

การจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ใหม่และแนวทางการประยุกต์ใช้

Identification of New Phosphate Solubilizing Bacteria and Application Guidelines

ชยานิด กล่ำสุข* และ ดุสิต อธิณูวัฒน์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Chayanid Klumsuk* and Dusit Athinuwat

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre

Received: September 9, 2021 ; Accepted: September 29, 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในระบบนิเวศเกษตร แบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชจำนวน 41 สายพันธุ์ ถูกแยกจากดินรอบรากฝอยในจังหวัดปทุมธานี ด้วยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) แบคทีเรียจำนวน 10 สายพันธุ์ จาก 41 สายพันธุ์ สามารถละลายฟอสเฟตบนอาหารทดสอบ Pikovskaya ได้ โดยที่สายพันธุ์ PSB28 และ PSB15 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด แสดงความกว้างบริเวณใสเท่ากับ 2.13 ± 0.07 และ 1.1 ± 0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ ($p < 0.05$) เมื่อนำทั้ง 2 สายพันธุ์ไปทดสอบการยับยั้งแอมโมเนียและปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันพบว่า PSB28 เป็นแบคทีเรียแอมโมเนียและ PSB15 เป็นแบคทีเรียแอมโมเนีย จึงนำเฉพาะ PSB15 ไปทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตจากแหล่งฟอสเฟตที่แตกต่างกัน ได้แก่ แคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) หินฟอสเฟต (rock-phosphate) และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$) ซึ่งพบว่า แคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) เป็นแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการละลายโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 ซึ่งตรวจพบปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเท่ากับ 69.67 ± 1.88 60.80 ± 8.66 และ 59.96 ± 8.31 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในวันที่ 7 14 และ 21 หลังปลูกเชื้อสายพันธุ์ PSB15 ตามลำดับ สำหรับการจำแนกชนิดแบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 ใช้ยูนีเวอร์แซลไพรมเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA จำนวน 2 ไพรมเมอร์ ได้แก่ 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') และ 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 พบว่ามีความคล้ายคลึง ≥ 98 เปอร์เซ็นต์ กับ *Bacillus paramycoides* ในฐานข้อมูล GenBank เมื่อนำ PSB15 มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการเพาะกล้าข้าว พบว่ามีประสิทธิภาพส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชสูง จึงสามารถนำไปใช้ร่วมหรือทดแทนปุ๋ยเคมีในการเพิ่มฟอสเฟตในดินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชได้ งานวิจัยนี้บ่งชี้ให้เห็นถึง การใช้แบคทีเรีย *B. paramycoides* PSB15 ที่

มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตร่วมกับฟอสเฟตจากแหล่งต่าง ๆ ในระบบนิเวศเกษตร จัดเป็นแนวทางในการลดการใช้ปุ๋ยเคมีสังเคราะห์ได้

คำสำคัญ: ฟอสฟอรัส, แบคทีเรียละลายฟอสเฟต, นิเวศวิทยาทางการเกษตร

Abstract

The purpose of this study was to screen the phosphate solubilizing bacteria (PSB) that enhance plant growth in an agroecosystem. Forty-one bacterial strains were isolated from bamboo rhizosphere soil at Pathum Thani province with completely randomized design (CRD). Ten out of forty-one strains showed phosphate solubilization capacity on Pikovskaya's agar. The PSB28 and PSB15 were the most efficient bacterial isolates for phosphate solubilization as shown the largest clear zone diameter with 2.13 ± 0.07 and 1 ± 0.26 cm, respectively ($p < 0.05$). Gram stain and hypersensitive response test revealed that PSB28 and PSB15 were Gram-negative and Gram-positive, respectively. Therefore, PSB15 was selected to test for the ability to solubilize phosphate with different phosphate sources, including calcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), rock phosphate, and ammonium dihydrogen phosphate ($(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$). The result showed that calcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) was the most capable source of phosphate dissolved by PSB15 as shown available phosphorus in the total amount of 69.67 ± 1.8 , 60.80 ± 8.66 , and 59.96 ± 8.31 mg/kg at 7, 14, and 21 days, respectively. For identification of PSB15, the 16S rRNA of gene sequencing was applied with two universal primers, 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3'). The analysis result showed that the yielded sequences had similarity score of $\geq 98\%$ with the sequences of *Bacillus paramycoides* in GenBank. When PSB15 was applied with rice seedlings, it showed high efficiency in plant growth promotion. It can be mixed, or substituted with chemical fertilizer to enhance available phosphorus in soil and increase plant growth. These results revealed that application of phosphate solubilizing bacteria, *B. paramycoides* PSB15 with phosphate source in agroecosystem could be an alternative method to reduce the use of synthetic fertilizer.

Keywords: phosphorus; phosphate solubilizing bacteria; agroecology

1. บทนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืชที่สำคัญธาตุหนึ่งที่พืชต้องการในปริมาณมาก เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ความสำคัญของฟอสฟอรัสต่อพืชคือ ช่วยการเจริญเติบโตของรากฝอยและรากแขนงในระยะแรก ช่วยเร่งให้พืชสูงงอม ช่วยให้ดอก ผล และเมล็ดของพืชสมบูรณ์ ช่วยให้รากพืชดูดซึ่มโพแทสเซียมได้มากขึ้น หากพืชขาดฟอสฟอรัสจะแสดงอาการ ลำ

ต้นแคระแกร็น ใบเหลือง ลำต้นเล็กลง ใบล่างเริ่มมีสีม่วงตามแผ่นใบ ดอกผลน้อย และรากเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ (Somsa, 2006) ต้นกำเนิดของธาตุฟอสฟอรัสมาจากหินฟอสเฟต และหินฟอสเฟตสามารถละลายออกมาให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์แก่พืช อย่างไรก็ตาม พบว่าหินฟอสเฟตมีการละลายออกมาให้พืชใช้ประโยชน์ได้น้อย ดังนั้นการใช้หินฟอสเฟตเป็นปุ๋ยโดยตรงจึงไม่เป็นที่นิยม

เนื่องจากจำเป็นต้องใช้หินฟอสเฟตในปริมาณมาก จึงได้มีการศึกษาวิธีการในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของหินฟอสเฟต เช่น การนำหินฟอสเฟตไปเผาหรืออบให้ละเอียด การใช้กรด หรือการใช้จุลินทรีย์ดินบางชนิดเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุฟอสฟอรัสในดิน และพบว่าจุลินทรีย์หลายกลุ่มทั้งแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซิส ที่สามารถจะทำให้หินฟอสเฟตละลายออกมาเป็นประโยชน์กับพืชได้มากขึ้น (Alexander, 1969) ปัจจุบันจึงมีผู้ศึกษาการนำจุลินทรีย์ดินสายพันธุ์ต่าง ๆ เข้ามาประยุกต์ใช้ร่วมกับการปลูกพืชเพื่อช่วยให้ฟอสเฟตอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเปลี่ยนสารประกอบฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่ละลายได้ และทำให้เกิดกรดอินทรีย์ขึ้น กรดอินทรีย์จะเปลี่ยนรูปแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO})_2$) ให้เป็นรูปไดและโมโนเบสิกฟอสเฟต (HPO_4^{2-} และ H_2PO_4^-) ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ แบคทีเรียและราที่สามารถเปลี่ยนรูปฟอสเฟตที่ละลายไม่ได้ให้เป็นรูปที่ละลายได้ จุลินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp., *Flavobacterium* spp., *Sclerotium* spp., *Bacillus* spp. และ *Aspergillus* spp. เป็นต้น โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีการปลดปล่อยกรดอินทรีย์เพื่อละลายฟอสเฟตออกมาแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ (Mala, 2003) ดังนั้นงานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตจากแหล่งฟอสเฟตที่แตกต่างกันเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมได้ในอนาคต

2. วิธีการ

2.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินรอบรากพืช

การแยกเชื้อและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินรอบรากพืชที่มีแนวโน้มในการละลายฟอสเฟตด้วยวิธีการตัดแปลงของ Mala (2007) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากไม้ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี จากนั้นชั่งตัวอย่างดิน ตัวอย่างละ 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร และทำการเจือจางสารละลายดินครั้งละ 10 เท่า (ten fold serial dilution) และนำสารละลายดินที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} 10^{-7} และ 10^{-8} มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการ cross streak บนอาหาร NA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำซ้ำ 1-2 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2. การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชในการละลายฟอสเฟต

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชที่คัดเลือกได้จำนวน 41 สายพันธุ์ ในการละลายฟอสเฟต ด้วยวิธีการตัดแปลงของ Mala (2007) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ทำการหยด suspension แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 cfu/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปวางบนหน้าอาหาร Pikovskayas ซึ่งเป็นอาหารสำหรับคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ทางการค้า *Bacillus polymyxa* ซึ่งมีรายงานว่ามีความสามารถในการละลายฟอสเฟต (positive control) และการ

ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (negative control) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณใสของการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย (clear zone) บนผิวหน้าอาหารทดสอบ โดยคำนวณประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตจากสูตร บริเวณส่วนใส (เซนติเมตร) =

$$\frac{\text{(ความกว้างบริเวณใสแนวตั้ง)} + \text{ความกว้างบริเวณใสแนวนอน}}{2}$$

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS version 25 จากนั้นนำแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ไปทดสอบแกรม (Gram stain) และปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (Hypersensitive Response, HR) บนต้นมะเขือเทศ อายุ 1 เดือน (Kositratana, 1994; Schaad, 1998) เพื่อตรวจสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช วางแผนการทดลองแบบ CRD สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น โดยนำกระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเข็มฉีดยา ตูด suspension ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีด suspension ของแบคทีเรียเข้าไปมะเขือเทศ เปรียบเทียบกับการฉีดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) บันทึกผลโดยการสังเกตอาการแผลจุดไหม้ตายหรือใบไหม้ในบริเวณที่ฉีดเชื้อแบคทีเรียอย่างเฉียบพลัน ภายใน 48 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่สามารถชักนำให้เกิด HR บนมะเขือเทศ ไปศึกษาวิจัยขั้นต่อไป

2.3 การศึกษาแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ PSB15 ในการละลายฟอสเฟตจากแหล่งฟอสเฟตที่แตกต่างกัน ได้แก่ แคลเซียมฟอสเฟต (Ca_3PO_4) หินฟอสเฟต (rock-phosphate)

และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$) ตามวิธีการดัดแปลงของ Suthon *et al.* (2016) วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมเติมแคลเซียมฟอสเฟตเพียงอย่างเดียว กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุมเติมหินฟอสเฟตเพียงอย่างเดียว กรรมวิธีที่ 3 ชุดควบคุมเติมแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเพียงอย่างเดียว กรรมวิธีที่ 4 เติมแคลเซียมฟอสเฟต และแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ PSB15 กรรมวิธีที่ 5 เติมหินฟอสเฟตและแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ PSB15 กรรมวิธีที่ 6 เติมแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ PSB15 และกรรมวิธีที่ 7 ชุดควบคุม ไม่มีการเติมแหล่งฟอสเฟตและไม่เติมแบคทีเรียละลายฟอสเฟต โดยเตรียม suspension ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ PSB15 ให้มีความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 cfu/ml จากนั้นบรรจุดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อของแต่ละกรรมวิธีลงในกระถางพลาสติกขนาด 7 นิ้ว กระถางละ 1.5 กิโลกรัม จากนั้นทำการเติม suspension ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ PSB15 กระถางละ 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ในถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชุ่มชื้นในดิน ทำการเก็บตัวอย่างดินในกระถางเพื่อตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) ในดินทุก 7 วัน เป็นเวลา 30 วัน ตามวิธีการดัดแปลงของกรมพัฒนาที่ดิน (2553) ทำการชั่งตัวอย่างดินตัวอย่างละ 1 กรัม ใส่ในขวดพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำยาสกัดดิน Bray II (Bray II, 1945) 10 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วเก็บสารละลายใส (aliquot) ในขวดพลาสติก จากนั้นทำการปิเปต aliquot 1 มิลลิลิตร ลงในขวดพลาสติกขนาด 25 มิลลิลิตร เติม reagent B 4 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร จากนั้น

เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร พร้อมบันทึกค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เปรียบเทียบกับสารละลายฟอสฟอรัสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน โดยคำนวณจากสูตร ปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม/กิโลกรัม) =

$$\text{(ppm จากกราฟ} \times \text{สัดส่วนของน้ำยาสกัด} \\ \text{ต่อดิน} \times \text{ปริมาตรสุดท้าย) / ปริมาตร aliquot}$$

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS version 25

2.4 การจำแนกจีโนมและสปีชีส์ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

ศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA โดยใช้ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') และ 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') ซึ่งรายงานโดย Woo et al. (2008) ภายใต้ปฏิกิริยาอุณหภูมิเมอเรส 30 รอบ ด้วยสภาวะการทำปฏิกิริยา denature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 61°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากชิ้นเจลด้วยชุด GEL/ PCR DNA fragments extraction kit เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี sequencing analysis แล้วนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย

2.5 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว

วางแผนการทดลองแบบ CRD ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 (T1) ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0+สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช+สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (กรรมวิธีควบคุม) กรรมวิธีที่ 2 (T2) ใส่ปุ๋ยสูตร 16-0-0 ร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต+สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช+สารกำจัดศัตรูพืช กรรมวิธีที่ 3 (T3) แบคทีเรียละลายฟอสเฟต+สารกำจัดศัตรูพืช กรรมวิธีที่ 4 (T4) ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-20-0 ร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต+สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช และกรรมวิธีที่ 5 (T5) ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0+สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทำการบันทึกผลโดยการวัดความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสดต้น น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักสตราก และน้ำหนักแห้งราก เมื่อข้าวมีอายุ 20 วัน นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยวิธี DMRT ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินรอบรากพืช

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียบริเวณรอบรากต้นไผ่ได้ทั้งหมด 41 สายพันธุ์ (Table 1) ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (colony morphology) ที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 โคโลนีกลม สีขาวขุ่น แบนราบ ขอบหยัก กลุ่มที่ 2 โคโลนีกลมมน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ กลุ่มที่ 3 โคโลนีกลมมน สีส้ม ขอบเรียบ กลุ่มที่ 4 โคโลนีกลม สีเทา บุ่มตรงกลาง ขอบไม่เรียบ

กลุ่มที่ 5 โคโลนีกลม หนูน สีเหลือง ขอบเรียบ และ
 กลุ่มที่ 6 โคโลนีกลม สีเทา บุ่มตรงกลาง ขอบขรุขระ
 (Figure 1) ซึ่งจะนำแบคทีเรียทั้งหมดนี้ไปทดสอบ

แกรม (Gram stain) และปฏิบัติการการตอบสนอง
 อย่างเฉียบพลันบนใบมะเขือเทศก่อนนำไปทดสอบ
 คุณสมบัติอื่น ๆ และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

Table 1 Rhizobacterial strains and their Grams stain and hypersensitivity responses on tomato plant

Bacterial strains	Gram stain	Hypersensitivity response ^{1/}	Bacterial strains	Gram stain	Hypersensitivity response ^{1/}
PSB01	Positive	-	PSB22	Negative	+
PSB02	Positive	-	PSB23	Positive	-
PSB03	Positive	-	PSB24	Negative	+
PSB04	Negative	+	PSB25	Positive	-
PSB05	Positive	-	PSB26	Negative	+
PSB06	Negative	+	PSB27	Negative	+
PSB07	Positive	-	PSB28	Negative	+
PSB08	Negative	+	PSB29	Negative	+
PSB09	Negative	+	PSB30	Positive	-
PSB10	Positive	-	PSB31	Negative	+
PSB11	Negative	+	PSB32	Negative	+
PSB12	Positive	-	PSB33	Positive	-
PSB13	Negative	+	PSB34	Positive	-
PSB14	Negative	+	PSB35	Positive	-
PSB15	Positive	-	PSB36	Negative	+
PSB16	Negative	+	PSB37	Positive	-
PSB17	Positive	-	PSB38	Negative	+
PSB18	Positive	-	PSB39	Positive	-
PSB19	Negative	+	PSB40	Positive	-
PSB20	Positive	-	PSB41	Positive	-
PSB21	Positive	-			

^{1/} Hypersensitivity responses: positive result (+) means necrotic symptom occurred after rhizobacterial suspension injected into tomato leaf within 48 h after inoculation. Negative result (-) means no necrotic symptom occurred.

**3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย
 บริเวณรอบรากพืชในการละลายฟอสเฟต**

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย
 รอบรากพืชทั้ง 41 สายพันธุ์ ในการละลายฟอสเฟต
 (Phosphate Solubilizing Bacteria, PSB) ในอาหาร

ทดสอบ Pikovskayas พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ PSB28 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยบริเวณละลายฟอสเฟต (clear zone) มีความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 2.13 ± 0.07 เซนติเมตร (Figure 2A) ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพรองลงมา ได้แก่ PSB15 (Figure 2A) PSB12 PSB18 PSB07 PSB05 PSB30 PSB14 PSB01 และ PSB39 ซึ่งแสดงบริเวณละลายฟอสเฟตความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 1.1 ± 0.26 1.06 ± 0.3 0.85 ± 0.07 0.83 ± 0.05 0.8 ± 0.1 0.78 ± 0.02 0.78 ± 0.07 0.76 ± 0.05 และ 0.73 ± 0.15 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 2) สอดคล้องกับรายงานของ Yiam-on *et al.* (2012) ทำการคัดเลือก PSB ที่มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูงระหว่าง 179-196 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากดินรอบรากอ้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยระดับความลึกของดินที่

แตกต่างกัน จะมีปริมาณจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟตที่แตกต่างกัน คือ ในดินชั้นบนจะมีปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมากกว่าดินชั้นล่าง (Uren, 2000; Bertin *et al.*, 2003; Karnamuey, 2007) Junrungreang *et al.* (2010) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยวิธี enrichment culture จากชุดดินรังสิตที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตร พบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ Rs01 Rs02 Rs03 Rs04 Rs05 และ Rs06 และภัทรชนนารวรรณ์ (2557) ทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากดินบริเวณรากพืชของข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์ จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตทั้งหมด 12 ไอโซเลท โดย *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตสูง (Srichai, 2003; Barea *et al.*, 2005; Tilak *et al.*, 2005)

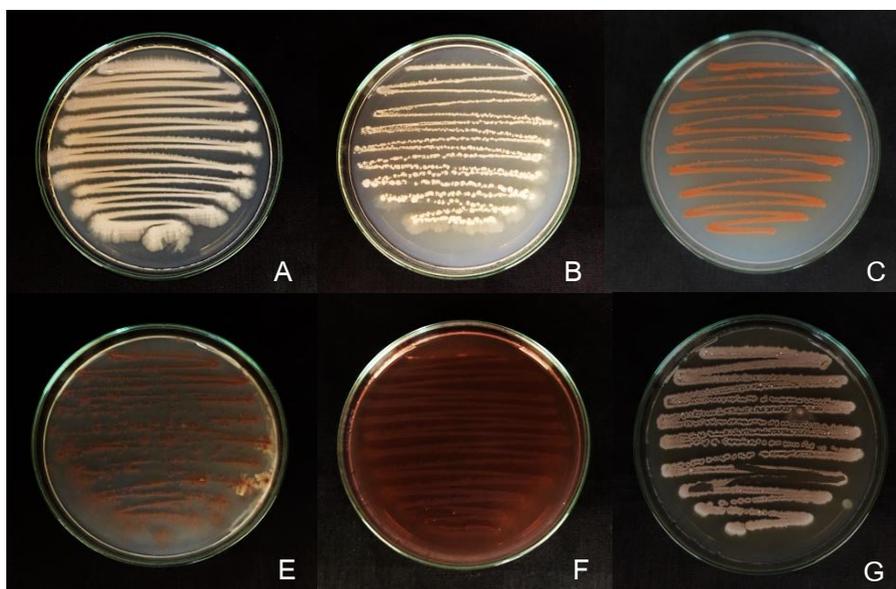


Figure 1 Colony morphology of the representative rhizobacterial strains in group1 (A), group 2 (B), group 3 (C), group 4 (D), group 5 (E), and group 6 (F).

Table 2 Efficacy of rhizobacterial strains in phosphorus solubilization

Bacterial strains	Clear zone (cm) ^{1/}	Bacterial strains	Clear zone (cm) ^{1/}
PSB01	0.76 ± 0.05 ^d	PSB22	0 ± 0 ^e
PSB02	0 ± 0 ^e	PSB23	0 ± 0 ^e
PSB03	0 ± 0 ^e	PSB24	0 ± 0 ^e
PSB04	0 ± 0 ^e	PSB25	0 ± 0 ^e
PSB05	0.8 ± 0.1 ^{cd}	PSB26	0 ± 0 ^e
PSB06	0 ± 0 ^e	PSB27	0 ± 0 ^e
PSB07	0.83 ± 0.05 ^{bcd}	PSB28	2.13 ± 0.07 ^a
PSB08	0 ± 0 ^e	PSB29	0 ± 0 ^e
PSB09	0 ± 0 ^e	PSB30	0.78 ± 0.02 ^d
PSB10	0 ± 0 ^e	PSB31	0 ± 0 ^e
PSB11	0 ± 0 ^e	PSB32	0 ± 0 ^e
PSB12	1.06 ± 0.3 ^{bc}	PSB33	0 ± 0 ^e
PSB13	0 ± 0 ^e	PSB34	0 ± 0 ^e
PSB14	0.78 ± 0.07 ^d	PSB35	0 ± 0 ^e
PSB15	1.1 ± 0.26 ^b	PSB36	0 ± 0 ^e
PSB16	0 ± 0 ^e	PSB37	0 ± 0 ^e
PSB17	0 ± 0 ^e	PSB38	0 ± 0 ^e
PSB18	0.85 ± 0.07 ^{bcd}	PSB39	0.73 ± 0.15 ^b
PSB19	0 ± 0 ^e	PSB40	0 ± 0 ^e
PSB20	0 ± 0 ^e	PSB41	0 ± 0 ^e
PSB21	0 ± 0 ^e	<i>Bacillus polymyxa</i>	0.83±0.07 ^{bcd}

^{1/} Means ± S.D. followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test (P<0.05) with SPSS version 25.

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 41 สายพันธุ์ มาทดสอบ
 แกรมและปฏิกริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน
 สามารถแบ่งเป็นแบคทีเรียทั้งหมดออกเป็น 2 กลุ่ม
 ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและให้ผลปฏิกริยาการ
 ตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบมะเขือเทศเป็นลบ

จำนวน 25 สายพันธุ์ ได้แก่ PSB01 PSB02 PSB03
 PSB05 PSB07 PSB10 PSB12 PSB15 PSB17
 PSB18 PSB20 PSB21 PSB23 PSB25 PSB29
 PSB30 PSB33 PSB34 PSB35 PSB37 PSB39
 PSB40 และ PSB41 และแบคทีเรียแกรมลบและ

ให้ผลปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบมะเขือเทศเป็นบวก จำนวน 16 สายพันธุ์ ได้แก่ PSB04 PSB06 PSB08 PSB11 PSB13 PSB14 PSB16 PSB19 PSB22 PSB24 PSB26 PSB26 PSB31 PSB32 PSB36 และ PSB38 (Table 1) เมื่อพิจารณาสายพันธุ์แบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตที่ดีที่สุด ได้แก่

PSB28 พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบและชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบมะเขือเทศ จัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่อาจเป็นสาเหตุโรคคน สัตว์ และพืช จึงหลีกเลี่ยงสายพันธุ์นี้ และพิจารณาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพรองลงมาสำหรับการศึกษาวิจัยในขั้นถัดไป ซึ่งได้แก่ PSB15

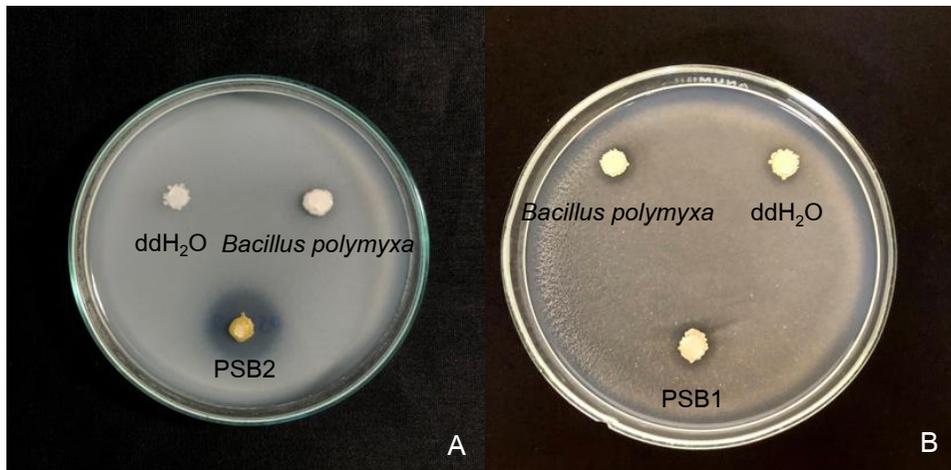


Figure 2 Phosphate solubilization on Pikovskaya's agar by PSB28 (A) and PSB15 (B).

3.3 ผลการศึกษาแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

จากการศึกษาแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ PSB15 ในการละลายฟอสเฟตจากแหล่งฟอสเฟตทั้ง 3 แหล่ง ได้แก่ แคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) หินฟอสเฟต (rock-phosphate) และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตจากแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ได้ดีที่สุดในวันที่ 7 วันที่ 14 และวันที่ 21 ($p < 0.05$) โดยมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน (available P) เท่ากับ 69.67 ± 1.88 , 60.80 ± 8.66 และ 59.96 ± 8.31 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Table 3) ซึ่งมีประสิทธิภาพ

ดีกว่าการใช้หินฟอสเฟต เท่ากับ 35.84, 47.24 และ 48.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมฟอสเฟต เท่ากับ 26.19, 30.58 และ 41.71 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gerretsen (1948) ได้ทำการทดลองใส่เชื้อในดินที่ปลูกพืชหลายชนิดและใช้แหล่งฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำหลายชนิด พบว่า ส่วนใหญ่พืชมีการดูดซึมฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น และพบว่า $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ และ bonemeal เป็นแหล่งฟอสเฟตที่สามารถละลายออกมาได้มากที่สุดเมื่อมีการใส่จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต จุลินทรีย์มีกลไกในการปลดปล่อยฟอสฟอรัสให้เป็นประโยชน์กับพืชแตกต่างกันออกไป (Salehrastin, 1999) เช่น กระบวนการทำให้เกิดกรด (acidification) กระบวนการคีเลต (chelation) และกระบวนการแลกเปลี่ยน (exchange) (Gerke, 1992; Dadarwal,

1997; Yadav and Dadarwal, 1997) และเนื่องจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตจะผลิตกรดอินทรีย์ออกมา โดยกรดอินทรีย์ดังกล่าวอาจเกิดคีเลทกับแคลเซียมจาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ และเหล็ก ทำให้การละลายและการใช้ฟอสเฟตมีมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Junrungreang *et al.* (2010) ทำการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้จำนวน 6 ไอโซเลท (Rs01-06) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ Rs01 มีประสิทธิภาพในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ได้ 878.5 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jantarasombat *et al.* (2009) ทดสอบผลของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้ง 6 สายพันธุ์ และเชื้อรา 4 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PSB8 และ PSB220 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานในสภาพโรงเรือนทดลองและในสภาพแปลงทดลอง พบว่า ในสภาพโรงเรือนทดลองการใส่จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตสามารถเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เพาะเชื้อ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanghae *et al.* (2018) ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพละลาย $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ในอาหารเหลว Pikovskaya's (PVK) พบ 25 ไอโซเลทที่สามารถละลายฟอสเฟตได้สูง 100-183 ppm และผลการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพละลาย $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ในดินกรด (pH = 4.67) พบ 13 ไอโซเลท สามารถละลายฟอสเฟตได้มากกว่า 50 ppm เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Wimat *et al.* (2020) ทำการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับหินฟอสเฟตมีผลต่อการเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน โดยการใส่เชื้อร่วมกัน (2 ไอโซเลท) ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตส่งผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงที่สุด นอกจากนี้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ PSB15 ที่ได้จากการศึกษาวิจัย

ครั้งนี้ ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยกลไกการแก่งแย่งแข่งขัน เมื่อศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ PSB15 (Figure 3) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus* sp. โดยสามารถย่อยสลายเจลาติน เคซีน และแป้งได้ ซึ่งจะทำให้การจำแนกจีโนมและสปีชีส์ของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีและเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่อไป

3.4 ผลการจำแนกจีโนมและสปีชีส์ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 ด้วยยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') และ 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') พบว่าลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 มีความคล้ายคลึง ≥ 98 เปอร์เซ็นต์กับ *Bacillus paramycooides* ในฐานข้อมูล GenBank บ่งชี้ให้ว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 คือ *Bacillus paramycooides*



Figure 3 Colony morphology of phosphobilitizing bacteria strain PSB15 on nutrient glucose agar.

Table 3 Efficacy of phosphate solubilizing bacteria (PSB15) applied on different phosphate sources

Treatments	Available P (mg/kg) ^{1/}			
	7 days	14 days	21 days	30 days
Ca ₃ PO ₄	62.68±8.63 ^b	37.8±0.45 ^{cd}	47.38±6.38 ^b	53.54±6.00 ^a
Rock-Phosphate	50.08±0.88 ^{cde}	35.35±2.00 ^{cde}	29.31±0.19 ^c	36.00±0.25 ^{bcd}
(NH ₄)H ₂ PO ₄)	54.93±0.88 ^c	48.29±5.29 ^b	36.78±2.53 ^c	39.88±2.32 ^{bc}
Ca ₃ PO ₄ with PSB15	69.67±1.88 ^a	60.80±8.66 ^a	59.96±8.31 ^a	56.08±4.88 ^a
Rock-Phosphate with PSB15	44.7±1.06 ^e	32.08±1.29 ^{de}	31.00±1.78 ^c	32.50±0.75 ^d
(NH ₄)H ₂ PO ₄ with PSB15	51.42±1.01 ^{cd}	42.21±1.55 ^{bc}	34.95±1.98 ^c	41.17±2.90 ^b
Negative control (untreated)	46.72±0.70 ^{de}	29.17±1.44 ^e	30.25±1.32 ^c	34.92±0.72 ^{cd}
F-test	**	**	**	**

^{1/} Means followed by the same letter in a column are not significantly different according to DMRT (P<0.05) with SPSS version 25.

5. ประสิทธิภาพแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ PSB15 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวอายุ 20 วัน พบว่า ความสูงต้นและความยาวรากของต้นกล้า ในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) เมื่อพิจารณาน้ำหนักสดลำต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งลำต้น และน้ำหนักแห้งราก พบว่า

T2 และ T3 ส่งผลให้ต้นข้าวมีน้ำหนักสดลำต้น น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งลำต้น และน้ำหนักแห้งรากสูงที่สุด (p<0.05) โดยมีน้ำหนักสดลำต้นเท่ากับ 6.02±0.4 และ 5.84±0.66 กรัม ตามลำดับ น้ำหนักสดรากเท่ากับ 2.32 และ 1.85 กรัม ตามลำดับ น้ำหนักแห้งลำต้นเท่ากับ 0.91 และ 0.84 กรัม ตามลำดับ และน้ำหนักแห้งรากเท่ากับ 0.20 และ 0.15 กรัม ตามลำดับ ซึ่งดีทัดเทียมกับ T1 ซึ่งใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 16-20-0 (Table 4; Figure 4)



Figure 4 Rice plant at 20 days old of T1 (A), T2 (B), T3 (C), T4 (D), and T5 (E).

Table 4 Efficacy of phosphate solubilizing bacteria to enhance rice plant growth at 20 days old under greenhouse conditions

Treatments	Stem height (cm)	Root length (cm)	Fresh stem weight (g)	Fresh root weight (g)	Dry stem weight (g)	Dry root weight (g)
T1	18.44±2.84 ^{1/}	8.65±0.94	3.80±0.26 ^b	1.94±0.15 ^{ab}	0.63±0.02 ^b	0.15±0.01 ^{bc}
T2	25.10±3.62	9.20±0.77	6.02±0.4 ^a	2.32±0.09 ^a	0.91±0.08 ^a	0.20±0.04 ^{ab}
T3	26.49±2.87	9.58±0.90	5.84±0.66 ^a	1.85±0.38 ^{ab}	0.84±0.49 ^{ab}	0.15±0.04 ^{bc}
T4	26.49±2.87	9.26±0.35	4.61±0.62 ^b	2.12±0.35 ^a	0.64±0.10 ^b	0.22±0.01 ^a
T5	23.74±5.63	9.90±1.52	4.60±0.70 ^b	1.53±0.1 ^b	0.66±0.17 ^b	0.11±0.04 ^c
F-test	ns	ns	**	*	*	*

^{1/} Means ± S. D. followed by the same letter in a column are not significantly different according to DMRT (P<0.05) with SPSS version 25.

4. สรุป

การวิจัยครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากไม้ได้ทั้งหมด 41 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ PSB28 และ PSB15 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด แสดงความกว้างบริเวณใส (clear zone) บนอาหารทดสอบ Pikovskaya เท่ากับ 2.13±0.07 และ 1.1±0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ (p<0.05) และพบว่าแคลเซียมฟอสเฟต (Ca₃(PO₄)₂) เป็นแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสมที่สุด โดยสายพันธุ์ PSB15 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตจากแคลเซียมฟอสเฟตได้มากที่สุด ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน (available P) ได้เท่ากับ 69.67±1.88, 60.80±8.66 และ 59.96±8.31 มิลลิกรัม ในวันที่ 7 วันที่ 14 และวันที่ 21 ของการทดลอง ตามลำดับ เมื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 ด้วยยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') และ

1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 คือ *B. paramycooides* เนื่องจากลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PSB15 มีความคล้ายคลึง ≥ 98 เปอร์เซ็นต์ กับ *B. paramycooides* ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเมื่อนำ PSB15 มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการเพาะกล้าข้าว พบว่ามีประสิทธิภาพละลายฟอสเฟตได้ดีและสามารถเข้าร่วมหรือทดแทนปุ๋ยเคมีในการช่วยละลายฟอสเฟตในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 (ตามบันทึกข้อตกลงเลขที่ 32/2562)

6. References

- Barea J.M., M.J. Pozo, R. Azcón and C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56: 1761-1778.
- Bertin C., H.W. Yang and L.A. Weston. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256: 67-83.
- Bray II, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of Total, Organic and Available Forms of Phosphorus in Soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- Dadarwal, K. R. 1997. Microorganisms for sustainable crop production. *Jodhpur.* 293-308.
- Department of Land Development. 2009. Plant and Fertilizer Analysis Protocol Manual. Manual No. OSD-03. Department of Land Development. Bangkok. (in Thai)
- Gerke, L. 1992. Phosphate, aluminum and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.* 155: 17-22.
- Gerretsen, F. C. 1948. The Influence of Microorganisms on the Phosphate Intake by the Plant. *Plant and Soil* 1: 51-81.
- Jantarasombat, W., N. Pasada, M. Peerawatchara, and V. Rophandung. 2009. Screening of Phosphate Solubilizing Microorganism for agricultural benefits. Office of Soil Resources Survey and Research. Department of Land Development. (in Thai)
- Junrungreang, S., B. Rossopa, and K. Sajjaphan. 2010. Effect of phosphate-solubilizing bacteria, *Burkholderia* sp. strain Rs01, on growth of Insee 2 sweet corn. Master Thesis Department of Soil Science. Kasetsart University. (in Thai)
- Alexander, M. 1969. Natural Selection of Microorganisms in Extreme Environments. *Plant and Soil* 43 (2) : 211-235. Final report. NASA- CR-105657. (in Thai)
- Kanghae, P., S. Jaikawin, A. Hantanapong, S. Pinmanee, and W. Homhual. 2018. Diversity and efficiency of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of rice in the upper northern Thailand. *Thai Rice Research Journal* 9(1): 46-59. (in Thai)
- Karnamnuey, N. 2007. Study of Diversity and Efficacy of *Bacillus* sp. For solubilizing Inorganic Phosphate. Master Thesis Department of Biotechnology. Kasetsart University. (in Thai)
- Kositratana, W. 1994. Bacteria causing plant disease. Faculty of Agriculture Kasetsart University, Bangkok. 87-89. (in Thai)
- Mala, T. 1991. The use of microorganisms that are soluble in phosphate rock to increase the usefulness of Phosphates and plant yields. Research report of Kasetsart University. (in Thai)
- Mala, T. 2003. Organic Fertilizer and Bio Fertilizer: Production technique and Application. Department of Soil

- Science, Faculty of Agriculture Kasetsart University. Bangkok. 300p. (in Thai)
- Mala, T. 2007. Organic Fertilizers and Biofertilizers: Production Techniques and Utilization. Faculty of Agriculture, Kasetsart University. Kasetsart University Press, Bangkok. (in Thai)
- Salehrastin N., 1999. Biological Fertilizers. Soil and Water Research Institute of Iran. Sci. J. Soil and Water. 12: 3.
- Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Bacteriology Committee of American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Somsa, K. 2006. Phosphorus. Agricultural Chemical Materials and Products Testing Group. Department of Science Service. (in Thai)
- Srichai, N. 2003. Isolating and Screening of Phosphate Solubilizing Bacteria from soil. Master Thesis Department of Biotechnology. Chiang Mai University. (in Thai)
- Suthon, W., Y. Khaosumain and C. Thanarut. 2016. Development of The Appropriate Technology on Plant Nutrition Management for Organic 'Chokanan' Mango Production. Mae-Jo University. (in Thai)
- Tilak K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, S. Mittal, A.K. Tripathi and B.N. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Curr. Sci. 89: 136-150.
- Uren N.C. 2000. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants, pp 19-40. In R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri, eds. The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil Interface. New York: Marcel, Dekker.
- Wimat, N., P. Pinjai, and N. Jittamart. 2020. Phosphorus Availability in Soil and Sugarcane Growth by Phosphate Solubilizing Bacteria. King Mongkut's Agr. J. 38(4): 477-488. (in Thai)
- Woo, P.C.Y., S.K.P. Lau, J.L.L. Teng, H. Tse, and K.Y. Yuen. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clin. Microbiol. Infect., 14(10): 908–934.
- Yadav, K. S. and K. R. Dadarwal. 1997. Phosphate solubilisation and mobilization through soil microorganisms. In K. R. Dadarwal (Ed.), Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production, p. 351.
- Yahya, A.I. and S.K. Al-Azwi. Occurance of Phosphate-solubilizing Bacteria in Some Iraqi Soils. Plant and Soil 117: 135-141.
- Yiam-on, T., N. Riddech, P. Jaisil, and S. Boonlue. 2012. Growth promotion of sugarcane by phosphate solubilizing bacteria in green house condition. Khon

Kaen Arg. J. 40(3): 185-193. (in
Thai)