การศึกษาความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาพโรงเรือนเพื่อการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์

Studies on Phosphorus Availability and Growth Promotion of Sugarcane by Phosphate Solubilizing Bacteria Under Greenhouse Condition for Biofertilizer Production

เพชรดา ปินใจ[1*] ฉัตราภรณ์ ทองปนแก้ว[1,2] และชนิดาภา ธนะศรีรางกูร[1,3]
Pechrada Pinjai[1*], Chattraporn Tongponkaew[1,2] and Chanidapa Thanasrirangkul[1,3]

บทคัดย่อ

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ซึ่งสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยกลไกต่าง ๆ เช่น การตรึงไนโตรเจน การผลิตฮอร์โมนพืช การละลายฟอสเฟต และการผลิตซิเดอร์โรฟอร์ เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยนี้สนใจศึกษาแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่คัดแยกจากดินบริเวณรากอ้อยในจังหวัดสระแก้ว เพื่อนำมาทดสอบการละลายฟอสเฟตในระดับห้องปฏิบัติการและสภาพโรงเรือนก่อนนำไปใช้ประโยชน์ในภาคสนาม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นของเซลล์และพีเอชที่ต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจสอบผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของอ้อย ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าระดับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ 10^8 CFU/ml ของแบคทีเรียเป็นระดับที่เหมาะสมต่อการละลายฟอสเฟต แบคทีเรียสามารถละลายฟอสเฟตได้เท่ากับ 212.5-787.5 µg/ml ที่ระดับ pH ในพิสัย 5-9 ขณะที่ไม่สามารถเจริญและละลายฟอสเฟตได้ที่สภาวะกรดจัดรุนแรง (pH 4.0) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียตัวแทน 2 ไอโซเลต ได้แก่ *Kosakonia radicincitans* (PSB1) และ *Bacillus subtilis* (PSB2) ส่งผลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตของอ้อย โดยการใส่เชื้อเดี่ยว PSB1 ร่วมกับหินฟอสเฟตส่งผลให้อ้อยมีการเจริญเติบโตในด้านของความสูง น้ำหนักสดลำ จำนวนลำ ความยาวปล้อง ความยาวลำ และเส้นผ่านศูนย์กลางลำเพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม รวมทั้งความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินเพิ่มขึ้น โดยการใส่เชื้อร่วมกันกับการเติมหินฟอสเฟตในภาพรวมให้ผลดีกับอ้อยมากที่สุด ดังนั้นแบคทีเรียตัวแทนทั้ง 2 ไอโซเลตนี้จึงน่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบในสภาพไร่เพื่อตรวจสอบผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพไร่ และพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: อ้อย แบคทีเรียละลายฟอสเฟต ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ การส่งเสริมการเจริญเติบโต

Abstract

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are beneficial bacteria that facilitate plant root colonization and enhance plant growth by a wide variety of mechanisms. The mechanisms of plant growth promotion are nitrogen fixation, hormone production, phosphate solubilization, and siderophore production. This research was a study of plant-growth-promoting bacteria extracted from the rhizospheres of sugarcane growing soils in Sa Kaeo province. However, before applying these bacteria to the field, tests in laboratory and greenhouse had to be carried out. The purposes of this experiment were to optimize the capability of bacteria to solubilize phosphate in various cell density and pH culture conditions, and to investigate the effects of phosphate solubilizing bacteria on sugarcane growth. The laboratory results revealed that a bacterial cell density of 10^8 CFU/ml was fit for PS. The pH range of 5-9 was found to be the most suitable for PS (212.5-787.5 µg/ml) among most isolates, whereas the extremely acidic conditions of pH 4.0 resulted in no growth and PS of bacteria. In addition, the two selected isolates, PSB1 (*Kosakonia radicincitans*) and PSB2 (*Bacillus subtilis*), had positive effects on sugarcane growth. A single inoculation of PSB1 with rock phosphates, which raised soil available phosphorus, significantly increased sugarcane growth, which was measured as height, stalk weight, stalk numbers, total stalk length, inter-nodal length,

[1] ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
[1] Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900
[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพัทลุง อ. เมือง จ. พัทลุง 93000
[2] Phatthalung Agricultural Research and Development Center, Muang, Phatthalung 93000
[3] สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
[3] National Research Council of Thailand, Chatuchak, Bangkok 10900
*Corresponding author, Email: agrprj@ku.ac.th

and stalk diameter, compared to the control. The combination of the inoculation with rock phosphate generally produced good growth performance for sugarcane. Thus, the two isolates are the most suitable for further study in the field of sugarcane cultivation and for the development of bio-products in the future.

Keywords: sugarcane, phosphate solubilizing bacteria, available phosphorus, plant growth promoter

คำนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช ทั้งนี้ฟอสฟอรัสจะพบอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์และโครโมโซม เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการหายใจ สังเคราะห์แสง สังเคราะห์แป้ง โปรตีน และไขมัน ส่งผลให้ฟอสฟอรัสมีผลต่อกระบวนการงอกของราก การออกดอก การสร้างหัว และการสุกของผล (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากรองจากไนโตรเจน แต่จากการศึกษาพบว่าในดินมีฟอสฟอรัสอยู่ในระดับที่ต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากฟอสฟอรัสในดินอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งมักเป็นปัจจัยมาจากคุณสมบัติทางเคมีของดิน ตัวอย่างเช่น การตรึงของฟอสฟอรัสกับธาตุแคลเซียมในดินด่างเกิดเป็นสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งไม่ละลายน้ำ ทำให้พืชไม่สามารถนำธาตุฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้ (ปัทมา วิตยากร, 2533) โดยปกติในดินส่วนมากจะมีฟอสฟอรัสในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ ซึ่งมีฟอสฟอรัสทั้งในรูปที่ละลายยากหรือไม่ละลาย โดยพืชสามารถใช้ประโยชน์จากฟอสฟอรัสได้ในรูปแอนไอออนของกรดออโทฟอสฟอริก (H_3PO_4) โดยเฉพาะในรูปของ HPO_4^{2-} (dibasic orthophosphate) หรือ H_2PO^{4-} (monobasic orthophosphate) แหล่งของฟอสฟอรัสในดินส่วนใหญ่จะได้มาจากหินที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ เช่น แร่อะฟาไทต์ปฐมภูมิ (primary apatite) และแร่ปฐมภูมิอื่น ๆ และการสลายตัวของสารอินทรียวัตถุในดินที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ การตรึงฟอสฟอรัสในดินขึ้นอยู่กับพีเอชและชนิดของดิน ในดินที่มีพีเอชเป็นกรดฟอสฟอรัสจะถูกตรึงด้วยออกไซด์และไฮดรอกไซด์ของเหล็กและอะลูมิเนียม ในขณะที่ปฏิกิริยาดินเป็นด่างฟอสฟอรัสจะถูกตรึงด้วยแคลเซียม ทำให้ประสิทธิภาพการละลายของฟอสฟอรัสต่ำ (Boden et al., 1980)

รายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบแบคทีเรียหลายชนิดสามารถย่อยสลายอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ เช่น tricalcium phosphate, dicalcium phosphate, hydroxyapatite และหินฟอสเฟต (Goldstein, 1986) ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (phosphate solubilizing bacteria, PSB) โดยพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดอินทรีย์โมเลกุลเล็ก ๆ จากกระบวนการเมแทบอลิซึม (organic acidic metabolites) หรือเอนไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatases) เพื่อใช้ในการย่อยสลายฟอสเฟตในรูปที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำ แบคทีเรียดังกล่าว ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas, Azospirillum, Burkholderia, Bacillus, Enterobacter, Rhizobium, Erwinia, Serratia, Alcaligenes, Arthrobacter, Acinetobacter* และ *Flavobacterium* เป็นต้น (Panwar et al., 2014) ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียมีหลายปัจจัย เช่น แหล่งคาร์บอน/แหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของฟอสฟอรัสอินทรีย์ (Qureshi et al., 2010) โดยเฉพาะพีเอช (pH) ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียมักอยู่ที่ระดับที่เป็นกลาง (pH 6.5-7) หรือกรดเล็กน้อย (pH 5.5-6.5) (Bajpai and Sundara, 1971) ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟตได้สูงมักจะเป็นผลจากค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย ดังรายงานของ Reena et al. (2013) พบว่า แบคทีเรียและราสามารถผลิตกรดคาร์บอกซิลิกที่ละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต (TCP) ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ และความเป็นกรดที่วัดได้มีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่า pH และความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่ละลายได้ ชี้ให้เห็นว่าการผลิตกรดอินทรีย์มีบทบาทสำคัญต่อความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะช่วยในการละลายฟอสเฟต หรือปัจจัยช่วงระยะเวลาการบ่มเชื้อซึ่งจะส่งผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ จากการศึกษาของ Stephen and Jisha (2011) พบว่า *Burkholderia* sp. (MTCC 8369) สามารถละลายฟอสฟอรัสได้สูงสุด (30.44 mg/100 ml) หลังจากการบ่มเชื้อในอาหาร Pikovskaya และ NBRIP เป็นเวลานาน 18 วัน และการละลายฟอสฟอรัสจะลดลงหลังจากนั้น เนื่องจากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลจากการใช้ฟอสฟอรัสและผลิตกรดอินทรีย์ในกระบวนการต่าง ๆ ของแบคทีเรีย (Tripura et al., 2007) ดังนั้นเมื่อพีเอชลดลงมากจนกระทบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก็จะกระทบต่อกระบวนการอื่น ๆ รวมทั้งความสามารถในการละลายฟอสเฟตด้วย นอกจากความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียแล้วยังพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชอีกด้วย โดยแบคทีเรียเหล่านี้มักพบในดินบริเวณรอบรากพืชเป็นส่วนใหญ่ นักวิจัยจึงสามารถคัดเลือกแบคทีเรียเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายด้าน โดยเฉพาะการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารในดินและการผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียและพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการละลายฟอสเฟตในสภาพห้องปฏิบัติการ รวมทั้งตรวจสอบผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพเรือนทดลองด้วย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนากล้าเชื้อสำหรับการต่อยอดการผลิตปุ๋ยชีวภาพกับอ้อยต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

แบคทีเรียตัวแทนที่ใช้ในการศึกษา

คัดเลือกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากอ้อยจากการวิจัยก่อนหน้านี้ (เพชรดา ปินใจ และคณะ, 2557) โดยคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนที่มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตในระดับสูง และมีกิจกรรมในการผลิตฮอร์โมนพืช (ออกซินและจิบเบอเรลลิน) จำนวน 4 ไอโซเลต คือ Tpk3-053, Ch1-021, Tpk4-083 และ Mki4-021 ดัง Table 1 ซึ่งระบุชนิดของแบคทีเรียได้เป็น *Kosakonia radicincitans*, *Bacillus subtilis* SKUAST1, *Bacillus subtilis* OTEB25 และ *Enterobacter* sp. ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลก่อนการทดลองแล้วว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคคน สัตว์ และพืช จึงมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ศึกษาได้

Table 1 Isolated of efficient high phosphate solubilizing bacteria and plant growth promoting.

No.	Isolates	Phosphate solubilizing (mg/l)	Plant hormones (mg/l)		Identified
			GA	IAA	
1	Tpk3-053	748.40	5.417	4.575	*Kosakonia radicincitans*
2	Ch1-021	480.03	6.500	4.252	*Bacillus subtilis* SKUAST1
3	Tpk4-083	729.36	4.333	4.377	*Bacillus subtilis* OTEB25
4	Mki4-010	447.37	8.000	4.350	*Enterobacter* sp.

การศึกษาสภาวะแวดล้อมของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ผลของระดับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ศึกษาระดับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟตโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร nutrient broth (NB) เพื่อเป็นเซลล์ตั้งต้น จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว NBRIP โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้อยู่ที่ 10^6, 10^7 และ 10^8 CFU/ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชม. นำมาวัดค่าการเจริญเติบโตด้วยการนับจำนวนด้วยวิธี spread plating บนอาหาร nutrient agar (NA) และวัดปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ด้วยวิธี vanadomolybdophosphoric acid (Lim, 1991) โดยนำเซลล์แบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงเซลล์และนำส่วนใสไปเติม 1N HCl (1:1) และ vanadate-molybdate reagent (3.5:1) (Mehta and Nautiyal, 2001) ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

ผลของ pH อาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

เตรียมเซลล์แบคทีเรียตั้งต้นในอาหารเหลว NB นำไปปั่นเหวี่ยง ล้างตะกอนเซลล์ด้วย NaCl 0.85% และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เท่ากับ 0.6 (OD_{600}) นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) ที่เติม $Ca_3(PO_4)_2$ (Nautiyal, 1999) ปรับสภาวะของอาหารให้อยู่ในช่วง pH เริ่มต้นที่ต้องการด้วย 1N HCl และ 1N NaOH (pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชม. (Sarker et al., 2014) เพื่อนำมาวัดอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยวัดค่าความขุ่นเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และวัดปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้โดยวิธี vanadomolybdophosphoric acid (Lim, 1991)

ผลของการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการละลายฟอสเฟตและการเจริญเติบโตของอ้อยภายใต้สภาวะโรงเรือน

นำแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (PSB) ที่มีประสิทธิภาพสูงเป็นตัวแทนในการศึกษาจำนวน 2 ไอโซเลต คือ Tpk3-053 (PSB1) และ Ch1-021 (PSB2) มาทดสอบการละลายฟอสเฟตในชุดดินทัพพริกภายใต้สภาวะโรงเรือน ตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลองมีความลึกไม่เกิน 30 ซม. เตรียมดินโดยนำตัวอย่างดินไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 5 ชม. จากนั้นนำดิน 120 กิโลกรัมมาใส่กระถาง (ถังขนาด 200 ลิตร) ตรวจสอบการปลอดเชื้อของดินด้วยวิธีการ dilution and plate ก่อนการทดลอง เพื่อตรวจสอบการปลอดเชื้อจุลินทรีย์ของดินที่ใช้ในการทดลอง ทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินก่อนปลูก เพื่อคำนวณการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ดัง Table 2

Table 2 Soil chemical analysis methods.

Chemical properties	Method	References
1. pH	pH meter (ratio of soil : water (1:1))	National Soil Survey Center (1996)
2. Electrical conductivity	Electrical conductivity bridge (ratio of soil : water (1:5))	National Soil Survey Center (1996)
3. Organic matter	Walkley and Black titration method	Nelson and Sommers (1996)
4. Total nitrogen	Kjeldahl method	Bremner and Mulvaney (1982)
5. Available phosphorous	Extracted by Bray II	Bray and Kurtz (1945)
6. Available potassium	Extracted by 1 M NH_4OAc (pH 7.0)	Pratt (1965)
7. Extractable bases	Extracted by 1 M NH_4OAc (pH 7.0)	Thomas (1982)
8. Cation exchange capacity	Extracted by 1 M NH_4OAc (pH 7.0)	Chapman (1965)

การเตรียมท่อนพันธุ์อ้อยและการปลูกเชื้อ

คัดเลือกท่อนพันธุ์อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีความสมบูรณ์ มีขนาดและจำนวนตาเท่ากัน นำท่อนพันธุ์มาตัดเป็นท่อนขนาด 5 นิ้ว โดยให้มีตาท่อนละ 1 ตา ฆ่าเชื้อที่ผิวท่อนพันธุ์ด้วยแอลกอฮอล์ 95% นาน 15 นาที ทิ้งให้แห้ง จากนั้นปลูกเชื้อที่ท่อนพันธุ์โดยนำท่อนพันธุ์ไปแช่ในภาชนะที่ใส่แบคทีเรียที่นำมาปลูกเชื้อนั้น ๆ โดยเตรียมเซลล์แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/ml แช่ท่อนพันธุ์นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชม. ก่อนนำไปลงกระถางตามตำรับการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 8 ตำรับการทดลอง 4 ซ้ำ ดังนี้

1. ตำรับการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ (ชุดควบคุม)
2. ตำรับการทดลองที่เติมเฉพาะหินฟอสเฟต (RP)
3. ตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อ PSB1
4. ตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อ PSB2
5. ตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อ 2 ไอโซเลต PSB1+PSB2
6. ตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อ PSB1 ร่วมกับการเติมหินฟอสเฟต
7. ตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อ PSB2 ร่วมกับการเติมหินฟอสเฟต
8. ตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อ 2 ไอโซเลต PSB1+PSB2 ร่วมกับการเติมหินฟอสเฟต

สำหรับตำรับการทดลองที่เติมหินฟอสเฟต ใส่หินฟอสเฟตปริมาณ 76.9 กรัมต่อกระถาง อัตรานี้คำนวณจากอัตราแนะนำของกรมวิชาการเกษตร จากนั้นใส่ท่อนพันธุ์ที่มีการปลูกเชื้อและไม่มีการปลูกเชื้อตามตำรับการทดลองดังกล่าว โดยวางท่อนพันธุ์ลึกลงไป 10 ซม. ทำการปลูกเชื้อตามตำรับการทดลองโดยการเทราดลงบนท่อนพันธุ์ปลอดเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้ท่อนพันธุ์แห้งจนเกินไป หลังจากนั้นทำการกลบท่อนพันธุ์ด้วยดิน หลังจากนั้น 1 เดือน ปลูกเชื้อซ้ำตามตำรับการทดลองบริเวณรอบรากอ้อย (โคนต้นอ้อย) โดยใช้เซลล์แบคทีเรียความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมน้ำในอัตรา 1:10 ต่อกระถาง เพื่อให้ได้เซลล์แบคทีเรียความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

ข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อย ตรวจวัดการเจริญเติบโตของอ้อยทุก ๆ หลังอ้อยงอก เป็นระยะเวลา 8 เดือน โดยวัดความสูง และการแตกกอ ชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของลำต้นและใบ วิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน (available phosphorous) โดยใช้น้ำยาสกัด Bray II แล้ววัดปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธี Vanado molybdenum blue method และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร (Bray and Kurtz, 1945)

สำหรับการอยู่รอดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดิน วัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยวิธี dilution and plate นำมาเพาะบนอาหารเลี้ยง NA ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ Chloramphenicol 500 ppb เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ใส่ลงไปในดิน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชม. และ 1 สัปดาห์ นับจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพื่อวัดอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียที่ทำการปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองที่ไม่มีการปลูกเชื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลและทดสอบทางสถิติ โดยนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) เพื่อหาค่า F-test พร้อมทั้งเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's Multiple Range Tests)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาสภาวะแวดล้อมของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟต

ระดับความเข้มข้นของเซลล์

ศึกษาระดับความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นที่ต่างกัน (10^6, 10^7 และ 10^8 CFU/ml) ต่อความเหมาะสมในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย Tpk3-053, Tpk4-083, Ch1-021 และ Mki4-010 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP พบว่าระดับความเข้มข้นเซลล์ที่ต่างกันมีผลทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตต่างกัน และส่งผลต่อปริมาณการละลายฟอสเฟตที่ต่างกัน เมื่อบ่มเชื้อที่เวลา 120 ชม. ซึ่งจะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นเซลล์ 10^8 CFU/ml ของไอโซเลต Tpk3-053 และ Ch1-021 มีแนวโน้มการละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้นและค่อย ๆ คงที่ เมื่อบ่มเชื้อครบ 72 และ 48 ชม. ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต Mki4-010 และ Tpk4-083 มีแนวโน้มของการละลายฟอสเฟตลดลงตามระยะเวลาการบ่มเชื้อที่นานขึ้น สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ระบุว่าความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 10^8 CFU/ml เหมาะสมต่อการใส่เชื้อแบคทีเรียบริเวณรากพืชทั้งในห้องปฏิบัติการ สภาพโรงเรือน และแปลงทดลอง (Sundara et al., 2002; Qureshi et al., 2012; Walpola and Yoon, 2013) เนื่องจากแบคทีเรียมีแนวโน้มในการรอดชีวิตสูงกว่าจากปริมาณเชื้อที่มีความเข้มข้นสูง จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลต Tpk3-053 ทุกระดับความเข้มข้นเซลล์มีการเจริญเติบโตค่อนข้างคงที่และมีจำนวนสูงกว่า 8.0 log CFU/ml ที่ระดับความเข้มข้นเซลล์ 10^6 และ 10^7 CFU/ml มีการละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มเชื้อ แต่การละลายฟอสเฟตไม่สม่ำเสมอ โดยละลายฟอสเฟตได้สูงสุดเท่ากับ 550 µg/ml ในขณะที่ความเข้มข้นเซลล์ 10^8 CFU/ml มีการละลายฟอสเฟตเพิ่มสูงขึ้นอย่างคงที่ตามระยะเวลาการบ่มเชื้อ โดยละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุดเท่ากับ 510 µg/ml ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลต Ch1-021 มีการเจริญเติบโตค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการบ่มเชื้อในทุกระดับความเข้มข้นเซลล์ แต่มีแนวโน้มการละลายฟอสเฟตแตกต่างกันในแต่ละระดับความเข้มข้นเซลล์ โดยระดับความเข้มข้นเซลล์ที่ 10^6 และ 10^7 CFU/ml มีการละลายฟอสเฟตลดลงตามระยะเวลาการบ่มเชื้อ และที่ระดับความเข้มข้นเซลล์ 10^8 CFU/ml มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 8.70 log CFU/ml เมื่อบ่มเชื้อครบ 120 ชม. โดยมีแนวโน้มการละลายฟอสเฟตคงที่เมื่อบ่มเชื้อครบ 120 ชม.

สำหรับแบคทีเรียไอโซเลต Tpk4-0 83 ในระดับทุกระดับความเข้มข้นเซลล์จะมีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 8.0 log CFU/ml แต่ค่อนข้างคงที่เมื่อบ่มเชื้อที่ระยะเวลา 120 ชม. และมีแนวโน้มของการละลายฟอสเฟตลดลงเมื่อบ่มเชื้อนานขึ้น โดยเมื่อบ่มเชื้อครบ 24 ชม. การละลายฟอสเฟตค่อนข้างสม่ำเสมอและลดลงอย่างช้า ๆ เช่นเดียวกับแบคทีเรียไอโซเลต Mki4-010 มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8.0 log CFU/ml และคงที่ตลอดระยะเวลาการบ่มเชื้อที่ 120 ชม. มีแนวโน้มการละลายฟอสเฟตลดลงทุกระดับความเข้มข้นเซลล์เมื่อบ่มเชื้อนานขึ้น

พีเอช

ทดสอบการละลายฟอสเฟตที่ระดับพีเอชต่างกัน (4, 5, 6, 7, 8 และ 9) โดยมีเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/ml ผลการทดลองพบระดับพีเอชต่างกันมีผลทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่ต่างกันและส่งผลต่อประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต กล่าวคือ แบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีและมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่พีเอชเป็นกรดจัดถึงด่างจัด (pH 5-9) ในขณะที่การบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเป็นกรดจัดรุนแรงมาก (pH 4) แบคทีเรียทุกไอโซเลตไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จึงไม่สามารถวัดการละลายฟอสเฟตที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของแบคทีเรียได้

จากกราฟจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลต Tpk3-053 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงขึ้นตามระยะเวลาบ่มเชื้อที่นานขึ้นในทุกระดับพีเอชที่ทดสอบ โดยการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดใน 48 ชม.แรก จากนั้นการละลายฟอสเฟตจะมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เมื่อบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 5 เป็นเวลา 48 ชม. สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุดเท่ากับ 787.5 µg/ml หลังจากนั้นการละลายฟอสเฟตจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อบ่มครบ 72 ชม. ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 7, 8 และ 9 ละลายฟอสเฟตได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลต Tpk4-083 ละลายฟอสเฟตได้สม่ำเสมอในทุกระดับ pH ที่ทำการทดสอบอยู่ในช่วง 212.5-525 µg/ml ซึ่งการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 5-9 ในช่วง 24-72 ชม. แบคทีเรียจะละลายฟอสเฟตได้อย่างต่อเนื่อง และละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุดที่เวลา 36 ชม. อยู่ในช่วง 400-525 µg/ml โดยที่ระดับ pH 6 ละลายฟอสเฟตได้สูงกว่าระดับพีเอชอื่นที่ทดสอบ อย่างไรก็ตามความสามารถในการละลายฟอสเฟตจะมีแนวโน้มในการละลายฟอสเฟตลดลงเมื่อบ่มเชื้อนานขึ้น แม้ว่าอัตราการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกระดับพีเอช สำหรับแบคทีเรียไอโซเลต Ch1-021 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและความสามารถในการละลายฟอสเฟตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกระดับพีเอชที่ทำการทดสอบ เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 36 ชม. โดยละลายฟอสเฟตได้ในช่วง 500-637.5 µg/ml และที่ระดับ pH 9 จะละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลต Mki4-010 สามารถละลายฟอสเฟตได้ในช่วง 212.5-612.5 µg/ml และการละลายจะค่อย ๆ ลดลงเช่นเดียวกับการเจริญเติบโต เมื่อมีการบ่มเชื้อนานขึ้น โดยการละลายเกิดได้สูงที่สุดที่เวลา 12 ชม. ในทุก ๆ ระดับพีเอชที่ทำการ

ทดสอบ และจะละลายได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 9 เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียที่พีเอชต่างกันร่วมกับความสามารถในการละลายฟอสเฟตตลอดระยะเวลาการบ่มแล้ว จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลต Tpk3-053 และ Ch1-021 เป็นแบคทีเรียที่มีความเหมาะสมต่อการศึกษาในสภาพโรงเรือน เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตและการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างคงที่ในสภาวะและระยะเวลาที่ทดสอบ

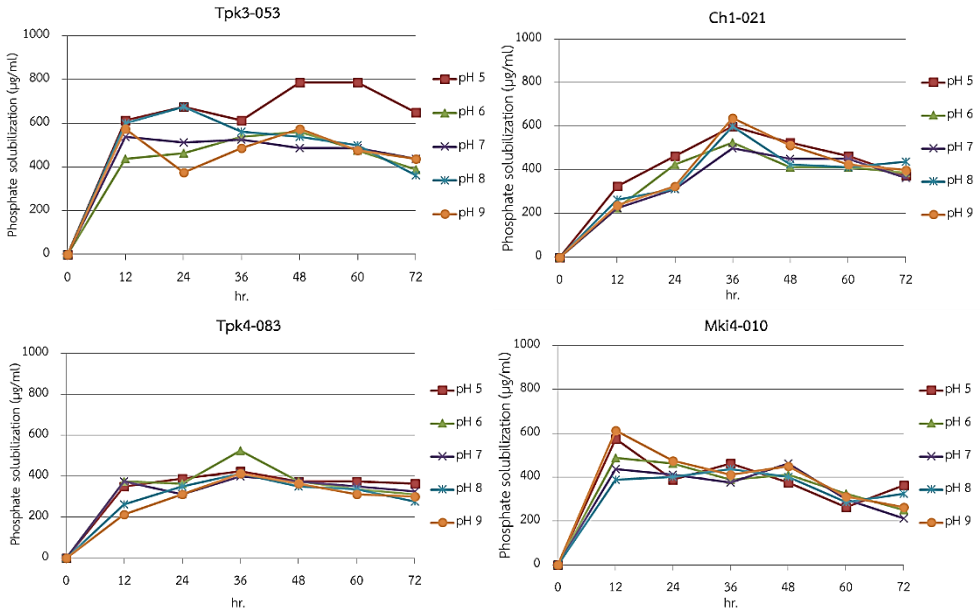

Figure 1 Effect of pH on efficiency of phosphorus solubilization.

ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย

การทดสอบการนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมาใช้กับอ้อยในชุดดินตัวแทน (ชุดดินทัพพริก) คัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลต จากผลการศึกษาสภาพแวดล้อม โดยการศึกษานี้เลือกใช้แบคทีเรีย Tpk3-053 (*Kosakonia radicincitans* (PSB1)) และ Ch1-010 (*Bacillus subtilis* SKUAST 1 (PSB2)) โดยชุดดินตัวแทนลักษณะของเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียว (clay loam) มีพีเอชเป็นด่างเล็กน้อย (pH 7.8) สภาพการนำไฟฟ้าจัดอยู่ในช่วงที่ไม่เค็ม (0.25 dS/m) มีอินทรียวัตถุ (2.58%) และมีค่าความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนในระดับค่อนข้างสูง (42.50 cmole/kg) ส่วนปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมดในดินอยู่ที่ระดับต่ำ (1.23 g/kg) โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ (56.66 mg/kg) และฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับปานกลาง (18.8 mg/kg) ซึ่งเป็นผลมาจากวัตถุต้นกำเนิดของชุดดินทับพริกเป็นหินดินดานและหินปูน และจะพบหินปูนที่กำลังสลายตัวตลอดหน้าตัดดินอยู่ในช่วงความลึก 100 ซม. จากผิวดิน ส่งผลให้พีเอชดินอยู่ในพิสัย 6.0-7.0 มีระดับความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนสูง และฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในระดับต่ำทำให้ชุดดินนี้ถูกจัดเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง หลังจากทำการใส่เชื้อตามตำรับการทดลองข้างต้น ผลการทดลองพบความสูงของอ้อยที่อายุ 8 เดือน มีความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการใส่เชื้อ PSB จะมีความสูงมากกว่าตำรับควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ (T1) อยู่ในช่วง 163.67-197.33 ซม. ชี้ให้เห็นว่าการใส่เชื้อมีผลทำให้ความสูงของอ้อยเพิ่มขึ้น ในขณะที่การแตกกอและจำนวนลำของอ้อย ตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ PSB1 (T3) มีจำนวนลำต่อกอที่เก็บเกี่ยวได้มากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ใส่เชื้อ PSB1 ร่วมกับเติมหินฟอสเฟต (T6) เท่ากับ 8.33 และ 7.33 ลำ/กอ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การใส่เชื้อ PSB1 มีผลทำให้อ้อยมีการแตกกอเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากตำรับควบคุม

สำหรับเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวลำอ้อย พบตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ PSB มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และความยาวลำสูงกว่าตำรับการควบคุม โดยตำรับการทดลองที่เติมหินฟอสเฟตร่วมกับการใส่เชื้อ PSB1 ที่มีการเติมหินฟอสเฟต (T6) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และความยาวลำสูงกว่าตำรับการทดลองที่ไม่เติมหินฟอสเฟต (T3) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และความยาวลำสูงที่สุด เท่ากับ 3.10 และ 176.57 ซม. ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าการเติมหินฟอสเฟตช่วยกระตุ้นกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกับน้ำหนักสดของลำอ้อย เมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน การเติมหินฟอสเฟตร่วมด้วยทำให้อ้อยมีน้ำหนักสดลำมากกว่าตำรับที่ไม่เติมหินฟอสเฟตและตำรับควบคุม ทั้งนี้พบการใส่เชื้อเดี่ยว

PSB1 ร่วมกับหินฟอสเฟต (T6) ส่งผลให้อ้อยมีน้ำหนักสดลำเพิ่มขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับตำรับที่ไม่เติมหินฟอสเฟตและตำรับควบคุม โดยมีน้ำหนักสดลำเท่ากับ 3,607.63 กรัม รองลงมาคือตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อร่วม (T8) และตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ PSB2 (T7) เท่ากับ 3,438.17 และ 3,354.93 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับความยาวปล้อง ความยาวลำ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ และความสูงของอ้อย

Table 3 Effect of phosphate solubilizing bacteria on tiller no., no. of stem, no. of internode, inter-node length, stalk diameter, total stalk length, and stalk weight of 8 months old sugar cane.

Treatment		Height (cm)	Tiller no.	No. of stem	Inter-node length (cm)	Stalk Diameter (cm)	Total stalk length (cm)	Stalk weight (g)
T1	Control	151.00cd	8.67b	6.67	6.98ab	2.58c	121.83c	3,060.47bc
T2	RP	149.33d	12.00a	6.00	7.30ab	2.85b	115.00c	2,860.50c
T3	PSB1	163.67bcd	11.67a	8.33	7.34ab	2.90b	126.67c	3,024.70bc
T4	PSB2	174.67abc	9.67ab	5.00	7.75a	2.82b	150.17b	3,088.47bc
T5	PSB1+PSB2	180.67abc	9.67ab	6.67	6.54b	2.96ab	147.83b	3,039.37bc
T6	PSB1+RP	197.33a	8.30b	7.33	7.82a	3.10a	176.57a	3,607.63a
T7	PSB2+RP	163.67bcd	8.00b	5.67	6.55b	2.83b	139.67b	3,354.93ab
T8	PSB1+PSB2+RP	187.00ab	11.33a	6.33	7.81a	2.89b	148.33b	3,438.17ab
F-test		*	**	ns	*	**	**	**
CV (%)		10.09	13.34	12.86	7.61	3.60	4.91	7.41

Mean in the same column of each treatments by common letter are not significantly different at 5% level by DMRT.
** = significant at 1%, * = significant at 5% level, ns = non-significant.

ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน

ทุกตำรับการทดลองมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสูงสุดในเดือนที่ 4 ยกเว้นตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ PSB1 (T6) ที่ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์จะลดลง หลังจากนั้นปริมาณของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์จะค่อย ๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากอ้อยจะดูดใช้ฟอสฟอรัสมากขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะแตกกอ ทั้งนี้ตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อเดี่ยว (PSB1 หรือ PSB2) ร่วมทั้งการใส่เชื้อร่วม (PSB1+PSB2) ที่มีการเติมหินฟอสเฟตมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงกว่าตำรับที่ไม่เติมหินฟอสเฟตและตำรับควบคุม แต่เมื่ออ้อยเจริญถึงเดือนที่ 8 กลับพบว่าการใส่เชื้อร่วม (PSB1+PSB2) ทั้งที่เติมหินฟอสเฟต (T8) และไม่เติมหินฟอสเฟต (T5) จะให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงกว่าตำรับการทดลองอื่น โดยการเติมหินฟอสเฟตยังคงมีแนวโน้มให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงที่สุด อย่างไรก็ตามการเติมหินฟอสเฟตมีผลในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน และช่วยส่งเสริมการทำงานของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตและผลผลิตของอ้อย โดยการใส่เชื้อร่วม PSB1 และ PSB2 มีศักยภาพในการละลายฟอสเฟตได้อย่างต่อเนื่องและลดลงในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณการดูดใช้ฟอสฟอรัสที่สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่าการใส่เชื้อร่วมมีศักยภาพในการละลายฟอสเฟตสูงกว่าการใส่เชื้อเดี่ยว (Chen et al., 2006; Akhtar et al., 2013; Walpola and Yoon, 2013) ซึ่งการใส่เชื้อร่วมกันสามารถส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน ดังงานวิจัยของ Akhtar et al. (2013) ซึ่งได้ทดสอบประสิทธิภาพของ *Rhizobium และ Bacillus sp.* ต่อการละลายฟอสฟอรัสและการเจริญเติบโตของข้าวสาลี พบว่าการใส่เชื้อร่วมกันส่งผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสในดินหลังเก็บเกี่ยวสูงกว่าตำรับการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังส่งผลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวสาลี เช่นเดียวกับ Walpola and Yoon (2013) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ *Pantoea agglomerans* และ *Burkholderia anthina* ร่วมกับหินฟอสเฟต พบว่าการใส่เชื้อร่วมทำให้จำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นด้วย สอดคล้องกับการเจริญเติบโตถั่วเขียวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 4 Effects of phosphate solubilizing bacteria on available phosphorous in soil.

Treatment		Soil available P (mg/kg)			
		2	4	6	8
		---------- (months) ----------			
T1	Control	22.68c	25.51c	19.84c	17.81b
T2	RP	13.86d	14.44de	15.84d	17.89b
T3	PSB1	13.46d	20.03cd	15.13d	15.10b
T4	PSB2	9.59d	11.03e	11.73d	18.17b
T5	PSB1+PSB2	13.88d	15.70de	12.97d	19.63ab
T6	PSB1+RP	45.75a	40.94b	25.37b	14.02b
T7	PSB2+RP	39.31b	53.79a	34.44a	17.90b
T8	PSB1+PSB2+RP	43.20ab	53.22a	35.60a	23.63a
F-test		**	**	**	**
CV (%)		9.84	11.48	10.64	16.49

Mean in the same column of each treatments by common letter are not significantly different at 5% level by DMRT.
** = significant at 1%.

การรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดิน

แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ใส่ลงไปในดินมีจำนวนลดลงจากเชื้อตั้งต้นที่ใส่ลงไป (10^8 CFU/g soil) โดยหลังจากใส่เชื้อไปนาน 4 เดือน แบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีอัตราการรอดชีวิตลดลงราว 10^3 CFU/g soil ทั้งตำรับที่มีการเติมหินฟอสเฟตและไม่เติมหินฟอสเฟต จากกราฟจะเห็นได้ว่าตำรับที่มีการเติมหินฟอสเฟตจะช่วยทำให้แบคทีเรียมีอัตราการอยู่รอดสูงกว่าตำรับที่ไม่มีการเติมหินฟอสเฟต โดยการใส่เชื้อ PSB1 จะมีแนวโน้มของแบคทีเรียที่รอดชีวิตมากกว่าการใส่เชื้อ PSB2 โดยการใส่เชื้อ PSB1 ทั้งที่มีการเติมหินฟอสเฟตและไม่เติมหินฟอสเฟตจะมีจำนวนแบคทีเรียรอดชีวิตมากที่สุดเท่ากับ $30.3x10^4$ และ $30.1 x10^4$ CFU/g soil ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับตำรับที่มีการใส่เชื้อร่วมกันสองไอโซเลต (PSB1+PSB2) จะพบว่าแบคทีเรียมีอัตราการอยู่รอดมากกว่าการใส่เชื้อ PSB2 เช่นกัน ชี้ให้เห็นว่าการใส่เชื้อ PSB1 จะช่วยส่งเสริมการอยู่รอดของเชื้อ PSB2 ได้สูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีการเติมหินฟอสเฟตร่วมด้วย ในขณะที่การใส่เชื้อ PSB1 แม้จะส่งผลต่อการรอดชีวิตที่สูงที่สุด แต่จะเห็นได้ชัดว่าตำรับที่มีการเติมหินฟอสเฟต ร่วมกับเชื้อ PSB1 ไม่ได้ช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเชื้อ PSB1 ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับตำรับที่ไม่เติมหินฟอสเฟต อย่างไรก็ตามเมื่อใส่เชื้อนาน 8 เดือน จะเห็นได้ว่าทุกตำรับการทดลองจะมีอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือราว 10^4 CFU/g soil ชี้ให้เห็นว่าจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือเมื่ออ้อยอายุ 4 เดือน ทุกตำรับการทดลองที่มีจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสูงจะมีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน พบจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yadav et al. (2011) กล่าวว่าการเติมหินฟอสเฟตทำให้จำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์มีความสัมพันธ์เชิงบวกกัน เช่นเดียวกับ Walpola and Yoon (2013) ศึกษาผลของแบคทีเรีย PSB ต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวในห้องปฏิบัติการ พบว่าจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้นทำให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นเช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้การใส่เชื้อมีประสิทธิภาพมากขึ้นควรมีการใส่เชื้อซ้ำโดยการฉีดพ่นก่อนอ้อยเข้าสู่ระยะแตกกอ เนื่องจากอ้อยจะมีความสูงมากเกินไปทำให้ยากต่อการฉีดพ่นเชื้อ

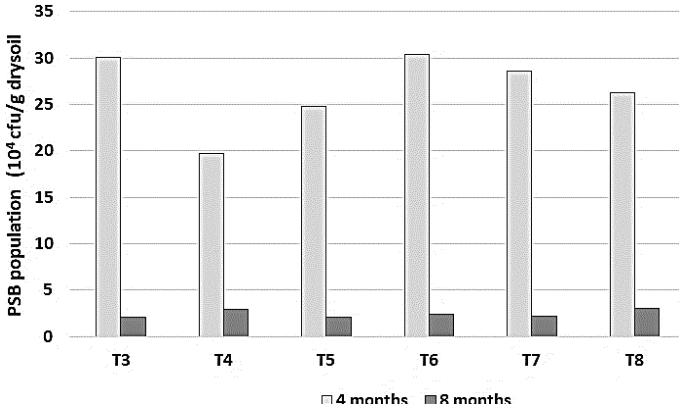

Figure 2 Number of phosphate solubilizing bacteria in soil (4 and 8 months).

สรุปผลการศึกษา

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชคัดเลือกได้จากดินบริเวณรอบรากอ้อยเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งละลายฟอสเฟตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับพีเอชเป็นกรดจัดมากจนถึงด่างจัด (pH 5-9) ในขณะที่สภาวะเป็นกรดจัดรุนแรง (pH 4.0) แบคทีเรียไม่สามารถเจริญและละลายฟอสเฟตได้ โดยจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10^8 CFU/ml มีความเหมาะสมต่อการละลายฟอสเฟตสูงที่สุด เมื่อนำแบคทีเรียตัวแทนมาศึกษาต่อในสภาพโรงเรือน พบการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟต PSB1 ร่วมกับหินฟอสเฟต สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อทั้งความสูง ความยาวปล้อง ความยาวลำ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ และน้ำหนักสดของต้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งการเติมหินฟอสเฟตร่วมกับการใส่เชื้อมีผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินและการเจริญเติบโตของอ้อยมากกว่าการไม่ใส่หินฟอสเฟต และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการใส่เชื้อเดี่ยวและการใส่เชื้อร่วม พบว่าการใส่เชื้อ PSB1 ร่วมกับการเติมหินฟอสเฟตจะให้น้ำหนักอ้อยสูงที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ปีงบประมาณ 2558 และขอขอบคุณโรงงานอ้อยและน้ำตาลตะวันออก (มหาชน) จำกัด อ. วัฒนานคร จ. สระแก้ว ที่ให้การสนับสนุนพื้นที่ในการทดลอง และอำนวยความสะดวกในการทำงาน

เอกสารอ้างอิง

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. *ปฐพีวิทยาเบื้องต้น*. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปัทมา วิตยากร. 2533. *ดิน: แหล่งธาตุอาหารของพืช*. ขอนแก่น: ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เพชรดา ปินใจ, เสาวนุช ถาวรพฤกษ์ และณัฐพล จิตมาตย์. 2557. การศึกษาแนวทางการใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเพิ่มผลผลิตอ้อยเพื่อการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์. ใน *รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (โครงการย่อยที่ 2) ภายใต้แผนงานวิจัยการพัฒนาดัชนีคุณภาพและผลิตภาพของดินเพื่อการผลิตอ้อยในภาคตะวันออกของประเทศไทย*. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

Akhtar, N. I., Arshad, M. A., Shakir, M. A., Qureshi, J., Sehrish, J., and Ali, L. 2013. Co-inoculation with *Rhizobium* and *Bacillus* sp. to improve the phosphorus availability and yield of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Journal of Animal and Plant Sciences* 23: 190-197.

Bajpai, P. D., and Sundara, R. W. V. B. 1971. Phosphate solubilizing bacteria. Solubilization of phosphate in liquid culture by selected bacteria as affected by different pH values. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 17: 41-43.

Boden, G., Master, R. W., Rezvani, I., Palmer, J. P., Lobe, T. E., and Owen, O. E. 1980. Glucagon deficiency and hyperaminoacidemia after total pancreatectomy. *The Journal of Clinical Investigation* 65: 706-716.

Bray, R. H., and Kurtz, L. T. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59: 39-45.

Bremner, J. M., and Mulvaney, C. S. 1982. Nitrogen-Total. In *Methods of Soil Analysis, Part 2. 2nd ed., Agronomy Monograph No. 9*, A. L. Page, R. H. Miller, and D. R. Keeney, eds. pp. 295-324. Madison, WI: American Society of Agronomy.

Chapman, H. 1965. Cation exchange capacity. In *Methods of Soil Analysis*, C. A. Black, ed. pp. 891-901. Madison, WI: American Society of Agronomy.

Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., and Young, C. C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.

Goldstein, A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture* 1: 51-57.

Lim, S. 1991. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, D.C.: American Public Health Association.

Metha, S., and Nautiyal, C. S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. *Current Microbiology* 43: 51-56.

National Soil Survey Center. 1996. *Soil survey laboratory methods manual, Soil survey investigations report No.42, version 3.0*. Lincoln, NE: Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture. U.S. Government Printing Office.

Nelson, D. W., and Sommers, L. E. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical methods. Soil Science of America and American Society of Agronomy,* C. A. Black, ed. pp. 961-1010. Madison, WI: Soil Science Society of America.

Panwar, M., Tewari, R., and Nayyar, H. 2014. Microbial consortium of plant growth-promoting rhizobacteria improves the performance of plants growing in stressed soils: an overview. In *Phosphate Solubilizing Microorganisms*, M. S. Khan, A. Zaidi, J. Musarrat, eds. pp. 257-285. Switzerland: Springer International Publishing.

Pratt, P. F. 1965. Potassium. In *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties,* C. A. Black, ed. pp. 1023-1031. Madison, WI : American Society of Agronomy.

Qureshi, A. S., Dahot, U., and Panhwar, S. I. 2010. Biosynthesis of alkaline phosphatase by *Escherichia coli*. Efr 13 in submerged fermentation. *World Applied Sciences Journal* 8: 50-56.

Qureshi, M. A., Lqbal, A., Akhtar, N., Shakir, M. A., and Khan, A. 2012. Co-inoculation of phosphate solubilizing bacteria and rhizobia in the presence of L-tryptophan for the promotion of mash bean (*Vigna mungo L.*). *The Journal Soil & Environment* 31: 47-54.

Reena, D. T., Deepthi, H., Pravitha, M. S., and Lecturer, D. 2013. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and fungi from rhizospheres soil from banana plants and its effect on the growth of *Amaranthus cruentus L. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 5: 6-11.

Stephen, J., and Jisha, M. S. 2011. Gluconic acid production as the principal mechanism of mineral phosphate solubilization by *Burkholderia* sp. (MTCC 8369). *Journal of Tropical Agriculture* 49: 99-103.

Sundara, B., Natarajan, V., and Hari, K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yield. *Field Crop Research* 77: 43-49.

Tripura, C., Sashidhar, B., and Podile, A. R. 2007. Ethyl methanesulfonate mutagenesis-enhanced mineral phosphate solubilization by groundnut-associated *Serratia marcescens* GPS-5. *Current Microbiology* 54: 79-84.

Thomas, G. W. 1982. Exchangeable cations. In *Methods of Soil Analysis, Part 2. 2nd ed., Agronomy Monograph No. 9*, A. L. Page, R. H. Miller, and D. R. Keeney, eds. pp. 159-165. Madison, WI.: American Society of Agronomy.

Walpola, B. C., and Yoon, M. H. 2013. Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). *Chilean Journal of Agricultural Research* 73: 275-281.

Yadav, S., Kaushik, R., Saxena, A. K., and Arora, D. K. 2011. Diversity and phylogeny of plant growth promoting bacilli from moderately acidic soil. *Journal of Basic Microbiology* 51: 98-106.

วันรับบทความ (Received date) : 4 ก.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 13 พ.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 6 มิ.ย. 63