PBRU SCIENCE JOURNAL
2022.19(1) : 72-83

การคัดเลือกและประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินในพื้นที่ปลูกข้าว จังหวัดศรีสะเกษ

Screening and Efficiency of Phosphate Solubilizing Bacteria from Rice Rhizosphere of Si Sa Ket Province

ทัย กาบบัว* และ อภิญญา ไชยรา

Thai Kabbua* and Apinya Chaiyara

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏศรีสะเกษ 33000

Division of Environmental Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Sisaket Rajabhat University, Sisaket, 33000

Corresponding author; E-mail: t.kabbua@sskru.ac.th

Received: 20 July 2021 /Revised: 21 August 2021 /Accepted: 26 September 2021

บทคัดย่อ

แบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria; PSB) มีบทบาทสำคัญในการช่วยเพิ่มปริมาณธาตุอาหารฟอสฟอรัสให้กับพืชและยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยการสร้างกรดอินทรีย์และฮอร์โมนพืชบางชนิด รวมทั้งการปลดปล่อยแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับพืชอีกด้วย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินในพื้นที่ปลูกข้าวของตำบลปราสาทเยอ อำเภอไพรบึง จังหวัดศรีสะเกษ ด้วยอาหารคัดเลือกสูตร Pikovskaya's agar (PVK) และทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหารเหลว Pikovskaya's broth ด้วยวิธี Vanadomolybdo phosphoric acid colorimetric ผลการวิจัยพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะวงใสรอบโคโลนี (clear zone) บนอาหารแข็ง PVK ได้ทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท PSB1-PSB10 โดยไอโซเลท PSB1, PSB2, PSB3, PSB4, PSB5, PSB6, PSB7, PSB8, PSB9 และ PSB10 สามารถละลายฟอสเฟตได้ปริมาณเท่ากับ 1.66, 1.49, 2.00, 3.29, 1.56, 1.22, 1.76, 1.21, 2.88 และ 2.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้แบคทีเรีย PSB ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยเฉพาะต้นข้าวต่อไป ซึ่งแบคทีเรีย PSB ที่คัดแยกได้นี้น่าจะมีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ฟอสฟอรัส ฮอร์โมนพืช ไนโตรเจน แบคทีเรียละลายฟอสเฟต

Abstract

Phosphate solubilizing bacteria (PSB) play a considerable function on plant phosphorus nutrition by enhancing phosphorus availability and plant growth by production of phytohormone, organic acid and acceleration of other available trace elements. This research aimed to isolate phosphate solubilizing bacteria from soil rhizosphere of rice in Prasat Yoe Subdistrict, Phrai Bueng District, Si Sa Ket Province by using Pikovskaya's (PVK) agar and determine phosphate solubility efficiency in Pikovskaya's broth by Vanadomolybdo phosphoric acid colorimetric method. The results showed that 10 bacterial isolates showing a clear zone on PVK agar were obtained. The bacterial isolates were named PSB1-PSB10. Bacterial isolates PSB1, PSB2, PSB3, PSB4, PSB5, PSB6, PSB7, PSB8, PSB9 and PSB10 solubilized phosphate at 1.66, 1.49, 2.00, 3.29, 1.56, 1.22, 1.76, 1.21, 2.88 and 2.19 mg/L, respectively. The preliminary study of morphology on isolated bacterial isolates found that they were rod-shaped gram-negative bacteria. However, further studies are needed to obtain the most effective PSB for plant growth promotion, especially for rice. The potential of isolated PSB from this study can be applied to use for soil quality improvement and rice growth promotion to increase rice productivity.

Keywords: Phosphorus, Phytohormone, Nitrogen, Phosphate solubilizing bacteria

บทนำ

แบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing bacteria; PSB) คือกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในดินบริเวณรอบ ๆ รากพืช และเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งพืชไม่สามารถนำธาตุฟอสฟอรัสในสารประกอบฟอสเฟตเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ได้ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตกรดอินทรีย์หรือเอนไซม์ฟอสฟาเตสเพื่อใช้ในการย่อยสลายฟอสเฟตในรูปที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายในน้ำ และพืชสามารถนำธาตุฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้ [1]

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญของพืช รองจากธาตุไนโตรเจน โดยมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโตของพืช เพราะเป็นธาตุที่มีความสำคัญในกระบวนการทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีของพืช ซึ่งจะใช้ธาตุอื่นแทนฟอสฟอรัสไม่ได้ เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในโครงสร้างของ DNA, RNA และ ATP ซึ่งจำเป็นสำหรับการถ่ายทอดพลังงานในทุกเซลล์ [2] หากพืชขาดฟอสฟอรัสจะทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ลำต้นแคระแกรน ใบมีจำนวนลดลง มีขนาดเล็กลง และจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มแกมน้ำเงิน [3]

จุลินทรีย์ในดินมีบทบาทสำคัญในกลไกการปลดปล่อยฟอสฟอรัสให้เป็นประโยชน์กับพืชที่แตกต่าง

กันออกไป [4] เนื่องจากจุลินทรีย์ในดินนั้นมีหลากหลายชนิดขึ้นกับการใช้ประโยชน์ที่ดิน และระบบเกษตรกรรมของพื้นที่นั้น ๆ [5] อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการละลายฟอสเฟตคือ กลุ่ม *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. และ *Rhizobium* spp.[6] สำหรับแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรากข้าวนั้นเป็นกลุ่ม *Enterobacter* spp., *Micrococus* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. และ *Serretia* sp. [7,8] โดยการศึกษาแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินนากรดกำมะถันของสุภาพร จันรุ่งเรือง และคณะ [4] พบว่าเป็น *Burkholderia multivarans* และจากการศึกษาของเกตน์ณนิภา วันชัย และคณะ [9] ที่คัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินนาข้าว และศึกษาผลของแบคทีเรียที่แยกได้ต่อการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์กข47 พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้เป็น *Burkhoderia* sp. และ *Pantoea dispersa* และส่งผลให้ข้าวมีการเจริญเติบโตทั้งในด้านความสูง จำนวนใบ ความยาวของราก และน้ำหนักแห้งของลำต้นที่สูงขึ้น เช่นเดียวกันกับการศึกษาของพิชญ์นันท์ กังแฮ และคณะ [10] ที่คัดแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากดินรากข้าวแล้วพบว่าแบคทีเรียสามารถละลายฟอสเฟตได้ดีกว่าราและแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้สูงสุด คือ *Bacillus australimaris* และเมื่อทดสอบผลการเจริญของข้าวพันธุ์ R258 ในสภาพโรงเรือน พบว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่งเสริมให้ต้นข้าวมีความสูงขึ้น น้ำหนักต้นและรากเพิ่มขึ้น และมีแนวโน้มทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในต้นสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้จากการศึกษาของ Stephen และคณะ [11] พบว่าแบคทีเรีย *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) และ *Burkholderia* sp. (MTCC 8369) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่น มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวภายใต้สภาพเรือนทดลอง โดยทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเตสและดีไฮโดรจีเนสสูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มมากขึ้นด้วย

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในพื้นที่ปลูกข้าวของตำบลปราสาทเยอ อำเภอไพรบึง จังหวัดศรีสะเกษ เพื่อหาแบคทีเรียท้องถิ่นสำหรับการพัฒนาใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เลือกเก็บตัวอย่างดินนาข้าวหลังการเก็บเกี่ยวทั้งหมด 4 จุด ในพื้นที่ปลูกข้าวของตำบลปราสาทเยอ อำเภอไพรบึง จังหวัดศรีสะเกษ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินกระจายให้ครอบคลุมทั่วพื้นที่ในแต่ละจุด (ก่อนขุดดินจะต้องถางหญ้า กวาดเศษพืช หรือวัสดุหน้าดินออกก่อน อย่าแซะ หรือปาดหน้าดินออก) เก็บตัวอย่างดินในแต่ละจุดโดยใช้วิธีการเก็บตัวอย่างดินเพื่อการวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร [12] คือใช้พลั่วหรือเสียมขุดดินเป็นรูป V ให้ลึกในแนวดิ่งประมาณ 5-10 เซนติเมตร ส่วนที่เป็นตัว V นี้ให้ทิ้งไป แล้วแซะเอาดินด้านหนึ่งให้เป็นแผ่นหนาประมาณ 2-3 เซนติเมตรด้วยการกดเสียมให้ลึกจากปากหลุมถึงก้นหลุม จากนั้นงัดดินขึ้นแล้วแบ่งดินด้านข้างทั้งสองของพลั่วหรือเสียมทิ้งไป นำดินส่วนที่เหลือใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาด ปิดปากถุงให้สนิท แล้วนำดินตัวอย่างไปทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ห้องปฏิบัติการ โดยเก็บ

รักษาตัวอย่างดินที่ 4 องศาเซลเซียส และไม่ควรเก็บตัวอย่างดินไว้นานเกิน 2 สัปดาห์ [5]

2. การคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดิน

ชั่งตัวอย่างดินนาข้าว 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เขย่าอย่างแรงเพื่อให้ดินและจุลินทรีย์กระจายในน้ำได้อย่างทั่วถึง จะได้สารละลายดินที่มีความเข้มข้นเป็น 10^{-1} เท่า จากนั้นเจือจางต่อไปจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-6} เท่า แล้วนำสารละลายดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} - 10^{-6} เท่า มาทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar (Microbiological grade, Himedia, India) แล้วเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นตรวจนับจำนวนและสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแบคทีเรียที่มีการสร้างวงใสรอบโคโลนี (Clear zone) ไปทำการคัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (Microbiological grade, Himedia, India) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนี และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยการย้อมสีแบบแกรม จากนั้นตรวจสอบลักษณะ การติดสีแกรม และรูปร่างของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลทมาศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตเบื้องต้นด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Pikovskaya's agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการสร้างวงใสรอบโคโลนีของเชื้อแต่ละไอโซเลท แล้ววัดค่ารัศมีบริเวณใสและรัศมีโคโลนีของเชื้อโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ เพื่อคำนวณหาค่า Halo:Colony ratio ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกความสามารถในการละลายฟอสเฟตของเชื้อในเบื้องต้น ถ้าค่า Halo:Colony ratio สูง แสดงว่าเชื้อละลายฟอสเฟตได้ดี จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของเชื้อในอาหารเหลว Pikovskaya's broth (Microbiological grade, Himedia, India) โดยถ่ายกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหาร Pikovskaya's broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มเขย่าให้อากาศบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำชุดควบคุม (Control) ควบคู่ไปกับการทดลองด้วย โดยชุดควบคุมจะไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย เมื่อครบ 72 ชั่วโมง ดูดตัวอย่างเชื้อแต่ละไอโซเลทที่เจริญในอาหาร Pikovskaya's broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นตกตะกอน นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (Supernatant) ที่อยู่ด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้สำหรับวัดปริมาณฟอสเฟตที่ละลายน้ำ ด้วยวิธี Vanadomolybdo phosphoric acid colorimetric [13] โดยมีขั้นตอน ดังนี้ ปิเปตส่วนใสปริมาตร1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Vanado-molybdate reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณฟอสเฟตที่ละลายน้ำโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple range test (Duncan หรือ DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics 20 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินนาข้าวของจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 4 จุด เป็นดินนาข้าวหลังการเก็บเกี่ยว และจากการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดินตัวอย่าง พบว่าค่า pH เฉลี่ยของดิน ในจุดเก็บที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 6.83±0.29, 6.88±0.20, 6.67±0.58 และ 6.67±0.58 ตามลำดับ ซึ่งค่า pH เฉลี่ยของดินในแต่ละจุดเก็บนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (PSB) ด้วยอาหาร Pikovskaya's agar

เมื่อนำสารละลายดินตัวอย่างมาทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar เพื่อคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในเบื้องต้น พบว่าปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากดินในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 มีปริมาณเฉลี่ย เท่ากับ $5.26\pm0.57 \times 10^5$ CFU/g, $1.68\pm0.55 \times 10^5$ CFU/g, $2.30\pm0.26 \times 10^5$ CFU/g และ $8.50\pm6.52 \times 10^5$ CFU/g ตามลำดับ และสามารถคัดแยกแบคทีเรียบนอาหาร PVK ได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลท โดยจำนวนไอโซเลทของเชื้อที่พบในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 8, 7, 6 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ ในจำนวนนี้มีแบคทีเรียที่สร้างวงใสรอบโคโลนี จำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้มาจากจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 จำนวน 2 ไอโซเลท คือไอโซเลท PSB1 และ PSB2, จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 จำนวน 2 ไอโซเลท คือไอโซเลท PSB3 และ PSB4, จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 จำนวน 3 ไอโซเลท คือไอโซเลท PSB5, PSB6 และ PSB7 และจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 จำนวน 3 ไอโซเลท คือไอโซเลท PSB8, PSB9 และ PSB10 (Table 1)

Table 1. Colony of bacteria isolated from soil sampling points on Pikovskaya's agar

Sampling points	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

3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย PSB

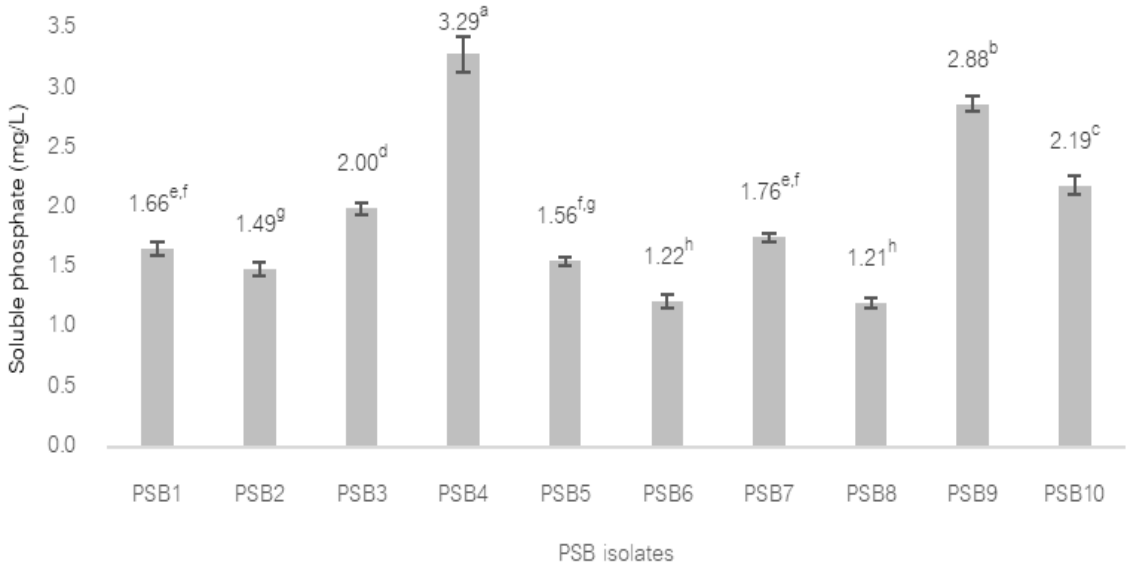
เมื่อศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหาร Pikovskaya's agar แล้ววัดค่ารัศมีบริเวณใสและรัศมีโคโลนีของเชื้อเพื่อคำนวณค่า Halo:Colony ratio ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท พบว่าค่าเฉลี่ย Halo:Colony ratio ของแบคทีเรียมีค่าตั้งแต่ 1.05 - 1.08 (Table 2.)

Table 2. Phosphate solubilization of isolated bacteria

Isolate	Halo:Colony ratio*	Soluble phosphate (mg/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}
PSB6	1.07±0.03	1.22±0.06^{h}
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}

*Mean within a column under each factor means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by DMRT

โดยค่าเฉลี่ยของค่า Halo:Colony ratio แต่ละไอโซเลทไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงนำแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท ไปทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูตร Pikovskaya's broth ผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรีย PSB แต่ละไอโซเลทสามารถละลายฟอสเฟตได้แตกต่างกัน (Table 2.) โดยไอโซเลทที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด 3 ลำดับแรกคือ ไอโซเลท PSB4, PSB9 และ PSB10 ได้ปริมาณฟอสเฟตเท่ากับ 3.29, 2.88 และ 2.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Figure 1)



*Remark: The same letters are not significantly different at the 5% level by DMRT

Figure 1. Phosphate solubilizing effectiveness of isolated bacteria

4. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย PSB

เพื่อให้ทราบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย PSB ที่คัดแยก จึงได้ศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว กลม ขอบเรียบ และจากการตรวจสอบลักษณะของเซลล์การติดสีแกรม และรูปร่างของเซลล์ ด้วยการย้อมสีแบบแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเซลล์ของแบคทีเรีย PSB ที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน เรียงตัวต่อกันเป็นสาย (Figure 2)

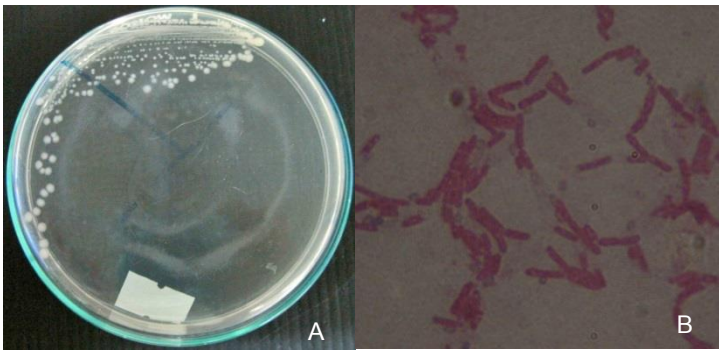


Figure 2. Bacterial colony of PSB4 on nutrient agar (NA) incubated at 37 ºC for 24 hours (A) and their cells under 1,000x microscopic (B)

อภิปรายผล

จากการเก็บตัวอย่างดินนาข้าวหลังการเก็บเกี่ยวของพื้นที่ตำบลปราสาทเยอ อำเภอไพรบึง จังหวัดศรีสะเกษเพื่อคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต พบว่าดินบริเวณที่เก็บตัวอย่าง มีค่า pH อยู่ระหว่าง 6-7 โดยค่า pH ของดินถือเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงและการตกตะกอนของฟอสเฟตในดิน [4] และยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้บ่งชี้ลักษณะโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียและจุลินทรีย์ในดิน เพราะค่า pH ของดินส่งผลกระทบต่อการทำหน้าที่เฉพาะอย่างของกลุ่มจุลินทรีย์ในดินบางกลุ่ม เช่น การทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเตสที่ละลายฟอสเฟตจะมีประสิทธิภาพที่ดีในดินที่มีค่า pH เป็นกรดจนถึงเป็นกลาง [6] นอกจากนี้ค่า pH ของดินยังส่งผลต่อชนิดและประชากรของแบคทีเรียละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตในดินอีกด้วย ซึ่งพบว่ากลุ่มแบคทีเรียละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตในดินที่มีค่า pH ระหว่าง 4-8 จะมีสายพันธุ์และปริมาณของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่โดดเด่นแตกต่างกันไป [14] สำหรับค่า pH ของดินตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้เป็นดินที่มีค่า pH อยู่ในช่วงกรดอ่อนถึงเป็นกลาง ซึ่งเป็นค่า pH ที่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตอาศัยอยู่ได้ จึงนำดินตัวอย่างไปทำการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อไป

จากการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินนาข้าว พบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตทั้งหมด 10 ไอโซเลท โดยมีวงใสรอบโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PVK ซึ่งวงใสที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากกการที่แบคทีเรียมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเตส หรือแบคทีเรียมีการสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ออกมา เช่น ซัคซินิก ออกซาลิก และโพรพิโอนิก เป็นต้น [15] เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร Pikovskaya's broth พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทสามารถละลายฟอสเฟตในรูปไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($Ca_3(PO_4)_2$) ได้ โดยไอโซเลท PSB4 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงสุด คือ 3.29±0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ของแบคทีเรีย PSB ที่คัดแยกได้จากดินนาข้าวครั้งนี้กับแบคทีเรีย PSB ที่ละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ จากดินนาแหล่งอื่น ๆ พบว่ามีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตที่แตกต่างกัน โดยการศึกษาแบคทีเรีย PSB ที่แยกได้จากรากข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์ที่ปลูกในพื้นที่อำเภอสันทรายและอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าไอโซเลทที่ละลายฟอสเฟตได้สูงสุดจะได้ปริมาณฟอสเฟตละลายน้ำเท่ากับ 191.02 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน [16] และการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตจากดินนาข้าวในอำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้สามารถละลายฟอสเฟตได้ปริมาณ 179.8 มิลลิกรัมต่อลิตร [17] นอกจากนี้การศึกษาแบคทีเรีย PSB จากดินรอบรากข้าวไร่ที่ปลูกในตำบลปรังเผล อำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าไอโซเลทของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการละลายฟอสเฟตนั้นให้ปริมาณฟอสเฟตละลายน้ำเท่ากับ 41.60 มิลลิกรัมต่อลิตร [18] โดยความแตกต่างในการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์กลุ่มละลายฟอสเฟตที่แยกได้จากดินนาแหล่งต่าง ๆ นั้นอาจเกิดมาจากความแตกต่างของระบบนิเวศในดินบริเวณที่

เก็บตัวอย่างด้วย ถึงแม้ว่าจะเป็นพื้นที่นาข้าวเช่นเดียวกัน แต่ระยะเวลาของพืชที่ปลูกและสภาพดินนาในขณะทำการเก็บตัวอย่างดินก็ส่งผลกลุ่มจุลินทรีย์ในดินที่ทำการคัดแยกได้เช่นเดียวกัน โดยในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างดินจากนาข้าวในช่วงระยะเวลาหลังการเก็บเกี่ยว สภาพดินนาเป็นดินแห้ง ไม่มีน้ำขัง และมีความชื้นน้อย ซึ่งส่งผลต่อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ทำการคัดแยกได้ เพราะชนิดและปริมาณของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดินนั้นอยู่กับชนิดของดิน ประเภทของการทำเกษตรกรรม ภูมิภาค และพืชที่ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ด้วย นอกจากนี้ความแตกต่างของกลไกที่ใช้ในการละลายฟอสเฟตก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรีย PSB ได้เช่นเดียวกัน โดยทั่วไปแบคทีเรีย PSB จะละลายฟอสเฟตได้ปริมาณตั้งแต่ 2.2 ถึง 227.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบฟอสเฟตด้วย เช่น ไตรแคลเซียมฟอสเฟต $(Ca_3PO_4)_2$,เฟอร์ริกฟอสเฟต ($FePO_4$) และอลูมินัมฟอสเฟต ($AlPO_4$) เป็นต้น [19 - 21] สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย PSB ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น สภาวะและปัจจัยต่าง ๆ เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ pH รวมถึงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจะส่งผลต่อการเจริญและความสามารถในการละลายฟอสเฟตด้วย [19, 22] ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย PSB ที่คัดแยกนี้ต่อไป เพื่อให้เกิดองค์ความรู้สำหรับการพัฒนาต่อยอดและประยุกต์ใช้แบคทีเรีย PSB ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในอนาคต

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย PSB ที่คัดแยกได้ พบว่าโคโลนีมีสีขาว กลม ขอบเรียบ และเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน สอดคล้องกับการวิจัยจากดินนาข้าวในอำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบ [9] และอาจจะเป็นไปได้ว่าเป็นแบคทีเรีย PSB ในสกุล *Pseudomonas* spp. เพราะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน และแบคทีเรีย PSB ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp. และ *Bacillus circulans* [23] อย่างไรก็ตามเป็นเพียงการสันนิษฐานเบื้องต้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเท่านั้น การจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลของเชื้อเพื่อให้ทราบสายพันธุ์ที่แท้จริงของแบคทีเรีย PSB ในดินที่คัดแยกได้จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ควรดำเนินการต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างดินนาหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อคัดแยกแบคทีเรีย PSB ในพื้นที่ปลูกข้าวของตำบลปราสาทเยอ อำเภอไพรบึง จังหวัดศรีสะเกษ พบว่าดินตัวอย่าง มีค่า pH เฉลี่ย อยู่ระหว่าง 6-7 เป็นดินที่มีค่าความเป็นกรดอ่อนถึงเป็นกลาง สามารถคัดแยกแบคทีเรีย PSB ที่ละลายฟอสเฟตในรูปไตรแคลเซียมฟอสเฟต $Ca_3(PO_4)_2$ ได้ทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท โดยไอโซเลท PSB4 สามารถละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ได้ปริมาณสูงที่สุด คือ 3.29 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร และจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรีย PSB ที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีสีขาว กลม ขอบเรียบ และ

เซลล์ของแบคทีเรีย PSB เป็นเซลล์รูปท่อน แกรมลบ ผลจากการวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาต่อยอดเพื่อหาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย PSB ที่คัดแยกได้ให้มีการเจริญและมีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตที่สูงขึ้น เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดมาประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ปลูกในพื้นที่ต่อไป แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาคุณสมบัติด้านอื่น ๆ ของแบคทีเรีย PSB ที่คัดแยกได้ด้วย เช่น การละลายฟอสเฟตในรูปอื่น ($FePO_4$, $AlPO_4$) การสร้างฮอร์โมนพืช การสร้างกรดอินทรีย์ การตรึงไนโตรเจน และการสร้างสารซิเดอร์โรฟอร์ เป็นต้น เพื่อนำแบคทีเรีย PSB ที่มีคุณสมบัติโดดเด่นในด้านต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ร่วมกันสำหรับส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวต่อไป นอกจากนี้ควรมีการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโดดเด่นด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อให้ทราบสายพันธุ์ที่แท้จริงของเชื้อเพื่อประโยชน์ในการเก็บรักษาสายพันธุ์และการนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ (งบ บกศ.) ของมหาวิทยาลัยราชภัฏศรีสะเกษ

เอกสารอ้างอิง

1. ไตรธานี เยี่ยมอ่อน, นันทวัน ฤทธิ์เดช, ประสิทธิ์ ใจศิล, โสภณ บุญลือ. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาพเรือนทดลอง. แก่นเกษตร 2556;40:185-93.
2. Johnston AE, Steen I. Understanding phosphorus and its use in agriculture. Brussels: European Fertilizer Manufacturers Association 2002.
3. ธัญณ์ชนก เขียวคำ, พิชญ์นันท์ กังแฮ, วิภา หอมหวน, วันวิสาข์ ปั้นศักดิ์. ผลของแบคทีเรียต่อการละลายฟอสเฟตและประสิทธิภาพการผลิตฮอร์โมน IAA โดยคัดแยกจากดินบริเวณรากข้าวในพื้นที่นาในเขตภาคเหนือตอนบน. การประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 14; 1-2 พฤศจิกายน 2559; มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก; 2559. หน้า 8-13.
4. สุภาพร จันรุ่งเรือง, เบญจมาส รสโสภา, กรรณิการ์ สัจจาพันธ์. ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรีย์ 2. วิทยาสารกำแพงแสน 2553;8:1-14.
5. เมธานี หอมทอง, วันเพ็ญ แก้วพุก, สุกัญญา แย้มสรวล, อนัญญา ทองสิม. ผลของระบบเกษตรกรรมต่อความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ในดินในพื้นที่ปลูกผักจังหวัดนครปฐม. วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี 2561;14:1-11.
6. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol Adv 1999;17:319-39.
7. Prasanna A, Deepa V, Murthy PB, Deecaraman M, Sridhar R, Dhandapani P. Insoluble phosphate solubilization by

bacterial strains isolated from rice rhizosphere soils from southern India. Int J Soil Sci 2011;6:134-41.

8. Dash N, Pahari A, Dangar TK. Functional characterization of phosphate solubilizing bacteria of coastal rice soils of Odisha, India. Oryza 2017;54:208-19.
9. เกตน์ณนิภา วันชัย, สมาพร เรืองสังข์. ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ตรึงอยู่บนขี้เถ้าแกลบต่อการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ กข47. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 2557;45 ฉบับพิเศษ 2;513-6.
10. พิชญ์นันท์ กังแฮ, สุทธกานต์ ใจกาวิล, อภิวัฒน์ หาญธนพงศ์, สาธิต ปิ่นมณี, วิภา หอมหวน. ความหลากหลายและประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินบริเวณรากข้าวในพื้นที่นาภาคเหนือตอนบน; การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ครั้งที่ 35; 26-28 มิถุนายน 2561; โรงแรมแซนด์ ดูนส์ เจ้าหลาว บีช รีสอร์ท. จันทบุรี; 2561. หน้า 61-73.
11. Stephen J, Shabanamol S, Rishad KS, Jisha MS. Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) and *Burkholderia* sp. (MTCC 8369) under greenhouse conditions. 3 Biotech 2015;5:831-7.
12. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. คู่มือการเก็บตัวอย่างดินและน้ำเพื่อวิเคราะห์. กรุงเทพฯ: ควิกปริ๊นท์ ออฟเซ็ท; 2548.
13. Pradhan S, Pokhrel MR. Spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juice, fertilizer, detergent and water samples by molybdenum blue method. Sci world J 2013;11:58-62.
14. Zheng BX, Zhang DP, Wang Y, Hao XL, Wadaan MAM, Hozzein WN, et al. Responses to soil pH gradients of inorganic phosphate solubilizing bacteria community. Sci Rep 2019;9:1-8.
15. สมคิด ดีจริง, อนุตตรีย์ บุญต่อ. การคัดเลือกและการจำแนกชนิดแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากดินปลูกข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์. วารสารเกษตร 2562;35:49-60.
16. ภัทธนาวรรณ์ ฉันท์รัตนโยธิน. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายฟอสเฟตจากรากพืชของข้าวหอมมะลิแดง. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้; 2557.
17. เกตน์ณนิภา วันชัย. การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่นที่ตรึงอยู่บนวัสดุชนิดต่าง ๆ ในการปรับปรุงคุณภาพดินนาข้าวที่เกิดอุทกภัย กรณีศึกษา: อ. บางบาล จ. พระนครศรีอยุธยา. พระนครศรีอยุธยา: มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา; 2556.
18. สุพัตรา รักษ์วงษ์. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตประสิทธิภาพสูงจากดินรอบรากข้าวไร่ที่ปลูกในตำบลปรังเผล อำเภอสังขละบุรี

จังหวัดกาญจนบุรี [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กาญจนบุรี: มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี; 2558.

19. วิไลวรรณ ไชยศร. การคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการละลายฟอสเฟต. วารสารวิชชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช 2560;36:11-24.
20. Zaidi A, Khan M, Ahemad M, Oves M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. Acta Microbiol Immunol Hung 2019;56:263-84.
21. Kundu BS, Nehra K, Yadav R, Tomar M. Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana. Indian J Microbiol 2009;49:120-7.
22. Pande A, Pandey P, Mehra S, Singh M, Kaushik S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. J Genet Eng Biotechnol 2017;15:379-91.
23. Dandessa C, Bacha K. Review on role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. Int J Curr Res Acad Rev 2018;6:48-55.