ประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว[1/]
Efficiency of Phosphate Solubilizing Bacterial on Rice Growth[1/]

ผู้ทำสัมมนา **นางสาวจิชญา วงค์บุตรดี[2/]**
อาจารย์ที่ปรึกษา **อาจารย์ สุพัตรา คำเรียง[3/]**

บทคัดย่อ

แบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Bacteria; PSB) มีบทบาทสำคัญในการช่วยเพิ่มปริมาณธาตุอาหารฟอสฟอรัสให้กับพืช และยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยการสร้างกรดอินทรีย์และฮอร์โมนพืชบางชนิด รวมทั้งการปลดปล่อยแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับพืช ในปัจจุบันมีการใช้จุลินทรีย์มาช่วยในการย่อยสลายฟอสเฟต ได้เก็บตัวอย่างดินพื้นที่ทำการเพาะปลูกข้าว คัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตได้จำนวน 27 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียมีการละลายฟอสเฟตได้แตกต่างกัน โดยไอโซเลท PSB4, PSB9 และ PSB10 มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดเท่ากับ 3.29, 2.88 และ 2.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการแยกและกำหนดลักษณะของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตจากดิน พบว่าแบคทีเรีย (PSB) สามารถแปลงรูปที่ไม่ละลายของฟอสฟอรัสเป็นรูปแบบที่เข้าถึงได้ PSB 11 สายพันธุ์รวมทั้งแบคทีเรียอนินทรีย์ 5 สายพันธุ์ (IPSBS) ประเมินค่าที่สูงกว่า 1.0 วงกลมโปร่งใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (D/d) บน $Ca_3(PO_4)_2$ พบว่า Caboud P (Ca-P) เป็นสปีชีส์หลักของสารอนินทรีย์ P (PI) และสารอนินทรีย์ที่มีความต้านทานทานสูง (HR-OP) คิดเป็นส่วนใหญ่ของสารอินทรีย์ P (OP) สายพันธุ์เหล่านี้เป็นสปีชีส์แบคทีเรียของ *Enterobacter asburiae*, *Acinetobactre* spp., สายพันธุ์ *Bacillus cereus* spp. ผลของการใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาพแอโรบิกพบว่า อิทธิพลของพันธุ์ข้าวมีผลต่อความแตกต่างในหลายลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้นและรากข้าว อายุ 7-28 วันหลังงอก ในขณะที่อิทธิพลของการใส่เชื้อละลาย แบคทีเรีย P ส่งผลอย่างชัดเจนเมื่อข้าวอายุได้ 21 วันหลังงอก ในด้านการเพิ่มขึ้นของความสูง จำนวนราก น้ำหนักแห้งต้นและราก และมีแนวโน้มในการส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนราก และความเขียวใบ เมื่ออายุข้าวได้ 28 วันหลังงอก ซึ่งผลของการใส่เชื้อ MC 21 ส่งผลให้จำนวนราก น้ำหนักรากแห้ง และความเขียวใบในข้าวทุกพันธุ์เพิ่มขึ้นถึง 60% 100% และ 32% ตามลำดับ

คำสำคัญ: แบคทีเรียละลายฟอสเฟต; ฟอสฟอรัส; จุลินทรีย์ดิน

[1/]เอกสารประกอบรายวิชา 1201 480 สัมมนา

[2/]นักศึกษาชั้นปีที่ 4 ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[3/]อาจารย์ประจำภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารหลักและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2564 ที่ผ่านมามีการส่งออกข้าวคิดเป็นมูลค่า 107,758 ล้านบาท ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมักมีผลผลิตต่ำ เนื่องจากสภาพพื้นที่เป็นดินเค็มจัดส่งผลต่อปริมาณธาตุอาหารหรือมีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ โดยเฉพาะฟอสฟอรัส (P) เป็นธาตุที่ไม่ค่อยเคลื่อนย้ายในดิน และถูกตรึงได้ง่ายด้วยธาตุอาหารอื่นๆ ทำให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ในสภาพที่ไม่มีน้ำขังฟอสฟอรัสละลายน้ำได้น้อยลงส่งผลให้ต้นข้าวดูดไปใช้ได้ยากขึ้น (กฤชญา, 2560) ลักษณะเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทรายความอุดมสมบูรณ์ต่ำ มีธาตุอาหารพืชบางชนิดไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของข้าว สภาพดินเป็นกรด มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่ำ (ศิวะพงศ์ และสมเกียรติ, 2549) จึงทำให้ส่งผลต่อผลผลิตข้าวเฉลี่ยต่อไร่ต่ำเมื่อดินเป็นกรดหรือเป็นด่าง ซึ่งจะทำให้ฟอสฟอรัสมีปริมาณต่ำและไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช ดังนั้นการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มสารอาหารให้แก่พืชจึงเป็นวิธีการที่เกษตรกรใช้กันอย่างกว้างขวางโดยที่การใช้ปุ๋ยเคมีในแปลงพืชผลทางการเกษตรของเกษตรกรในปัจจุบันมีผลกระทบอย่างหนึ่งที่สำคัญคือ การสะสมฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่สามารถใช้ในดินสะสมเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันปัญหาดินที่ใช้ในการทำการเกษตรอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานเกิดปัญหาดินเสื่อมคุณภาพ ดังนั้นถ้าสามารถย่อยสลายฟอสเฟตในดินกลุ่มที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ให้พืชสามารถใช้ได้จัดเป็นแนวทางอย่างหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งมีจุลินทรีย์ในธรรมชาติบางชนิดมีศักยภาพในการละลายฟอสเฟตในดินให้พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ วิไลวรรณ (2560)

สำหรับแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนรูปฟอสเฟตที่ละลายไม่ได้ให้อยู่ในรูปที่ละลายได้ จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp., *Flavobacteruim* spp., *Sclerotium* spp., *Bacillus* spp. *Aspergillus* spp. เป็นต้น โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีการปลดปล่อยกรดอินทรีย์เพื่อละลายฟอสเฟตออกมาแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ (ชญานิศ และดุสิต, 2564) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่ออภิปลายประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

คุณสมบัติของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการปรับสมดุลของฟอสฟอรัสสามารถทำได้ 2 แนวทางทั้งการแปรสภาพอินทรีย์ฟอสฟอรัสและอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ที่อยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืชให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่นไฟทินจัดเป็นอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืชแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และเชื้อรา *Aspergillus* spp., *Thiobacillus* spp, *Penicillium* spp, *Rhizopus* spp. เป็นต้น จะผลิตเอนไซม์ Phytase, Phosphatase, Nucleotidases และ glecerophosphatase เพื่อแปรสภาพอินทรีย์ฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปของอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่เรียกว่าออโธฟอสเฟต (Orthophosphate) ซึ่งเป็นไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPO_4) และไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPO_4) สำหรับสารประกอบอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ที่อยู่ในรูปหินฟอสเฟตและฟอสเฟตในดินที่ไม่ละลายน้ำพืชจึงไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2จุลินทรีย์บางชนิดในสกุล *Bacillus* spp. และ *Aspergillus* spp. จะช่วยทำให้ฟอสเฟตละลายน้ำเพิ่มมากขึ้นโดยการปลดปล่อยกรดโปรตอนหรือสารคีเลต (เป็นสารที่สามารถจับกับไอออนของธาตุไว้ในรูปที่พืชสามารถดูดไปใช้ได้) ทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟอสเฟตในดินทำให้ฟอสเฟตถูกเปลี่ยนเป็นรูปที่ละลายน้ำได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกันกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยกันและกัน (Symbiosis) ช่วยทำให้รากพืชดูดซับธาตุอาหารได้ดียิ่งขึ้น จุลินทรีย์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นราที่อาศัยอยู่ทั้งภายในรากพืชและบางมีส่วนองค์ประกอบของราอยู่ภายนอกรากพืช โดยส่วนที่อยู่ภายนอกรากพืชจะทำหน้าที่คล้ายกับรากขนอ่อนของพืชช่วยดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นขณะเดียวกันราก็จะได้รับสารประกอบคาร์บอนจากการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชเป็นอาหารตัวอย่าง เช่นราไมคอร์ไรซา (Mycorrhizal fungi) ที่มีบทบาทในการละลายและส่งเสริมการดูดใช้ธาตุฟอสฟอรัสแก่พืช

ความหลากหลายของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

ชนิดของจุลินทรีย์ละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลก มีการประยุกต์ใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ดินที่มีประสิทธิภาพในการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตเป็นปุ๋ยชีวภาพ เพื่อเพิ่มผลผลิตพืชโดยกลุ่มจุลินทรีย์ละลายอนินทรีย์ฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Microorganism: PSM) เป็นจุลินทรีย์ดินที่มีความสามารถในการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตที่อยู่ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ และเป็นประโยชน์แก่พืชจุลินทรีย์เหล่านี้มีหลายชนิดทั้งที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา*เช่น Aspergillus sp., Penicillium sp., Pseudomonas sp., Azospirillum sp., Bacillus sp., Rhizobium sp ., Burkholderia sp., Arthrobacter sp., Alcaligenes sp., Serratia sp., Enterobacter sp., Acinetobacter sp.,* Flavobacterium sp. (ตารางที่ 1) จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถพบได้ทั่วไปในดินพื้นที่เกษตรกรรมพื้นที่ป่าไม้และพื้นที่ทั่วไปโดยเฉพาะดินบริเวณรากพืช แต่ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดของดินและการใช้ประโยชน์ที่ดิน นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ในกลุ่มแอ็คติโนมัยซีส (Actinomycetes) เช่น *Actinomyces sp., Streptomyces sp.* จุลินทรีย์กลุ่ม Lauluunnisa (Cyanobacteria) *Anabena* spp., *Calithrix braunii* spp., *Nostoc* spp., *Scytonema* spp., *Paunsulundu Arbuscular* Mycorrhiza (VAM) Fasciculatum เป็นต้น ที่สามารถละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตในดินได้ Glomus วุฒิชัย (2558)

ตารางที่ 1 ชนิดของจุลินทรีย์ละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตในดิน

จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียที่ละลายอนินทรีย์ฟอสเฟต	**จุลินทรีย์ในกลุ่มราที่ละลายฟอสเฟต**
Achromobacter	**Aspergillus**
Bacillus	- *A. awamori*
- *B. subtilis*	- *A. carbonum*
- *B. cereus*	- *A. flavas*
- *B. circulans*	- *A. niger*
- *B. megaterium Var. phosphaticm*	- *A. terreus*
- *B. mycoides*	- *A. tubingensis*
- *B. polymyxa*	**Cladospporium**
- *B. pulvifaciens*	**Curvalria**
Escherichia	- *C. lunata*
- *E. freundii*	Cylindrocladium
Flavobacterium	**Fusarium**
Micrococcus	- *F. oxysporum*
Pseudomonas	**Micromonospora**
- *P. fiuorescens*	**Paeclomyces**
- *P. putida*	**Penicillium**
- *P. rathonis*	- *P.digitatum*
- *P. striata*	- *P. pinophilum*
Serratia	- *P. rubrum*
- S. phosphaticum	**Pythium**
Thaiobacillus	**Rhizopus**
- *T. thiooxidans*	**Schwanniomyces**
- *T. thioparus*	- *S. occidentalis*
	Sclerotium
	- *S. rolfsii*
	Trichoderma

ที่มา: วุฒิชัย (2558)

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (พิชญ์นันท์, 2561)

1. การแยกแบคทีเรียและเชื้อราจากดินรอบรากข้าว ด้วยวิธี Soil Dilution Plating โดยนำตัวอย่างดินจำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เจือจางสารแขวนลอยตัวอย่างดินให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับแยกแบคทีเรีย 10^{-4} ดูดสารแขวนลอยดินที่ได้ใส่จานเพาะจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มจานเพาะจุลินทรีย์ทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) เป็นเวลา 2-7 วัน แยกโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว ๆ ไปเพาะเลี้ยง (Streak) บนอาหาร Nutrient agar (NA) เก็บรักษาจุลินทรีย์ทุกไอโซเลทในหลอดทดลองที่มีอาหาร NA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2. การคัดเลือกแบคทีเรียและราที่มีประสิทธิภาพละลายฟอสเฟตด้วยการทดสอบบนอาหารแข็ง Pikovskaya 's (PVK) ที่มีแคลเซียมฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตจะสร้างบริเวณ ใส (Clear zone) ขึ้นรอบๆโคโลนี วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบริเวณใสให้ได้มากเพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสจาก $Ca_3(PO_4)_2$ ในอาหารเหลว

3. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว ด้วยการเลี้ยงในอาหาร PDA บ่มเลี้ยงจนเจริญเต็มจานเพาะแล้วใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะอาหารนำชิ้นอาหารที่ได้เลี้ยงในอาหารเหลว PVK ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน ขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มิลลิลิตร โดยมี $Ca_3(PO_4)_2$ เป็นแหล่งฟอสฟอรัสบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 3,5,7,9 วัน แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 นำสารละลายไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสด้วยวิธี Molybdenum blue วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV visible-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (พิชญ์นันท์, 2561)

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลทมาศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตเบื้องต้นด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Pikovskaya's Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-42°C) เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการสร้างวงใสรอบโคโลนี่ของเชื้อแต่ละไอโซเลทแล้ววัดค่ารัศมีบริเวณใสและรัศมีโคโลนีของเชื้อ โดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์เพื่อคำนวณหาค่า Halo: Colony Ratio ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกความสามารถในการละลายฟอสเฟตของเชื้อในเบื้องต้นถ้าค่า Halo: Colony Ratio สูงแสดงว่าเชื้อละลายฟอสเฟตได้ดีจากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของเชื้อในอาหารเหลว Pikovskaya's Broth (Microbiological Arade, Himedia, India) โดยถ่ายกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ลงในขวดรูปชมพูขนาด 250 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอาหาร Pikovskaya's Broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มเขย่าให้อากาศบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (28-42°C) เป็นเวลา 72 ชั่วโมงและทำชุดควบคุม (Control) ควบคู่ไปกับการทดลองด้วยโดย ชุดควบคุมจะไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียเมื่อครบ 72 ชั่วโมงดูดตัวอย่างเชื้อแต่ละไอโซเลทที่เจริญในอาหาร Pikovskaya's broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใส่หลอดปีนตกตะกอนตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาทีเก็บ ส่วนใส (Supernatant) ที่อยู่ด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้

สำหรับวัดปริมาณฟอสเฟตที่ละลายน้ำด้วยวิธี Vanadomolybdo Phosphoricacid Colorimetric 13 โดยมีขั้นตอนดังนี้ ปิเปตส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Vanado Molybdate Reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีจากนั้นนำไปวัด 420 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงทีความยาวคลื่นคำนวณปริมาณฟอสเฟตที่ละลายน้ำโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ทับ และคณะ (2561) การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของข้าว วางแผนการทดลองแบบ CRD ในสภาพเรือนปลูกพืชดลองประกอบด้วย 5 กรรมวิธีกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ดังนี้กรรมวิธีที่ 1 (T1) ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 + สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (กรรมวิธีควบคุม) กรรมวิธีที่ 2 (T2) ใส่ปุ๋ยสูตร 16 0-0 + ร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต + สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชสารกำจัดศัตรูพืชกรรมวิธีที่ 3 (T3) แบคทีเรียละลายฟอสเฟต + สารกำจัดศัตรูพืชกรรมวิธีที่ 4 (T4) ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-20-0 ร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต + สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชและกรรมวิธีที่ 5 (T5) ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 + สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชทำการบันทึกผลโดย การวัดความสูงต้นความยาวรากน้ำหนักสุดต้นน้ำหนักแห้งต้นน้ำหนักสดรากและน้ำหนักแห้งรากเมื่อข้าวมีอายุ 20 วันนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี DMRT ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (PSB) ด้วยอาหาร Pikovskaya's Agar เมื่อนำสารละลายดินตัวอย่างมาทำการ Spread Plate Method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar เพื่อคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในเบื้องต้น พบว่าปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากดินในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 มีปริมาณเฉลี่ย เท่ากับ $5.26 \pm 0.57 \times 10^{\circ}$ CFU/g. $1.68 \pm 0.55 \times 105$ CFU/g, $2.30 \pm 0.26 \times 10^{3}$ CFU/g และ $8.50 \pm 6.52 \times 10$ CFU/g ตามลำดับและสามารถคัดแยกแบคทีเรียบนอาหาร PVK ได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลทโดยจำนวนไอโซเลทของเชื้อที่พบในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 8, 7, 6 และ 6 ไอโซเลทตามลำดับ ในจำนวนนี้มีแบคทีเรียที่สร้างวงใสรอบโคโลนี จำนวน 10 ไอโซเลทซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้มาจากจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 จำนวน 2 ไอโซเลทคือไอโซเลท PSB1 และ PSB2 จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 จำนวน 2 ไอโซเลทคือไอโซเลท PSB3 และ PSB4, จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 จำนวน 3 ไอโซเลทคือไอโซเลท PSB5, PSB6 และ PSB7 และจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 จำนวน 3 ไอโซเลทคือไอโซเลท PSB8 PSB9 และ PSB10 (ตารางที่ 2)
ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย PSB เมื่อศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหาร Pikovskaya's agar แล้ววัดค่ารัศมีบริเวณใสและรัศมีโคโลนีของเชื้อเพื่อคำนวณค่า Halo: Colony Ratio 1.08 (ตารางที่ 3) ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท พบว่าค่าเฉลี่ย Halo: Colony Ratio ของแบคทีเรียมีค่าตั้งแต่ 1.05 -1.08

ตารางที่ 2 โคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างดิน

Points Sampling	Bacterial isolates (Isolate)	Bacterial isolates showing clear zone (Isolate)	Isolate
1	8	2	PSB1, PSB2
2	7	2	PSB3, PSB4
3	6	3	PSB5, PSB6, PSB7
4	6	3	PSB8, PSB9, PSB10

ที่มา: ทับ และคณะ(2561)

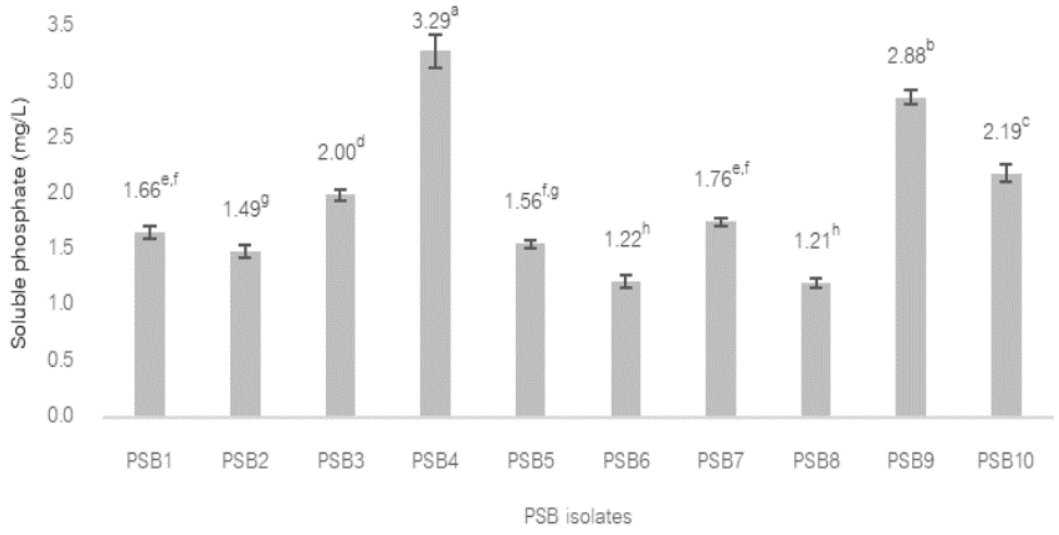
ตารางที่ 3 การละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่แยกได้

Isolate	Halo: Colony ratio*	Soluble phosphate (my/L)*
PSB1	1.06±0.02	1.66±0.06^{e,f}
PSB2	1.06±0.03	1.49±0.06^{g}
PSB3	1.08±0.02	2.00±0.05^{d}
PSB4	1.08±0.02	3.29±0.14^{a}
PSB5	1.06±0.03	1.56±0.04^{f,g}
PSB7	1.06±0.02	1.76±0.04^{e,f}
PSB8	1.08±0.01	1.21±0.05^{h}
PSB9	1.07±0.02	2.88±0.06^{b}
PSB10	1.05±0.03	2.19±0.08^{c}

* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ภายใต้แต่ละปัจจัย หมายถึง ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 5% โดย DMRT

ที่มา: ทับ และคณะ (2561)

ผลค่าเฉลี่ยของค่า Halo: Colony Ratio แต่ละไอโซเลทไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงนำแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท ไปทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูตร Pikovskaya's Broth ผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรีย PSB แต่ละไอโซเลทสามารถละลายฟอสเฟตได้แตกต่างกัน (ตาราง 3) โดยไอโซเลทที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด 3 ลำดับแรกคือ ไอโซเลท PSB4, PSB9 และ PSB10 ได้ปริมาณฟอสเฟตเท่ากับ 3.29, 2.88 และ 2.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



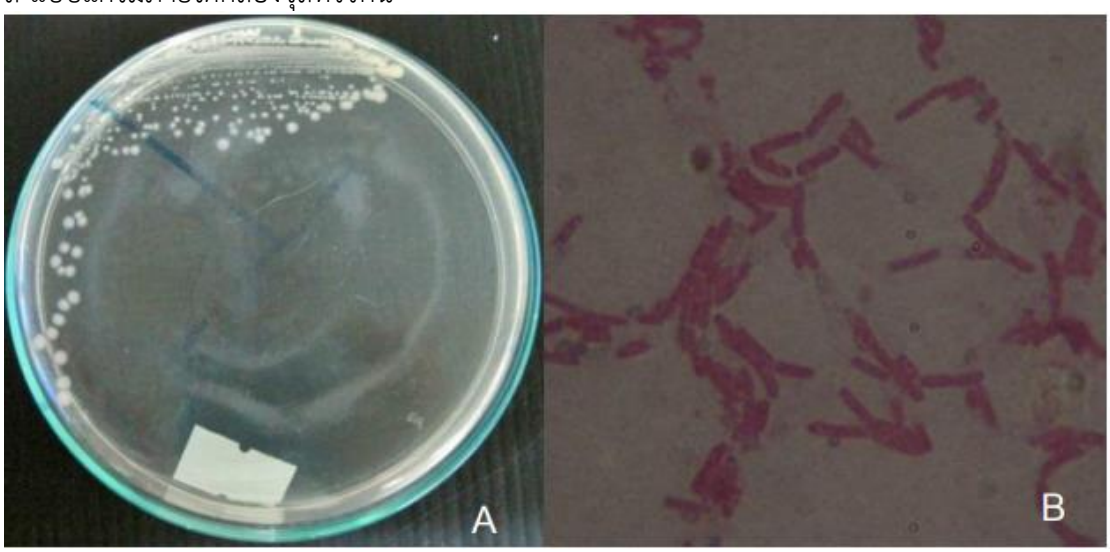
* หมายเหตุ ตัวอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 5% โดย DMRT

ที่มา: ทับและคณะ (2561)

ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่แยกได้

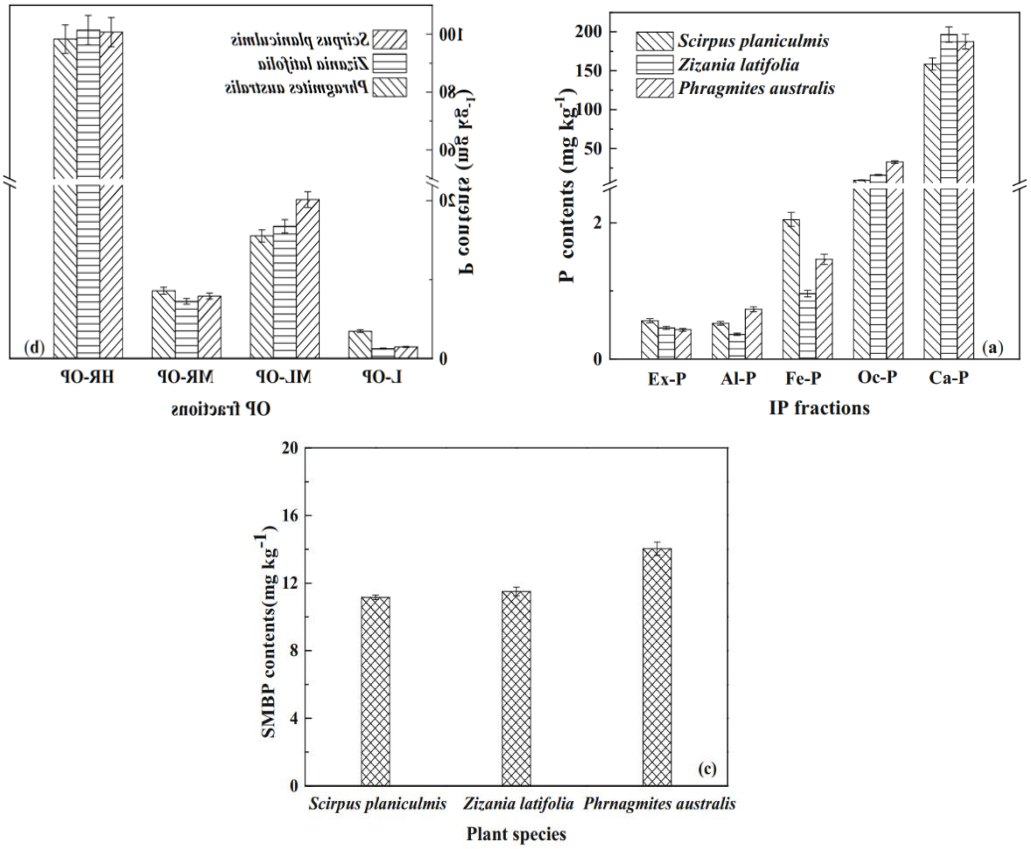
ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย PSB เพื่อให้ทราบลักษณะทางสัณฐานของแบคทีเรีย PSB ที่คัดแยก จึงได้ศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนี่เป็นสีขาว กลม ขอบเรียบ และจากการตรวจสอบลักษณะของเซลล์ การติดสีแกรม และรูปร่างของเซลล์ ด้วยการย้อมสี แบบแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์



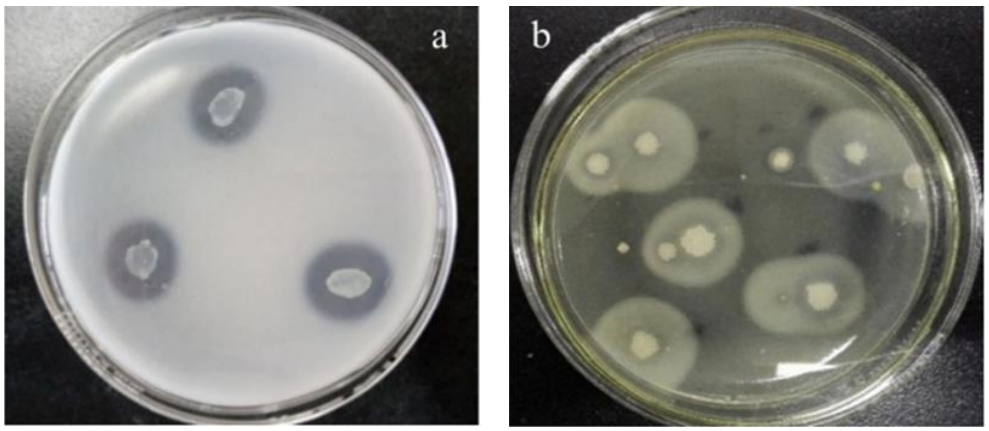
ที่มา: ทับและคณะ (2561)

ภาพที่ 2 กลุ่มแบคทีเรียของ PSB4 บนสารอาหารวุ้น (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) และเซลล์ของพวกมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (B)



ที่มา: Zedong *et al.* (2018)

ภาพที่ 3 การกระจาย IP ของดิน (a), OP (b) เศษส่วนและจุลินทรีย์ชีวมวลในดิน (C) ของแหล่งที่อยู่อาศัยPSBs (Ex-P:P แลกเปลี่ยนได้P, Al-P: Al-bound P, Fe-P: Fe-bound P, Oc-P: Occluded P, Ca-P:Ca-bound P, LOP :สารอินทรีย์ที่ไม่อยู่ในน้ำขังP, L-OP: สารอินทรีย์ที่มีความทนทานปานกลาง P, HP-OP : สารอินทรีย์ที่มีความทนทานปานกลาง P, MBP: อวัยวะที่มีความทนทานสูง ic P,SMBP: ดินจุลินทรีย์ ฟอสฟอรัส มวลชีวภาพ)



ที่มา: Zedong *et al*. (2018)

ภาพที่ 4 เคลียร์โซนที่เกิดจากฟอสฟอรัสละลายบน $Ca_3(PO_4)_2$ (a) และ เลซิติน (b)

จากการศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพแอโรบิก ของกฤชญา และคณะ (2560) วางแผนการทดลองแบบ 3x3x3 Factorial in RCBD มี 3 ซ้ำ โดยปัจจัยที่ 1 คือ ชนิดเชื้อจุลินทรีย์ (*Acinetobacterbaumannii* strain CR 1.8 *Bacillus* sp. strain MC 21 และไม่ใส่เชื้อ เป็นกรรมวิธีควบคุม) ปัจจัยที่ 2 คือพันธุ์ข้าว (ขาวดอกมะลิ 105 กข 49 และ R 258) และปัจจัยที่ 3 คือ วิธีการใช้เชื้อ (แช่เชื้อ ฉีดพ่นเชื้อ และฉีดพ่นน้ำกลั่น) ผลการศึกษาพบว่า ผลของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของข้าวที่ 21 วันหลังงอก (ตารางที่ 4) โดยความสูงของต้นข้าวจะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งเชื้อ MC 21 จะมีความสูงต้นสูงที่สุด คือ 41.8 ± 3.5 cm. รองลงมาคือ เชื้อ CR 1.8 คือ 39.0 ± 4.1 cm. และ Control จะมีความสูงต่ำที่สุด คือ 36.6 ± 4.8 cm. ส่วนค่าความเขียวใบมีนัยสำคัญทางสถิติระดับสูงมาก จะเห็นว่าเชื้อ MC 21 จะมีค่าความเขียวใบสูงที่สุด คือ 26.0 ± 22 แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเชื้อ CR 1.8 ซึ่งมีค่าความเขียวใบ 25.3 ± 1.7 และ Control จะมีค่าความเขียวใบต่ำที่สุด คือ 24.0 ± 2.3 แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเชื้อ CR 1.8 ส่วนความยาวรากมีนัยสำคัญทางสถิติระดับสูง จะเห็นว่าเชื้อ MC 21 และ เชื้อ CR 1.8 จะมีความยาวรากสูงกว่า Control น้ำหนักแห้งต้นมีนัยสำคัญทางสถิติระดับสูงมาก เชื้อ MC 21 จะมีน้ำหนักแห้งต้นมากที่สุด คือ 0.085 ± 0.009 g. รองลงมาคือ เชื้อ CR 1.8 กับ Control ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าน้ำหนักแห้งต้น 0.076 ± 0.009 g. และ 0.073 ± 0.011 g. ตามลำดับ น้ำหนักแห้งรากจะเห็นว่าเชื้อ MC 21 จะมีน้ำหนักแห้งรากมากที่สุด คือ 0.034 ± 0.006 g. แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเชื้อ CR 1.8 ซึ่งมีน้ำหนักแห้งราก 0.030 ± 0.005 g. และ Control จะมีน้ำหนักแห้งรากต่ำที่สุด คือ 0.031 ± 0.002 g. แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเชื้อ CR 1.8

ตารางที่ 4 ผลของสายพันธุ์จุลินทรีย์ต่อตัวแปรการเจริญเติบโตของข้าวที่ 21 วันหลังงอก

2345	**Shoot length (cm.)**	**Leaf Greenness**	**Root No. / plant**	**SDW (g plant^{-1})**	**RDW (g plant^{-1})**
MC 21	41.8 ± 3.5 a	26.0 ± 22 a	16.4 ± 2.5 a	0.085 ± 0.009 a	0.034 ± 0.006 a
CR 1.8	39.0 ± 4.1 b	25.3 ± 1.7 ab	15.1 ± 2.6 a	0.076 ± 0.009 b	0.030 ± 0.005 ab
Control	36.6 ± 4.8 c	24.0 ± 2.3 b	15.9 ± 3.3 ab	0.073 ± 0.011 b	0.031 ± 0.002 b
F-test	****	****	****	****	*
LSD (p<0.05)	**2.3**	**1.5**	**1.3**	**0.060**	**0.004**

หมายถึง ในคอล์มเดียวกันกับตัวอักษรบางตัวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (LSD)

* = สำคัญที่ P≤ 0.05,** = สำคัญที่ P≤ 0.01 และ*** = สำคัญที่ P≤ 0.001

ที่มา: กฤชญา และคณะ(2560)

ผลของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของข้าวที่ 28 วันหลังงอก พบว่าวิธีการใช้เชื้อด้วยวิธีการฉีดพ่นเชื้อ แช่เชื้อ และฉีดพ่นน้ำกลั่น (**Control**) ไม่ส่งผลต่อความยาวราก และน้ำหนักรากแห้ง ทำให้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่วิธีการใช้เชื้อด้วยวิธีการฉีดพ่นเชื้อมีผลทำให้ความสูงต้น จำนวนใบ ค่าความเขียวใบ จำนวนราก และน้ำหนักแห้งต้นมีค่าเพิ่มขึ้น และวิธีการใช้เชื้อแบบแช่เมล็ด มีผลในการเพิ่มความสูงต้นข้าวเพียงลักษณะเดียว ในขณะที่วิธีการใช้เชื้อแบบแช่เมล็ดมีผลในการเพิ่มความสูงต้นข้าวเพียงลักษณะเดียว

ตารางที่ 5 ผลของวิธีการใส่จุลินทรีย์ต่อตัวแปรการเจริญเติบโตของข้าว 28 วันหลังงอก

Effect	Shoot length (cm.)	Leaf No. / plant	Leaf Greenness	Root length (cm.)	Root No./plant	SDW (g/plant)	RDW (g/plant)
Spay	42.5 ± 5.3a	4.2 ± 0.2 a	21.4 ± 1.7 a	18.9 ± 2.9 a	19.0 ± 3.2 a	0.116 ± 0.027 a	0.054 ± 0.011a
Soaking	41.4 ± 6.4 a	3.9 ± 0.5 ab	20.3 ± 1.9 ab	18.9 ± 2.7 a	15.8 ± 3.1 b	0.102 ± 0.025 b	0.051 ± 0.001 a
Control	37.0 ± 6 b	3.8 ± 0.6 b	18.7 ± 2.1 b	20.1 ± 2 a	15.4 ± 4.6 b	0.093 ± 0.022 b	0.043 ± 0.01 a
F-test	**	**	**	ns	***	***	ns
LSD (p<0.05)	3.9	0.4	1.5		2	0.01	

หมายถึง ในคอล์มเดียวกันกับตัวอักษรบางตัวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (LSD)

* = สำคัญที่ P≤ 0.05,** = สำคัญที่ P≤ 0.01 และ*** = สำคัญที่ P≤ 0.001

ที่มา: กฤชญา และคณะ(2560)

สรุป

จากการศึกษาความหลากหลายและประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟต มีความสามารถละลายฟอสเฟตได้แตกต่างกัน คือ ไอโซเลท PSB4, PSB9 และ PSB10 ได้ละลายฟอสเฟตได้ปริมาณ 3.29, 2.88 และ 2.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อคัดแยกลักษณะของแบคทีเรียที่ละลายฟอสแฟต พบว่าแบคทีเรีย (PSB) ที่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้จำนวน 11 ไอโซเลท ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Enterobacter asburiae*, *Acinetobactre* spp. และ *Bacillus* spp. ซึ่งมีอิทธิพลการเจริญเติบโตทางลำต้นและรากข้าวของข้าว และทำให้ความสูง จำนวนราก น้ำหนักแห้งต้นและรากเพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ปริมาณจุลินทรีย์ละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ขยายเพื่อเพิ่มปริมาณ ต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่า 10^7 โคโลนีต่อกรัมเพื่อให้สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน และสามารถมีชีวิตอยู่รอดและดำเนินกิจกรรมในดินได้ดี

2. จุลินทรีย์ละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจึงควรเติมอินทรียวัตถุต่าง ๆ ลงในดิน จะช่วยส่งเสริมกิจกรรมของจุลินทรีย์ละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตได้ จึงไม่ควรเผาตอซังพืชหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตเพราะจะทำลายอินทรียวัตถุในดิน

3. ดินที่มีปริมาณฟอสฟอรัสในดินต่ำมาก ๆ และดินเปรี้ยวจัดควรมีการศึกษาการใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตร่วมกับปุ๋ยเคมี ฟอสฟอรัสและแหล่งฟอสฟอรัสอื่น ๆ เช่น หินฟอสเฟตเพื่อเพิ่มแหล่งฟอสฟอรัสและกิจกรรมของจุลินทรีย์ เนื่องจากประสิทธิภาพและกิจกรรมของจุลินทรีย์ละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตขึ้นอยู่ปริมาณและชนิดของฟอสฟอรัสในดิน

4. ดินที่มีความเป็นกรดรุนแรงมากโดยเฉพาะดินเปรี้ยวจัด ควรมีการศึกษาการจัดการดินโดยการยกระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินให้ได้ระดับหนึ่ง ซึ่งอาจไม่ถึงค่าความต้องการปูนของดินร่วมกับการใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต เพื่อเพิ่มกิจกรรมและปริมาณการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตของจุลินทรีย์และยังเป็นการช่วยลดอัตราการใช้ปูนในการปรับปรุงดิน

เอกสารอ้างอิง

กฤชญา ปัญญา, เนตรนภา อินสลุด และ สายสมร ลำยอง. 2560. ผลของการใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ของข้าวในสภาพแอโรบิก. แก่นเกษตร 45(1): 1093-1098.

ชญานิศ กล่าสุข และ ดุสิต อธินุวัฒน์. 2564. การจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ ใหม่และแนว. Thai Journal of Science and Technology 38(3): 39-49

ทับ กาบบัว และ อภิญญา ไชยรา. 2565. การคัดเลือกและประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินในพื้นที่ปลูกข้าวจังหวัดศรีสะเกษ. PBRU Science journal 19(1): 72-83

พิชญ์นันท์ กังแฮ, สุทธกานต์ ใจการิน, อภิวัฒน์ หาญธนพงศ์, สาธิต ปิ่นมณี และ วิภา หอมหวน. 2561. ความหลากหลายและประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินบริเวณรากข้าวในพื้นที่นาภาคเหนือ. วารสารวิชสการข้าว 9(1): 46-59

วุฒิชัย จันทรสมบัติ. 2558. การใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ซุปเปอร์ พด.9 ในดินกรดจัด. เอกสารวิชาการกองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน. 0836(4): 1-28

ศิวะพงศ์ นฤบาล และ สมเกียรติ กวิกรานต์. 2549. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าวในโครงการสถานีพัฒนาการเกษตรที่สูงดอยยอมพายตามพระดำริ. ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตแม่ฮ่องสอน 9: 224-251

Zedong, T., Z. Chen, Q. Zhang, Y. Yao, M.Y. Song, and M. Li. 2018. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soils of the Yeyahu Wetland in Beijing, China. Environment Science and Pollution Research 26:33976-33987.