BSJ
BURAPHA SCIENCE JOURNAL
ISSN 2985-0983 (online)

วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 31 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2569

BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 31 (No.3) September – December 2026

Research Article

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮดด้วยน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมกำมะถันในสกุล *Rhodopseudomonas*

Promoting the Growth of Butterhead Lettuce by Bio-Fermented Extract from Purple Non-Sulfur Bacteria in Genus *Rhodopseudomonas*

อรรถพล ตันไสว[1], พีรพันธ์ ทองเปลว[2] และ ณัฏฐิรา ก่ำวินจันทร์[1*]

Uttapoln Tansawai[1], Pheeraphan Thongplew[2] and Nuttira Kavinchan[1*]

[1]*สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ประเทศไทย*

[2]*สาขาพืชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ประเทศไทย*

[1]*Department of Science, Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Thailand*

[2] *Department of Plant Science, Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Thailand*

Received: 8 June 2026, Received in revised form: 4 October 2026, Accepted: 15 October 2026

Available online: 6 November 2026

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา: แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมกำมะถัน (purple non-sulfur bacteria: PNSB) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มนี้สามารถสร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของพืชได้หลายชนิด เช่น สาร 5-อะมิโนลีวูลินิก, ออกซิน หรือไซโตไคนิน เป็นต้น จึงถูกนำมาผลิตน้ำหมักชีวภาพและนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน ทั้งนี้การใช้น้ำหมักแบคทีเรียสังเคราะห์แสงยังมีความผันแปร ไม่ว่าสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิต วิธีการทำหมักชีวภาพ รูปแบบการใช้กับพืชเศรษฐกิจแต่ละชนิดรวมทั้งองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับสายพันธุ์จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงในประเทศไทย มีการศึกษาไม่มากเมื่อเทียบกับประเทศที่มีการวิจัยทางเกษตรสูงอย่างเช่น ญี่ปุ่น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดทำการวิจัยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกับการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจ ตั้งแต่แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง คัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตน้ำหมักชีวภาพ รูปแบบการใช้น้ำหมักต่อการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจให้เป็นรูปแบบที่มีการใช้งานได้จริง โดยทำการทดสอบการเจริญเติบโตในบัตเตอร์เฮด เนื่องจากเป็นผักทานใบ เป็นผักมูลค่าสูง มีการส่งเสริมให้เพาะปลูกแบบอินทรีย์ และเป็นที่นิยมในกลุ่มผู้บริโภคผักสด

วิธีดำเนินการวิจัย: เก็บตัวอย่างดิน ตัวอย่างน้ำ จากพื้นที่ทำการเกษตร หรือตามธรรมชาติ ในพื้นที่ 9 จังหวัด แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ GM broth นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิตน้ำหมักชีวภาพและส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยทำการทดสอบความเร็วในการเจริญ การสร้างกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (5-aminolevulinic acid : 5-ALA) การสร้างกรดอินดอลอะซิติก (Indole-3-acetic acid: IAA) การย่อยโปรตีน การย่อยเซลลูโลส และการละลายฟอสเฟต นำไอโซเลทที่คัดเลือกไปจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและผลิตน้ำหมัก

ชีวภาพไปทดสอบประสิทธิภาพกับบัตเตอร์เฮดพันธุ์ MJ-7 ในสภาพกระถาง แบ่งเป็น 8 กรรมวิธี บันทึกการเจริญเติบโต บันทึกข้อมูลผลผลิต

ผลการวิจัย: จากการลงพื้นที่ 9 จังหวัดทั้งภาคเหนือและภาคกลาง เก็บตัวอย่างทั้งหมด 108 ตัวอย่าง แยกเป็นดินและน้ำจำนวน 44 และ 64 ตามลำดับ นำมาแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงบริสุทธิ์ได้จำนวน 59 ไอโซเลท ผลการทดสอบความเร็วการเจริญเติบโต พบว่าหลังจากบ่มเชื้อ 7 วัน สามารถเจริญได้ดี (51 ไอโซเลท) เมื่อนำไปทดสอบความสามารถของเชื้อที่จะช่วยในการเจริญเติบโตของพืช แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ด้าน คือ การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสาร และความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสาร พบว่ามีเชื้อจำนวน 15 ไอโซเลทที่ละลายฟอสเฟตในรูปของสารอนินทรีย์ ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่ามี 2 ไอโซเลทที่สามารถย่อยได้ และผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนโดยเลือกใช้เจลาตินเป็นสารสำหรับทดสอบ พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายได้ สำหรับการทดสอบความสามารถในการสร้างฮอร์โมนพืช 2 ชนิด ผลการทดสอบพบว่าทุกไอโซเลทสร้าง 5-ALA ได้ ในขณะที่เชื้อ 50 ไอโซเลทที่สร้าง IAA ได้ จากการทดสอบคุณสมบัติ 6 ด้าน จึงทำการคัดเลือก 12 ไอโซเลทมาวิเคราะห์ชนิดของเชื้อด้วยการทำ PCR และ DNA sequencing ของยีน 16S rRNA gene และเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับรายงานบนฐานข้อมูล NCBI ร่วมกับการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 12 พบว่าทั้งหมดเป็นเชื้อใน Genus *Rhodopseudomonas* โดยจัดเป็น *Rhodopseudomonas* sp. 4 ไอโซเลท และ *R. palustris* 8 ไอโซเลท คัดเลือก 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่ UT-7, UT-8 และ UT-67 ไปผลิตน้ำหมักชีวภาพและทดสอบการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮดทั้ง 8 กรรมวิธี พบว่าความกว้างทรงพุ่มของบัตเตอร์เฮดในกรรมวิธีที่ 8 มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 38.33 ± 2.69 เซนติเมตร โดยมีความแตกต่างจากกรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญสูง ($P \leq 0.01$)

สรุปผลการวิจัย: จากตัวอย่างดินและน้ำในพื้นเกษตรและพื้นที่ทั่วไปจำนวน 108 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้จำนวน 59 ไอโซเลท ได้คัดเลือก 3 ไอโซเลท ได้แก่ UT-7, UT-8 และ UT-67 จากประสิทธิภาพและความสามารถในการสร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ทดสอบประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮด โดยน้ำหมักจากไอโซเลท UT-7 ช่วยส่งเสริมการเจริญด้านความสูง และ UT-67 ช่วยส่งเสริมทางด้านจำนวนใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีแนวโน้มเพิ่มน้ำหนักสด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุม

คำสำคัญ: การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี; การเจริญเติบโต; บัตเตอร์เฮด; น้ำหมักชีวภาพ; ฮอร์โมนพืช

Abstract

Background and Objectives: Purple non-sulfur photosynthetic bacteria (PNSB) can produce several compounds that benefit plant growth, such as 5-aminolaevulinic acid, auxin, and cytokinin. As a result, they are used to produce bio-fermented liquid fertilizers for various applications. However, the use of PNSB-based bio-fermented liquid fertilizers is affected by variations in suitable strains, bio-fermentation methods, and application to different cash crops, as well as by limited basic knowledge of photosynthetic microbial strains in Thailand compared with countries

with highly advanced agricultural research, such as Japan. Consequently, this research aims to investigate photosynthetic bacteria for cash crop cultivation, starting with isolating the bacteria, followed by selecting suitable strains for the production of bio-fermented extract fertilizers, and developing practical application models for cash crop cultivation. Growth tests were conducted on butterhead lettuce, a high-value leafy vegetable that is popular among consumers who prefer fresh vegetables and is promoted for organic cultivation.

Methodology: Soil and water samples were collected from agricultural and natural areas in nine provinces in northern and central Thailand. Photosynthetic bacteria were isolated using GM broth. Pure cultures of the isolates were then screened to select efficient isolates for producing bio-fermented extract and promoting plant growth. Growth rate, 5-aminolevulinic acid (5-ALA) production, indole-3-acetic acid (IAA) production, protein digestion, cellulose digestion, and phosphate solubilization were tested. The selected isolates were classified by species of photosynthetic bacteria, and the effects of their bio-fermented extracts was tested on butterhead lettuce (cv. MJ-7) grown in pots under eight treatment conditions. In addition, plant growth and yield data were recorded.

Main Results: From the fieldwork conducted in nine provinces in northern and central Thailand, a total of 108 samples were collected, consisting of 44 soil samples and 64 water samples. Fifty-nine pure photosynthetic bacterial isolates were obtained. Growth rate testing showed that 51 isolates exhibited good growth after 7 days of incubation. The ability of these isolates to promote plant growth was further tested in two respects: biodegradation capacity and plant hormone production. The biodegradation tests showed that 15 isolates were able to solubilize inorganic phosphate. The cellulose and protein degradation tests revealed that two isolates were able to degrade cellulose, and three isolates were able to degrade protein (gelatin). Regarding the production of the two plant growth-promoting substances, all isolates produced 5-ALA, while 50 isolates produced IAA. Based on the evaluation of these six characteristics, 12 isolates were selected for species identification using PCR and DNA sequencing of the 16S rRNA gene. The resulting nucleotide sequences were compared with those available in the NCBI database, and a phylogenetic tree was constructed using MEGA 12 software. It was found that all 12 selected isolates belonged to the genus *Rhodopseudomonas*, with four isolates classified as *Rhodopseudomonas* sp. and eight isolates classified as *R. palustris*. Three efficient isolates, UT-7, UT-8, and UT-67, were selected to produce bio-fermented extract, which was then tested on the growth of butterhead lettuce under eight different treatments. The treatments revealed that the canopy width of butterhead lettuce was greatest in treatment 8, at 38.33 ± 2.69 centimeters, which was significantly different from other treatments ($p \leq 0.01$).

BSJ
BURAPHA SCIENCE JOURNAL
ISSN 2985-0983 (online)
วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 31 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2569
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 31 (No.3) September – December 2026
Research Article

Conclusions: From 108 soil and water samples collected from agricultural and natural areas in nine provinces in northern and central Thailand, 59 photosynthetic bacterial isolates were obtained. Three isolates, UT-7, UT-8, and UT-67, were selected based on their efficiency and ability to produce plant-beneficial substances. In addition, their effects on the growth of butterhead lettuce were tested. The bio-fermented extract from isolate UT-7 significantly promoted plant height, while the bio-fermented extract from UT-67 significantly increased the number of leaves. This extract also showed a tendency to increase fresh weight; however, this increase was not statistically significant compared with the control group.

Keywords: good agricultural practices; growth; butterhead; bio-fermented extract; plant hormone

***Corresponding author. E-mail :** Nuttira224@rmutl.ac.th

Introduction

เกษตรปลอดภัยรวมถึงเกษตรอินทรีย์ เป็นแนวคิดที่มีการส่งเสริมให้มีการปฏิบัติจริงจังอย่างต่อเนื่อง มีการกำหนดเป้าหมายยุทธศาสตร์เพื่อเพิ่มพื้นที่เกษตรปลอดภัยและกลุ่มเกษตรกรที่เข้าร่วมกิจกรรมหลักที่นำไปสู่การสร้างเกษตรปลอดภัย คือ การรณรงค์ลดการใช้สารเคมีต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นปุ๋ย ยาฆ่าแมลงและศัตรูพืช ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น การเลือกใช้สารชีวภาพหรือสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ เช่น น้ำหมักชีวภาพ น้ำส้มควันไม้หรือจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จึงกลายมาเป็นทางเลือกหนึ่งในการทดแทนสารเคมีเหล่านี้ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (photosynthetic bacteria: PSB) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติทั้งในน้ำและในดิน กลุ่มที่ได้รับการสนใจเป็นพิเศษ คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมกำมะถัน (purple non-sulfur bacteria: PNSB) เนื่องจากเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของพืชได้หลายชนิด แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจึงถูกมาผลิตน้ำหมักชีวภาพและนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร บำรุงดิน บำบัดน้ำเสีย เป็นต้น ทั้งนี้การศึกษาโดยทั่วไปได้มีการนำเอาน้ำหมักชีวภาพมาใช้กับกลุ่มผักสลัด เช่น Bankerlang *et al*., (2018) โดยการนำเอา PSB ร่วมกับถ่านชีวภาพในอัตราส่วนที่ต่างกันต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม พบว่า PSB 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 40 ลิตรกับถ่านชีวภาพ 500 กรัมต่อตารางเมตร โดยพบว่า ให้ผลดีที่สุดทั้งทางด้านการเจริญเติบโต ผลผลิตและคุณภาพของผักกาดหอม ส่วนงานวิจัยของ Ditprasert *et al*., (2026) มีการนำเอา PSB จากลุ่มน้ำแม่กลองในบริเวณต่าง ๆ มาทำการทดลองการเจริญเติบโตของผักสลัดเรดโอ๊ค ด้านความสูงของต้น จำนวนใบ และค่าความเขียวของใบ และการทดลองของ Tongnate *et al*., (2026) PSB สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักสลัดกรีนโอ๊คได้เทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมี อย่างไรก็ตาม การใช้ PNSB ยังมีความผันแปร ไม่ว่าสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิต วิธีการทำหมักชีวภาพ รูปแบบการใช้กับพืชเศรษฐกิจแต่ละชนิด รวมทั้งองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับสายพันธุ์ PNSB ในประเทศไทย มีการศึกษาไม่มากเมื่อเทียบกับประเทศที่มีการวิจัยทางเกษตรสูง ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการทำการวิจัย PNSB กับการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจ โดยเริ่มตั้งแต่

แยก PNSB คัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตน้ำหมักชีวภาพ รูปแบบการใช้น้ำหมักต่อการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจให้เป็นรูปแบบที่มีการใช้งานได้จริง

Methodology

1. การแยก PNSB

ตัวอย่างดินและน้ำที่นำมาแยกเชื้อ เก็บด้วยวัสดุปราศจากเชื้อในพื้นที่เกษตรกรรมหรือตามธรรมชาติ 9 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ พะเยา พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลำปาง สุโขทัย อุทัยธานี และอุตรดิตถ์ ในเดือนกุมภาพันธ์ - เมษายน พ.ศ. 2566 เก็บตัวอย่างดิน 10 กรัม ให้ลึกจากผิวหน้าดินประมาณ 5 – 10 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ห่างจากขอบตลิ่งประมาณ 20 – 30 เซนติเมตร และลึกจากผิวน้ำประมาณ 10 เซนติเมตร ทำการผสมให้ตัวอย่างเข้ากัน นำตัวอย่างที่เก็บ 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ GM broth 14 มิลลิลิตร (sodium-L-glutamate 3.8 กรัม, DL-malic acid 2.7 กรัม, yeast extract 2.0 กรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.95 กรัม, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.8 กรัม, KH_2PO_4 0.5 กรัม, K_2HPO_4 0.5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, $CaCl_2.2H_2O$ 0.053 กรัม, $C_6H_5FeO_7$ 0.025 กรัม, $MnSO_4.5H_2O$ 0.012 กรัม, biotin 0.010 กรัม, nicotinic acid 0.001 กรัม และ thiamine hydrochloride 0.001 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ค่าพีเอช 7.0) บ่มภายใต้สภาวะออกซิเจนน้อย-มีแสง ที่ความเข้มแสง 3,000 – 3,500 Lux เป็นเวลา 7 – 10 วัน เมื่อมีแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเจริญ อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดง ชมพู หรือน้ำตาล (Panwichian *et al*., 2010) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มในอาหาร นำมาแยกให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GM agar บ่มภายใต้สภาวะออกซิเจนน้อย-มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 – 7 วัน เลือกโคโลนีที่สีแดงหรือชมพู นำมาขีดเชื้อซ้ำและบ่มภายใต้สภาวะเดิม เลือกโคโลนีเดี่ยว 1 ไอโซเลทต่อ 1 ตัวอย่าง ยืนยันการเป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยการย้อมสีแกรมและตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในสารละลายกลีเซอรอล 20 % (w/v) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การคัดเลือก PNSB ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ

คัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้สำหรับการผลิตน้ำหมักชีวภาพต่อการนำไปใช้ส่งเสริมการเจริญของบัตเตอร์เฮดด้วยการทดสอบ 6 คุณสมบัติ ได้แก่

2.1 ความเร็วในการเจริญเติบโต

เตรียมเชื้อโดยเลี้ยงในอาหาร GM broth 10 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะออกซิเจนน้อย-มีแสง ความเข้มแสงประมาณ 3,000 – 3,500 Lux บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 5 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน เทส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยการเติมสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนอีกครั้ง เทส่วนของเหลวทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาปรับความขุ่นด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Lambda 365+, PerkinElmer, Korea) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปิเปตสารละลายเชื้อที่เตรียม 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน GM broth ใหม่ 14 มิลลิลิตร บ่มภายใต้สภาวะเดิม 7 วัน ปิเปตสารละลายเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 5 นาที เทส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง

เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดความขุ่น (optical density) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) (ดัดแปลงวิธีจาก Paipitak *et al*., 2013; Saikeur, 2013)

2.2 การสร้าง 5-ALA

เตรียมเชื้อตามวิธีการที่ 2.1 หลังจากหมุนเหวี่ยงเซลล์ให้ตกตะกอนแล้ว ปิเปตส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย 1 M acetate buffer (sodium acetate trihydrate 13.61 กรัม, น้ำกลั่น 70.00 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.6 และปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตร และ acetyl acetone 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 15 นาที นำมาแช่ในน้ำแข็งทันที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายเย็น เติมสารสะละลาย modified Ehrlich's reagent 3.5 มิลลิลิตร (dimethyl-*p*-aminobenzaldehyde 2.0 กรัม, 70% perchloric acid 16.0 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid 84.0 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร (Mauzerall & Granick, 1956) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank และอาหารเลี้ยงเชื้อ GM broth ที่ไม่มีการเพาะเชื้อเป็นตัวควบคุม (control) วิเคราะห์ปริมาณของ 5-ALA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของปริมาณ 5-ALA ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

2.3 การสร้าง IAA

เตรียมปริมาณเชื้อ 0.5 McFarland ตามวิธีการที่ 2.1 ปิเปตสารละลายเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ GM broth ที่มี tryptophan 0.102 กรัม/ลิตร บ่มตามวิธีการเดียวกับ 2.1 หลังจากหมุนเหวี่ยงเซลล์ให้ตกตะกอนแล้ว ปิเปตส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย van Urk-Salkowski reagent 2 มิลลิลิตร ($HClO_4$ 50 มิลลิลิตร, $FeCl_2$ 8.11 กรัม, น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 41 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร) บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (Ehmann, 1977; Shutsrirung, 2002) ใช้น้ำกลั่นเป็น blank และ GM broth ที่ไม่มีการเพาะเชื้อเป็นตัวควบคุม วิเคราะห์ปริมาณของ IAA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากการสร้างกราฟมาตรฐานของปริมาณ IAA ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

2.4 การสร้างเอนไซม์ย่อยเจลาติน (gelatinase production)

เตรียมปริมาณเชื้อ 0.5 McFarland ตามวิธีการที่ 2.1 หยดสารละลายเชื้อ 10 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ gelatin medium ในหลอดทดลอง (peptone 4.0 กรัม, yeast extract 1 กรัม, gelatin 15 กรัม, agar 7.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแทงตำแหน่งที่หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืด ตรวจผลโดยนำหลอดทดลองแช่ในน้ำแข็ง 15 นาที ทำการเอียงหลอดทดลอง หากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นของเหลวแสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเจลาตินได้ สังเกตผลวันที่ 1 - 4 หากอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงแข็ง ให้บ่มต่อจนครบ 14 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (ดัดแปลงวิธีจาก Seangtumnor *et al*., 2018)

2.5 การสร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส (cellulase production)

เตรียมปริมาณเชื้อ 0.5 McFarland ตามวิธีการที่ 2.1 หยดสารละลายเชื้อ 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ carboxy methyl cellulose agar (carboxy methyl cellulose 5.0 กรัม, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 กรัม, yeast extract 1.0 กรัม, KH_2PO_4

0.6 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม, K_2HPO_4 0.4 กรัม และ agar 15.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) บ่มอุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน นำมาตรวจสอบผลการย่อยเซลลูโลสโดยเทสารละลาย 0.1% (w/v) congo red (congo red 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร) ให้ท่วมผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เทสารละลาย ล้างด้วย 1 M NaCl (เตรียม Stock solution ของ 3M NaCl โดยละลาย NaCl 17.54 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) 2 ครั้ง สังเกตวงใส (clear zone) รอบตำแหน่งที่เชื้อเจริญ แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ (Chountragoon *et al*., 2011) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ประสิทธิภาพของการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโดยคำนวนค่า Hydrolysis capacity (HC value) = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) / ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร) (George *et al*., 2001) โดยค่า HC value ที่มากกว่า 1.0 แสดงเชื้อมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส

2.6 การละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilization)

ทดสอบเช่นเดียวกับวิธีการที่ 2.4 แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar (Himedia, India) ที่มี tricalcium phosphate เป็นส่วนผสม บ่มอุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน สังเกตวงใสรอบบริเวณเชื้อเจริญ แสดงว่า เชื้อสามารถละลายฟอสเฟตในรูปของแข็งได้ (Rao Subba, 1993) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยคำนวนค่า Phosphate solubilizing index (PSI) = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) / ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร) (Sudewi *et al*., 2020)

3. การจำแนกชนิดของ PNSB

นำไอโซเลทของ PNSB ที่คัดเลือก 12 ไอโซเลท มาจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5′ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3′) และ 1492R (5′ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3′) (Lane, 1991) ใช้ 1 โคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ผสมกับน้ำ deionized water 500 ไมโครลิตร เพื่อเตรียมเป็น template ปฏิกิริยาของ PCR ประกอบด้วย template 1 ไมโครลิตร, 1x PCR buffer, 200 µM dNTPs, 0.5 µM Primer แต่ละเส้น, 1x PCR buffer และ 1 unit ของ *Taq* DNA polymerase (Vivantis Technologies, Malaysia) ปรับปริมาตรด้วย deionized water เป็น 20 ไมโครลิตร ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ, ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 30 รอบ คือ 1) denaturation 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 2) primer annealing 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 3) primer extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และขั้นตอน final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ (GeneExplorer Thermal Cycler, Bioer Technology, China) ขนาดของ PCR product ประมาณ 1,480 คู่เบส ตรวจผลด้วยเทคนิค 1% (w/v) agarose gel electrophoresis นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ ส่งตัวอย่างให้บริษัท Bio Basic Inc. ประเทศแคนาดา ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน วิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียด้วยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบ (BLAST) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่มีรายงานอยู่บนฐานข้อมูลใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) โดยวิธี Maximum likelihood วิเคราะห์ด้วยการใช้ Bootstrap method ที่1,000 replicates ด้วยโปรแกรม MEGA 12 (Kumar *et al*., 2024) เลือกใช้ *Escherichia coli*

strain 5/41 (accession number: NR_024570.1) เป็นตัวแทนสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการไกลจากกลุ่มที่ศึกษา (Out-group) ค่า bootstrap value ที่น้อยกว่า 50% เป็นค่าที่ไม่สนับสนุนความเชื่อมั่นว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

4. การทดสอบการเจริญของ PNSB ในสูตรน้ำหมักชีวภาพที่เกษตรกรนิยมใช้

นำไอโซเลทที่คัดเลือกจำนวน 12 ไอโซเลท มาทดสอบการเจริญเติบโตในส่วนผสมสำหรับการทำน้ำหมักชีวภาพที่เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้เตรียมสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดยทำการผลิตหัวเชื้อด้วยอาหาร GM broth 50 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะออกซิเจนน้อย-มีแสง ที่ความเข้มแสง 3,000 – 3,500 Lux บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน นำเชื้อมาหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 5 นาที ล้างเซลล์และปรับความขุ่นด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ให้เท่ากับ 0.5 McFarland นำสารละลายเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GM broth 500 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะออกซิเจนน้อย-มีแสง ความเข้มแสง 3,000 – 3,500 Lux เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเตรียมส่วนผสมสำหรับน้ำหมักชีวภาพ ประกอบด้วยกะปิ 15 กรัม, ผงชูรส 10 กรัม, ไข่ไก่ 1 ฟอง และน้ำ 10 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Theerak *et al*., 2020) ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว เตรียมน้ำปราศจากเชื้อใส่ลงในขวดประมาณ 1,400 มิลลิลิตร เติมส่วนผสม 10 มิลลิลิตร ลงในขวด เขย่าขวดให้ส่วนผสมเข้ากัน เติมหัวเชื้อแบคทีเรียลงในขวดๆละ 50 มิลลิลิตร นำขวดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง มีแสงประมาณ 3,000 Lux เป็นเวลา 14 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ คัดเลือกไอโซเลทที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของน้ำหมักชีวภาพ เป็นสีชมพูหรือแดง

5. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพ PNSB ต่อการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮด

นำน้ำหมักชีวภาพมาทดสอบการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮด พันธุ์ MJ-7 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) ประกอบด้วย 8 กรรมวิธี ประกอบด้วย

1) กรรมวิธีที่ 1 (T1) รดด้วยน้ำเปล่า (control)
2) กรรมวิธีที่ 2 (T2) รดด้วย PNSB ไอโซเลท UT-7
3) กรรมวิธีที่ 3 (T3) รดด้วย PNSB ไอโซเลท UT-8
4) กรรมวิธีที่ 4 (T4) รดด้วย PNSB ไอโซเลท UT-67
5) กรรมวิธีที่ 5 (T5) รดด้วย PNSB ไอโซเลท UT-7 + UT-8 (อัตราส่วน 1:1)
6) กรรมวิธีที่ 6 (T6) รดด้วย PNSB ไอโซเลท UT-7 + UT-67 (อัตราส่วน 1:1)
7) กรรมวิธีที่ 7 (T7) รดด้วย PNSB ไอโซเลท UT-8 + UT-67 (อัตราส่วน 1:1)
8) กรรมวิธีที่ 8 (T8) รดด้วย PNSB ไอโซเลท UT-7 + UT-8 + UT-67 (อัตราส่วน 1:1:1)

การวางแผนการทดลองสำหรับบัตเตอร์เฮดมีการศึกษา 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำประกอบด้วยกระถางย่อย 3 กระถาง (กระถางละ 1 ต้น) วางในตำแหน่งเดียวกัน จำนวนทั้งสิ้น 72 ต้น ทำการทดสอบน้ำหมักแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกับบัตเตอร์เฮดพันธุ์ MJ-7 ช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2566 – มกราคม พ.ศ. 2567 เริ่มโดยการเพาะเมล็ดบัตเตอร์เฮดลงในพีทมอสที่บรรจุในถาดเพาะขนาด 104 หลุม รดน้ำทุกเช้า-เย็น เมื่อต้นกล้าอายุ 14 วันเริ่มมีใบงอกออกมาประมาณ 3 ใบและความสูงของต้นกล้ามีขนาดเท่า ๆ กันประมาณ 3 - 5 เซนติเมตร จึงเตรียมนำลงปลูกในกระถางขนาด

เส้นผ่านศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร ทำการรดน้ำต้นกล้า 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง ทุกเช้าเย็น เมื่อต้นกล้าอายุครบ 1 สัปดาห์ เริ่มรดน้ำที่ผสมน้ำหมักแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสูตรต่างๆ ในอัตราส่วนน้ำหมักแบคทีเรียสังเคราะห์แสงต่อน้ำ คือ 1:500 (Thuwa Kham & Fanfuenha, 2019) โดยรดน้ำผสมน้ำหมักแต่ละสูตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ๆ ละ 100 มิลลิลิตร เริ่มบันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นบัตเตอร์เฮดหลังย้ายกล้า 2 สัปดาห์จนถึงวันเก็บเกี่ยว ได้แก่ จำนวนใบและความสูงของต้น หลังจากย้ายกล้า 36 วัน ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยบันทึกข้อมูลผลผลิต ได้แก่ ความสูง ความกว้างทรงพุ่ม และทำการตัดบริเวณโคนต้นที่ติดกับดิน เพื่อนำไปนับจำนวนใบ ชั่งน้ำหนักสด และวัดความเขียวของใบโดยใช้เครื่องวัดคลอโรฟิลล์รุ่น SPAD-502Plus

6.การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลผลผลิตบัตเตอร์เฮดไปวิเคราะห์ทางสถิติ (n = 3) โดยคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม R version 4.5.1 (package agricolae) (Chomphuk, 2009)

Results

1. ผลการแยก PNSB

ตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บในพื้นที่ 9 จังหวัด จำนวน 108 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างดินและน้ำ 44 และ 64 ตัวอย่าง ตามลำดับ (Table 1) นำมาแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้ทั้งหมด 59 ไอโซเลท โคโลนีขนาดเล็ก สีแดงหรือชมพู เชื้อทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (Figure 1)



Figure 1 A) Colony morphology and B) Gram stain of purple non-sulfur bacteria (1,000x)

2. ผลการคัดเลือก PNSB ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ

นำเชื้อบริสุทธิ์จำนวนทั้งหมด 59 ไอโซเลท (Table 2) มาทดสอบ 6 คุณสมบัติ เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพ โดยการทดสอบความเร็วในการเจริญเติบโต การสร้างฮอร์โมนพืชเป็นการทดสอบจำนวน 1 ซ้ำ ผลการทดสอบความเร็วในการเจริญเติบโตหลังจากบ่มเชื้อ 7 วัน พบว่าเชื้อ 51 ไอโซเลท (86.4%) สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยมีค่า OD_{600} มากกว่า 1.000

ยกเว้นไอโซเลท UT-26, UT-59, UT-60, UT-61, UT-67 และ UT-68 ที่มีค่า OD_{600} น้อยกว่า 1.000 และ UT-20, UT-24 มีค่าน้อยกว่า 0.500 (Table 2) เมื่อนำไปทดสอบความสามารถของเชื้อในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 คุณลักษณะ คือ การสร้างฮอร์โมนพืช 2 ชนิด ได้แก่ 5-ALA และ IAA การย่อยสลายสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์เป็นโมเลกุลเล็กลง ทำให้พืชสามารถดูดซึมสารอาหารนำไปใช้ได้ ได้แก่ การย่อยสลายโปรตีนจากการสร้างเอนไซม์ gelatinase, การย่อยสลายเซลลูโลสจากการสร้างเอนไซม์ cellulase และการละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปของแข็ง โดยพบ 20 ไอโซเลท (33.9%) ที่แสดง 2 คุณลักษณะ (Table 2)

Table 1 *Sources of samples*

Provinces	Sources of samples		Total of samples
	Soil	Water	
Chiang Mai	3	5	8
Lampang	1	0	1
Phayao	16	21	37
Phetchabun	3	3	6
Phichit	5	7	12
Phitsanulok	11	12	23
Sukhothai	3	8	11
Uthai Thani	1	7	8
Uttaradit	1	1	2
Total	**44**	**64**	**108**

Table 2 *The screening results of PNSB*

Isolates	Sources of samples	Provinces (Latitude, Longitude)	Growth with OD_{600}	5-ALA production (µg/ml)	IAA production (µg/ml)	Gelatinase production	Cellulase production (HC Value)	Phosphate solubilization (PSI)
UT-1	Water	Phichit (16°30'47.3"N, 100°11'56.3"E)	1.029	1.82	27.76	-	-	-
UT-2	Water	Phayao (19°16'39.8"N, 99°58'24.7"E)	1.275	2.55	37.05	-	-	-
UT-3	Water	Phayao (19°16'39.8"N, 99°58'24.7"E)	1.246	2.42	29.83	-	-	-
UT-4	Water	Phayao (19°16'39.8"N, 99°58'24.7"E)	1.253	2.05	35.39	-	-	-

Isolates	Sources of samples	Provinces (Latitude, Longitude)	Growth with OD_{600}	5-ALA production (µg/ml)	IAA production (µg/ml)	Gelatinase production	Cellulase production (HC Value)	Phosphate solubilization (PSI)
UT-5	Water	Phayao (19°16'39.8"N, 99°58'24.7"E)	1.251	2.32	29.75	-	-	-
UT-6	Water	Phayao (19°16'39.8"N, 99°58'24.7"E)	1.253	1.39	20.14	-	-	-
UT-7	Soil	Phayao (19°09'30.1"N, 99°55'18.1"E)	1.045	2.35	21.33	-	-	2.20 ± 0.20
UT-8	Soil	Phayao (19°09'30.1"N, 99°55'18.1"E)	1.228	2.81	34.59	-	2.17 ± 0.17	-
UT-9	Soil	Phayao (19°09'30.1"N, 99°55'18.1"E)	1.194	1.69	24.51	-	-	1.42 ± 0.07
UT-10	Soil	Phayao (19°09'30.1"N, 99°55'18.1"E)	1.102	1.72	21.81	-	-	1.67 ± 0.43
UT-11	Water	Phayao (19°09'29.8"N, 99°55'21.6"E)	1.230	2.45	35.94	-	-	-
UT-12	Water	Phayao (19°09'29.8"N, 99°55'21.6"E)	1.254	2.42	47.22	-	-	-
UT-13	Water	Phayao (19°09'29.8"N, 99°55'21.6"E)	1.275	2.52	43.72	-	-	-
UT-14	Water	Phayao (19°09'21.9"N, 99°55'37.0"E)	1.299	2.98	43.88	-	-	-
UT-15	Water	Phayao (19°09'21.9"N, 99°55'37.0"E)	1.263	2.38	40.87	-	-	-
UT-16	Water	Phayao (19°01'37.8"N, 99°53'46.8"E)	1.218	1.56	20.85	-	-	-
UT-17	Water	Phayao (19°01'37.8"N, 99°53'46.8"E)	1.280	1.99	25.70	-	-	1.76 ± 0.21

Isolates	Sources of samples	Provinces (Latitude, Longitude)	Growth with OD_{600}	5-ALA production (µg/ml)	IAA production (µg/ml)	Gelatinase production	Cellulase production (HC Value)	Phosphate solubilization (PSI)
UT-18	Water	Phayao (19°01'37.8"N, 99°53'46.8"E)	1.265	2.45	-	-	-	-
UT-19	Water	Phayao (19°01'37.8"N, 99°53'46.8"E)	1.339	2.58	14.74	-	-	1.30 ± 0.06
UT-20	Water	Phayao (19°01'37.8"N, 99°53'46.8"E)	0.200	1.76	-	-	-	1.31 ± 0.08
UT-24	Water	Phayao (19°09'32.7"N, 99°54'38.5"E)	0.400	1.69	-	-	-	-
UT-26	Water	Phayao (19°09'32.7"N, 99°54'38.5"E)	0.694	1.69	-	-	-	-
UT-27	Water	Phayao (19°09'32.7"N, 99°54'38.5"E)	1.362	2.65	40.55	+	-	-
UT-28	Water	Phayao (19°09'32.7"N, 99°54'38.5"E)	1.677	2.09	24.11	-	-	-
UT-32	Water	Phayao (19°09'32.7"N, 99°54'38.5"E)	1.079	3.14	33.48	+	-	-
UT-33	Water	Phayao (19°09'30.6"N, 99°54'28.9"E)	1.551	2.09	30.46	-	-	2.03 ± 0.55
UT-34	Water	Phayao (19°16'39.8"N, 99°58'24.7"E)	1.354	2.29	40.87	-	-	2.02 ± 0.31
UT-35	Water	Phayao (19°09'29.8"N, 99°55'21.6"E)	1.604	2.22	31.73	-	-	2.02 ± 0.33
UT-36	Water	Phayao (19°16'39.8"N, 99°58'24.7"E)	1.452	2.55	38.01	-	-	2.01 ± 0.18
UT-37	Water	Phichit (16°30'03.5"N, 100°14'43.9"E)	1.410	1.13	24.74	-	-	-

Isolates	Sources of samples	Provinces (Latitude, Longitude)	Growth with OD_{600}	5-ALA production (µg/ml)	IAA production (µg/ml)	Gelatinase production	Cellulase production (HC Value)	Phosphate solubilization (PSI)
UT-38	Water	Phichit (16°30'03.5"N, 100°14'43.9"E)	1.517	2.55	33.24	-	-	1.50 ± 0.29
UT-39	Water	Phayao (19°08'18.7"N, 99°53'36.8"E)	1.270	2.15	30.38	-	2.00 ± 0.50	-
UT-40	Water	Phayao (19°16'39.8"N, 99°58'24.7"E)	1.265	2.75	-	-	-	-
UT-43	Water	Phetchabun (15°44'30.0"N, 101°12'09.5"E)	1.515	2.95	36.02	-	-	-
UT-44	Water	Phetchabun (15°44'30.0"N, 101°12'09.5"E)	1.500	2.68	44.76	-	-	-
UT-45	Soil	Phetchabun (15°44'48.6"N, 101°11'25.0"E)	1.584	2.25	29.51	-	-	-
UT-46	Water	Phichit (16°30'03.5"N, 100°14'43.9"E)	1.291	2.15	21.96	-	-	-
UT-47	Water	Phichit (16°30'03.5"N, 100°14'43.9"E)	1.040	1.82	11.56	-	-	-
UT-48	Soil	Uttaradit (17°43'40.8"N, 100°41'19.2"E)	1.360	2.81	53.41	-	-	-
UT-49	Soil	Uttaradit (17°43'40.8"N, 100°41'19.2"E)	1.595	1.86	11.00	-	-	-
UT-50	Water	Phetchabun (15°44'30.0"N, 101°12'09.5"E)	1.182	2.12	27.60	-	-	-
UT-51	Water	Sukhothai (17°00'44.9"N, 99°41'51.8"E)	1.567	1.92	34.51	-	-	-
UT-52	Water	Phichit (16°30'03.5"N, 100°14'43.9"E)	1.108	1.92	18.63	-	-	-

Isolates	Sources of samples	Provinces (Latitude, Longitude)	Growth with OD_{600}	5-ALA production (µg/ml)	IAA production (µg/ml)	Gelatinase production	Cellulase production (HC Value)	Phosphate solubilization (PSI)
UT-53	Water	Phichit (16°30'03.5"N, 100°14'43.9"E)	1.321	1.66	26.57	-	-	-
UT-54	Soil	Phichit (16°31'31.0"N, 100°12'35.7"E)	1.113	1.76	20.85	-	-	-
UT-55	Soil	Uttaradit (17°43'40.8"N, 100°41'19.2"E)	1.158	1.72	34.67	-	-	1.44 ± 0.19
UT-56	Soil	Uttaradit (17°43'40.8"N, 100°41'19.2"E)	1.224	2.12	33.24	-	-	1.55 ± 0.36
UT-57	Water	Phayao (19°08'18.7"N, 99°53'36.8"E)	1.313	2.35	37.61	-	-	-
UT-58	Water	Uthai Thani (15°18'05.5"N, 99°44'10.6"E)	1.010	3.71	6.56	-	-	1.67 ± 0.29
UT-59	Soil	Phetchabun (15°44'48.6"N, 101°11'25.0"E)	0.727	1.62	-	-	-	-
UT-60	Soil	Phetchabun (15°45'06.9"N, 101°10'46.6"E)	0.671	1.56	-	-	-	-
UT-61	Soil	Phetchabun (15°45'06.9"N, 101°10'46.6"E)	0.933	3.64	-	-	-	-
UT-62	Soil	Phitsanulok (16°36'06.3"N, 100°26'08.1"E)	1.111	1.29	39.20	+	-	-
UT-63	Soil	Phichit (16°31'31.0"N, 100°12'35.7"E)	1.443	2.32	37.13	-	-	-
UT-64	Soil	Phichit (16°31'31.0"N, 100°12'35.7"E)	1.342	2.48	41.74	-	-	-
UT-65	Water	Phayao (19°16'07.1"N, 99°58'10.8"E)	1.279	2.22	39.83	-	-	-

Isolates	Sources of samples	Provinces (Latitude, Longitude)	Growth with OD_{600}	5-ALA production (µg/ml)	IAA production (µg/ml)	Gelatinase production	Cellulase production (HC Value)	Phosphate solubilization (PSI)
UT-66	Water	Phayao (19°10'05.6"N, 99°53'43.7"E)	1.145	1.99	12.83	-	-	-
UT-67	Water	Phayao (19°08'22.0"N, 99°54'28.2"E)	0.942	3.67	43.41	-	-	-
UT-68	Water	Uthai Thani (15°14'40.5"N, 99°25'55.2"E)	0.966	2.91	-	-	-	2.07 ± 0.32

Note: "+" = positive result, "-" = negative result and "*" = mean ± standard deviation (SD)

ผลการทดสอบการสร้างฮอร์โมนพืช 5-ALA พบว่าเชื้อทั้งหมด (100%) สามารถสร้างได้ ไอโซเลทที่สร้าง 5-ALA ปริมาณมากที่สุด คือ UT-58 รองลงมา คือ UT-67, UT-61 และ UT-32 โดยมีปริมาณเท่ากับ 3.71, 3.67, 3.64 และ 3.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2) สำหรับการสร้าง IAA พบเชื้อ 50 ไอโซเลท (84.7%) สามารถสร้างได้ ไอโซเลทที่สร้าง IAA ปริมาณมากที่สุด คือ UT-48, UT-12, UT-44 และ UT-14 มีปริมาณเท่ากับ 53.41, 47.22, 44.76 และ 43.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบความสามารถย่อยสลายโปรตีนมี 3 ไอโซเลท (5.1%) ที่ให้ผลบวก คือ UT-27, UT-32 และ UT-62 สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลส มี 2 ไอโซเลท (3.4%) ที่ย่อยสลายได้ คือ UT-8 และ UT-39 โดยมีค่า HC value เท่ากับ 2.17 ± 0.17 และ 2.00 ± 0.50 และมี 15 ไอโซเลท (25.4%) ที่ให้ผลบวกจากการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยมีไอโซเลท UT-7 มีค่า PSI สูงสุด รองลงมาคือ UT-68 และ UT-33 โดยมีค่าเท่ากับ 2.20 ± 0.20, 2.07 ± 0.32 และ 2.03 ± 0.55

การคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ พิจารณาจากคุณสมบัติของการสร้างฮอร์โมนพืชเป็นหลัก เลือกจากไอโซเลทที่สร้างฮอร์โมนพืชทั้งสองชนิดได้สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ โดยแบ่งกลุ่มไอโซเลทที่สร้าง 5-ALA ได้มากกว่า 2.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสร้าง IAA มากกว่า 40.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์พบว่า ไอโซเลท UT-48 และ UT-67 สามารถสร้างฮอร์โมนทั้งสองได้สูง เกณฑ์การพิจารณาต่อไปวิเคราะห์ความสามารถในสร้างฮอร์โมนชนิดใดชนิดหนึ่งได้สูง ร่วมกับคุณสมบัติการย่อยสลายสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์เป็นโมเลกุลเล็กลง และมีความเร็วในการเจริญเติบโตจากการวัดค่า OD_{600} มากกว่า 1.000 หรือใกล้เคียง ผลการคัดเลือกด้วยเกณฑ์ดังกล่าว จึงคัดเลือกไอโซเลทสำหรับการทดสอบขั้นตอนไป จำนวน 12 ไอโซเลท ได้แก่ UT-7, UT-8, UT-13, UT-14, UT-15, UT-32, UT-48, UT-55, UT-58, UT-61, UT-67 และ UT-68

3. ผลการจำแนกชนิดของ PNSB

เชื้อจำนวน 12 ไอโซเลทที่คัดเลือกนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR และ DNA sequencing ของยีน 16S rRNA ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีขนาด 655 – 1,341 คู่เบส การวิเคราะห์เบื้องต้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่

มีรายงานบนฐานข้อมูล NCBI เชื้อทั้งหมดจัดเป็นเชื้อใน Genus *Rhodopseudomonas* ได้แก่ *Rhodopseudomonas* sp., *R. palustris* และ *R. telluris* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) มากกว่า 99% (Table 3) ทำการยืนยันชนิดของ PNSB จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้าง Phylogenetic tree (Figure 2) พบว่า ไอโซเลท UT-7, UT-8, UT-13, UT-14, UT-15, UT-48, UT-55 และ UT-61 ถูกจำแนกเป็นเชื้อ *R. palustris* โดยมีค่า Bootstrap value ที่ 93% ไอโซเลท UT-58 และ UT-68 ถูกจัดจำแนกเป็น *Rhodopseudomonas* sp. มีค่า Bootstrap value เท่ากับ 48% ในขณะที่ UT-67 ถูกจำแนกเป็น *R. telluris* มีค่า Bootstrap value เท่ากับ 66% อย่างไรก็ตามผลการทำ DNA sequencing ของ UT-32, UT-58 และ UT-67 ได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำกว่า 1,000 bp ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นสปีชีส์ *R. palustris* หรือ *R. telluris* จึงถูกจัดจำแนกเป็นเพียง *Rhodopseudomonas* sp. สรุปได้ว่าเชื้อ PNSB 12 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *R. palustris* 8 ไอโซเลท ได้แก่ UT-7, UT-8, UT-13, UT-14, UT-15, UT-48, UT-55 และ UT-61 และเป็นเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. 4 ไอโซเลท ได้แก่ UT-32, UT-58, UT-67 และ UT-68

Table 3 Identification of PNSB by 16S rRNA gene sequencing compared to database on NCBI

Isolates	DNA sequences (bp)	Species	Accession Numbers	% Identity
UT-7	1,340	*Rhodopseudomonas palustris*	CP019967.1	99.93
UT-8	1,328	*R. palustris*	CP019967.1	99.80
UT-13	1,333	*R. palustris*	CP019967.1	100
UT-14	1,104	*R. palustris*	CP019967.1	100
UT-15	1,143	*R. palustris*	CP019967.1	99.91
UT-32	655	*Rhodopseudomonas* sp.	LC500585.1	100
UT-48	1,341	*R. palustris*	CP019967.1	100
UT-55	1,326	*R. palustris*	CP019967.1	100
UT-58	887	*Rhodopseudomonas* sp.	MK014257.1	99.55
UT-61	1,071	*R. palustris*	CP019967.1	99.35
UT-67	927	*R. telluris*	MW010429.1	99.57
UT-68	1,312	*Rhodopseudomonas* sp.	MK014256.1	99.70

4. ผลการทดสอบการเจริญของ PNSB ในสูตรน้ำหมักชีวภาพที่เกษตรกรนิยมใช้

ผลการทดสอบการเจริญของ PNSB โดยใช้สูตรน้ำหมักชีวภาพตามที่เกษตรกรนิยมใช้เลี้ยงเชื้อ พบว่า ส่วนใหญ่สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีน้ำหมักชีวภาพเป็นสีแดงได้ทั้ง 3 ซ้ำ ยกเว้นไอโซเลท UT-13, UT-48 และ UT-68 ที่พบการเปลี่ยนแปลงสีแดงของน้ำหมักเพียง 2 ซ้ำ ในขณะเดียวกันเมื่อวิเคราะห์ความเร็วในการเจริญของเชื้อพบว่า ไอโซเลท UT-7, UT-8 และ UT-67 พบการเปลี่ยนแปลงสีในวันที่ 7 และเปลี่ยนสีครบทุกซ้ำในวันที่ 9 ของการทดลอง ในขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ

พบการเปลี่ยนแปลงสีในวันที่ 9 -14 ดังนั้นในงานวิจัยจึงทำการคัดเลือกไอโซเลท UT-7, UT-8 และ UT-67 สำหรับการผลิตน้ำหมักชีวภาพในการทดสอบการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮดในขั้นตอนต่อไป

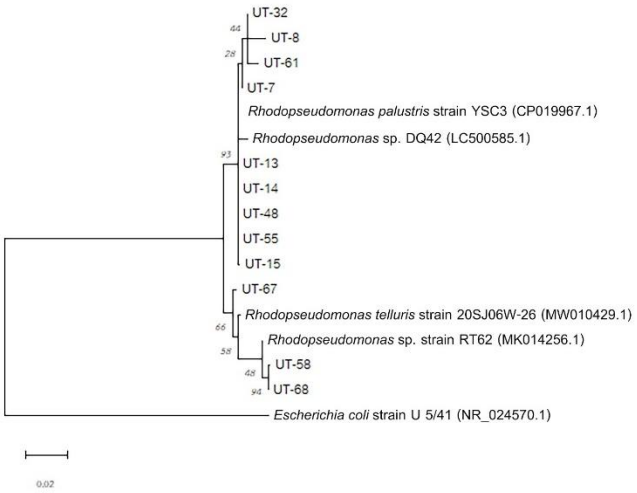


Figure 2 The phylogenetic tree of PNSB with representatives of *Rhodopseudomonas* species

5. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพ PNSB ต่อการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮด

หลังย้ายกล้า 2 สัปดาห์ เริ่มบันทึกจำนวนใบเป็นสัปดาห์ที่ 1 ก่อนการเริ่มรดบัตเตอร์เฮดด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแต่ละสูตร พบว่าจำนวนใบของบัตเตอร์เฮดในสัปดาห์ที่ 1 อยู่ระหว่าง 9.11 – 9.78 ใบ สัปดาห์ที่ 2 มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนใบอยู่ระหว่าง 14.33 – 16.56 ใบ โดยทั้งสองสัปดาห์จำนวนใบต่อต้นบัตเตอร์เฮดของแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนสัปดาห์ที่ 3 จำนวนใบอยู่ระหว่าง 18.67 – 23.44 ใบ โดยพบว่ากรรมวิธีที่ 2 ให้ค่าจำนวนใบที่สูงที่สุด และแตกต่างจากกรรมวิธีที่ 1, 4, 5 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ 3, 7 และ 8 (Table 4) สำหรับการวิเคราะห์ความสูง พบว่าความสูงของบัตเตอร์เฮดในสัปดาห์ที่ 1 อยู่ระหว่าง 9.22 – 10.11 เซนติเมตร สัปดาห์ที่ 2 มีการเพิ่มขึ้นของความสูงของลำต้น อยู่ระหว่าง 13.28 – 15.22 เซนติเมตร ส่วนสัปดาห์ที่ 3 มีการเพิ่มขึ้นของความสูงของลำต้นอยู่ระหว่าง 14.50 – 19.28 เซนติเมตร โดยในกรรมวิธี T8 ให้ค่าความสูงมากที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 1, 3, 4, 5, 6 และ 7 แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ 2 พอเข้าสัปดาห์ที่ 4 ความสูงของลำต้นลดลงอยู่ระหว่าง 14.06 – 16.17 เซนติเมตร เนื่องจากเป็นสัปดาห์ที่บัตเตอร์เฮดเริ่มมีการห่อของใบทำให้ความสูงของลำต้นลดลง (Table 5)

เมื่อต้นบัตเตอร์เฮดมีอายุ 36 วัน หลังจากย้ายกล้า ทำการเก็บเกี่ยวผล และวิเคราะห์ข้อมูล พบว่าความสูงของต้นบัตเตอร์เฮดอยู่ระหว่าง 15.78 – 18.78 เซนติเมตร โดยความสูงของบัตเตอร์เฮดสูงสุดในกรรมวิธีที่ 2 ส่วนความกว้างของทรงพุ่มของบัตเตอร์เฮดอยู่ระหว่าง 32.22 – 38.33 เซนติเมตร โดยความกว้างของทรงพุ่มสูงสุดในกรรมวิธีที่ 8 โดยกรรมวิธีที่ 4 ให้ผลทางจำนวนใบมากที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 1 (ชุดควบคุม), 6 และ 8 แต่ไม่แตกต่าง

จากกรรมวิธีที่ 2, 3, 5 และ 7 ทางด้านน้ำหนักสดของบัตเตอร์เฮดอยู่ระหว่าง 119.06 – 184.75 กรัม โดยกรรมวิธีที่ 4 ให้ผลทางน้ำหนักสดมากที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 6 และ 8 แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีอื่น ๆ ส่วนความเขียวของใบอยู่ระหว่าง 26.30 – 30.06 โดยกรรมวิธีที่ 1 ให้ความเขียวของใบมากที่สุดแต่ไม่ต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ (Table 6) (Figure 3)



Figure 3 Butterhead lettuce watered with treatments 1 – 8 (T1 – T8)

Table 4 Weekly number of leaves per plant

Treatment	Number of leaves		
	Week 1	Week 2	Week 3
T1 : Water (Control)	9.67 ± 0.50	14.33 ± 1.94	20.78 ± 1.79 ^{bcd}
T2 : UT-7	9.22 ± 0.44	14.78 ± 1.92	23.44 ± 2.13 ^{a}
T3 : UT-8	9.44 ± 0.53	15.56 ± 1.81	21.22 ± 1.79 ^{abcd}
T4 : UT-67	9.56 ± 0.73	15.44 ± 1.24	18.67 ± 2.60 ^{d}
T5 : UT-7 + UT-8 (1:1)	9.11 ± 0.33	15.33 ± 1.50	19.22 ± 3.53 ^{d}
T6 : UT-7 + UT-67 (1:1)	9.22 ± 0.67	16.56 ± 1.13	19.89 ± 3.26 ^{cd}
T7 : UT-8 + UT-67 (1:1)	9.67 ± 0.71	15.33 ± 0.87	22.11 ± 2.71 ^{abc}
T8 : UT-7 + UT-8 + UT-67 (1:1:1)	9.78 ± 0.97	16.22 ± 1.20	22.78 ± 1.79 ^{ab}
F-test	ns	Ns	***
C.V.(%)	6.74	9.70	12.05

ns = non significant; *** = significant difference at $P \leq 0.001$

Different superscript letters within the same column indicate significant differences among treatments based on Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Values are presented as mean ± SE (n = 3)

Table 5 Weekly height of butterhead lettuce

Treatment	Height of butterhead lettuce (cm)			
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
T1 : Water (Control)	9.22 ± 0.51	13.28 ± 1.30	16.83 ± 2.32^{bc}	14.94 ± 1.16
T2 : UT-7	9.94 ± 0.63	14.00 ± 2.08	17.94 ± 3.23^{ab}	16.11 ± 2.36
T3 : UT-8	9.61 ± 0.70	14.00 ± 1.66	16.00 ± 3.13^{bc}	14.56 ± 2.39
T4 : UT-67	9.78 ± 0.44	13.78 ± 1.20	14.50 ± 2.24^{c}	14.06 ± 0.77
T5 : UT-7 + UT-8 (1:1)	9.61 ± 0.49	14.11 ± 1.29	15.22 ± 2.49^{c}	14.33 ± 1.58
T6 : UT-7 + UT-67 (1:1)	10.11 ± 0.22	14.22 ± 0.97	15.89 ± 2.30^{bc}	16.00 ± 2.02
T7 : UT-8 + UT-67 (1:1)	9.67 ± 0.56	13.78 ± 0.75	15.11 ± 2.03^{c}	15.61 ± 1.78
T8 : UT-7 + UT-8 + UT-67 (1:1:1)	9.72 ± 0.83	15.22 ± 0.62	19.28 ± 0.83^{a}	16.17 ± 1.32
F-test	ns	ns	**	Ns
C.V. (%)	5.90	9.34	14.81	11.54

ns = non significant; ** = significant difference at P $\leq$ 0.01. Different superscript letters within the same column indicate significant differences among treatments based on Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Values are presented as mean ± SE (n = 3)

Discussion

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถัน นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศในฐานะผู้ย่อยสลายแล้ว เชื้อกลุ่มนี้ยังมีลักษณะเด่นที่สามารถเจริญได้หลายสภาวะ สามารถใช้ทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน รวมทั้งสร้างสารสำคัญที่ประโยชน์ได้หลายชนิด จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายในด้านเกษตรกรรม การแพทย์ พลังงานชีวภาพ และการบำบัดน้ำเสีย (Morrison & Bose, 2024) สำหรับด้านเกษตรกรรมเชื้อก่อให้เกิดประโยชน์ทางตรงกับพืช โดยเมื่อเชื้อตายลงจะมีการปลดปล่อยธาตุสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของมวลชีวภาพให้พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น ไนโตรเจน, โพแทสเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น ประโยชน์ทางอ้อม คือ การสร้างสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ฮอร์โมน 5-aminolevulinic acid (5-ALA) และ indole-3-acetic acid (IAA) ที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต การเจริญของปลายรากและการดูดซึมธาตุอาหารของพืช (Sakpirom *et al*., 2017) การย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ การเปลี่ยนธาตุและสารประกอบให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น การย่อยสลายสารอินทรีย์กลุ่มโปรตีน, เซลลูโลส, การตรึงไนโตรเจน (N_2) ให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย (NH_3), การละลายฟอสเฟต, หรือสร้างไซเดอร์โรฟอร์ (siderophores) ที่ช่วยจับธาตุเหล็ก เป็นต้น (Sakarika *et al*., 2020) ด้วยความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เชื้อจึงถูกจัดอยู่ในกลุ่ม plant promoting bacteria (PGPB) งานวิจัยหลายฉบับจึงนิยมใช้คุณสมบัติเหล่านี้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการใช้ประโยชน์ต่างๆ รวมทั้งการผลิตน้ำหมักชีวภาพ นอกเหนือไปจากการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เชื้อยังมีคุณสมบัติอื่นๆ

เช่น การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช (Nookongbut *et al*., 2019), สร้างสาร coenzyme Q10 (Krairak & Krairak, 2020), ช่วยฟื้นฟูการปนเปื้อนจากโลหะหนัก เช่น สังกะสีและแคดเมียด และลดการปล่อยก๊าซมีเทน (Sakpirom *et al*., 2017) เชื้อที่คัดเลือกในงานวิจัยครั้งนี้สอดคล้องรายงานหลายฉบับที่รายงานว่า ส่วนใหญ่เป็นเชื้อใน Genus *Rhodopseudomonas* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสปีชีส์ *R. palustris* (Krairak & Krairak, 2020; Nookongbut *et al*., 2020, Sakpirom *et al*., 2017)

Table 6 The height, the width, number of leaves, fresh weight and leaf greenness

Treatment	Height (cm)	width (cm)	Number of leaves	Fresh weight (g)	Leaf greenness (SPAD units)
T1 : Water (Control)	16.61 ± 1.27^{bc}	32.44 ± 3.05^{b}	33.67 ± 3.61^{bc}	178.79 ± 21.78^{ab}	30.06 ± 3.23
T2 : UT-7	18.78 ± 2.05^{a}	34.33 ± 2.06^{b}	36.22 ± 6.22^{ab}	177.91 ± 38.38^{ab}	26.30 ± 2.85
T3 : UT-8	17.28 ± 2.08^{abc}	32.33 ± 3.81^{b}	36.22 ± 4.94^{ab}	165.52 ± 33.56^{ab}	27.12 ± 2.57
T4 : UT-67	16.50 ± 0.50^{bc}	32.22 ± 2.22^{b}	38.78 ± 3.49^{a}	184.75 ± 22.06^{a}	27.29 ± 2.25
T5 : UT-7 + UT-8 (1:1)	17.33 ± 1.20^{abc}	34.11 ± 4.96^{b}	36.44 ± 4.50^{ab}	173.40 ± 33.9^{ab}	26.41 ± 3.15
T6 : UT-7 + UT-67 (1:1)	15.78 ± 2.86^{c}	32.22 ± 4.29^{b}	34.22 ± 1.64 ^{bc}	150.62 ± 20.17^{b}	28.31 ± 1.77
T7 : UT-8 + UT-67 (1:1)	15.89 ± 2.09^{c}	32.67 ± 3.16^{b}	36.56 ± 3.57 ^{ab}	177.31 ± 27.60^{ab}	27.82 ± 2.86
T8 : UT-7 + UT-8 + UT-67 (1:1:1)	18.22 ± 1.56^{ab}	38.33 ± 2.69^{a}	31.89 ± 3.14 ^{c}	119.06 ± 32.97^{c}	26.62 ± 1.96
F-test	**	**	*	**	ns
C.V.(%)	10.74	10.17	11.53	17.78	9.57

ns = non significant; * = significant difference at P ≤ 0.05; ** = significant difference at P ≤ 0.01. Different superscript letters within the same column indicate significant differences among treatments based on Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Values are presented as mean ± SE (n = 3)

การทดสอบคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงแต่ละสูตรต่อการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮด โดยแต่ละสูตรให้ผลทางด้านการเจริญเติบโตของต้นบัตเตอร์เฮดแตกต่างกัน ในช่วงการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮด สัปดาห์ที่ 3 หลังย้ายกล้า พบว่าในกรรมวิธีที่ 2 (UT-7) มีแนวโน้มจำนวนใบมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ อาจเนื่องมาจากน้ำหมัก UT-7 มีคุณสมบัติของการย่อยสลายฟอสเฟต จึงช่วยยึดตรึงฟอสฟอรัสในดิน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเร่งอัตราการแบ่งเซลล์ตรงจุดเจริญปลายยอดและการพัฒนาตาข้าง ส่งผลให้ จำนวนใบต่อต้นเพิ่มขึ้น (Sakarika *et al*., 2020)

ในช่วงการเก็บเกี่ยวผลผลิตพบว่า ความกว้างทรงพุ่มของบัตเตอร์เฮดในกรรมวิธีที่ 8 พบว่ามีแนวโน้มให้ค่ามากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hsu *et al*., (2021) ที่ทำการทดลองในเชื้อ *Rhodopseudomonas palustris* ต่อการเจริญเติบโตของกะหล่ำปลี พบว่า แบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวช่วยส่งเสริมการดูดซึมไนโตรเจนในดิน เพิ่มระดับ auxin ทำให้ใบพืชมีการ

ยืดขยาย แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่า บัตเตอร์เฮดในกรรมวิธีที่ 8 มีการยืดขยายของใบ ทำให้ทรงพุ่มที่มากกว่ากลุ่มอื่น ๆ แต่เป็นลักษณะการบานออก ไม่มีการห่อของหัวบัตเตอร์เฮดและสัมพันธ์กับจำนวนใบที่น้อยกว่ากลุ่มอื่น ๆ กรรมวิธีที่ 4 (UT- 67) มีแนวโน้มให้ผลด้านการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮดทางด้านจำนวนใบมากที่สุด จากการสังเกตพบว่ามีการห่อตัวที่แน่น และส่งผลให้น้ำหนักสดของบัตเตอร์เฮดมีแนวโน้มสูงกว่าบัตเตอร์เฮดในกรรมวิธีอื่น ๆ อาจเนื่องมาจาก UT-67 มีคุณสมบัติในการผลิต 5-ALA และ IAA ได้ค่อนข้างสูงกว่า กรรมวิธีอื่น ๆ ซึ่ง ส่งผลต่อการยืดขยายของใบ การอัดแน่นของใบและน้ำหนักสดของผลผลิต สอดคล้องกับการทดลอง Lee *et al*. (2021) ของศึกษากลไกในผักกวางตุ้งจีน (*Brassica rapa*) พบว่าการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิต 5-ALA และ IAA ช่วยเพิ่มการสะสม Auxin/IAA ภายในใบ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ เพิ่มพื้นที่ใบ และทำให้น้ำหนักสด ของผักกินใบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าความเขียวของใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มที่ชุดควบคุมมีค่าความเขียวของใบมากกว่าชุดอื่น ๆ เป็นไปได้ว่า ความเข้มข้น PNSB ที่ใส่ไปแต่ละชุดการทดลอง ส่งผลให้มีการยืดขยายของใบเร็วจนเกินไปจนปริมาณคลอโรฟิลด์ต่อพื้นที่ใบกระจายตัวเจือจางลง (Dilution effect) (Hsu *et al*., 2021) อย่างไรก็ตาม การทดสอบครั้งนี้ยังขาดชุดทดลองเฉพาะน้ำหมักอาหารที่ไม่เติมเชื้อลงไป เพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพที่มาจากแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ซึ่งอาจจะต้องทำการทดสอบในครั้งต่อไป

Conclusions

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ไม่สะสมกำมะถันจำนวน 59 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินและน้ำในพื้นที่ 9 จังหวัด นำมาคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่ ความเร็วในการเจริญเติบโต ความสามารถในการละลายฟอสเฟต ย่อยสลายเซลลูโลส ย่อยสลายเจลาติน การสร้างฮอร์โมนพืช 5-ALA และ IAA พบไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิตน้ำหมักชีวภาพ 3 ไอโซเลท ได้แก่ UT-7, UT-8 และ UT-67 ซึ่งเป็นเชื้อใน Genus *Rhodopseudomonas* การผลิตน้ำหมักใช้สูตรการทำน้ำหมักเช่นเดียวกับวัตถุดิบที่เกษตรกรนิยมใช้ ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักแบคทีเรียสังเคราะห์แสงต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของบัตเตอร์เฮด โดยมีการทดสอบสูตรน้ำหมักแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแบบใช้น้ำหมักจากเชื้อตัวเดียวและแบบผสม เปรียบเทียบ control คือ น้ำเปล่า สำหรับการทดสอบกับบัตเตอร์เฮดใช้อัตราส่วนน้ำหมักต่อน้ำ เท่ากับ 1:500 รดน้ำหมักทุกๆ 7 วัน ผลการทดสอบพบว่า น้ำหมักจากไอโซเลท UT-7 ช่วยส่งเสริมการเจริญด้านความสูง และ UT-67 ช่วยส่งเสริมทางด้านจำนวนใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีแนวโน้มเพิ่มน้ำหนักสด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุม ทั้งนี้อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้น้ำหมัก และต้องทดสอบกับพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไป

Acknowledgments

ขอขอบคุณงบวิจัยจากโครงการวิจัยทุนอุดหนุนงบประมาณด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) เพื่อสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund) ประจำปีงบประมาณ 2566 ขอบคุณนางสาวณัฐชญา สายคำวงศ์และนางจุฑารัตน์ จีนด้วง สำหรับความช่วยเหลือในงานวิจัยครั้งนี้

References

Bankerlang S., Vijay B., & Samir E. T. (2018). Influence of photosynthetic bacteria and bio charcoal on growth, yield and quality of lettuce (*Lactuca sativa*) cv. iceberg chrispiano. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2018, 7*(4), 2584-2588.

Chomphuk, C. (2009). Statistics: experimental design and data analysis in plant research using "R". Bangkok: Kasetsart University Press.

Chountragoon, O., Tantirungkij, & Tongdonae, W. (2011). Selection of bacteria for the production of compost inoculum. In *Proceeding The 8th KU KPS National Conference*. (pp. 1517–1522). Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus: Nakhon Pathom. (in Thai)

Ditprasert , K., Sampaothong, P., Metus Wongthirapong, M., Ornpailin Ritsarnpitak, O., Piyangkun Lueangjaroenkit, P. & Prarokijjak, W. (2026). A study on the growth of red oak Lettuce (*Lactuca sativa* L.) using photosynthetic bacteria in the Mae Klong River Basin, Samut Songkhram Province. *Science and Technology Northern Journal, 7*(1), 31-45. (in Thai)

Ehmann, A. (1977). The van Urk-Salkowski reagent -a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *Journal of Chromatography, 132*(2), 267–276.

George, S. P., Ahmad, A., & Rao, M. B. (2001). Studies on carboxy methyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresource Technology*, *77*(2), 171–175.

Hsu, S., Shen, M. Chen, J. , Lur, H., & Liu, C. (2021). The photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3 exerts plant growth-promoting effects by stimulating nitrogen uptake and elevating auxin levels in expanding leaves. *Frontiers in Plant Science, 12, 573634*.

Krairak, S., & Krairak, N. (2020). The coenzyme Q10 production from *Rhodopseudomonas* sp. S12-13 mutant. *Burapha Science Journal*, *26*(1), 105–116.

Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution*, *41*(12), 1-9.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt, & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (pp.115–175). New York: John Wiley & Sons

Lee, S.K., Lur, H.S., & Liu, C.T. (2021). From lab to farm: elucidating the beneficial roles of photosynthetic bacteria in sustainable agriculture. *Microorganisms 2021, 9,* 2453

Mauzerall, D, & Granick, S. (1956). The occurrence and determination of δ-aminolevuline acid and porphobilinogen in urine. *Journal of Biological Chemistry*, *219*(1), 435–446.

Morrison, H.M., & Bose, A. (2024). Purple non-sulfur bacteria for biotechnological applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *31*, 52.

Nookongbut, P., Kantachote, D., & Khuong, N. Q., Sukhoom, A., Tantirungkij, M.& Limtong, S. (2019). Selection of acid-resistant purple nonsulfur bacteria from peat swamp forests to apply as biofertilizers and biocontrol agents. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *19*, 488–500.

Nookongbut, P., Jingjit, N., Kantachote, D., Sukhoom, A., & Tantirungkij, M. (2020). Selection of acid tolerant purple nonsulfur bacteria for application in agriculture. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, *19*(4), 774–790.

Paipitak, S., Wongchawalit, J., & Srisodsuk, M. (2013). Plant root stimulation by purple non-sulfur photosynthetic bacteria. *Agricultural Science Journal*, *44*(2), 147–157. (in Thai)

Panwichian, S., Kantachote, D., Wittayaweerasak, B., & Mallavarapu, M. (2010). Isolation of purple nonsulfur bacteria for the removal of heavy metals and sodium from contaminated shrimp ponds. *Electronic Journal of Biotechnology*, *13*(4).

Rao Subba, N. S. (1993). *Biofertilizers in Agricultural and forestry* 3rd ed. Oxford & IBH Publishing Company, Delhi, 242 p.

Saikeur, A. (2013). Isolation of acidotolerant/acidophilic photosynthetic bacteria from peat soils in Nakhon Si Thammarat Province and the promoting of biomass and 5-aminolevulinic acid production by Plackett-Burman technique. *Science and Technology RMUTT Journal*, *3*(2), 75–89. (in Thai)

Sakarika, M., Spanoghe, J., Sui, Y., Wambacq, E., Grunert, O., Haesaert, G., Spiller, M., & Vlaeminck, S. E. (2020). Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microbial Biotechnology*, *13*(5), 1336–1365.

Sakpirom, J., Kantachote, D., Nunkaew, T., & Khan, E. (2017). Characterizations of purple non-sulfur bacteria isolated from paddy fields, and identification of strains with potential for plant growth-promotion, greenhouse gas mitigation and heavy metal bioremediation. *Research in Microbiology*, *168*(3), 266–275.

Seangtumnor, N., Kantachote, D., Nookongbut, P., & Sukhoom, A. (2018). The potential of selected purple nonsulfur bacteria with ability to produce proteolytic enzymes and antivibrio compounds for using in shrimp cultivation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *14*, 138–144.

Shutsrirung, A. (2002). *Production of indole-3-acetic acid and rhizobitoxine by Bradyrhizobia*. Department of Soil Science and Conservation, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. https://archive.lib.cmu.ac.th/full/res/2545/tressct490643_45_full.pdf (in Thai)

Sudewi, S., Ala, A., Patandjengi, B., & Farid, M. B. D. R. (2020). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of local aromatic rice in Bada Valley Central Sulawesi, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth Environment Science*, *575,* 012017.

Theerak, W., Sumranram, W., & Rattanakaew, T. (2020). Effects of photosynthetic bacteria and bio extract on growth and yield of RD43 rice cultivated in organic systems, *Journal of Agricultural Research and Extension*, 37(2), 25–35. (in Thai)

Thuwa Kham, N., & Fanfuenha, W. (2019). Efficiency of bioextract from fruits residues towards green oak leaf lettuce growth. *KKU Science Journal*, *47*(2), 266–272. (in Thai)

Tongnate, K., Chantabut, L., Chatjaraskul, V., Sahapong, T., Khumsing, K.,& Worasern W. (2026). Effect of photosynthetic bacteria concentration on growth yield and physical quality of lettuce. *Prawarun Agricultural Journal*, *23*(1), 24-29. (in Thai)