

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

-----

1. แผนงานวิจัย : -

2. โครงการวิจัย : การใช้จุลินทรีย์ดินเพื่อลดการใส่ปุ๋ยเคมีและเพิ่มการดูดซับธาตุอาหารในการปลูกสับปะรด

3. ชื่อการทดลอง

(ภาษาไทย) : การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชในห้องปฏิบัติการ

(ภาษาอังกฤษ) : Selection of Phosphate and Potash Solubilizing Bacteria in Laboratory

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายสนธยา ขำดีบ สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นางสาวปราณี มั่นหมาย สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

### บทคัดย่อ

ดินในประเทศไทยส่วนใหญ่ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชต่ำ การใช้ปุ๋ยเคมีฟอสเฟตและโพแทชจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อทดแทนปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช อย่างไรก็ตามฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมบางส่วนจะสูญเสียไป หรืออยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ และสะสมในดิน ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนฟอสเฟตและโพแทชที่สะสมในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์แก่พืช จะทำให้พืชสามารถใช้ธาตุอาหารในพื้นที่เพาะปลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช ซึ่งเป็นพื้นฐานในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพ โดยคัดเลือกจากแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ได้จากการคัดแยกใหม่ของตัวอย่างดินรอบรากและรากสับปะรด ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 49 ไอโซเลท และแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่เก็บรวบรวมไว้ของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน จำนวน 6 ไอโซเลท ผลการทดลองพบว่า มีแบคทีเรียเพียง 5 ไอโซเลท ได้แก่ SM-P032 PaS2(1) PaS2(3) PaS2(5) และ PaS11(1) ที่มีความสามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช โดย PaS2(1) มีค่าดัชนีการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง Pikovskaya agar จากการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน สูงสุดเท่ากับ 2.8 รองลงมา คือ PaS2(5) PaS2(3) SM-P032 และ PaS11(1) มีค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 2.6 2.2 2.1 และ 1.4 ตามลำดับ การละลายโพแทช พบว่า PaS2(1) มีค่าดัชนีการละลายโพแทชบนอาหารแข็ง Aleksandrov agar จากการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน สูงสุดเท่ากับ 1.5 รองลงมา คือ PaS2(3) SM-P032 PaS2(5) และ PaS11(1) มีค่าดัชนีการละลายโพแทช เท่ากับ 1.2 1.2 1.1 และ 1.1 ตามลำดับ นอกจากนี้

ยังพบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถผลิตสาร indole-3-acetic acid (IAA) โดย SM-P032B ผลิต IAA สูงสุด เท่ากับ 192.60 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ PaS11(1) PaS2(1) PaS2(3) และ PaS2(5) ผลิต IAA เท่ากับ 68.73 21.70 18.46 และ 16.42 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท มาจัด จำแนกโดยเปรียบเทียบลำดับ 16s rDNA กับฐานข้อมูลบน GenBank ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดจำแนกแบคทีเรีย ได้ดังนี้ *Pantoea dispersa* SM-P032 *Burkholderia ferrariae* PaS2(1) *Burkholderia cepacia* PaS2(3) *Burkholderia territorii* PaS2(5) และ *Serratia marcescens* PaS11(1) โดย *Pantoea dispersa* SM-P032 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร เพาะเลี้ยง 7.0 ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร *Burkholderia ferrariae* PaS2(1) มีสภาวะที่เหมาะสม ต่อการเจริญ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 7.0 ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร *Burkholderia cepacia* PaS2(3) มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร เพาะเลี้ยง 5.5 ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร *Burkholderia territorii* PaS2(5) มีสภาวะที่เหมาะสมต่อ การเจริญ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 5.5 ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และ *Serratia marcescens* PaS11(1) มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร เพาะเลี้ยง 6.0 ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร จากการทดลองจะเห็นว่ามีเพียง *Burkholderia ferrariae* PaS2(1) และ *Burkholderia territorii* PaS2(5) ที่มีรายงานความสามารถในการเพิ่มความชื้นประโยชน์ของ ฟอสเฟตและโพแทชในดิน และไม่ก่อโรคในพืชและมนุษย์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียดังกล่าวมา พัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพต่อไปได้

### Abstract

This study aims to select and identify phosphate-potash solubilizing bacteria from pineapple rhizosphere and pineapple root that potentially develop as bio-fertilizer. Forty-nine isolates of phosphate solubilizing bacteria, collected from pineapple rhizosphere and pineapple root, were selected for phosphate-potash solubilizing bacteria. Five bacteria isolates capable of solubilizing phosphate and potash were SM-P032, PaS2(1), PaS2(3), PaS2(5) and PaS11(1). The phosphate solubilizing and potash solubilizing were tested on Pikovskaya agar and Alexandrov agar respectively. The PaS2(1) showed the highest phosphate solubility index (PSI) and potash solubility index (KSI). In addition, all of the isolates could produce indole-3-acetic acid (IAA). Based on 16S rRNA gene sequence morphology and biochemical analysis, SM-P032, PaS2(1), PaS2(3), PaS2(5) and PaS11(1) were identified as *Pantoea dispersa*, *Burkholderia ferrariae*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia territorii* and *Serratia marcescens* respectively. The optimum initial pH of *Pantoea dispersa* SM-P032, *Burkholderia ferrariae* PaS2(1), *Burkholderia cepacia* PaS2(3), *Burkholderia territorii* PaS2(5) and *Serratia marcescens* PaS11(1) growth were 7.0, 7.0,

5.5, 5.5 and 6.0 respectively. The optimum glucose concentrations were 10, 10, 20, 20 and 20 g/L respectively.

## 6. คำนำ

ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของพืช ซึ่งในประเทศไทย พบว่า ดินมีปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชต่ำ การใช้ปุ๋ยเคมีที่มีฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อทดแทนปริมาณฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชที่มีอยู่ในปริมาณน้อยในดิน อย่างไรก็ตามการใส่ปุ๋ยเคมีฟอสฟอรัส ให้กับพืช 75 - 90% ของฟอสฟอรัสจะทำปฏิกิริยากับไอออนของ  $Al^{3+}$  และ  $Fe^{3+}$  เป็นสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟต ได้แก่ อะลูมิเนียมฟอสเฟต และเฟอริกฟอสเฟต ในดินที่มีสภาพเป็นกรด และทำปฏิกิริยากับไอออนของ  $Ca^{2+}$  เป็นแคลเซียมฟอสเฟต ในดินที่มีสภาพเป็นด่าง (Cunningham and Kuiack 1992) ส่วนโพแทสเซียมจะสูญเสียไป หรืออยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้สะสมในดิน การใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียม ซึ่งมีความสามารถเปลี่ยนฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถใช้ประโยชน์ได้ ทำให้การใช้ประโยชน์ของธาตุอาหารพืชในพื้นที่เพาะปลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

**แบคทีเรียละลายฟอสเฟต** เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตโดยสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ (กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น) (Whitelaw, 2000; Maliha et al., 2004) และ/หรือ กรดอนินทรีย์ (กรดไนตริกและกรดซัลฟูริก) (Azam and Memon, 1996) ออกมาเพื่อละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตที่อยู่ในดิน เป็นฟอสฟอรัสที่ละลายอยู่ในสารละลายดินในรูปโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน ( $HPO_4^{2-}$ ) และไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน ( $H_2PO_4^-$ ) (Frossard et al., 1995) ซึ่งโดยทั่วไป ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Serratia* และ *Micrococcus* เป็นต้น (Son et al., 2006) ในประเทศไทยได้มีการศึกษาการนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมาใช้ร่วมกับการปลูกพืชเพื่อช่วยให้พืชสามารถใช้ฟอสเฟตได้อย่างมีประสิทธิภาพ และลดต้นทุนจากการใช้ปุ๋ยเคมีฟอสเฟต จากการศึกษาของ ไตรธานี และคณะ (2555) ทดลองใช้แบคทีเรียที่มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูงต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพเรือนทดลอง พบว่า การใช้แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ร่วมกับการใส่ปุ๋ยหินฟอสเฟต ทำให้อ้อยมีการเจริญเติบโตในทุกด้าน และการสะสมธาตุฟอสฟอรัสในลำต้นสูงกว่าอ้อยชุดควบคุม และเกตน์ธนิภา สมมาตร (2557) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการละลายฟอสเฟต นำไปศึกษาผลของแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ กข 47 พบว่า ข้าวมีการเจริญเติบโตทั้งในด้านความสูง จำนวนใบ ความยาวของราก และน้ำหนักแห้งของลำต้น ซึ่งข้าวที่ปลูกในดินที่มีการเติมเชื้อ *Burkholderia* sp. และตรึงบนขี้เถ้าแกลบมีการเจริญเติบโตมากที่สุด นอกจากนี้ จีราภรณ์ และคณะ (2556) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ภายใต้การผลิตลำไยอินทรีย์ในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน ในพื้นที่ของเกษตรกรที่เป็นสมาชิกของกลุ่มลำไยอินทรีย์จากอำเภอดอยสะเก็ด และอำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการใช้

เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับหินฟอสเฟตในเขตอำเภอดอยสะเก็ด และการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟอสเฟตส่งผลทำให้ความหวานของลำไยสูงสุด

**แบคทีเรียละลายโพแทช** เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถ K-minerals เช่น mica illite และ orthoclase ในดินโดยการผลิตและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ หรือการผลิต capsular polysaccharide (Friedrich et al., 1991; Sheng and He, 2006) ซึ่งโดยทั่วไป ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล Pseudomonas, Burkholderia, Acidothiobacillus, Bacillus และ Paenibacillus (Lian et al., 2002; Sheng, 2005; Li et al., 2006; Liu et al., 2012)

ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชมีการศึกษาไม่มากนัก โดยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาของต่างประเทศ ซึ่งเป็นการคัดแยกจุลินทรีย์ และทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างของการศึกษา เช่น Hu et al. (2006) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากดินบนภูเขาเทียนมู มณฑลเจ้อเจียง ประเทศจีน ซึ่งจากการทดลองสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชสูง 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus mucilaginosus* KNP413 และ *B. mucilaginosus* KNP414 Diep และ Hieu (2013) ทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากดินภูเขาฮาเทียน (Ha Tien Mountain) จังหวัดเกียนยาง (Kien Giang Province) ประเทศเวียดนาม ซึ่งสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท และพบว่ามีเพียง 7 ไอโซเลท ที่มีความสามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชได้สูง (>10 mg/L P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> และ >50 mg/L K<sub>2</sub>O) ซึ่งผลการจัดจำแนกจุลินทรีย์ทั้ง 7 ไอโซเลท คือ *Microbacterium hominis* DNV16, *Flectobacillus* sp. TC1D, *Agrobacterium tumefaciens* CH9E, *B. cereus* TC1A, *B. cereus* CH7A, *B. subtilis* TD6B และ *B. megaterium* CH7D

ดังนั้นการศึกษการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช จึงเป็นการสร้างองค์ความรู้ที่สำคัญต่อการพัฒนาต่อยอดให้อยู่ในรูปปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพในปัจจุบันที่มีความสามารถละลายฟอสเฟตเพียงอย่างเดียว

## 7. วิธีดำเนินการ

### - สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ pikovskaya broth pikovskaya agar aleksandrow agar nutrient broth nutrient agar และ minimal medium
2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต และ Indole-3-acetic acid
3. สารเคมีสำหรับงานอณูชีววิทยา ได้แก่ สีย้อมดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอไพรมเมอร์ อาการ์โรส TAE buffer TIANamp bacteria DNA kit One PCR ultra mastermix และ PureLink quick PCR purification kit
4. ชุดทดสอบการติดสีแกรม
5. ชุดทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย
6. วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ได้แก่ จานเพาะเลี้ยง หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ หลอดทดลอง ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ แผ่นสไลด์ ลูบเขียนเชื้อ หลอดพีซีอาร์ กรวยกรอง กระดาษกรอง และไมโครปิเปตต์ทิป

7. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งสาร หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง เครื่องบ่มเขย่า ตู้ปลอดเชื้อ สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เครื่องปั่นเหวี่ยง กล้องจุลทรรศน์ เครื่องเทอโมไซเคิล เครื่องเจลีเล็กโทรโพรีซิส และไมโครปิเปตต์

#### - วิธีการ

##### 1. การเก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกสับปะรดจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ (ตารางที่ 1) ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร บริเวณรอบ ๆ ราก จำนวน 21 ตัวอย่าง และตัวอย่างรากสับปะรด จำนวน 21 ตัวอย่าง ใส่ในถุงพลาสติกขนส่งมายังห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา เพื่อคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (enrichment technique) โดยใช้ตัวอย่างดินหรือรากสับปะรด 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร pikovskaya broth (Pikovskaya, 1948) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางมาคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร pikovskaya agar (Pikovskaya, 1948) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีที่สร้างโซนใสรอบ ๆ และมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหาร nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

##### 2. การคัดเลือกแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช

นำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่เก็บรวบรวมไว้ของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน จำนวน 6 ไอโซเลท (คัดแยกจากดินในพื้นที่ปลูกสับปะรดจังหวัดตราด) และที่ได้จากการคัดแยกใหม่ จำนวน 49 ไอโซเลท และแบคทีเรียละลายฟอสเฟต มาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตและโพแทช โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทในอาหาร nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางความเข้มข้นของเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.95 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าการกระเจิงแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 แล้วจุดตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวอาหาร pikovskaya agar (Pikovskaya, 1948) เพื่อทดสอบการละลายฟอสเฟต และอาหาร aleksandrow agar (Aleksandrov et al., 1967) เพื่อทดสอบการละลายโพแทช บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและโซนใส เพื่อคำนวณค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization index) และค่าดัชนีการละลายโพแทช (potash solubilization index) ตามสมการ (1) (Setargie et al., 2015)

$$\text{ดัชนีการละลายฟอสเฟตหรือโพแทช} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี} + \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}} \quad (1)$$

##### 3. การทดสอบการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) ของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช

การวิเคราะห์ปริมาณของ IAA ดำเนินการตามวิธีของ Mamta et al. (2010) โดยนำแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหาร minimal medium ที่มี L-tryptophan ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Kubota 7000, Kubota Corp., Osaka, Japan) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเพาะเลี้ยง ดูดสารละลายส่วนใสโดยใช้ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Salkowski's reagent 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน indole-3-acetic acid ที่มีความเข้มข้น 0 - 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 4. การจัดจำแนกแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชในอาหาร nutrient broth ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Kubota 7000, Kubota Corp., Osaka, Japan) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเพาะเลี้ยง เติสารละลายส่วนใสทั้ง นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอด้วย TIANamp Bacteria DNA Kit (Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd., Beijing, China) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย โดยใช้สารเคมีผสม One PCR ultra (GeneDireX Inc., Taiwan) และ universal primer ได้แก่ 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') เป็น forward primer และ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') เป็น reverse primer ดำเนินการในเครื่องเทอร์โมไซเคิล โดยมีสภาวะในการทำงาน ดังนี้ (1) pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (2) denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที (3) annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดำเนินการซ้ำในขั้นตอนที่ (2) - (4) จำนวน 30 รอบ (5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ PureLink Quick PCR Purification kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Baltics, UAB) ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenkBank บนเว็บไซต์ของ NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีการ multiple sequences alignment กับตัวอย่างอ้างอิงจากฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม ClustalX2 สร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในรูปแบบแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood การทำ bootstrapping เท่ากับ 1,000 ซ้ำ (Felsenstein, 1985)

#### 5. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

การศึกษาทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช เริ่มต้นโดยนำแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหาร nutrient agar

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเปียเชื้อตะแคงโคโลนีแบคทีเรีย จากนั้นเสมียร์ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมสีแกรมด้วยสีย้อมแกรม (K001-1KT, Hi Media, Mumbai, India) ตามวิธีการ Hucker method (Doetsch, 1981) นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX43, Olympus, Tokyo, Japan) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อตรวจสอบการติดสีแกรมและลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย ส่วนการศึกษาทางชีวเคมีของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช ได้แก่ ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ความสามารถในการใช้ไลซีน (lysine utilization) ออร์นิทีน (ornithine utilization) กรดซิตริก (citrate utilization) และกรดมาโลนิค (malonate utilization) การสร้างเอนไซม์ oxidase และ urease การย่อยเอสคูลิน (esculin hydrolysis) การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H<sub>2</sub>S production) และความสามารถในกระบวนการไนเตรตรีดักชัน (nitrate reduction) ด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี (KB003™ Hi25 Enterobacteriaceae Identification Kit, Hi Media, Mumbai, India) ดำเนินการตามวิธีการของชุดทดสอบ

#### 6. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช โดยแปรผันความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง (4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0) และความเข้มข้นของน้ำตาล (10 15 20 25 30 35 และ 40 กรัมต่อลิตร) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องบ่มเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างตรวจนับปริมาณแบคทีเรียด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร nutrient agar และวัดค่าการกระเจิงแสง (optical density; OD) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกผลการเจริญของแบคทีเรีย ณ วันที่ 0 1 2 3 4 และ 5 วัน ของการเพาะเลี้ยง

#### - เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง : ตุลาคม 2560 – กันยายน พ.ศ. 2561

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. คัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

จากการนำตัวอย่างดิน และรากสับประรดในพื้นที่ จ.เพชรบุรี และ จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 42 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) มาคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ก่อนนำไป spread บนอาหาร pikovskaya agar และเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้ทั้งหมด 49 ไอโซเลท ซึ่งมาจากตัวอย่างดิน จำนวน 31 ไอโซเลท ได้แก่ จากตัวอย่างดิน ต.สามพระยา อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี จำนวน 4 ไอโซเลท

จากตัวอย่างดิน ต.หินเหล็กไฟ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 5 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน ต.ทับใต้ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 5 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน ต.วังก้ง อ.ปราณบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 1 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน ต.สามกระบะทราย อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 12 ไอโซเลท และจากตัวอย่างดิน ต.หาดขาม อ.กุยบุรี จำนวน 4 ไอโซเลท และมาจากตัวอย่างรากสับปะรด จำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ จากตัวอย่างรากสับปะรด ต.สามพระยา อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี จำนวน 3 ไอโซเลท จากตัวอย่างรากสับปะรด ต.หินเหล็กไฟ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 4 ไอโซเลท จากตัวอย่างรากสับปะรด ต.ทับใต้ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 3 ไอโซเลท จากตัวอย่างรากสับปะรด ต.วังก้ง อ.ปราณบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 2 ไอโซเลท จากตัวอย่างรากสับปะรด ต.สามกระบะทราย อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 4 ไอโซเลท และจากตัวอย่างรากสับปะรด ต.หาดขาม อ.กุยบุรี จำนวน 2 ไอโซเลท

**ตารางที่ 1** แบบที่เรียลละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากดินและรากสับปะรดในพื้นที่ปลูกสับปะรด จ.เพชรบุรี และ จ.ประจวบคีรีขันธ์

สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	แบบที่เรียลละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้
แปลงสับปะรด ต.สามพระยา อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี	ตัวอย่างดิน 2 ตัวอย่าง	PaS2(1) PaS2(3) PaS2(4) และ PaS2(5)
	ตัวอย่างราก 2 ตัวอย่าง	PaR2(1) PaR2(2) และ PaR2(3)
แปลงสับปะรด ต.หินเหล็กไฟ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	ตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง	PaS3(2) PaS3(3) PaS4(2) PaS5(2) และ PaS5(3)
	ตัวอย่างราก 3 ตัวอย่าง	PaR3(1) PaR3(2) PaR5(1) และ PaR5(2)
แปลงสับปะรด ต.ทับใต้ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	ตัวอย่างดิน 4 ตัวอย่าง	PaS6(1) PaS6(2) PaS6(3) PaS6(4) และ PaS21(1)
	ตัวอย่างราก 4 ตัวอย่าง	PaR6(1) PaR6(2) และ PaR6(3)
แปลงสับปะรด ต.วังก้ง อ.ปราณบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์	ตัวอย่างดิน 1 ตัวอย่าง	PaS7(2)
	ตัวอย่างราก 1 ตัวอย่าง	PaR7(1) และ PaR7(2)
แปลงสับปะรด ต.สามกระบะทราย อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์	ตัวอย่างดิน 8 ตัวอย่าง	PaS9(1) PaS9(2) PaS9(6) PaS11(1) PaS12(1) PaS12(2) PaS12(3) PaS13(1) PaS13(2) PaS13(3) PaS14(1) และ PaS14(2)
	ตัวอย่างราก 8 ตัวอย่าง	PaR12(1) PaR12(2) PaR15(1) และ PaR15(2)
แปลงสับปะรด ต.หาดขาม อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์	ตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง	PaS18(1) PaS18(2) PaS18(3) และ PaS18(4)
	ตัวอย่างราก 3 ตัวอย่าง	PaR17(1) และ PaR18(1)

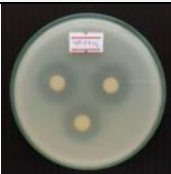
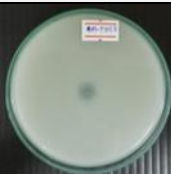








## 2. คัดเลือกแบบที่เรียลละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช

จากแบบที่เรียลละลายฟอสเฟตที่นำมาทดสอบ จำนวน 54 ไอโซเลท ได้แก่ แบบที่เรียลละลายฟอสเฟตจากการเก็บรวบรวมโดยกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน จำนวน 6 ไอโซเลท (SM-P027 SM-P028 SM-P029 SM-P030 SM-P031 และ SM-P032) และแบบที่เรียลละลายฟอสเฟตที่คัดแยกใหม่ จำนวน 49 ไอโซเลท พบว่ามีแบบที่เรียลละลายฟอสเฟตเพียง 5 ไอโซเลท ที่สามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชได้ คือ SM-P032 PaS2(1) PaS2(3) PaS2(5) และ PaS11(1) โดย PaS2(1) มีความสามารถละลายฟอสเฟตสูงสุด มีค่าดัชนีการละลายฟอสเฟตบน



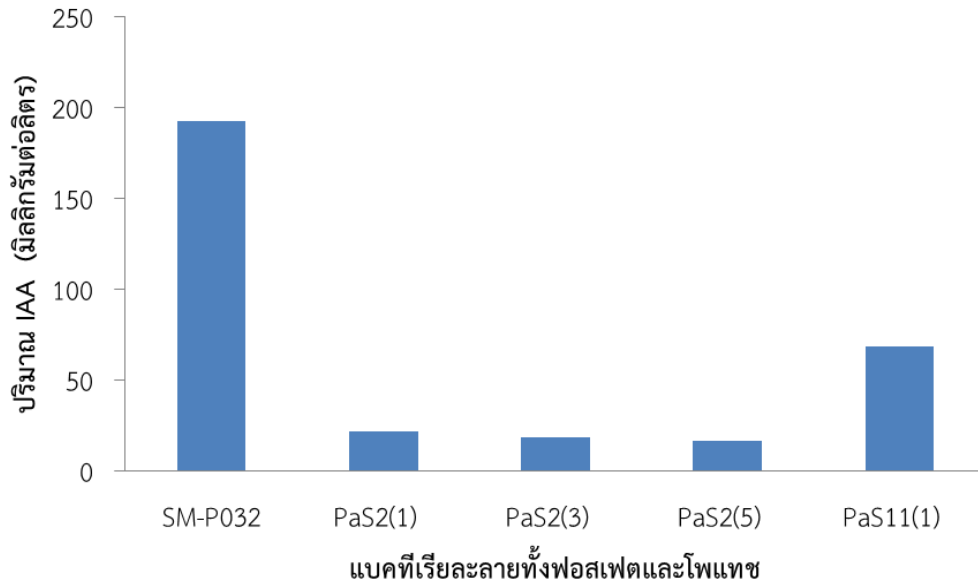
อาหาร pikovskaya agar จากการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เท่ากับ 2.8 รองลงมา คือ PaS2(5) PaS2(3) SM-P032 และ PaS11(1) มีค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 2.6 2.2 2.1 และ 1.4 ตามลำดับ การละลายโพแทช พบว่า PaS2(1) มีความสามารถละลายโพแทชสูงสุด มีค่าดัชนีการละลายโพแทชบนอาหาร aleksandrov agar จากการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เท่ากับ 1.5 รองลงมา คือ PaS2(3) SM-P032 PaS2(5) และ PaS11(1) มีค่าดัชนีการละลายโพแทช เท่ากับ 1.2 1.2 1.1 และ 1.1 ตามลำดับ

**ตารางที่ 2** ความสามารถละลายฟอสเฟตและโพแทชของแบคทีเรียบนอาหาร pikovskaya agar และ aleksandrov agar

ไอโซเลท	การละลายฟอสเฟต		การละลายโพแทช	
SM-P032		ค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 2.1		ค่าดัชนีการละลายโพแทช เท่ากับ 1.2
PaS2(1)		ค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 2.8		ค่าดัชนีการละลายโพแทช เท่ากับ 1.5
PaS2(3)		ค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 2.2		ค่าดัชนีการละลายโพแทช เท่ากับ 1.2
PaS2(5)		ค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 2.6		ค่าดัชนีการละลายโพแทช เท่ากับ 1.1
PaS11(1)		ค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 1.4		ค่าดัชนีการละลายโพแทช เท่ากับ 1.1

### 3. การทดสอบการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) ของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช

ศึกษาการผลิตสาร IAA ของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชที่คัดเลือกได้ พบว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถผลิตสาร IAA ได้ โดย SM-P032 ผลิต IAA สูงสุด เท่ากับ 192.60 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ PaS11(1) PaS2(1) PaS2(3) และ PaS2(5) ผลิต IAA เท่ากับ 68.73 21.70 18.46 และ 16.42 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4 ปริมาณ IAA ที่ผลิตได้ของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชแต่ละไอโซเลท

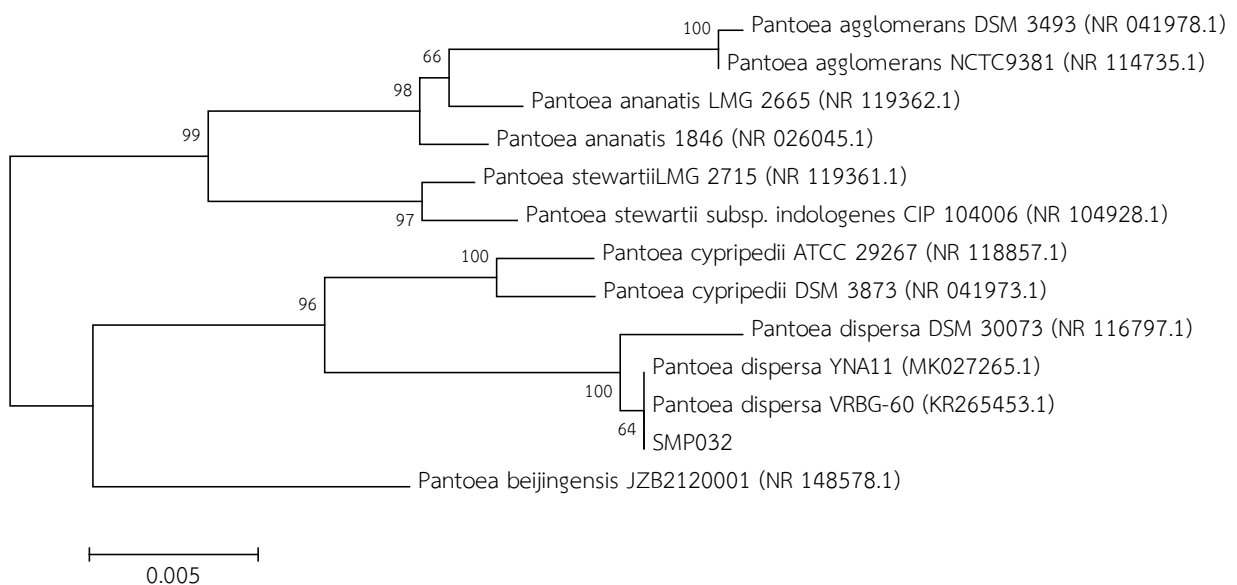
#### 4. การจัดจำแนกแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช

การจัดจำแนกแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลาร์ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีขนาด 1,401 - 1,429 นิวคลีโอไทด์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTn search ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SM-P032 (1,408 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Pantoea dispersa* VRBG-60 (KR265453.1) 99.72 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PaS2(1) (1,435 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Burkholderia ferrariae* NBRC 106233 (AB537487.1) 99.44 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PaS2(3) (1,408 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Burkholderia cepacia* NBRC 14074 (NR\_113645.1) 99.40 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PaS2(5) (1,401 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Burkholderia territorii* LMG 28158 (NR\_136496.1) 99.71 เปอร์เซ็นต์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PaS11(1) (1,408 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Serratia marcescens* NBRC 102204 (NR\_114043.1) 99.50 เปอร์เซ็นต์

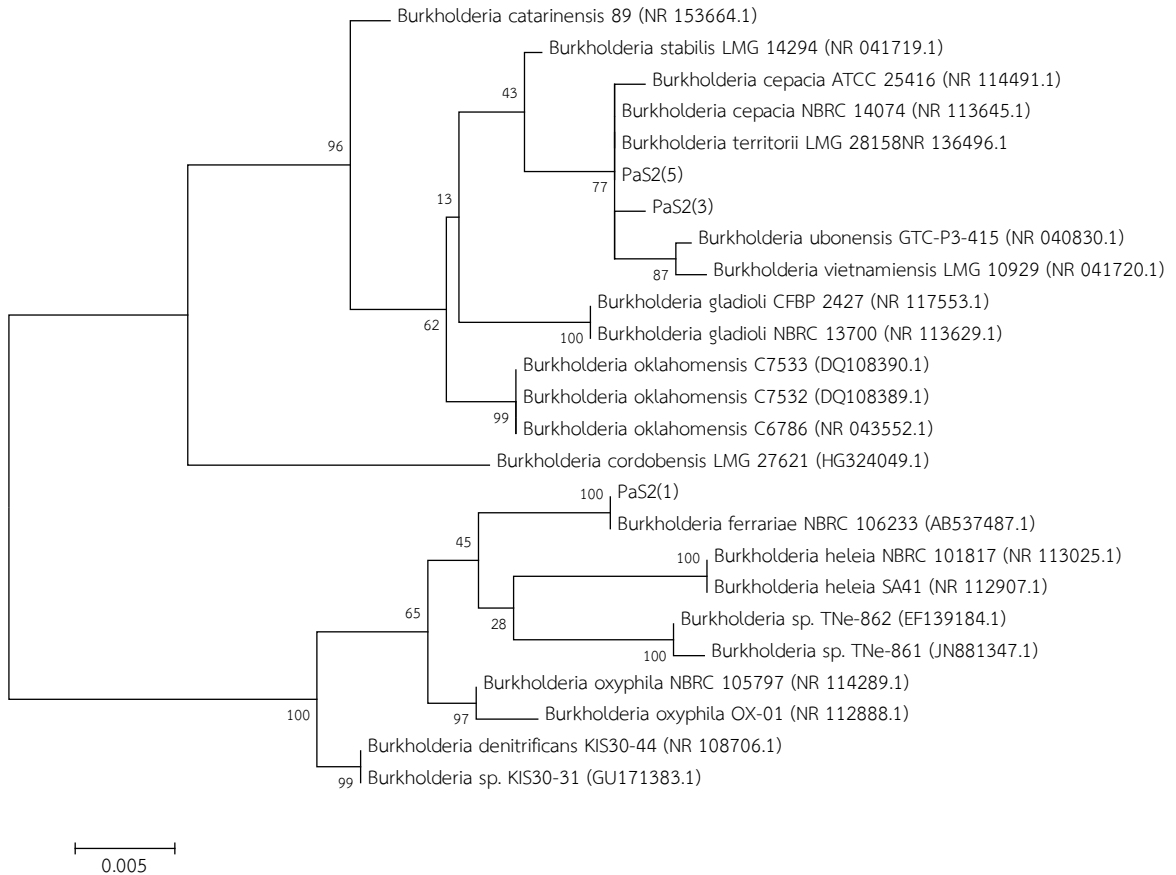
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank โดยวิธีการ multiple sequences alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX2 และสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในรูปแบบแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood การทำ bootstrapping เท่ากับ 1,000 ซ้ำ พบว่า SM-P032 มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับ *Pantoea dispersa* ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นในสกุล *Pantoea* (ภาพที่ 1) PaS2(1) PaS2(3) และ PaS2(5) มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับ *Burkholderia ferrariae* *Burkholderia cepacia* และ *Burkholderia territorii* ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นในสกุล *Burkholderia* (ภาพที่ 2) PaS11(1) มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับ *Serratia marcescens* ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นในสกุล *Serratia* (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชที่คัดเลือกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank

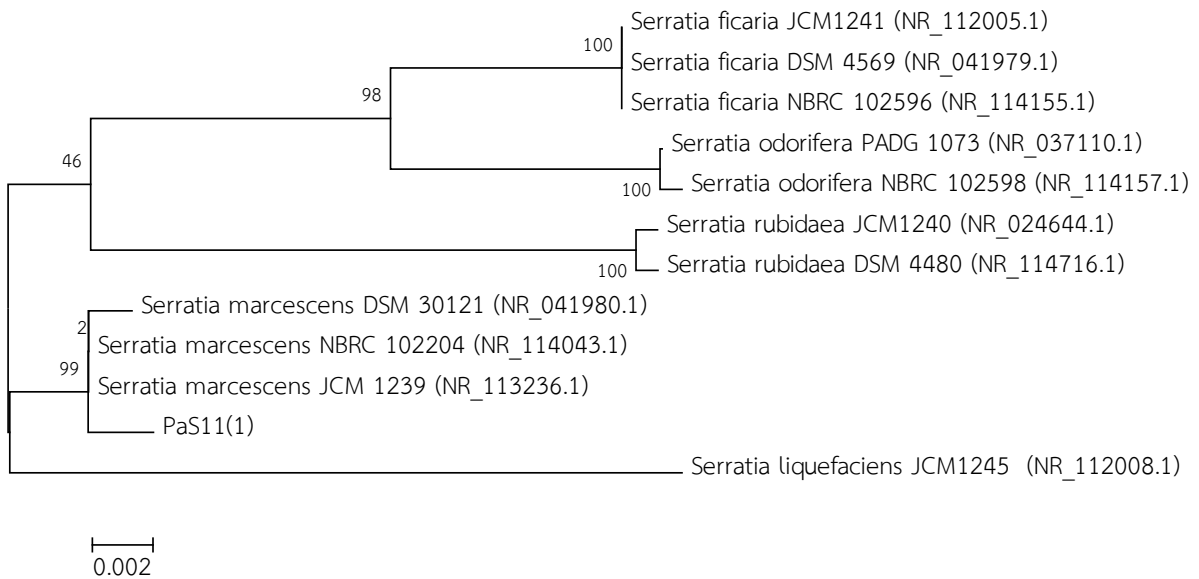
แบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช		ผลเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank		
ไอโซเลท	ขนาดดีเอ็นเอ (นิวคลีโอไทด์)	ความเหมือน (%)	ชนิดแบคทีเรีย	Accession No.
SM-P032	1,408	99.72	<i>Pantoea dispersa</i> VRBG-60	KR265453.1
PaS2(1)	1,429	99.44	<i>Burkholderia ferrariae</i> NBRC 106233	AB537487.1
PaS2(3)	1,408	99.40	<i>Burkholderia cepacia</i> NBRC 14074	NR_113645.1
PaS2(5)	1,401	99.71	<i>Burkholderia territorii</i> LMG 28158	NR_136496.1
PaS11(1)	1,408	99.50	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204	NR_114043.1



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic trees) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SM-P032 และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในสกุล *Pantoea* จากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood การทำ bootstrapping เท่ากับ 1,000 ซ้ำ



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic trees) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PaS2(1) PaS2(3) PaS2(5) และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในสกุล *Burkholderia* จากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood การทำ bootstrapping เท่ากับ 1,000 ซ้ำ

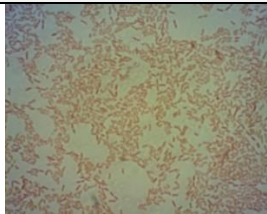
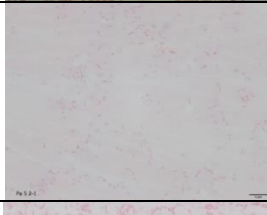
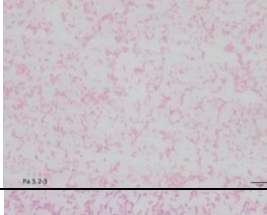




**ภาพที่ 3** ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic trees) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PaS11(1) และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในสกุล *Serratia* จากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood การทำ bootstrapping เท่ากับ 1,000 ซ้ำ

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยการย้อมสีแบคทีเรียด้วยคริสตอลไวโอเล็ต (Crystal violet) และซาฟรานิน (Safranin) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามการติดสีแกรม และลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากติดสีแดงของ safranin โดย SM-P032 PaS2(1) PaS2(3) และ PaS2(5) มีรูปร่างเป็นท่อนยาว ส่วน PaS11(1) มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4** การติดสีแกรมของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช	รูปร่าง และการติดสีแกรม	
<i>Pantoea dispersa</i> SM-P032		รูปร่าง : เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนยาว การติดสีแกรม : ติดสีแดงของ safranin
<i>Burkholderia ferrariae</i> PaS2(1)		รูปร่าง : เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนยาว การติดสีแกรม : ติดสีแดงของ safranin
<i>Burkholderia cepacia</i> PaS2(3)		รูปร่าง : เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนยาว การติดสีแกรม : ติดสีแดงของ safranin
<i>Burkholderia territorii</i> PaS2(5)		รูปร่าง : เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนยาว การติดสีแกรม : ติดสีแดงของ safranin
<i>Serratia marcescens</i> PaS11(1)		รูปร่าง : เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน การติดสีแกรม : ติดสีแดงของ safranin

การศึกษาทางชีวเคมีของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งจะพบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถใช้น้ำตาลแซ็กคาโรส และ กลูโคส ในการเจริญได้ แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลเมลลิโบไอสได้ นอกจากนั้นยังพบว่า SM-P032 PaS2(1) PaS2(3) และ PaS2(5) สามารถใช้น้ำตาล pentose ได้แก่ น้ำตาลอะราบิโนส และไซโลสได้ แรมโนส มีเพียง SM-P032 ที่สามารถใช้ได้ น้ำตาลเซลโลไบโอส มีเพียง PaS2(1) และ PaS2(3) ที่สามารถใช้ได้ น้ำตาลราฟิโนส มีเพียง PaS11(1) ที่สามารถใช้ได้ น้ำตาลทรีฮาโลส มีเพียง SM-P032 และ PaS11(1) ที่สามารถใช้ได้ และน้ำตาลแลคโตสมี PaS2(3) และ PaS2(5) ที่สามารถใช้ได้ ส่วนความสามารถทางชีวเคมีอื่น ๆ ของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชที่คัดเลือกได้ พบว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถการสร้างเอนไซม์ urease มีกิจกรรมของกระบวนการไนเตรตรีดักชัน (nitrate reduction) และสามารถกรดซิตริก (citrate utilization) ได้ แต่ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H<sub>2</sub>S production) โดยแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบว่า PaS2(1) PaS2(3) และ PaS2(5) สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase แต่มีเพียง PaS2(3) และ PaS2(5) ที่สามารถใช้กรดมาโลนิค (malonate utilization) ส่วนการย่อยเอสคูลิน (esculin hydrolysis) และใช้ออร์นิทีน (ornithine utilization) พบเพียง PaS11(1) ที่มีความสามารถดังกล่าว และมีเพียง SM-P032 ที่สามารถใช้ไลซีน (lysine utilization)

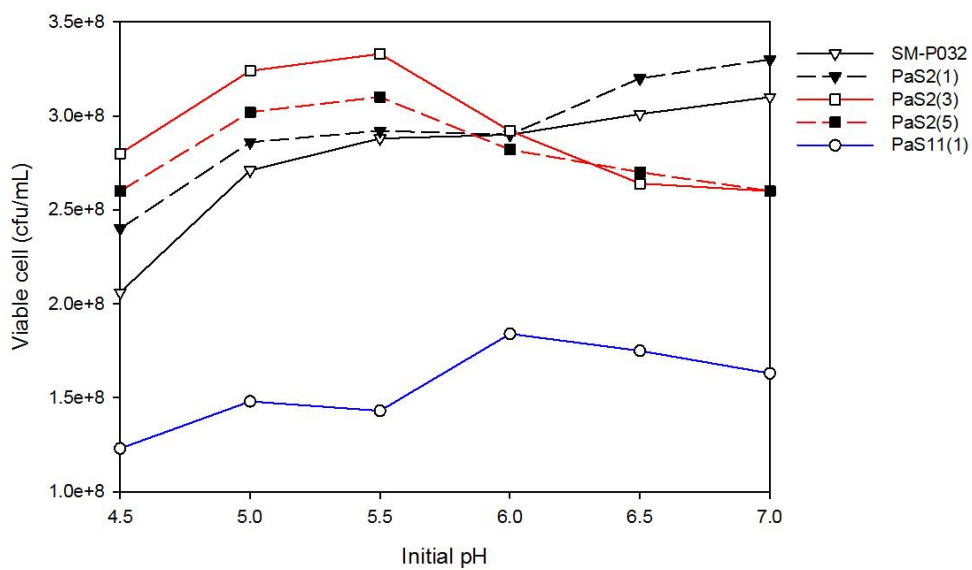
**ตารางที่ 5** แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช

คุณสมบัติทางชีวเคมี	SM-P032	PaS2(1)	PaS2(3)	PaS2(5)	PaS11(1)
อะราบิโนส (arabinose)	+	+	+	+	-
ไซโลส (xylose)	+	+	+	+	-
แรมโนส (rhamnose)	+	-	-	-	-
เซลโลไบโอส (cellobiose)	-	+	+	-	-
เมลลิโบไอส (melibiose)	-	-	-	-	-
แซ็กคาโรส (saccharose)	+	+	+	+	+
ราฟิโนส (raffinose)	-	-	-	-	+
ทรีฮาโลส (trehalose)	+	-	-	-	+
กลูโคส (glucose)	+	+	+	+	+
แลคโตส (lactose)	-	-	+	+	-
Esculin hydrolysis	-	-	-	-	+
Oxidase	-	+	+	+	-
Lysine utilization	-	+	+	+	+
Ornithine utilization	-	-	-	-	+
Urease	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+

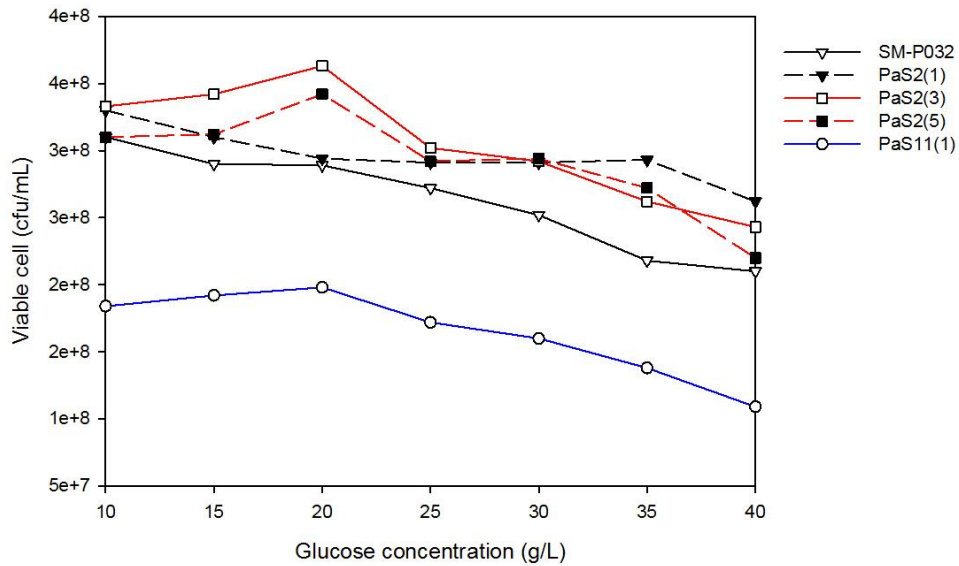
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-
Citrate utilization	+	+	+	+	+
Malonate utilization	-	-	+	+	-

## 6. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต โดยทำการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ SM-P032 คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 7.0 ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร PaS2(1) คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 7.0 ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร PaS2(3) คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 5.5 ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร PaS2(5) คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 5.5 ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และ PaS11(1) คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 6.0 ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียทั้งละลายฟอสเฟตและโพแทชที่คัดเลือกได้ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 4.5 - 7.0



ภาพที่ 6 ปริมาณแบคทีเรียทั้งละลายฟอสเฟตและโพแทชที่คัดเลือกได้ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของแต่ละไอโซเลท แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 – 40 กรัมต่อลิตร

## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การคัดเลือกแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชจากแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่เก็บรวบรวมไว้ของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน และที่ได้จากการคัดแยกใหม่จากตัวอย่างดิน และรากสับปะรดในพื้นที่ปลูกสับปะรดจังหวัดเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ สามารถคัดเลือก สามารถคัดเลือกแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชได้ 5 ไอโซเลท คือ *Pantoea dispersa* SM-P032 *Burkholderia ferrariae* PaS2(1) *Burkholderia cepacia* PaS2(3) *Burkholderia territorii* PaS2(5) และ *Serratia marcescens* PaS11(1) โดย *Pantoea dispersa* SM-P032

2. จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 7.0 ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Pantoea dispersa* SM-P032 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 7.0 ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Burkholderia ferrariae* PaS2(1) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 5.5 ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Burkholderia cepacia* PaS2(3) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 5.5 ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Burkholderia territorii* PaS2(5) และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 6.0 ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Serratia marcescens* PaS11(1)

3. จากการศึกษา พบว่า มีแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช 3 ไอโซเลท ได้แก่ *Pantoea dispersa* SM-P032 *Burkholderia cepacia* PaS2(3) และ *Serratia marcescens* PaS11(1) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ



โรคที่มีความเสี่ยงปานกลางหรืออันตรายปานกลาง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 ดังนั้นจะเหลือเพียง *Burkholderia ferrariae* PaS2(1) และ *Burkholderia territorii* PaS2(5) ที่สามารถนำไปศึกษาต่อได้

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

แบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทชที่คัดเลือกได้ สามารถนำไปพัฒนาให้อยู่รูปแบบของปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และ/หรือ โพแทช เพื่อช่วยลดการใส่เคมีในการปลูกสับปะรด และพืชอื่น ๆ ได้

## 11. คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2561 ขอขอบคุณ ดร. กนกอร บุญพา ดร. บุญทริก ฉิมชาติ และอาจารย์ ดร. ธวัชชัย อินทร์บุญช่วย ที่ให้ความช่วยเหลือเก็บตัวอย่างดินและตัวอย่างรากสับปะรดจากพื้นที่ปลูกสับปะรดในจังหวัดเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ขอขอบคุณทีมงานห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทดลอง ขอขอบคุณ ดร. อำนาจ เอี่ยมวิจารย์ ดร. อมรรัตน์ ไฉยะเสน และ ดร. กัลยากร โปรงจันทิก ที่อนุเคราะห์สารเคมี และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานทางอนุชีววิทยา และขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้งานวิจัยนี้เสร็จสิ้นไปได้ด้วยดี

## 12. เอกสารอ้างอิง

- เกตูร ทองเครือ. ม.ป.ป. การปลูกสับปะรดระบบเกษตรอินทรีย์. สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- จิราภรณ์ อินทสาร ปฏิภาณ สุทธิกุลบุตร และ จักรพงษ์ไชยวงศ์. 2556. การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ภายใต้การผลิตลำไยอินทรีย์ [ออนไลน์].
- ไตรธานี เขียมอ่อน นันทวัน ฤทธิเดช ประสิทธิ์ ใจศีล และโสภณ บุญลือ. 2555. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ในสภาพเรือนทดลอง: แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3: 185-193
- Aleksandrov, V.G., R.N. Blagodyr and I.P. liiev. 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Mikrobiology Zh (Kiev)* 29: 111-114.
- Azam, F. and G.H. Memon. 1996. Soil organisms. Pages. 200–232. In: E. Bashir and R. Bantel., (eds.) *Soil science*. National Book Foundation, Islamabad.
- Cunningham, J.E. and C. Kuiack, 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied Environ. Microbiol.*, 58: 1451-1458.
- Diep, C.N. and T.N. Hieu. 2013. Phosphate and potassium solubilizing bacteria from weathered materials of denatured rock mountain, Ha Tien, Kiên Giang province, Vietnam. *Am. J. Life Sci.* 1: 88-92.

- Doetsch, R.N. 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Gerhardt P, editor. Manual of methods for general bacteriology. Washington, DC: American Society for Microbiology;. P 29-30.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Friedrich, S., N.P. Platonova, G.I. Karavaiko, E. Stichel and F. Glombitza, 1991. Chemical and microbiological solubilization of silicates. *Acta Biotechnologica*, 11: 187-196.
- Frossard, E.; M. Brossard; M.J. Hedley and A. Metherell. 1995. Reactions controlling the cycling of P in soils. Pages. 107–138. In: H. Tiessen., (eds.) Phosphorus in the Global Environment. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, U.K.
- Hu, X., J. Chen and J. Guo, 2006. Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria Isolated from Tianmu mountain, Zhejiang, China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (9): 983-990.
- Li, F.C., S. Li, Y.Z. Yang and L.J. Cheng, 2006. Advances in the study of weathering products of primary silicate minerals, exemplified by mica and feldspar. *Acta Petrologica Mineralogica*, 25: 440-448.
- Lian, B., P.Q. Fu, D.M. Mo and C.Q. Liu, 2002. A comprehensive review of the mechanism of potassium releasing by silicate bacteria. *Acta Mineralogica Sinica*, 22: 179-183.
- Liu, D., B. Lian and H. Dong, 2012. Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiol. J.*, 29: 413-421.
- Maliha, R.; K. Samina; A. Najma; A. Sadia and L. Farooq. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms under in vitro conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7: 187–196.
- Mamta, R.P., V. Pathania, A. Gulati, B. Singh, R.K. Bhanwra and R. Tewari, 2010. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology*, 46: 222-229.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*. 17: 362-370.
- Setargie, A., S. Tilahun, S. Alemayehu, T. Dejenie and S. Kiros, 2015. Isolation and phenotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria from lentil (*Lens culnaris*.) rhizosphere soils from Southern parts of Tigray, Ethiopia. *International Journal of Microbiological Research*. 6: 188-194.

- Sheng, X.F. and L.Y. He, 2006. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Can. J. Microbiol.*, 52: 66-72.
- Sheng, X.F., 2005. Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 1918-1922.
- Son, H.J., G.T. Park, M.S. Cha and M.S. Heo, 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresour. Technol.*, 97: 204-210.
- Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69:99–151.

### 13. ภาคผนวก

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทสเซียมที่คัดเลือกได้

>*Pantoea dispersa* strain SM-P03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TGCAGTCGAACGGCAGCACAGAAGAGCTTGCTCTTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGG  
 GAAACTGCCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGT  
 GGGGGACCTTCGGCCTCACACCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCA  
 CCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCC  
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAG  
 AAGGCYTTCCGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGCGGTGAGGTTTAATAACCTTSGCCGATTGA  
 CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA  
 ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCT  
 GGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAAT  
 GCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA  
 GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTTCGACTTGGAGTTGTGCC  
 CTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGTAAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTC  
 AAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC  
 CTGGCCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCAT  
 GGCTGTCGTAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGC  
 CAGCGGCTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT  
 CATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGA  
 GCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG

CTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCGCCCCGTACACCCATG  
GGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCG

>*Burkholderia ferrariae* strain PaS2(1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGGACGGCAGCGCGGGAGCAATCCTGGCGGCGAGTG  
GCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCAGTAGTGGGGGATAGCCCCGGCGAAAGCCGGATTAATAC  
CGCATAACGATCTATGGATGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTATTGGGGTGGCCGATGGCGGATTA  
GCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACT  
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTG  
ATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGGAAGAAATCCCYTG  
MYCYAATACRKCAGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTGATGTAAGACCGAT  
GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTACTGCATTGCTCGAGTATGGCAGAGGGGGGTGG  
AATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCC  
AATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAC  
GATGTCAACTGGTTGTCGGGCCTTCATTGGCTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAG  
TACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTC  
GATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTACGGAAKTCTGCCGAGAGGTGGAWGTGCCCGAAA  
GGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC  
GAGCGCAACCCTTGTCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA  
GGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGA  
GGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG  
ACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGAC  
ACACCGCCCCTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACC

>*Burkholderia cepacia* strain PaS2(3) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGCCTGTAGTGGGGGATAGCCCCGGCGAAAGCCGGATTAA  
TACCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGA  
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCACAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCT  
GATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTG  
ACTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG

TAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGCTAAGACCGA  
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTA  
GAATTCCACGTGTAGCATGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCC  
AATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAC  
GATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAG  
TACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTC  
GATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGCGGGAGTGCTCGAAAG  
AGAACCGGCGCACAGGTCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA  
GCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAACAATGGTTCGGAACAGAGGG  
TTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTG  
CATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACAC  
CGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAA

>*Burkholderia territorii* strain PaS2(5) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

CATGCAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGA  
ACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCCACGGATGAAAGCGG  
GGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCA  
AGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAA  
GGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTA  
CCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA  
ATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC  
TGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAG  
AGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGG  
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTC  
CCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGA  
ATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCC  
TTGACATGGTTCGGAATCCTGCTGAGAGGCGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGC  
TGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGGTCCTTAGTTGCT  
ACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATG  
GCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAACAATGGTTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGC  
TAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTA

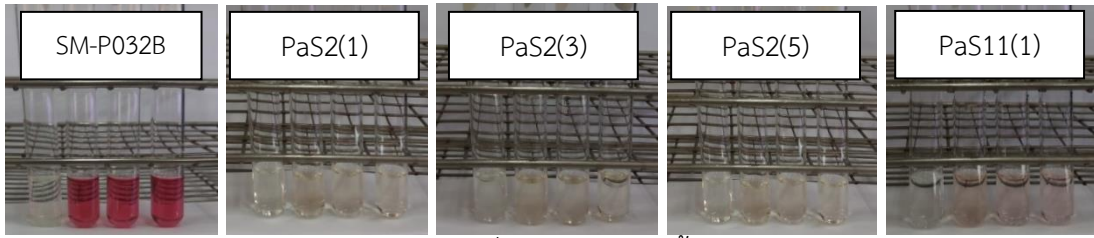
ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG  
GGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACG

>*Serratia marcescens* strain PaS11(1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG  
TCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACC  
AAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGG  
CTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT  
GAAGAAGGCCTTCGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATCAATTG  
ACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT  
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC  
TGGAAGTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAA  
TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA  
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGC  
CCTTGAGGCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA  
CTCAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT  
TACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTASCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTG  
CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGT  
TGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA  
AGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG  
AGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA  
TCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC  
ATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGG



จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินพื้นที่ปลูกสับปะรด



การผลิต IAA ของแบคทีเรียที่สามารถละลายทั้งฟอสเฟตและโพแทช