดใน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saechow et al. (2018) มีรายงานว่า แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* BAS23 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่ม lipopeptides คือ iturin A ในยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อรา *C. lunata*, *Fusarium semitectum* และ *Helminthosporium oryzae* ที่เป็นสาเหตุโรค เมล็ดต่างในข้าวได้ สำหรับ *Pantoea allii* KK269 นั้น จัดอยู่ในจีนัส *Pantoea* และตระกูล *Enterobacteriaceae* ซึ่งในการศึกษานี้ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Bipolaris oryzae* สูงที่สุด และจากการ ทบทวนวรรณกรรมพบว่า มีการรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียจีนัส *Pantoea* ในการยับยั้งเชื้อรา *B. oryzae* หรือเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวได้น้อย แต่มีการรายงานแบคทีเรียในจีนัสอื่นๆ เช่น จีนัส *Bacillus* โดยในปี 2018 Chiangsin et al. รายงานว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถยับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อรา *B. oryzae* ได้ และในปี 2019 Park et al. รายงานว่า แบคทีเรีย *B. velezensis* GH1-13 สามารถผลิตสาร lipopeptides คือ surfactin ในยับยั้งการเจริญเติบโตของ เส้นใย ของ เชื้อ รา *B. oryzae*, *Gibberella moniliformis*, *Fusarium fujikuroi* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. แบคทีเรียจีนัส *Bacillus* เป็นแหล่งสารควบคุมทางชีวภาพที่สำคัญและใช้กันอย่าง แพร่หลายในการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อก่อโรคในพืช (Ongena and Jacques, 2008; Jayaraj et al., 2009; Liu et al., 2009) เนื่องจากสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ เช่น ยาปฏิชีวนะ ไลโปเปปไทด์ และเอนไซม์ไฮโดรไลติก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเป็นปรปักษ์กันโดยตรงของเชื้อราโรคพืช (Kildea et al. 2008; Yang et al. 2008; Saidi et al. 2009) และจากการรายงานพบว่า สารประกอบไล โปเปปไทด์ที่สำคัญและผลิตโดยจีนัส *Bacillus* ได้แก่ iturin, fengycin และ surfactin (Ongena et al., 2007) ในการศึกษานี้ ได้ทำการทดสอบการผลิตไลโปเปปไทด์จากแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ด้วยวิธี Paper disc diffusion method พบว่า *Bacillus* sp. KK281 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *C. lunata*

และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ได้ และที่ความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xoo ได้คือ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

อย่างไรก็ดีบทบาทของไลโปเปปไทด์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคในข้าว เช่น โรคไหม้ข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* ซึ่งมีรายงานการวิจัยของ Zhang et al. (2022) พบว่า *Bacillus velezensis* GS-1 สามารถผลิตสารประกอบไลโปเปปไทด์ ได้แก่ surfactin, fengycin และ plantazolicin และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *M. oryzae* ที่ทำให้เกิดโรคไหม้ในข้าวได้ โดยอาศัยกลไกควบคุมการแสดงออกของยีน นอกจากนี้บทบาทของไลโปเปปไทด์ในการยับยั้งแบคทีเรีย Xoo สาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว นั้นพบว่า Li et al. ในปี 2016 ได้ทำการทดสอบ lipopeptide AXLP14 กลุ่ม surfactin ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* B014 ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืชมาทำการทดสอบกิจกรรมต้านแบคทีเรีย Xoo 102 ด้วยวิธี paper disc method พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย Xoo 102 เท่ากับ 1.25 และ 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.613 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง biofilm ของ Xoo 102 ที่ก่อให้เกิดโรคขอบใบแห้งในข้าวอย่างรุนแรง ในบางการศึกษายังมีการศึกษาคุณสมบัติของ *Bacillus* ที่แยกได้จาก phyllosphere และ rhizosphere เพื่อใช้ในการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าว (El-shakh et al., 2015) ซึ่งเป็นการควบคุมโดยใช้ชีววิธี

6. ในการศึกษาได้ทำการระบุสารประกอบที่มีอยู่ในสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเชิงคุณภาพเบื้องต้นด้วยเทคนิค Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) พบว่า สารสกัดหยาบไลโปเปปไทด์ KK281 มีอนุพันธ์และการแตกตัวของอนุพันธ์สอดคล้องกับสารมาตรฐาน surfactin ซึ่งแสดงการมีอยู่ของสารประกอบ surfactin ด้วยค่า m/z เท่ากับ 1036 ($M+H^+$) เมื่อสังเกตรูปแบบการแตกตัวของอนุพันธ์ของตัวอย่างสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 จะพบว่า ที่การแตกตัวของอนุพันธ์พิกที่ m/z 328.1881 จะแตกต่างกับสารมาตรฐาน surfactin เพียงพิกเดียว (m/z 352.2475) และจากรูปแบบการแตกตัวของอนุพันธ์ของสารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 พบว่า มีรูปแบบการแตกตัวของอนุพันธ์คล้ายคลึงกับรายงานของ Moro et al (2018) วิเคราะห์ว่า เป็นสารไลโปเปปไทด์กลุ่ม surfactin ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* MO4B นอกจากนี้ de Faria et al (2011) รายงานว่าสาร surfactin ที่บริสุทธิ์จาก *Bacillus subtilis* LSFM-05 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีกลูโคส สารสกัดจากยีสต์ และแอมโมเนียมไนเตรต เป็นสารตั้งต้นจะมีมวล ESI สเปกตรัมของ m/z 1022, 1036, 1044 และ 1058 และมีรายงานว่า โดยทั่วไปสาร surfactin ส่วนใหญ่ที่อยู่ในตระกูล cyclic lipopeptide ผลิตโดย *Bacillus* spp. (Mehetre et al., 2019) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในการศึกษา สารสกัดไลโปเปปไทด์ KK281 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

7. จากการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ KK018 และ KK275 ในการทดสอบการพิสูจน์การก่อโรคในข้าวด้วยวิธี Koch's postulates แสดงให้เห็นว่ากรรมวิธีที่ใช้สารแขวนลอยไอโซเลต KK018 ไอโซเลต KK275 และน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ส่งผลให้การงอกของเมล็ดข้าว ความยาวรากต้นอ่อน และความสูงต้นอ่อนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในระหว่างการศึกษาได้มีการสังเกตว่า เมล็ดข้าวบางเมล็ดมีการเกิดโรคจากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยมีเส้นใยสีขาวของเชื้อราและลักษณะเป็นเมือกๆ ของแบคทีเรียรอบๆ เมล็ดข้าวในทุกกรรมวิธี ซึ่งคาดว่าเกิดจากปัจจัยภายนอกในระหว่างบันทึกผลการทดลอง และการใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ในระดับโรงเรือน แสดงให้เห็นว่า กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต KK018, ไอโซเลต KK275 และการใช้แบคทีเรียร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ทำให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ อาจเกิดจากพื้นที่ปลูกข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ที่ไม่เหมาะสม จุลินทรีย์ที่ใช้หรือปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม รวมถึงโรคและแมลงศัตรูของข้าวในช่วงระยะเก็บเกี่ยวทำให้ผลผลิตของข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ลดลงได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียเพิ่มเติมก่อนนำไปทำการทดสอบในระดับโรงเรือน เช่น การทนทานต่อแสงยูวี ความร้อน การมีชีวิตรอดในดิน ความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต เป็นต้น
2. ควรทำการศึกษาในระดับโรงเรือนและในระดับแปลงปลูกอย่างน้อย 3 ปี เพื่อใช้ข้อมูลที่ได้ในการตัดสินใจก่อนนำไปพัฒนาเป็นต้นแบบปุ๋ยชีวภาพและสารชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในการเพาะปลูกข้าวไร่ลุ่มผั่วเพชรบูรณ์ต่อไป

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- Afzal, I., Iqrar, I., Shinwari, Z. K., & Yasmin, A. (2017). Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth Regulation*, 81(3), 399-408.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S. & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research*, 221, 36-49.
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2012). Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1139-1144.
- Arima, K., Kakinuma, A., & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31(3), 488-494.
- Arshad, H. M. I., Khan, J. A., Naz, S., Khan, S. N., & Akram, M. (2009). Grain discoloration disease complex: a new threat for rice crop and its management. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 21(1), 31-36.
- Bai, Y., D'Aoust, F., Smith, D. L. & Driscoll, B. T. (2002). Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian journal of microbiology*, 48(3), 230-238.
- Baldani, V. D., Baldani, J. I. & Döbereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5-6), 485-491.
- Balgude, Y. S. & Gaikwad, A. P. (2016). Integrated management of grain discoloration disease in paddy. *Journal of Rice Research*. 9, 59-62.
- Benizri, E., Baudoin, E. & Guckert, A. (2001). Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol science and technology*, 11(5), 557-574.

- Borah, M., Das, P., Pathak, S. S., Boro, R. C., & Barooah, M. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from *Oryza sativa*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 2713-21.
- Bose, A., Kher, M. M., Nataraj, M., & Keharia, H. (2016). Phytostimulatory effect of indole-3-acetic acid by *Enterobacter cloacae* SN19 isolated from *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng rhizosphere. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 128-137.
- Busch, U., & Nitschko, H. (1999). Methods for the differentiation of microorganisms. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2), 263-278.
- Carrell, A. A. & Frank, A. C. (2014). *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology*, 5, 333.
- Chaturvedi, H., Singh, V., & Gupta, G. (2016). Potential of bacterial endophytes as plant growth promoting factors. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 7(9), 1-6.
- Chen, X., Lu, Y., Shan, M., Zhao, H., Lu, Z., & Lu, Y. (2022). A mini-review: Mechanism of antimicrobial action and application of surfactin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(8), 143.
- Chiangsin, R., Keesee, C., & Sangchote, S. (2018). Biological control of *Bipolaris oryzae* with *Bacillus subtilis* and the development of a formulation for rice seed treatment. *Thai Journal of Agricultural Science*, 51(3), 139-151.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Ait Barka, E. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1685-1693.
- Coutinho, B. G., Licastro, D., Mendonça-Previato, L., Câmara, M., & Venturi, V. (2015). Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(1), 10-21.
- de Faria, A. F., Teodoro-Martinez, D. S., de Oliveira Barbosa, G. N., Vaz, B. G., Silva, Í. S., Garcia, J. S., ... & Durrant, L. R. (2011). Production and structural characterization

- of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46(10), 1951-1957.
- Defez, R., Andreozzi, A., & Bianco, C. (2017). The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants. *Microbial Ecology*, 74(2), 441-452.
- Ding, L. J., Cui, H. L., Nie, S. A., Long, X. E., Duan, G. L. & Zhu, Y. G. (2019). Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 95(5), fiz040.
- Dong, Y., Li, H., Rong, S., Xu, H., Guan, Y., Zhao, L., ... & Xu, Z. (2019). Isolation and evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* Rdx5 as a potential biocontrol agent against *Magnaporthe oryzae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 408-418.
- Dubois, M., Van den Broeck, L. & Inzé, D. (2018). The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in plant science*, 23(4), 311-323.
- Elazegui, F., & Islam, Z. (2003). Diagnosis of common diseases of rice. *International Rice Research Institute*.
- Emmert, E. A., & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology letters*, 171(1), 1-9.
- Eslava, C., Romeu, B., Salazar, P., Hernández, U., Rojas, N., Navarro, A., & Lugo, D. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1-9.
- Etesami, H., Mirsyed Hosseini, H., & Alikhani, H. A. (2014). In planta selection of plant growth promoting endophytic bacteria for rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of soil science and plant nutrition*, 14(2), 491-503.
- Etminani, F., & Harighi, B. (2018). Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild pistachio trees. *The plant pathology journal*, 34(3), 208.
- Feakin, S.D. (1971). Pest control in rice. *New Zealand journal of agriculture research* pp. 69-74.

- Findlay, J. A., Li, G. & Johnson, J. A. (1997). Bioactive compounds from an endophytic fungus from eastern larch (*Larix laricina*) needles. *Canadian journal of chemistry*, 75(6), 716-719.
- Gamalero, E., & Glick, B. R. (2015). Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiology*, 169(1), 13-22.
- Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., & Schumacher, J. (2019). Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-protocol*, 9(9), e3230-e3230.
- Ghoze, R. L. M., Ghatge, M. B., & Subramamanyan, V. (1960). Rice in India (revised edition). New Delhi, India, *Indian Council of Agricultural Research*.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39.
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.
- Goswami, S. K., & Thind, T. S. (2018). Efficacy of fungicides against grain discoloration of rice under natural conditions. *Indian Phytopathology*, 71(3), 453-455.
- Gray, E. J. & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412.
- Guo, L. D., Hyde, K. D. & Liew, E. C. Y. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *The New Phytologist*, 147(3), 617-630.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7(2), 096-102.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. & Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914.

- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S. & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471.
- Hariprasad, P., & Niranjana, S. R. (2009). Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and Soil*, 316(1), 13-24.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273-290.
- Hu, X. J., Li, Z. J., Cao, Y. C., Zhang, J., Gong, Y. X., & Yang, Y. F. (2010). Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. *Aquaculture international*, 18(6), 1079-1091.
- Hussain, T., & Khan, A. A. (2022). Biocontrol prospective of *Bacillus siamensis*-AMU03 against Soil-borne fungal pathogens of potato tubers. *Indian Phytopathology*, 75(1), 179-189.
- Jetiyanon, K. & Plianbangchang, P. (2012). Potential of *Bacillus cereus* strain RS87 for partial replacement of chemical fertilisers in the production of Thai rice cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(5), 1080-1085.
- Ji, S. H., Gururani, M. A. & Chun, S. C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological research*, 169(1), 83-98.
- Jiang, J., Gao, L., Bie, X., Lu, Z., Liu, H., Zhang, C., ... & Zhao, H. (2016). Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. *BMC microbiology*, 16, 1-14.
- John Bullied, W., Buss, T. J. & Kevin Vessey, J. (2002). *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: field studies. *Canadian journal of plant science*, 82(2), 291-298.
- Jumpathong, J., Nuengchamnon, N., Masin, K., Nakaew, N., & Suphrom, N. (2019). Thin Layer Chromatography-Bioautography Assay for Antibacterial Compounds from

- Streptomyces* sp. TBRC 8912, a Newly Isolated Actinomycin D Producer. *Chiang Mai Journal of Science*, 46(5), 839-849.
- Kalayu, G. (2019). Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 1-7.
- Kamnev, A. A., Shchelochkov, A. G., Perfiliev, Y. D., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (2001). Spectroscopic investigation of indole-3-acetic acid interaction with iron (III). *Journal of molecular structure*, 563, 565-572.
- Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, S., & Khosravi, V. (2012). Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 297-305.
- Kim, P. I., Ryu, J. W., Kim, Y. H., & Chi, Y. T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 138-145.
- Kloepper, J.W. & Schroth, M.N. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria, INRA, Gilbert-Clarey, Tours, France, 2: 879-882.
- Kongcharoen, N., Kaewsalong, N., & Dethoup, T. (2020). Efficacy of fungicides in controlling rice blast and dirty panicle diseases in Thailand. *Scientific Reports*, 10(1), 1-7.
- Kumar, V. (2012). Phosphate solubilizing activity of some bacterial strains isolated from chemical pesticide exposed agriculture soil.
- Kumar, A., Maurya, B. R., & Raghuwanshi, R. (2014). Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 121-128.
- Kumar, V., Jain, L., Jain, S. K., Chaturvedi, S., & Kaushal, P. (2020). Bacterial endophytes of rice (*Oryza sativa* L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic activities. *South African Journal of Botany*, 134, 50-63.
- Kumla, J., Suwannarach, N., Matsui, K., & Lumyong, S. (2020). Biosynthetic pathway of indole-3-acetic acid in ectomycorrhizal fungi collected from northern Thailand. *PloS one*, 15(1), e0227478.

- Li, S. B., Xu, S. R., Zhang, R. N., Liu, Y., & Zhou, R. C. (2016). The antibiosis action and rice-induced resistance, mediated by a lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* B014, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 748-756.
- Liu, X., Ren, B., Gao, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., ... & Zhang, L. (2012). Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLoS one*, 7(5), e34430.
- Liu, Z., & Xie, Y. (2015). Isolation of rhizosphere bacterial communities from soil. *Molecular Plant Microbe Interactions*.
- Liu, S. (2019). Identification and Characterization of the Phosphate-Solubilizing Bacterium *Pantoea* sp. S32 in reclamation soil in Shanxi, china. *Frontiers in microbiology*, 10, 2171.
- Liu, Z., Wang, H., Xu, W., & Wang, Z. (2020). Isolation and evaluation of the plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus methylotrophicus* (DD-1) for growth enhancement of rice seedling. *Archives of Microbiology*, 202(8), 2169-2179.
- Liu, Z., Zhang, X., Li, L., Xu, N., Hu, Y., Wang, C., ... & Li, D. (2022). Isolation and characterization of three plant growth-promoting rhizobacteria for growth enhancement of rice seedling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(3), 1382-1393.
- Lynch, J.M. (1990). The rhizosphere. Wiley-Interscience, Chichester, 458 p.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 174, 14-25.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., & Ptak, M. (1992). Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, 74(12), 1047-1051.
- Mehetre, G. T., Dastager, S. G., & Dharme, M. S. (2019). Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. *Science of The Total Environment*, 679, 52-60.

- Mehnaz, S. (2011). Plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer, Berlin, Heidelberg, 165-187.
- Merino, E., Jensen, R. A., & Yanofsky, C. (2008). Evolution of bacterial trp operons and their regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 78-86.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638-649.
- Moro, G. V., Almeida, R. T., Napp, A. P., Porto, C., Pilau, E. J., Lüdtke, D. S., ... & Vainstein, M. H. (2018). Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. *Microbial Biotechnology*, 11(4), 759-769.
- Murphy, J., & Riley J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36.
- Myo, E. M., Ge, B., Ma, J., Cui, H., Liu, B., Shi, L.,... & Zhang, K. (2019). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC microbiology*, 19(1), 1-14.
- Nascimento, I. D. O., Rodrigues, A. A. C., Braun, H., Santos, C. C. & Catarino, A. D. M. (2018). Silicon fertilization and seed microbiolization on disease severity and agronomic performance of upland rice. *Revista Caatinga*, 31(1), 126-134.
- Nautiyal, C. S., Srivastava, S., Chauhan, P. S., Seem, K., Mishra, A., & Sopory, S. K. (2013). Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 1-9.
- Olayemi, O. P. & Odedara, O. O. (2017). Screening of endophytic plant growth-promoting bacteria isolated from two Nigerian rice varieties. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 33(1), 1-10.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084-1090.

- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125.
- Ou, S.H. (1985). Rice Diseases 2nd edn. CMI, Kew, England, 370 pp.
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 379-391.
- Park, G., Nam, J., Kim, J., Song, J., Kim, P. I., Min, H. J., & Lee, C. W. (2019). Structure and mechanism of surfactin peptide from *Bacillus velezensis* antagonistic to fungi plant pathogens. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 40(7), 704-709.
- Partida-Martinez, L. P. P. & Heil, M. (2011). The microbe-free plant: fact or artifact. *Frontiers in Plant Science*, 2, 100.
- Patel, J. B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6(4), 313-321.
- Pathak, K. V., Keharia, H., Gupta, K., Thakur, S. S., & Balaram, P. (2012). Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 23(10), 1716-1728.
- Pathak, K. V., & Keharia, H. (2014). Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *3 Biotech*, 4(3), 283-295.
- Patten, C. L. & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207-220.
- Patten, C. L., Blakney, A. J., & Coulson, T. J. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 395-415.
- Prabhu, A. S., Barbosa Filho, M. P., Datnoff, L. E., Snyder, G. H., Berni, R. F., Rodrigues, F. A., & Dallagnol, L. J. (2012). Silicon reduces brown spot severity and grain discoloration on several rice genotypes. *Tropical Plant Pathology*, 37, 409-414.

- Pradhan, S., & Pokhrel, M. R. (2013). Spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juice, fertilizer, detergent and water samples by molybdenum blue method. *Scientific world*, 11(11), 58-62.
- Prajapati, S., Kumar, N., Kumar, S., & Maurya, S. (2020). Biological control a sustainable approach for plant diseases management: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 1514-1523.
- Prashar, P., Kapoor, N. & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(1), 63-77.
- Prathuangwong, S., S. Kasem, J. Thowthampitak and D. Athinuwat. (2005). Multiple plant response to bacterial mediated protection against various diseases. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 11:79-87.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037-1062.
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 403-424.
- Rahman, A., Sitepu, I. R., Tang, S. Y., & Hashidoko, Y. (2010). Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(11), 2202-2208.
- Raweekul, W., Wuttitummaporn, S., Sodchuen, W. & Kittiwongwattana, C. (2016). Plant growth promotion by endophytic bacteria isolated from rice (*Oryza sativa*). *Science & Technology Asia*, 6-17.
- Rashid, S., Charles, T.C. & Glick, B.R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217-224.
- Reinhold-Hurek, B. & Hurek, T. (1998). Life in Grasses: Diazotrophic Endophytes. *Trends in Microbiology*, 6, 139-144.

- Romano, A., Vitullo, D., Di Pietro, A., Lima, G., & Lanzotti, V. (2011). Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO7. *Journal of Natural Products*, 74(2), 145-151.
- Rong, S., Xu, H., Li, L., Chen, R., Gao, X. & Xu, Z. (2020). Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162, 69-77.
- Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2010). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 141-172.
- Rosenblueth, M. & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 827-837.
- Saechow, S., Thammasittirong, A., Kittakoop, P., Prachya, S., & Thammasittirong, S. N. R. (2018). Antagonistic activity against dirty panicle rice fungal pathogens and plant growth-promoting activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(9), 1527–1535.
- Saengsanga, T. (2018). Isolation and characterization of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on growth at the early stage of Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. KDML105). *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(7), 3359-3369.
- Sahu, P. K., Tilgam, J., Mishra, S., Hamid, S., Gupta, A., Verma, S. K., & Kharwar, R. N. (2022). Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow. *Journal of Basic Microbiology* 62:647–668.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.
- Sengupta, S., Ganguli, S., & Singh, P. K. (2017). Metagenome analysis of the root endophytic microbial community of Indian rice (*O. sativa* L.). *Genomics data*, 12, 41-43.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587.

- Shivas, R. G. & Hyde, K. D. (1997). Biodiversity of plant pathogenic fungi in the tropics. *Biodiversity of Tropical Microfungi*, 47-56.
- Simon, S. & Petrášek, J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180(3), 454-460.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.
- Spaepen, S. & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a001438.
- Srinivasan, B., & Gnanamanickam, S. S. (2005). Identification of a new source of resistance in wild rice, *Oryza rufipogon* to bacterial blight of rice caused by Indian strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Current Science*, 88(8), 1229-1231.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural products*, 67(2), 257-268.
- Sunder, S., Singh, R., & Agarwal, R. (2014). Brown spot of rice: an overview. *Indian Phytopathology*, 67(3), 201-215.
- Suttajit M., S. Immark, S. Teerajan, S. Suttajit & C. Chaiyasut. (2006). Antioxidative activity and polyphenol content in different varieties of Thai rice grains. In : Proceedings of Asia Pacific Clinical Nutrition Society. Joint 8th ISCN and 5th APCNS Conference 2006. Volume 15.
- Tamreihao, K., Nimaichand, S., & Ningthoujam, D. S. (2018). Antagonistic and plant growth promoting *Bacillus* sp. MBRL 576 enhances the growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.). *Oryza*, 55(1), 202-213.
- Velivelli, S. L., De Vos, P., Kromann, P., Declerck, S., & Prestwich, B. D. (2014). Biological control agents: from field to market, problems, and challenges. *Trends in Biotechnology*, 32(10), 493-496.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586.
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 7, e7258.

- Watanabe, F. S., & Olsen, S. R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO_3 extracts from soil. *Soil Science Society of America Journal*, 29(6), 677-678.
- Weilharter, A., Mitter, B., Shin, M. V., Chain, P. S., Nowak, J. & Sessitsch, A. (2011). Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Journal Bacteriology*, 3383-3384
- Woodward, A. W. & Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707-735.
- Zarei, M., Aminzadeh, S., Zolgharnein, H., Safahieh, A., Daliri, M., Noghabi, K.A., Ghoroghi, A. & Motallebi, A. (2011). Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1017-1029.
- Zhang, D., Spadaro, D., Valente, S., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. (2012). Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 453-464.
- Zhang, Y., Zhao, M., Chen, W., Yu, H., Jia, W., Pan, H., & Zhang, X. (2022). Multi-omics techniques for analysis antifungal mechanisms of lipopeptides produced by *Bacillus velezensis* GS-1 against *Magnaporthe oryzae* In vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 37-62.
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., ... & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 5951-5960.
- กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2557). โรคแมลงศัตรูข้าวและการป้องกันกำจัด ปี 2557. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 55 หน้า.
- กฤตย์ สมสาร. (2549). ฟอสฟอรัสในดิน. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ตุลาคม 2562 จาก http://www.dss.go.th/images/st-article/cp_9_2549_Phosphorus.pdf.
- ทานตะวัน วรธนะวลัญช์. (2556). ข้าวสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์สู่สหภาพยุโรป. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว กรมการข้าว, หน้า 7-8.

- ปัทมา วิทยากร. (2557). เอกสารประกอบการสอนเรื่องความอุดมสมบูรณ์ของดินและโภชนาการพืช. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปัทมา วิทยากร. (2559). เอกสารประกอบการสอนเรื่องความอุดมสมบูรณ์ของดินและโภชนาการพืช. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สมคิด ตีจรง และวิชญาพร ปาวงค์. (2560). การแยก การคัดเลือกและการระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ละลายฟอสเฟตจากข้าวแปลงเกษตรอินทรีย์ 5 ปี. หน้า 144-151. ใน: รายงานประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2562). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2562. กรุงเทพมหานคร: สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เอกสารงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 242 หน้า.
- สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. (2555). ข้าวลิ้มผัวมรดกของแผ่นดิน. 60 หน้า
- สุจิตรา ปะนันโต, ภาคภูมิ ตันเตชสาธิต, ศิริลักษณ์ จิตรอักษร, รังสฤษดิ์ กาวีตะ และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์. (2556). เอนโดไฟติกแบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว. *แก่นเกษตร*, 41(4), 457-468.
- อภิชาติ เนินพลับ, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ, สุรีย์ ศรีวันทนิยกุล, นลินี เจียงวรรณนะ, สุพัตรา สุวรรณธาดา, สออง ไชยรินทร์, ดวงอร อริยพฤกษ์, พงศา สุขเสริม, ภมร ปัตตาวะตัง, ควพร พุ่มเขย, พรสุรี กาญจนนา, เจตน์ คชฤกษ์, พจน์ วัจนภูมิ, เยาวลักษณ์ กัญยะมี, สุธีรา มุลศรี, ศิลาวัน จันทรบุต, ธิติมา ชันตยวิชัย, จรัญจิต เฟ็งรัตน์ และ สุภาณี จงดี. (2559). ข้าวเหนียวพันธุ์ลิ้มผัว. *วารสารวิชาการข้าว*, 7(2): 47-62.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. (2560). ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 366 หน้า.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร Pilkovskaya's (PVK) medium (Pikovskaya, 1948; Nautiyal, 1999)

Glucose	10	กรัม
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	กรัม
NaCl	0.2	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
KCl	0.2	กรัม
yeast extract	0.5	กรัม
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.002	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.002	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน โดยเติมน้ำกลั่นปริมาณ 750 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นนำไปวัดค่า pH เท่ากับ 7 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เทใส่ภาชนะที่มีฝาปิด ทำการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. สูตรอาหาร Minimum salt liquid medium (MSLM) (Romano et al., 2011)

K ₂ HPO ₄	2.5	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.5	กรัม
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.007	กรัม
sucrose	10	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน โดยเติมน้ำกลั่นปริมาณ 750 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นนำไปวัดค่า pH เท่ากับ 7.5 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เทใส่ภาชนะที่มีฝาปิด ทำการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. สูตรอาหาร Peat moss extract agar (Hamaki et al., 2005)

Peat moss	200	กรัม
Agar	15	กรัม
Sodium hydroxide	2	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH	5	

1. เตรียมสารละลาย sodium hydroxide ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่ง sodium hydroxide น้ำหนัก 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. ชั่ง peat moss น้ำหนัก 200 กรัม ใส่ในสารละลาย sodium hydroxide ที่เตรียมไว้
3. นำไป sonicate ที่อุณหภูมิตั้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. กรอง peat moss ด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร และนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5
5. เติมน้ำกลั่น โดยคิดเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)
6. นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิตั้งที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม Salkowski's reagent (2% 0.5M FeCl₃ in 35% HClO₄ solution) (Gordon and Weber, 1951)

35% HClO ₄	50	มิลลิลิตร
0.5M FeCl ₃	1	มิลลิลิตร

สารละลาย ferric chloride 0.5 M ได้โดยใช้สูตร molarity

น้ำหนักโมเลกุล (MW.) = 162, molarity (M) = 0.5 ปริมาตร (V) = 100 มิลลิลิตร

$$\text{สูตร } \frac{g}{MW} \times 1,000 \text{ ml} = M \times V$$

$$g = \frac{(0.5 \text{ M} \times 100 \text{ ml}) \times 162 \text{ g}}{1,000 \text{ ml}}$$

$$g = 8.10 \text{ g}$$

ซึ่ง FeCl₃ จำนวน 8.10 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร คนให้ละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย 35% perchloric (HClO₄)

70 % HClO ₄	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ทำการตวง 70 % HClO₄ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเทน้ำกลั่นลงในปิ๊กเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ เทกรดลงให้น้ำกลั่น และคนจนกว่าจะครบ 50 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ต้องเตรียมสารละลายใน Hood และการเตรียมต้องเทกรดใส่น้ำ โดยภาชนะที่ใช้บรรจุควรเป็นขวดสีชาห่อด้วยฟอยด์ ทำการเก็บในตู้เย็น และการเตรียมแต่ละครั้งไม่ควรเตรียมเกิน 24 ชั่วโมง

2. การเตรียมการสำหรับทำปฏิกิริยา (น้ำยา develop สี)

1. ชั่ง Ammonium molybdate 2.4 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
2. ชั่ง Potassium antimonyl tartrate 0.0582 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
3. ตวง H_2SO_4 5N dilute Conc. H_2SO_4 27.8 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร
4. เทสารข้อ 1 และ 2 ลงในข้อ 3 จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร
5. ชั่ง Ascorbic acid จำนวน 2.112 กรัม ใส่ลงในข้อ 4 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง)

3. การเตรียม Stock L-tryptophan ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

L-tryptophan	0.1	กรัม
Deionized water	10	มิลลิลิตร

ทำการชั่ง L-tryptophan 0.1 กรัม เติม Deionized water 10 มิลลิลิตร ละลายสารให้เข้ากันจนหมด จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 micron โดยภาชนะที่ใช้รองรับต้องผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X (pH 7.4)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.44	กรัม
KH_2PO_4	0.24	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.4 ด้วย HCl เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม 2.5% glutaraldehyde (เตรียม 100 มิลลิลิตร)

25% glutaraldehyde	10	กรัม
Distilled water	90	มิลลิลิตร

ต้องเตรียม 25% glutaraldehyde ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เติม Distilled water ปริมาณ 90 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน

6. การเตรียมสารละลาย 0.1 M Phosphate buffer solution

Stock Solution A

ชั่ง 0.25 M Sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 27.6 กรัม หรือ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 31.21 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

Stock Solution B

ชั่ง 0.2 M Sodium phosphate dibasic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 35.61 กรัม หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.64 กรัม หรือ Na_2HPO_4 28.392 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

ต้องการเตรียมสารละลาย 0.1 M phosphate buffer ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ทำการดูดสารละลายจาก Stock Solution A ปริมาตร 23 มิลลิลิตร และสารละลายจาก Stock Solution B ปริมาตร 77 มิลลิลิตร ละลายสารให้เข้ากัน และนำไปปรับ pH เท่ากับ 7.3 จะได้สารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.2 M จากนั้นทำการเติม distilled water ปริมาณ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M

7. การเตรียมสารละลาย HMDS : Methanol (1:1) เตรียม 9 มิลลิลิตร

ทำการดูดสารละลาย HMDS ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร และ methanol ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน

ภาคผนวก ค การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน IAA (Ahmad, 2008)

1. เตรียม stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการชั่ง IAA 10 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เพื่อละลาย IAA จากนั้นใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย IAA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA ในหลอดทดลองโดยดูด IAA จาก stock solution ดังตาราง 20

ตาราง 20 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA

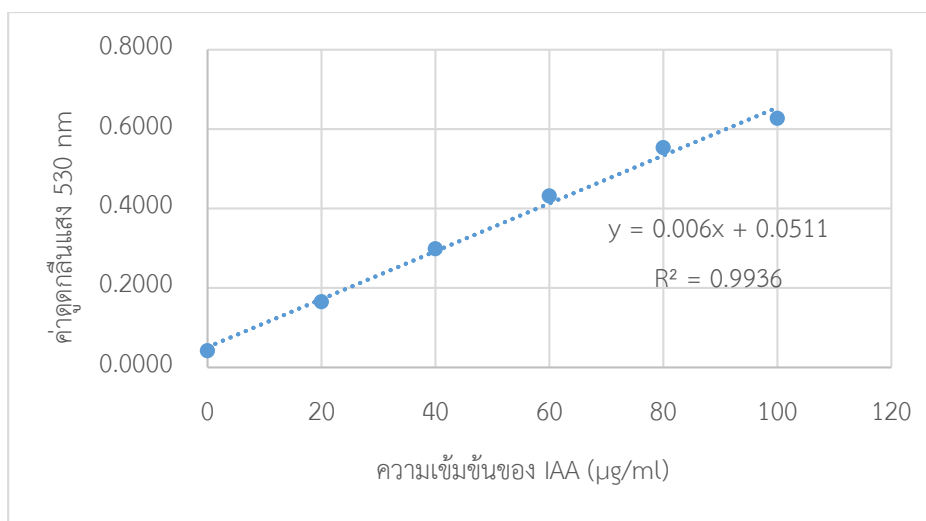
หลอดทดลอง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	stock solution (มิลลิลิตร)	YM media (มิลลิลิตร)
1	0.000	0.000	5.000
2	0.020	0.100	4.900
3	0.040	0.200	4.800
4	0.060	0.300	4.700
5	0.080	0.400	4.600
6	0.100	0.500	4.500

ทำการ dilution stock IAA ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.000, 0.020, 0.040, 0.060, 0.080 และ 0.100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร YM โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

3. ดูดสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มา 1 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ
4. เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร
6. นำค่าที่ได้ไปพอร์ตรกราฟระหว่างความเข้มข้นของ IAA ในหน่วย mg/ml กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานของ IAA เลี้ยวในอาหาร YM ที่มีการเติม L-tryptophan พบว่า สมการเส้นตรง $y = 0.006x + 0.0511$ เมื่อแกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

และแกน x คือ ความเข้มข้นของ IAA มาตรฐาน ดังนั้นเมื่อทราบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทดสอบ สามารถแทนค่าลงในค่า y เพื่อคำนวณความเข้มข้นของ IAA ที่ได้ (ภาพ 16)



ภาพ 16 แสดงกราฟมาตรฐานของ IAA เลี้ยงในอาหาร YM ที่มีการเติม L-tryptophan ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

2. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานฟอสเฟต

1. เตรียม stock solution ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่ง KH_2PO_4 (ซึ่งผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) จำนวน 0.0215 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาณ 75 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย KH_2PO_4 ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลาย KH_2PO_4 ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย KH_2PO_4 ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตจาก stock solution ดังตาราง 21

ตาราง 21 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน KH_2PO_4

ความเข้มข้นสุดท้าย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	Stock KH_2PO_4 5 ppm (มิลลิลิตร)	Distill water (มิลลิลิตร)	Ascorbic acid (มิลลิลิตร)
0.00	0.00	20.00	5.00
0.20	0.80	19.20	5.00
0.40	1.60	18.40	5.00
0.60	2.40	17.60	5.00
0.80	3.20	16.80	5.00
1.00	4.00	16.00	5.00

ทำการ dilution stock ฟอสเฟต ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

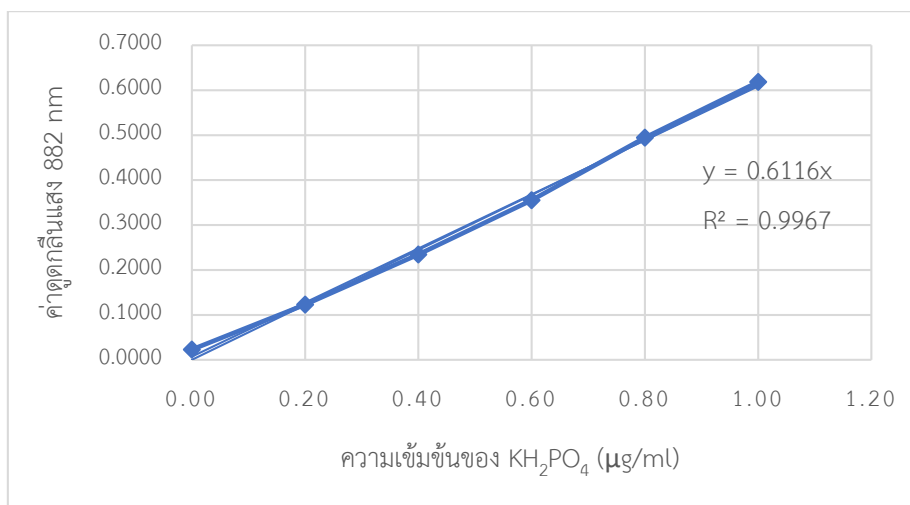
3.ปิเปตสารละลาย Stock KH_2PO_4 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ตาราง 20) ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร

4. เติมน้ำยา develop สีปริมาณ 5 มิลลิลิตร

5.จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาณ 19 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายสีน้ำเงิน

6.นำค่าที่ได้ไปพอร์ตกราฟระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร แล้วนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานฟอสเฟต

กราฟมาตรฐานของ KH_2PO_4 ที่ได้ พบว่า สมการเส้นตรง $y = 0.6116x$ เมื่อแกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร และแกน x คือ ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 มาตรฐาน ดังนั้นเมื่อทราบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ สามารถแทนค่าลงในค่า y เพื่อคำนวณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ได้ (ภาพ 17)



ภาพ 17 แสดงกราฟมาตรฐานของ KH_2PO_4 ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร



ภาคผนวก ง

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากเพิ่มเติม

1. การศึกษาลักษณะรูปร่างโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

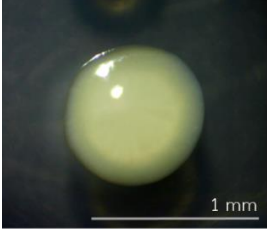
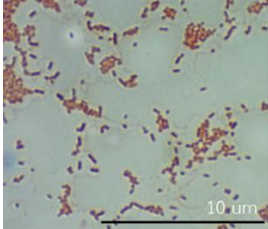
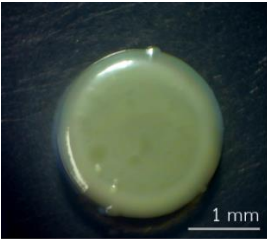
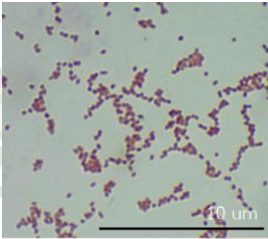
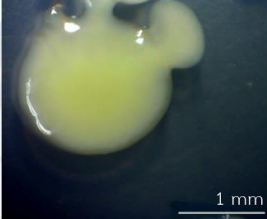
นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง Tryptic soya agar (TSA) สังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาลักษณะของเซลล์และรูปร่างของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2. การศึกษารายละเอียดของโครงสร้างภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)

ทำการ Streak แบคทีเรียลงบนอาหาร TSA เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียละลายด้วย 25% NaCl จากนั้นทำการหยดเชื้อลงบนอาหาร TSA ทิ้งไว้เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดใช้หลอดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร เจาะวงบริเวณที่มีแบคทีเรียมาวางลงบนสไลด์ นำสไลด์แช่ใน 2.5% glutaraldehyde เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างออกด้วย 0.1 M Phosphate buffer solution 5 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นไล่น้ำออกโดยใช้สารละลาย ethanol ความเข้มข้น 30,50,70 และ 95% ความเข้มข้นละ 10 นาที ทำให้แห้งด้วย HMDS และนำตัวอย่างบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

จากการศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวพบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ KK066, KK138 และ KK269 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และนำมาศึกษาลักษณะรูปร่างโคโลนี ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังตาราง 22

ตาราง 22 ลักษณะรูปร่างโคโลนี และลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มเติม

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์	SEM*
KK066			ยังไม่มีข้อมูล
KK138			ยังไม่มีข้อมูล
KK269		ยังไม่มีข้อมูล	ยังไม่มีข้อมูล

หมายเหตุ: *ศึกษารายละเอียดของโครงสร้างภายนอกของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ภาคผนวก จ การทดสอบในระดับโรงเรียน

1. การคำนวณ

ในการศึกษานี้ใช้กระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นิ้ว และใส่ดิน 5 กิโลกรัมต่อกระถาง

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักดิน (1 ไร่)} &= \text{ปริมาตรรวมของดิน (m}^3\text{)} \times \text{ความหนาแน่นของดิน (g/cm}^3\text{)} \\ &= (\text{ความลึก (m)} \times \text{พื้นที่ (m}^2\text{)}) \times \text{ความหนาแน่นของดิน} \\ &= (0.15 \text{ m} \times 1600 \text{ m}^2) \times 1.34 \text{ g/cm}^3 \\ &= 321,600 \text{ กิโลกรัม} \end{aligned}$$

1.1 การใส่ปุ๋ยรองพื้น NPK (15-15-15) อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักปุ๋ย NPK (กก./กระถาง)} &= (\text{น้ำหนักดิน 1 กระถาง (กก.)}) \times \text{น้ำหนักปุ๋ย 1 ไร่} \\ &\quad (\text{กก.}) / \text{น้ำหนักดิน 1 ไร่ (กก.)} \\ &= (5 \text{ กก. / กระถาง}) \times (20 \text{ กก. / ไร่}) / 321,600 \text{ กก.} \\ &= 0.00031 \text{ กิโลกรัม} \\ &= 0.310 \text{ กรัม/กระถาง} \\ \text{แบ่งเป็น 3 ส่วน} &= 0.103 \text{ กรัม/กระถาง} \end{aligned}$$

ดังนั้น เมื่อแบ่งปุ๋ยเป็น 3 ส่วน จะใส่ปุ๋ย NPK 0.103 กรัมต่อกระถาง

1.2 การใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่

1.2.1 ปุ๋ยยูเรีย อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักปุ๋ยยูเรีย (กก. / กระถาง)} &= (\text{น้ำหนักดิน 1 กระถาง (กก.)}) \times \text{น้ำหนักปุ๋ย 1 ไร่} \\ &\quad (\text{กก.}) / \text{น้ำหนักดิน 1 ไร่ (กก.)} \\ &= (5 \text{ กก. / กระถาง}) \times (5 \text{ กก. / ไร่}) / 321,600 \text{ กก.} \\ &= 0.00007774 \text{ กิโลกรัม} \\ &= 0.078 \text{ กรัม / กระถาง} \\ \text{แบ่งเป็น 3 ส่วน} &= 0.026 \text{ กรัม / กระถาง} \end{aligned}$$

ดังนั้น เมื่อแบ่งปุ๋ยเป็น 3 ส่วน จะใส่ปุ๋ยยูเรีย 0.026 กรัม / กระถาง ในระยะสร้างช่อดอก

1.2.2 ปุ๋ยยูเรีย อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักปุ๋ยยูเรีย (กก. / กระถาง)} &= (\text{น้ำหนักดิน 1 กระถาง (กก.)}) \times \text{น้ำหนักปุ๋ย 1 ไร่} \\ &\quad (\text{กก.}) / \text{น้ำหนักดิน 1 ไร่ (กก.)} \\ &= (5 \text{ กก. / กระถาง}) \times (2.5 \text{ กก. / ไร่}) / 321,600 \text{ กก.} \end{aligned}$$

= 0.00003887 กิโลกรัม

= 0.039 กรัม / กระจก

แบ่งเป็น 3 ส่วน = 0.013 กรัม / กระจก

ดังนั้น เมื่อแบ่งปุ๋ยเป็น 3 ส่วน จะใส่ปุ๋ยยูเรีย 0.013 กรัม / กระจก ในระยะสร้างช่อดอก

2. การเตรียมดินปลูก

ทำการฆ่าเชื้อดินปลูกโดยการอบด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง บรรจุดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 5 กิโลกรัม ลงในกระจกขนาด 10x8 นิ้ว จำนวน 120 กระจก (สุจิตตรา ปะนันโต และคณะ, 2556) (ภาพ 18)



ภาพ 18 การเตรียมดินปลูก

3. การฆ่าเชื้อเมล็ดข้าว

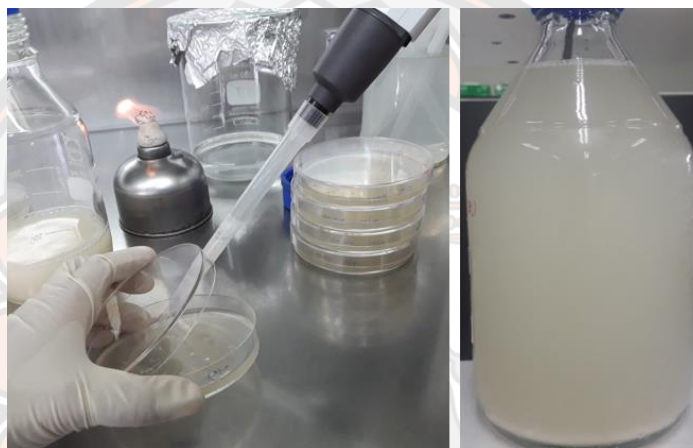
นำเมล็ดพันธุ์ข้าวไร้ลิ้มผิวเพชรบูรณ์มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่น (ddH₂O) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง (Jetiyanon and Plianbangchang, 2012) (ภาพ 19)



ภาพ 19 การฆ่าเชื้อเมล็ดข้าว

4. การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตกตะกอนเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนเชื้อด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับความขุ่นที่ค่า OD_{600} ให้ได้ค่าเท่ากับ 1 หรือ $10^6 - 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Jetiyanon and Plianbangchang, 2012; Nascimento et al., 2018; Saengsanga, 2018) (ภาพ 20)



ภาพ 20 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

5. ขั้นตอนการปลูกข้าวไร่ส้มผิวเพชรบูรณ์

นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาทำการปลูกลงในกระถางขนาด 10×8 นิ้ว กระถางละ 3 เมล็ด จำนวนทั้งสิ้น 120 กระถาง หลังจากข้าวงอกอายุ 14 วัน ทำการถอนให้เหลือ 1 ต้นต่อกระถาง ที่มีสภาพแข็งแรงสมบูรณ์และปราศจากอาการโรค เมื่อข้าวอายุ 30 วันหลังงอก และก่อนข้าวออกดอก ทำการใส่แบคทีเรีย ปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง (ภาพ 21)



ภาพ 21 ขั้นตอนการปลูกข้าวไร้ลิ้มผัวเพชรบูรณ์

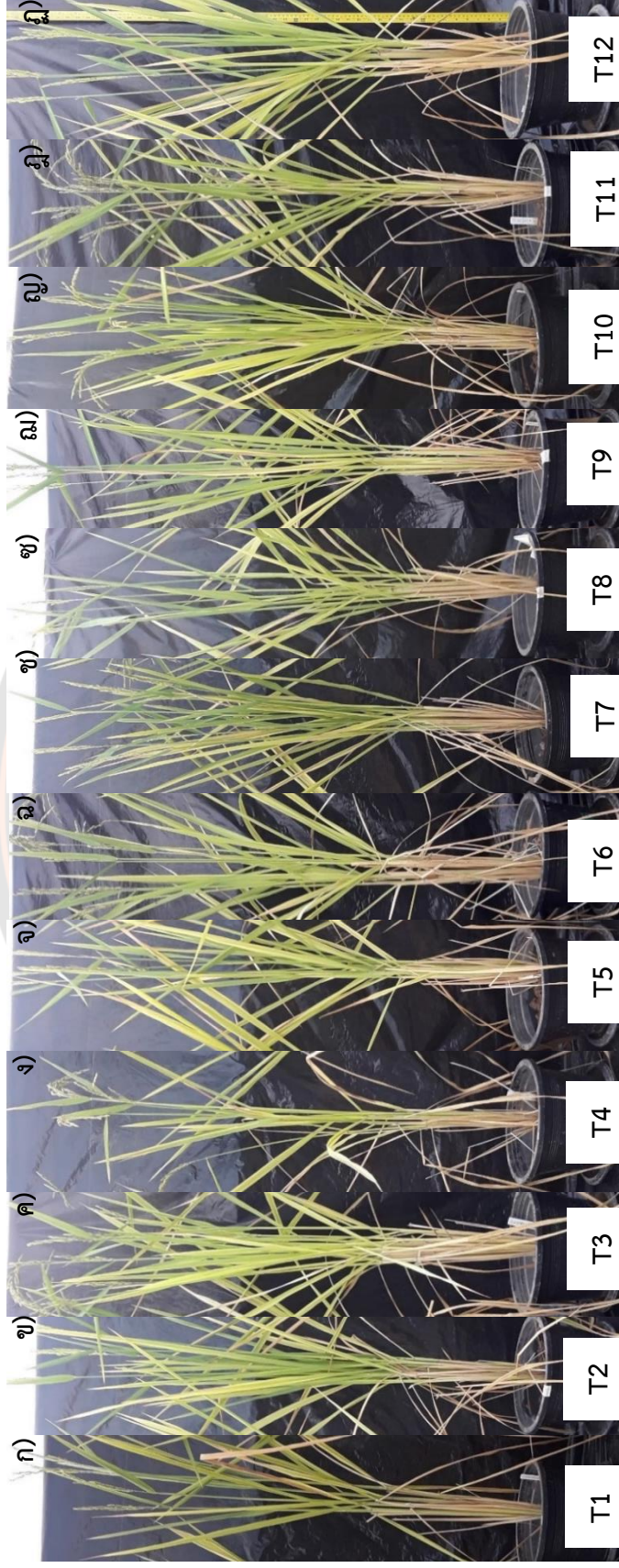
6. การใส่ปุ๋ย

การใส่ปุ๋ยรองพื้น ใส่ปุ๋ยสูตรเสมอ (15-15-15) ก่อนปลูก ในอัตราส่วน 20-25 กิโลกรัมต่อไร่ การใส่ปุ๋ยครั้งที่ 1 ปุ๋ยแต่งหน้า ใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) อัตราส่วน 5-10 กิโลกรัมต่อไร่ 30 วัน หลังปลูก เป็นระยะข้าวแตกกอ เพื่อช่วยในการเร่งการสร้าง ใบ ต้น กิ่ง แขนง เป็นการเจริญทางลำต้น และใบ

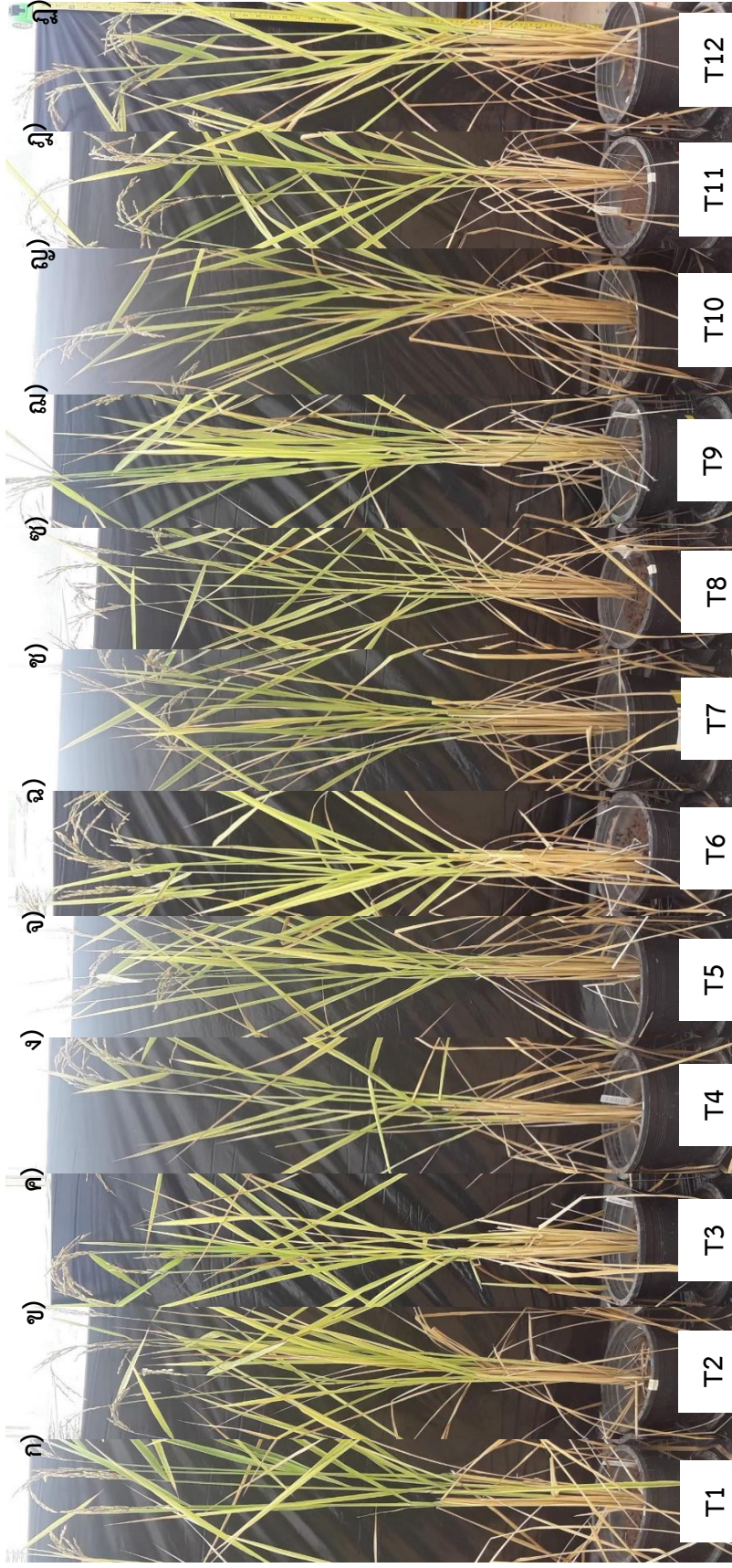
การใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 ปุ๋ยแต่งหน้า ใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) อัตราส่วน 5-10 กิโลกรัมต่อไร่ ที่ระยะ ก้านีตช่อดอกหรือ 30 วันก่อนข้าวออกดอก เพื่อให้พืชนำธาตุอาหารไปใช้ในการสร้างดอก ผล และ เมล็ดได้อย่างสมบูรณ์

การรดน้ำ ใช้น้ำธรรมชาติทุกวันทั้งเช้าและเย็น โดยการใส่ปริมาณน้ำให้เท่าๆ กัน ในแต่ละ กระจ่าง

7. ภาพการศึกษาคงสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวไร้มันม่วงด้วยแบคทีเรียเอนโดไฟต์และแบคทีเรียรอบรากในระดับปรีเรเนียน



ภาพ 22 ต้นข้าวไร้มันม่วงที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยคอก 104



ภาพ 23 ต้นข้าวไร่ส้มผิวพรรณบูรณ์ หลังย้ายปลูกลงกระถาง วันที่ 123

- ก) กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกมาเชื้อ
- ข) กรรมวิธีที่ 2 ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์
- ค) กรรมวิธีที่ 3 ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์
- ง) กรรมวิธีที่ 4 แบททีเรีย KK018 100 มิลลิลิตร
- จ) กรรมวิธีที่ 5 ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับแบททีเรีย KK018 50 มิลลิลิตร
- ฉ) กรรมวิธีที่ 6 ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับแบททีเรีย KK018 50 มิลลิลิตร
- ช) กรรมวิธีที่ 7 แบททีเรีย KK275 100 มิลลิลิตร
- ซ) กรรมวิธีที่ 8 ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับแบททีเรีย KK275 50 มิลลิลิตร
- ฌ) กรรมวิธีที่ 9 ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับเชื้อ KK275 50 มิลลิลิตร
- ญ) กรรมวิธีที่ 10 แบททีเรีย KK018 ร่วมกับแบททีเรีย KK275 (50:50)
- ฎ) กรรมวิธีที่ 11 ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับแบททีเรีย KK018 25 มิลลิลิตรและแบททีเรีย KK275 25 มิลลิลิตร
- ฏ) กรรมวิธีที่ 12 ปุ๋ยเคมี อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับแบททีเรีย KK018 25 มิลลิลิตรและแบททีเรีย KK275 25 มิลลิลิตร