# การส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาพเรือนทดลอง

# Growth promotion of sugarcane by phosphate solubilizing bacteria in green house condition

**ไตรธานี เยี่ยมอ่อน[1], นันทวัน ฤทธิ์เดช[1], ประสิทธิ์ ใจศิล[2] และ โสภณ บุญลือ[1*]**

**Tritanee Yiam-on[1], Nuntavun Riddech[1], Prasit Jaisil[2] and Sophon Boonlue[1*]**

**บทคัดย่อ**: ปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในรูปของปุ๋ยชีวภาพสำหรับการทำการเกษตรอย่างยั่งยืนได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น แบคทีเรียละลายฟอสเฟต (phosphate solubilizing bacteria; PSB) เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถเปลี่ยนฟอสเฟตในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย PSB ที่มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูงจากดินรอบรากอ้อยที่ปลูกในแปลงเกษตรกรรมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และตรวจสอบผลของแบคทีเรีย PSB ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพเรือนทดลอง ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกแบคทีเรีย PSB ได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลต และพบว่าแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ได้แก่ NR-KKU-5-3, UT-KKU-10, UT-KKU-26 และ KK-KKU-32 มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูงระหว่าง 179-196 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การวิเคราะห์สายวงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต โดยอาศัยลำดับเบสของยีนในบริเวณ 16S rDNA ชี้ให้เห็นว่า แบคทีเรียเหล่านี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bacillus megaterium* SMS3, *B. stratosphericus* GD65, *B. aryabhattai* MDSR11 และ *B. altitudinis* DYJK5-5 ตามลำดับ การคัดเลือกแบคทีเรีย PSB ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพเรือนทดลอง พบว่าการปลูกแบคทีเรียชนิดต่างๆ ร่วมกับการใส่ปุ๋ยหินฟอสเฟต ทำให้อ้อยมีการเจริญเติบโตในทุกด้าน และการสะสมธาตุฟอสฟอรัสในลำต้น สูงกว่าอ้อยชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในจำนวนตำรับการทดลองที่ปลูกแบคทีเรีย PSB ทั้งหมดนี้ พบว่าเชื้อ *B. aryabhattai* UT-KKU-26 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดีที่สุด ซึ่งเหมาะที่จะพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการเพาะปลูกอ้อยต่อไปได้ในอนาคต

**คำสำคัญ** : การเจริญเติบโต, แบคทีเรียละลายฟอสเฟต, อ้อย, *Bacillus*

**ABSTRACT:** Current exploitation of microbial activities as a biofertilizer for development of sustainable of agriculture has much attracted. Phosphate solubilizing bacteria is one of interesting microorganism since insoluble form of phosphate can be converted in to soluble form by this bacteria. Therefore, this study aimed to isolate and screen for phosphate solubilizing bacteria (PSB) that has high phosphate solubilizing activity from rhisospheric soil of sugarcane planted in farmer fields in Northeastern of Thailand, and examine for the effects of PSB on the growth of sugarcane in green house condition. The results showed that 19 isolates were obtained. Among of there, 4 isolates of PSB, NR-KKU-5-3, UT-KKU-10, UT-KKU-26 and KK-KKU-32 exhibited high phosphate solubilizing activity

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

[2] ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

* Corresponding author: bsopho@kku.ac.th

at concentration from 179 to 196 $\mu$g/ml. Phylogenetic analysis, based on 16S rDNA gene sequence from these four bacterial isolates indicated that these bacterial isolates were mostly correlated to *Bacillus megaterium* SMS3, *B. stratosphericus* GD65, *B. aryabhattai* MDSR11, and *B. altitudinis* DYJK5-5, respectively. Screening for the effective of PSB on the growth promotion of sugarcane under greenhouse condition showed that all plant growth parameters and the accumulation of major plant nutrient (Total P) in the shoot of sugarcane inoculated with various different of PSB were significantly higher than those from uninoculated plant (control). Among of the treatments inoculated with PSB, *B. aryabhattai* UT-KKU-26 was the best isolate as plant growth promotor and suitable for developing as biofertilizer for production of sugarcane in the future.
**Keywords:** *Bacillus*, Growth, Phosphate solubilizing bacteria, Sugarcane

## บทนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ใช้เป็นวัตถุดิบที่สำคัญสำหรับการผลิตน้ำตาลและผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นพลังทดแทนในปัจจุบัน การผลิตโดยทั่วไปใช้ปุ๋ยเคมีเป็นหลัก ซึ่งปุ๋ยเคมีมีราคาค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ปุ๋ยอนินทรีย์เคมีอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ในแปลงเกษตรกรรมหลายๆ แห่ง ทำให้มีการสะสมของฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายน้ำเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีของดิน เช่น ทำให้เกิดการตรึงของฟอสฟอรัสกับธาตุแคลเซียมในดิน เกิดเป็นสารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้พืชไม่สามารถนำธาตุฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้ (Richardson, 1994; Dey, 1988) จากรายงานผลการทดลองก่อนหน้านี้จำนวนมาก กล่าวว่า แบคทีเรียหลายชนิดสามารถย่อยสลายอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ เช่น tricalcium phosphate, dicalcium phosphate, hydroxyapatite และ หินฟอสเฟต (Goldstein, 1986) ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (phosphate solubilizing bacteria; PSB) โดยพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ สามารถผลิตกรดอินทรีย์โมเลกุลเล็กๆ จากกระบวนการเมแทบอลิซึม (organic acidic metabolites) หรือ เอนไซม์ phosphatases เพื่อใช้ในการย่อยสลายฟอสเฟตในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำ แบคทีเรียดังกล่าว ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas, Azospirillum, Burkholderia, Bacillus, Enterobacter, Rhizobium, Erwinia, Serratia, Alcaligenes, Arthrobacter, Acinetobacter* และ *Flavobacterium* เป็นต้น (Kloepper and Schroth, 1978) ซึ่งสามารถพบแบคทีเรียเหล่านี้ได้ในดินรอบๆ รากพืช และแบคทีเรียเหล่านี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชอีกด้วย (Gyaneshwar et al., 2006; Hameeda et al., 2008) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย PSB ที่มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูงจากดินรอบรากอ้อยที่ปลูกในแปลงเกษตรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และตรวจสอบผลของแบคทีเรีย PSB ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพเรือนทดลอง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการพัฒนาการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการเพาะปลูกอ้อยต่อไปในอนาคต

## วิธีการศึกษา

### การเก็บตัวอย่าง

สำรวจ และเก็บตัวอย่างดินรอบรากอ้อยจากแปลงเกษตรกรรมจำนวน 22 แปลง ในบริเวณ 3 อำเภอ 3 จังหวัด ได้แก่ อ.แก้งสนามนาง จ.นครราชสีมา อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี และ อ.เมืองขอนแก่น จ.ขอนแก่น การเก็บตัวอย่างดินปฏิบัติตามวิธีของโสภณ (2540) โดยกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างขนาด 9 ตารางเมตร ในแต่ละแปลงที่เก็บตัวอย่างดิน จากนั้นขุดดินรอบรากอ้อยที่ปลูกในพื้นที่ 9 ตารางเมตร สุ่มจำนวน 3 ต้นต่อแปลง แบ่งดินส่วนหนึ่งประมาณ 100 กรัม ใส่ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง แช่ในถังน้ำแข็ง เพื่อนำมาแยกแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ ดินอีกส่วนหนึ่งประมาณ 3 กิโลกรัม เก็บใส่ถุงพลาสติกแล้วนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของดิน ดังนี้ organic matter (OM) โดยวิธีของ Walkley and Black (1934) หาปริมาณ Total N โดยวิธี micro-

Kjeldahl method ของ Bremner (1960) ด้วยเครื่อง Flow Injection Analyzer วัด Available P โดยวิธี Bray II method Bray and Kurt (1945) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer วัด Exchangeable K, Ca, Na โดยวิธีสกัดด้วย 1N Ammonium acetate pH 7.0 extraction ของ Schollerger and Simon (1945)

**การแยกแบคทีเรีย PSB**

นำดินมาทำเจือจางแบบลดลงทีละสิบเท่า (10 fold serial dilution) ที่ระดับ $10^{-4}$ ถึง $10^{-6}$ แล้วนำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย PSB ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar ที่มี tricalcium phosphate เป็นองค์ประกอบ (Pikovskaya, 1948) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน แล้วตรวจสอบแบคทีเรีย PSB ซึ่งสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

**ทดสอบการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย PSB ในสภาพหลอดทดลอง (*in vitro*)**

ทดสอบการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย PSB ในสภาพหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยนำตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด มาเลี้ยงในอาหาร Pikovskaya's broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียที่เวลา 72 ชั่วโมง นำอาหารที่เชื้อเจริญไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสข้างบน (supernatant) มาตรวจหาปริมาณฟอสฟอรัสที่เชื้อปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาต่างๆ ด้วยวิธี Vanado molybdenum blue method (Murphy and Riley, 1985)

**การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย PSB โดยวิธีทางชีวโมเลกุล**

จำแนกชนิดแบคทีเรีย PSB จำนวน 4 ไอโซเลต ซึ่งมีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูง โดยการเพิ่มขยายลำดับ นิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนในบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียด้วยวิธี PCR และวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยหน่วยบริการ MU-OU: CRC คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยเครื่อง Automate DNA Sequencer (3100-Avant Genetic Analyzer, ABI) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GenBank โดยโปรแกรม BLAST analysis (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST/) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียตัวอื่นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียตัวอย่าง โดยโปรแกรม Clustal X2 คำนวณค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์โดย Kimura 2-parameter method (Kimura, 1980) และสร้างสายวงศ์วานวิวัฒนาการโดยวิธี neighbor-joining method (Jukes and Cantor, 1969) ด้วยโปรแกรม Philip-3.69 และตรวจดูสายวงศ์วานวิวัฒนาการในรูปแบบภาพด้วยโปรแกรม Tree view

**การทดสอบผลของแบคทีเรีย PSB ต่อการเจริญของอ้อยในสภาพเรือนทดลอง**

การทดลองในส่วนนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรีย PSB จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *B. megaterium* NR-KKU-5-3, *B. stratosphericus*, UT-KKU-10 *B. aryabhattai* UT-KKU-26, และ *B. altitudinis* KK-KKU-32 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูงสุด มาทดสอบผลของเชื้อแบคทีเรียต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) ประกอบด้วย 10 ตำรับการทดลอง 4 ซ้ำ ตำรับต่างๆ ประกอบด้วย 1) ตำรับการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ (ชุดควบคุม) 2) ตำรับการทดลองที่เติมเฉพาะหินฟอสเฟต (RP), 3-6) ตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อ PSB ทั้ง 4 ไอโซเลต และ 7-10) ตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อ PSB ทั้ง 4 ไอโซเลตร่วมกับการเติมหินฟอสเฟต โดยใช้อ้อยพันธุ์ K-92 ฆ่าเชื้อที่ผิวท่อนพันธุ์ด้วย 95% แอลกอฮอล์ แล้วตัดเป็นท่อนๆ ละ

1 ตา นำไปปลูกในถุงเพาะกล้า ที่บรรจุดินปลอดเชื้อ (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งค้างคืน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง) รดด้วยน้ำกรองทุกวัน เป็นเวลานาน 10 วัน แล้วคัดเลือกต้นอ้อยที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาใช้ในการทดลอง โดยย้ายไปปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ที่ใส่ดินปลอดเชื้อกระถางละ 10 กิโลกรัม รดด้วยน้ำกรองทุกวัน ปลูกทดลองเป็นเวลา 120 วัน และสำหรับตำรับการทดลองที่เติมปุ๋ยหินฟอสเฟต เตรียมโดยเติมหินฟอสเฟตที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 0.125 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 กรัมต่อกระถาง (ปริมาณฟอสฟอรัสของปุ๋ยรวม 0.125 กรัม) ลงในกระถาง และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน สำหรับการปลูกเชื้อแบคทีเรีย PSB ทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSB ในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ $10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร ปลูกแบคทีเรียลงบริเวณรากอ้อย ปริมาตร 5 มิลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาปลอดเชื้อในครั้งแรกที่ปลูกอ้อยในกระถาง และฉีดเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ ด้วยปริมาตรเท่าเดิม จนครบ 120 วัน

**การตรวจวัดผล**

ตรวจวัดการเจริญเติบโตของอ้อย โดยวัดส่วนสูง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ของลำต้นและราก โดยเก็บส่วนของลำต้น และรากของอ้อย ชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักสด แล้วใส่ถุงกระดาษ นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ประมาณ 5-7 วัน แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักแห้ง วิเคราะห์หาความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในลำต้นโดยใช้วิธี wet oxidation โดยกรดเปอร์คลอริค และกรดไนตริก และวัดความเข้มของสี Vanado molybdenum blue method (Murphy and Riley, 1985) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 nm

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

การวิเคราะห์ข้อมูลและทดสอบทางสถิติ ปฏิบัติด้วยโปรแกรม Statistix 8.0 โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่วัดได้ ทุกลักษณะที่ศึกษาตามแผนการทดลอง Randomized complete block design และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Gomez and Gomez, 1984)

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

ธาตุอาหารในดินรอบรากอ้อยที่ปลูกในแปลงเกษตรกรรมแหล่งต่างๆ พบว่าตัวอย่างดินจาก อ.แก้งสนามนาง จ.นครราชสีมา อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี และ อ.เมืองขอนแก่น จ.ขอนแก่น มี pH 7.32, 7.09 และ 6.07 ตามลำดับ และพบว่าตัวอย่างดินจาก อ.แก้งสนามนาง จ.นครราชสีมา และ อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี มีปริมาณอินทรียวัตถุ (OM), Total N, P, K และ Ca สูงกว่าตัวอย่างดินที่เก็บจาก อ.เมืองขอนแก่น จ.ขอนแก่น ส่วน Na มีปริมาณใกล้เคียงกัน (**Table 1**)

จากการทดลองสามารถแยกแบคทีเรีย PSB จากดินรอบรากอ้อยที่ปลูกในแปลงเกษตรกรรมได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลต (**Figure 2**) แล้วนำแบคทีเรียที่แยกได้นี้มาตรวจสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต UT-KKU-26 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด โดยพบปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ คือ 195.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ไอโซเลต NR-KKU-5-3, UT-KKU-10 และ KK-KKU-32 ซึ่งพบปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ คือ 178.90, 188.22 และ 189.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียไอโซเลตอื่นๆ อย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (**Figure 2**) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย PSB ทุกไอโซเลต ที่แยกได้จาก อ.แก้งสนามนาง จ.นครราชสีมา และ อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตได้สูงกว่า เชื้อ PSB ที่แยกได้จาก อ.เมืองขอนแก่น จ.ขอนแก่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นแบคทีเรียไอโซเลต KK-KKU 32 ที่มีความสามารถในการ

ย่อยสลายฟอสเฟตได้สูง (**Figure 2**) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Arvind et al. (2010) โดยกล่าวว่า แบคทีเรีย PSB ที่แยกได้จากดินในแปลงเกษตรที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูง จะมีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตได้มากกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ ซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณธาตุอาหารในดินจากแหล่งปลูกอ้อยใน (**Table 1**) พบว่าความอุดมสมบูรณ์ของดินไม่มีผลต่อจำนวนแบคทีเรีย PSB ที่แยกได้ กล่าวคือ ดินที่มีธาตุอาหารต่ำ ซึ่งเก็บจาก อ.เมืองขอนแก่น จ.ขอนแก่น สามารถแยกแบคทีเรีย PSB ได้มากกว่า ดินที่เก็บจาก อ.แก้งสนามนาง จ.นครราชสีมา และ อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี ซึ่งดินมีความสมบูรณ์สูงกว่า ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Chen et al. (2006) ซึ่งรายงานว่า ดินที่มีความสมบูรณ์สูง สามารถพบแบคทีเรีย PSB มากกว่าดินที่มีความสมบูรณ์ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า กิจกรรมการละลายของแบคทีเรีย PSB ที่แยกได้ไม่ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน

NJ tree (**Figure 1**) แสดงสายวงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรีย PSB ที่จำแนกชนิดโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในบริเวณ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* ทั้งหมด โดย Kloepper and Schroth (1978) รายงานว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตเป็นเชื้อที่อยู่ในสกุล *Pseudomonas, Azospirillum, Burkholderia* และ *Bacillus* จากรายงานของ Pérez-García et al. (2011) กล่าวว่าเชื้อในสกุล *Bacillus* หลายสปีชีส์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และมีศักยภาพในการนำไปใช้ในแปลงเกษตรกรรม โดยแบคทีเรียไอโซเลต NR-KKU-5-3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *B. megaterium* SMS3 (JN106416.1) มากที่สุด ด้วย 100 % similarity ส่วนเชื้อไอโซเลต UT-KKU-26 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *B. aryabhattai* MDSR11 (JN135237.1) มากที่สุด ด้วย 99 % similarity เชื้อไอโซเลต KK-KKU-32 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียในสกุล *B. altitudinis* DYJK5-5 (HQ843847.1) มากที่สุด ด้วย 100 % similarity เชื้อไอโซเลต UT-KKU-10 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *B. stratosphericus* GD65 (HQ857755.1) มากที่สุด ด้วย 100 % similarity

การคัดเลือกแบคทีเรีย PSB ที่มีประสิทธิภาพต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในกระถางในสภาพเรือนทดลอง พบว่าการปลูกเชื้อ PSB เพียงอย่างเดียว ไม่ทำให้อ้อยมีความสูงและปริมาณฟอสฟอรัสสูงกว่าอ้อยที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (ชุดควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในจำนวนตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อ PSB เพียงอย่างเดียวนี้ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต *B. stratosphericus* UT-KKU-10 ช่วยทำให้อ้อยมีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของลำต้น และราก สูงกว่าอ้อยชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (**Table 2 and 3**) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างตำรับการทดลองที่ปลูกแบคทีเรีย PSB เพียงอย่างเดียว และปลูกแบคทีเรีย PSB ร่วมกับการใส่ปุ๋ยหินฟอสเฟต (RP) นั้น พบว่าการปลูกแบคทีเรีย PSB ร่วมกับการใส่ปุ๋ย RP ทำให้อ้อยมีการเจริญในด้านต่างๆ สูงกว่าอ้อยชุดควบคุม (control) และสูงกว่าการปลูกแบคทีเรีย PSB เพียงอย่างเดียว โดยทำให้ความสูงของลำต้นอ้อย น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของต้นและราก และปริมาณฟอสฟอรัส สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (**Table 2 and 3**) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Babana and Antoun (2007) โดยทดลองปลูกแบคทีเรีย PSB ไอโซเลต B27 ร่วมกับการใส่ปุ๋ย Tilemsi phosphate rock ในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L. cv. Tetra) พบว่าทำให้ข้าวสาลีมีความสูงและน้ำหนักแห้งของลำต้นมากกว่าข้าวสาลีที่ใส่ปุ๋ย RP อย่างเดียว แต่น้ำหนักแห้งของรากไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ Rodríguez and Fraga (1999) ยังกล่าวว่าพืชที่ปลูกเชื้อแบคทีเรีย PSB จะสามารถเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากแบคทีเรีย PSB ช่วยละลายฟอสเฟตในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ให้ไปอยู่ในรูปที่ละลายน้ำ ทำให้พืชดูดไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ และพบว่าตำรับการทดลองที่ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *B. Aryabhattai* UT-KKU-26 + RP และ *B. megaterium* NR-KKU-5-3+ RP มีน้ำหนักสดของราก สูงกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับน้ำหนักแห้งของรากพบว่า การปลูก

เชื้อแบคทีเรีย *B. aryabhattai* UT-KKU-26 + RP, *B. altitudinis* KK-KKU-32 + RP และ *B. megaterium* NR-KKU-5-3+ RP ทำให้อ้อยมีน้ำหนักแห้งของรากสูงกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (**Table 2 and 3**) จากรายงานของ Kapulnik (1985); Baldani (1987) และ Sarig (1990) กล่าวว่า *Bacillus* spp. สามารถย่อยสลายฟอสเฟตและเพิ่มผลผลิตของถั่วลิสง มันฝรั่ง ข้าวฟ่าง และ ข้าวสาลี ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ตำรับการทดลอง *B. aryabhattai* UT-KKU-26 + RP ซึ่งเป็นเชื้อ PSB ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดทำให้ความสูง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ของต้นและราก และปริมาณฟอสฟอรัสสูงกว่าตำรับการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ (ชุดควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Khurram et al. (2011) โดยพบว่าเชื้อ *B. aryabhattai* KA1 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลี โดยทำให้น้ำหนักแห้งของลำต้นและราก และปริมาณฟอสฟอรัสของข้าวสาลีเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ Sol et al. (2011) รายงานว่าเชื้อ *B. aryabhattai* สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของลำต้น และรากของต้น *Xanthium italicum* LS9, LS11, LS12, และ LS15 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control)

**Table 1** The chemical properties of the soil collected from farmer's field of sugarcane plantation.

| Collected sample sites | pH | OM (%) | Total N (%) | P (mg/kg) | K (ppm) | Ca (ppm) | Na (ppm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kaeng Sanam Nang District Nakhonratchasima povince | 7.32 | 0.847 | 0.0463 | 157.09 | 51.81 | 1537 | 50.85 |
| Khonkaen District Khonkaen povince | 7.29 | 0.287 | 0.0183 | 78.67 | 32.38 | 279 | 48.29 |
| Kumphawapi District Udon povince | 6.07 | 0.971 | 0.0525 | 285.71 | 73.09 | 1123 | 45.30 |

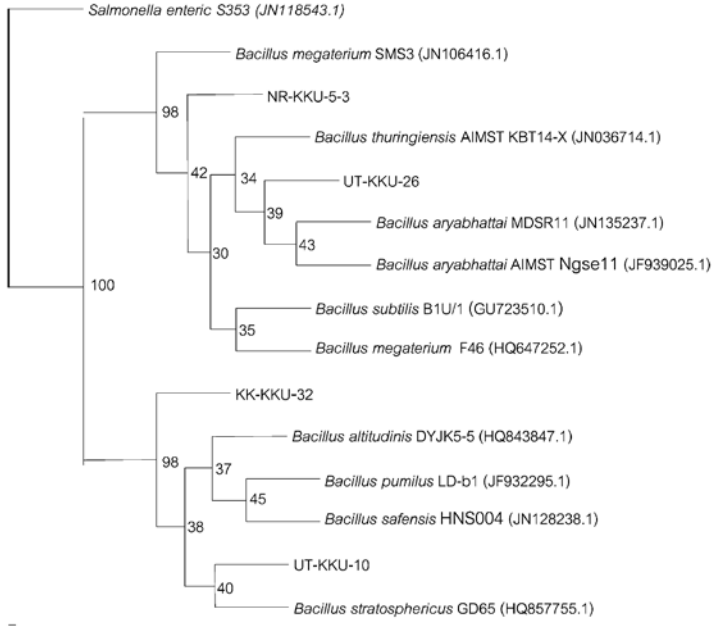


**Figure 1** Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequence available from GenBank (NCBI) (accession numbers are given in parentheses) was constructed. Distances (distance options according to the Kimura 2-parameter method) and clustering with the neighbor-joining method.

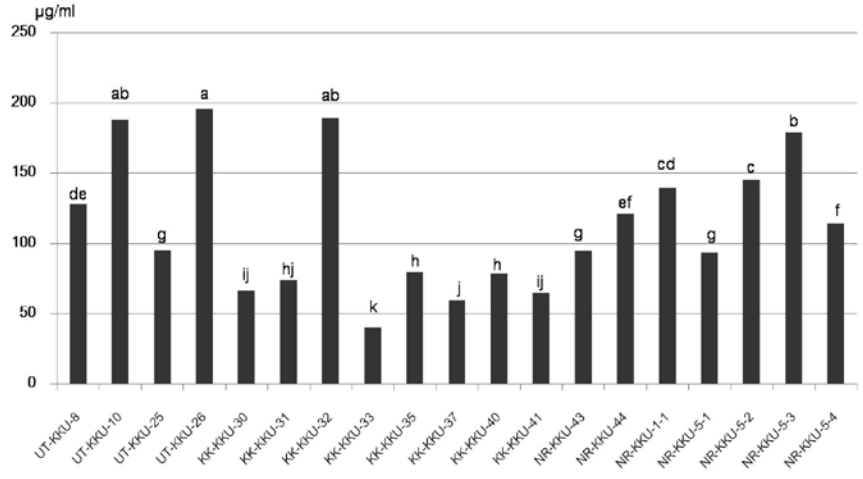


**Figure 2** Phosphate solubilizing activity (*in vitro*) from phosphate solubilizing bacteria isolated from rhizospheric soil of sugarcane.

**Table 2** Growth parameter and P accumulation in shoot of sugarcane inoculated with different PSB species.

| Treatments | Height (cm) | Shoot | | Root | | Total P (mg/100 g plant) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Fresh weight (g) | Dry weight (g) | Fresh weight (g) | Dry weight (g) | |
| Control | 43.93 $^{d}$ | 137.87 $^{e}$ | 26.71 $^{d}$ | 236.40 $^{b}$ | 43.02 $^{c}$ | 0.056 $^{de}$ |
| Rock Phosphate (RP) | 48.53 $^{cd}$ | 191.25 $^{bc}$ | 37.85 $^{b}$ | 285.60 $^{ab}$ | 58.61 $^{abc}$ | 0.062 $^{cd}$ |
| *B. stratosphericus* UT-KKU-10 | 45.03 $^{d}$ | 177.26 $^{cd}$ | 36.86 $^{bc}$ | 303.97 $^{a}$ | 62.22 $^{ab}$ | 0.057 $^{de}$ |
| *B. aryabhattai* UT-KKU-26 | 45.57 $^{d}$ | 153.09 $^{de}$ | 26.69 $^{d}$ | 308.64 $^{a}$ | 62.62 $^{ab}$ | 0.060 $^{cde}$ |
| *B. altitudinis* KK-KKU-32 | 47.47 $^{d}$ | 192.61 $^{bc}$ | 37.90 $^{b}$ | 259.87 $^{ab}$ | 49.36 $^{bc}$ | 0.054 $^{e}$ |
| *B. megaterium* NR-KKU-5-3 | 46.40 $^{d}$ | 148.48 $^{e}$ | 31.26 $^{cd}$ | 298.15 $^{a}$ | 60.90 $^{ab}$ | 0.062 $^{cd}$ |
| *B. stratosphericus* UT-KKU-10+RP | 54.97 $^{bc}$ | 208.28 $^{b}$ | 42.03 $^{ab}$ | 287.20 $^{ab}$ | 57.87 $^{abc}$ | 0.069 $^{ab}$ |
| *B. aryabhattai* UT-KKU-26+RP | 64.70 $^{a}$ | 240.15 $^{a}$ | 47.97 $^{a}$ | 317.24 $^{a}$ | 65.77 $^{ab}$ | 0.075 $^{a}$ |
| *B. altitudinis* KK-KKU-32+RP | 64.47 $^{a}$ | 206.66 $^{b}$ | 42.19 $^{ab}$ | 296.61 $^{ab}$ | 62.18 $^{ab}$ | 0.067 $^{bc}$ |
| *B. megaterium* NR-KKU-5-3+RP | 57.00 $^{b}$ | 206.63 $^{b}$ | 40.61 $^{b}$ | 318.37 $^{a}$ | 66.72 $^{a}$ | 0.071 $^{ab}$ |

Mean values sharing the same letter in the same column do not differ significantly at P<0.05, according to DMRT test

**Table 3** Analysis of variance (ANOVA)

| Sov | Df | Height (cm) | Shoot | | Root | | Total P (mg/100 g plant) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Fresh weight (g) | Dry weight (g) | Fresh weight (g) | Dry weight (g) | |
| Rep | 2 | 6.332 | 379.74 | 6.64 | 1294.33 | 51.241 | 3.233 |
| Tmt | 9 | 189.686$^{*}$ | 3078.55$^{*}$ | 144.121$^{*}$ | 1997.35 ns | 164.066 ns | 1.484$^{*}$ |
| Error | 18 | 16.399 | 199.31 | 13.446 | 1290.39 | 92.059 | 1.531 |
| Total | 29 | | | | | | |
| CV (%) | | 7.82 | 7.58 | 9.91 | 12.34 | 16.28 | 6.19 |

$^{*}$ = significant (at P<0.05) ns = non- significant

## สรุป

ดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงไม่มีผลต่อจำนวนของแบคทีเรีย PSB กิจกรรมการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่แยกจากดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ไม่แตกต่างจากเชื้อที่แยกได้จากดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ แบคทีเรีย PSB ที่มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูงอยู่ในสกุล *Bacillus* ได้แก่ *B. megaterium* NR-KKU-5-3, *B. aryabhattai* UT-KKU-26, *B. altitudinis* KK-KKU-32 และ *B. stratosphericus* UT-KKU-10 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย PSB ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยพบว่า เชื้อ *B. aryabhattai* UT-KKU-26 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย โดยต้องใช้เชื้อนี้ร่วมกับการใส่ปุ๋ยหินฟอสเฟต ซึ่งหากจะนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพจริงจำเป็นต้องทดสอบผลของเชื้อต่อพืชในสภาพแปลงทดลองต่อไป

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2553 และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

## เอกสารอ้างอิง

โสภณ บุญลือ.2540. ความสามารถในการอยู่รอดในดิน การเข้าอยู่อาศัยในรากข้าวโพดและถั่วลิสง และผลต่อการเจริญเติบโต ของข้าวโพดของเชื้อราเวสสิคูลา อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Arvind, K., B. Poonam, and R. Lal Chand. 2010. Isolation and molecular characterization of phosphate solubilizing *Enterobacter* and *Exiguobacterium* species from paddy fields of Eastern Uttar Pradesh, India. Afr. J. Microbiol. Res. 4(9):820-829

Babana, A. and H. Antoun. 2007. Biological system for improving the availability of Tilemsi phosphate rock for wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in Mali. Nurt. Cycl. Agroecosys. 72(2): 147-157.

Baldani, V.L.D., J.I. Baldani, and J. Döbereiner. 1987. Inoculation on field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. Biel. Fert. Soils. 4:37-40.

Bray, R.H. and N. Kurtz. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. Soil. Sci. 59: 39-45.

Bremner, J.M. 1960. Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. J. Agric. Sci. 55: 11-33.

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

Dey K.B. 1988. Phosphate solubilizing organisms in improving fertility status. In: Sen SP, Palit P, editors. Biofertilizers: Potentialities and Problems. Calcutta: Plant Physiology Forum, Naya Prokash. pp. 48-237.

Goldstein, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. Am. J. Altern. Agri. 1:51-7.

Gomez, K.A. and A.A. Gomez. 1984. Statistical procedures for agricultural research. John Wiley and Sons, New York.

Gyaneshwar, P., G.N. Kumar, L.J. Parekh and P.S. Poole. 2006. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant Soil. 245:83-93.

Hameeda, B., G.O.P. Harini, Rupela, S.P. Wani, and G. Reddy. 2008. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from compost and microfauna. Microbiol. Res. 163:234-242.

Jukes, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, pp. 121-132, In Munro, H.N. (ed), Mammalian protein metabolism, Academic Press, New York, N.Y., USA.

Kapulnik, J., R. Gafny and Y. Okon. 1985. Effect of *Azopirillum* spp. inoculation on root development and NO-3 uptake in wheat (*Titicum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. Can. J. Bot. 63:627-31.

Khurram, S.b., A. Muhammad, S. Baby, K. Azeem and A. Iftikhar. 2011. Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). Ann. Microbiol.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evo. 16: 111-120.

Kloepper, JW. and MN. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. P. 879-82. In: Station de Pathologievegetale et Phyto-bacteriologie, editor. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol II. Tours: Gilbert-Clary.

Murphy, J. and J.P. Riley. 1985. A single solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 37:9-14.

Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologiya 17:362-370.

Pérez-García, A., D.Romero, and A. de Vincente. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: bio-technological applications of Bacilli in agriculture. Curr. Opin. Biotechnol. 22: 187-193.

Richardson, A.E., 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. P. 50-62. In: Pankhurst CE, Doube BM, Grupta VVSR, Grace PR, editors. Soil Biota, Management in Sustainable Farming Systems. Melbourne, Australia: CSIRO.

Rodriguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Advances. 17:319-339.

Sarig, S., Y. Okon, and A. Blum. 1990. Promotion of leaf area development and field in Sorghum bicolor inoculated with *Azospirillum brasilense*. Symbiosis. 9:235-45.

Schollerger, C.J. and R.H. Simmon, 1945. Determinate of exchange capacity and exchangeable bases in soil- ammonium acetate method. Soil Sci. 59: 13-24

Sol, L., K. Jong-Ok, and S. Hong-Gyu. 2011. Growth Promotion of Xanthium italicum by Application of Rhizobacterial Isolates of Bacillus aryabhattai in Microcosm Soil. J. Microbiol. 50:45-49.

Walkley, A. and I.A. Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chronic acid titration method. Soil Sci. 37: 29-38.