

การคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณ
ที่ทำการเกษตรกรรมในเขตภาคกลาง

Screening for Biological Activities of Bacteria Isolated from
Agricultural Soil in Central Area

จวงจันทร์ จำปาทอง^{1,2*} และกุลวดี มาสิน¹

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร

²สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร

*Email: juangjunj@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในท้องนาซึ่งมีประวัติการฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชในเขตจังหวัดกำแพงเพชร ชัยนาท พิษณุโลก และพิจิตร จำนวน 115 ไอโซเลต เมื่อคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพด้วยวิธี Modified drop collapse method พบว่า น้ำเลี้ยงจากแบคทีเรียไอโซเลต M57 และ M59 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ และน้ำเลี้ยงจากไอโซเลต M57 มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากเน่าในพริกและมะเขือเทศเมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion จากการศึกษากิจกรรมการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในอาหารเหลว Pikovskaya's medium พบว่าแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตคือ M14, M39, M43 และ M59 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูงระหว่าง 205.58 ± 1.50 ถึง 288.48 ± 6.80 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไอโซเลต M43 มีความสามารถละลายฟอสเฟตสูงสุด จากการศึกษาลำดับเบสของยีนในบริเวณ 16S rDNA พบว่า แบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลตคือ M14, M39, M43, M57 และ M59 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับลำดับเบสของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* SP16, *Bacillus megaterium* WR19A, *Bacillus* sp. 7B-635, *Pseudomonas aeruginosa* strain EH8 และ *Pseudomonas aeruginosa* strain G1 ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และ *Pseudomonas* ที่ได้จากการวิจัยนี้ เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมี เนื่องจากมีคุณสมบัติในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูง เห็นสมควรในการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตในระดับโรงเรือน เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

คำสำคัญ: สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารต้านเชื้อรา แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Bacillus Pseudomonas*

Abstract

The purpose of this study was to screen for the biological activities and potential phosphate solubilizing activity of 115 bacteria isolates from soil in a field that had recently been sprayed with pesticides in parts of KamphaengPhet, Chainat, Phitsanulok and Phichit. A modified drop collapse method was employed to screen for surfactant producing bacteria. Our results showed bacterial isolates M57 and M59 produced biosurfactants, and the biosurfactant producing supernatant of M57 was able to inhibit the growth of *Sclerotium rolfsii* when tested by the Agar well diffusion method. Pikovskaya's liquid medium was used to cultivate phosphate solubilizing bacteria, and the phosphate solubilizing activity was examined by the molybdenum blue method. Bacterial isolates M14, M39, M43 and M59 all exhibited phosphate solubilizing activity between 205.58 ± 1.50 - 288.48 ± 6.80 mg/L, with the highest phosphate solubilizing ability being M43. Based on 16S rDNA sequence data, bacterial isolates M14, M39, M43, M57 and M59 were correlated to *Pseudomonas aeruginosa* SP16, *Bacillus megaterium* WR19A, *Bacillus* sp. 7B-635, *P. aeruginosa* strain EH8 and *P. aeruginosa* strain G1, respectively. Bacteria in the genus *Bacillus* and *Pseudomonas* derived from this research will be further studied to develop bio-products and bio-pesticides for greenhouse applications.

Keywords: Biosurfactant, Antifungal activity, Phosphate solubilizing bacteria, *Bacillus*, *Pseudomonas*

บทนำ

การนิยามความหมายและคำจำกัดความของ “การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี” (Biological control) นั้น เริ่มต้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1919 โดยมุ่งเน้นการกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยศัตรูธรรมชาติ (Nollet and Rathore, 2015) ต่อมา ในปีค.ศ. 1960 ได้มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อควบคุมศัตรูพืชอื่นๆ อาทิ เช่น ไร แมลง และวัชพืช เป็นต้น (Van Driesche and Bellows, 1996) จากนั้น การใช้ประโยชน์จากวิธีดังกล่าวได้แพร่หลายออกไปในหลายประเทศ รวมถึงประเทศไทย (Napompeth, 1990) โดยมีการศึกษาและรายงานเกี่ยวกับชนิดของศัตรูเป้าหมาย สารชีวภาพและวิธีการควบคุม รวมถึงแหล่งที่มาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและควบคุมศัตรูพืช (Swain and Ray, 2009; กุศล และพิศาล, 2556; Afzal et al., 2017) ปัจจุบัน สารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สารกำจัดศัตรูพืชจากจุลินทรีย์ (microbial pesticide) สารกำจัดศัตรูพืชจากสารชีวเคมี (biochemical pesticide) และ สารสกัดจากพืชที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (plant-incorporated protectants)(Nollet and Rathore, 2015) เมื่อไม่นานมานี้ Khan and Rahman (2017) ระบุว่า สถานการณ์ตลาดสารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพในช่วงปี ค.ศ. 2003-2010 ได้มีแนวโน้มสูงขึ้น และคาดการณ์ว่า สารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพจะสร้างรายได้ถึง 3.2 พันล้านเหรียญสหรัฐในปีค.ศ. 2017 นอกจากนี้

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพยังมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็น 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบจำนวนผลงานตีพิมพ์นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003 จนถึงปี ค.ศ. 2016 (Web of Science, 2017) จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า สารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพกำลังได้รับความสนใจและเข้ามามีบทบาทในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรอย่างยั่งยืนมากขึ้น

ในช่วงต้นปี ค.ศ. 1990 ถือเป็นช่วงเวลาเริ่มต้นของวิถีเกษตรกรรมเคมีสีเขียว (green chemistry) ซึ่งมีจุดเด่นคือ มุ่งเน้นด้านความปลอดภัยของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อผลผลิตและสิ่งแวดล้อม (Mulligan et al., 2014) ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารชีวภัณฑ์และสารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพจากจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก มีการรายงานเกี่ยวกับการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพและประยุกต์ใช้โดยชีววิธี เพื่อควบคุมศัตรูพืชและเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เช่น แบคทีเรียจีส *Bacillus* จีส *Brevibacillus* และจีส *Pseudomonas* (Prasana et al., 2013; Shafi et al., 2017; Pual and Sinha, 2017) โดยเฉพาะแบคทีเรียจีส *Bacillus* และจีส *Pseudomonas* พบว่า มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านจุลชีพ สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ รวมถึงความสามารถในการเปลี่ยนรูปของธาตุอาหารต่างๆ ในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น การละลายฟอสเฟตในดิน เป็นต้น นอกจากนี้ Raaijmakers et al. (2010) ได้ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับคุณสมบัติหลากหลายของแบคทีเรียจีส *Bacillus* และจีส *Pseudomonas* ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่ม Lipopeptides และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น antimicrobial, antitumor และ cytotoxicity เป็นต้น ในอุตสาหกรรมสารลดแรงตึงผิว ได้มีการศึกษากลไกทางชีวภาพของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่ม Rhamnolipids สารในกลุ่มนี้ ได้นำมาใช้ในการบำบัดของเสียหรือสารตกค้างในธรรมชาติ รวมถึงใช้เป็นสารชีวภัณฑ์เพื่อการควบคุมศัตรูพืชด้วยชีววิธี (Maier and Soberón-Chávez, 2000) นอกจากนี้คุณสมบัติดังกล่าวแล้ว ยังมีการรายงานว่า *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas aeruginosa* ยังมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชอีกด้วย (ไตรธานีและคณะ 2555, Pual and Sinha, 2017) ในช่วงเวลาที่ผ่านมานี้ ได้มีการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับคุณสมบัติและประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพของแบคทีเรียจีส *Brevibacillus* พบว่า แบคทีเรียจีสนี้ เป็นแหล่งสำคัญของเอนไซม์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสารต้านจุลชีพ (Tian et al., 2006, Chandel et al., 2010, Song et al., 2012) เช่น *Brevibacillus laterosporus* สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งตัวอ่อนของแมลงและควบคุมจำนวนแมลงครอบครัวตั้งแต่ลำดับ Lepidoptera จนถึง Coleoptera อีกด้วย (De Oliveira et al., 2004, Panda et al., 2014) นอกจากนี้ มีการรายงานว่า *Brevibacillus aureum* MSA13 ที่แยกได้จากน้ำทะเล มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่ม Lipopeptides ชนิดใหม่บนอาหารแข็ง ซึ่งแบคทีเรียนี้ สามารถนำมาบำบัดมลพิษในสิ่งแวดล้อมทางทะเลได้ (Kiran et al., 2010)

อย่างไรก็ดี การพยายามคัดกรองหาแบคทีเรียหนึ่งสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย (versatile) นั้น ถือเป็นเรื่องที่ทำนายในปัจจุบัน ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา รวมถึงกิจกรรมในการละลายฟอสเฟตในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลายเพื่อศึกษาต่อไปในระดับโรงเรียน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

สุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ทำเกษตรกรรมที่มีประวัติการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในจังหวัดกำแพงเพชร พืชปลูก พืชไร่ และชัณหา จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้งก่อนนำไปบดละเอียดด้วยโกร่ง โดยนำตัวอย่างดินอย่างละ 2 กรัม มาเจือจางด้วยสารละลายยูน 0.15% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 18 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วนำสารละลายเจือจางมาทำการแยกเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง Luria-Bertani (HIMEDIA®) จนได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อทำการทดลองต่อไป

2. การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

ส่งตรวจวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen (South Korea) โดยนำแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษามาวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rDNA จากดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rDNA โดยใช้ primer 1 คู่ (785F' : 5' GGA TTA GAT ACC CTG GTA 3' และ 907R' : 5' CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT 3') โดยใช้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ ชิ้นส่วนที่ได้นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส (ABI PRISM 3730XL Analyzer) จากนั้น จึงทำการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ ชิ้นส่วนยีน 16S rDNA จากแบคทีเรียอื่นๆ ที่เก็บไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยอาศัยโปรแกรม NCBI BLAST ในการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนหรือแตกต่างกัน

3. การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี Modified drop collapse (MDC)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษามาเลี้ยงในอาหารที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยประยุกต์สูตรอาหารจาก El-Sheshtaway and Doheim (2014) ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวดังกล่าวบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้น นำเซลล์และน้ำเลี้ยงมาปั่นเพื่อแยกส่วนใส ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำน้ำเลี้ยงที่ได้มาทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี MDC โดยวิธีดังกล่าว ให้เตรียมน้ำมัน Pennzoi® ZDX (20W-40) ปริมาณ 1.8 ไมโครลิตร มาเคลือบ บางๆ บนภาตหลุม 96 หลุม วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าน้ำมันเรียบเสมอกัน นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการแยกปั่นเหวี่ยงแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร มาหยดตรงกลางภาตหลุมที่เคลือบน้ำมัน ทิ้งไว้ นาน 1 นาที จำนวน 3 ซ้ำ ถ้าหากปรากฏการสลายคราบน้ำมันบนภาตที่เตรียมไว้ แสดงว่า ตัวอย่างอาจมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยชุดควบคุมในการทดลองนี้กำหนดให้สารลดแรงตึงผิวทางการค้า (Tween 20) เป็นชุดควบคุมแบบ positive control และน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมแบบ negative control (Bodour and Miller-Maier, 1998)

4. การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อก่อโรครากเน่าด้วยวิธี **Agar well diffusion method**

ศึกษาการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อราก่อโรครากเน่าในพริกและมะเขือเทศ โดยการนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสารปฏิชีวนะ Wickerhams Antibiotic Test Medium (WATM) (Raper and Thom, 1949) และอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (EI-Sheshtaway and Doheim, 2014) โดยทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลล์และน้ำเลี้ยงมาปั่นเพื่อแยกส่วนใส ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำน้ำเลี้ยงที่ได้มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในพริกและมะเขือเทศ (*Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii*) ด้วยวิธี Agar well diffusion method บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) โดยเลี้ยงเชื้อราก่อโรคเป็นเวลา 2-3 วันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโต เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าว จึงทำการเจาะรูอาหารแข็ง แล้วจึงเติมน้ำเลี้ยงที่ได้ของแต่ละตัวอย่างลงในหลุม หลุมละ 35 ไมโครลิตร โดยใช้สารต้านเชื้อรา Cycloheximide (35 ไมโครกรัมต่อหลุม) เป็นชุดควบคุม บันทึกผลการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง

5. การทดสอบการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในอาหารเหลว **Pikovskaya's medium (PVK)**

ในการทดลองนี้ ได้วิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสเฟตด้วยวิธี molybdenum blue method โดยเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย (10^8 cfu/mL) โดยเตรียมสารละลายแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียได้จาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว PVK ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบเวลาการบ่มแล้ว นำตัวอย่างไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเอาเซลล์แบคทีเรียออก ทำซ้ำจนกว่าจะได้น้ำเลี้ยงใสปราศจากเซลล์ บันทึกค่า pH และวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available phosphorus) โดยดูดสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต (ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันวางทิ้งไว้ เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าเปอร์เซ็นต์ transmittance (% T) ด้วยเครื่องดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร (นิกาล, 2550)

การคำนวณหาปริมาณของฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้เป็นมิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่าง (มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร)} = \frac{Z \times \text{ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

Z คือ ค่าความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในตัวอย่างที่คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐาน ฟอสเฟต ปริมาตรสุดท้าย คือ 25 มิลลิลิตร ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ คือ 2 มิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกรรมวิธีโดยวิธีการของ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป SPSS version 17

ผลการวิจัย

ผลการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวภูมิวิทยา

จากการศึกษานี้ พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีประวัติการฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชในจังหวัดกำแพงเพชร พิษณุโลก พิจิตร และชัยนาท จำนวน 115 ไอโซเลต เพื่อทำการศึกษารายละเอียดทางชีวภาพ เช่น สารต้านเชื้อรา สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย รวมถึงการย้อมสีแกรมเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope)

จากผลการวิจัยดังกล่าว ได้นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดกรองเบื้องต้น ทั้งหมด 20 ไอโซเลตมาทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA พบว่า มีแบคทีเรียที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกับยีนส์ *Bacillus* (12 ไอโซเลต) *Brevibacillus* (4 ไอโซเลต) และ *Pseudomonas* (4 ไอโซเลต) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม NCBI BLAST

ไอโซเลต	สถานที่เก็บตัวอย่าง	เอกลักษณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์	ความเหมือน /เอกลักษณ์* (%)	เลขทะเบียน
M1	Kamphaeng Phet	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain IHB B 2667	99	KF475847
M3	Kamphaeng Phet	<i>Bacillus cereus</i> strain Sami	99	KF751725
M4	Kamphaeng Phet	<i>Bacillus</i> sp. B-3-35	99	KT583528
M9	Kamphaeng Phet	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> strain DE11	99	CP013984
M13	Chai Nat	<i>Bacillus clausii</i> strain ENTPro	99	CP012475
M14	Phitsanulok	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP16	99	LC109958
M17	Kamphaeng Phet	<i>Bacillus nealsonii</i> strain EBL2	99	KP212401
M18	Kamphaeng Phet	<i>Brevibacillus massiliensis</i> strain phR	100	NR_11832
M20	Chai Nat	<i>Bacillus</i> sp. WR1A-1	99	LM655321
M39	Kamphaeng Phet	<i>Bacillus megaterium</i> WR19A	99	AY030336

ไอโซเลต	สถานที่เก็บตัวอย่าง	เอกลักษณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์	ความเหมือน /เอกลักษณ์* (%)	เลขทะเบียน
M43	Kamphaeng Phet	<i>Bacillus</i> sp. 7B-635	99	KF441691
M44	Kamphaeng Phet	<i>Brevibacillus laterosporus</i> LMG15441	99	CP007806
M45	Phichit	<i>Bacillus megaterium</i> strain CCMM B583	100	KM068046
M48	Chai Nat	<i>Bacillus cereus</i> strain 2012 BaDB20	99	JX041915
M53	Kamphaeng Phet	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AT-1	99	KF826711
M54	Kamphaeng Phet	<i>Bacillus</i> sp. OM-3	99	KF543093
M57	Kamphaeng Phet	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain EH8	99	GU339238
M59	Kamphaeng Phet	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain G1	99	KF438226
M92	Kamphaeng Phet	<i>Brevibacillus laterosporus</i> strain IHB B 2667	99	KF475847
M93	Kamphaeng Phet	<i>Bacillus</i> sp. BAB-2797	99	KF879098

* คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในการเปรียบเทียบกันโดยใช้ BLASTN

ผลการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี Modified drop collapse (MDC)

จากการผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวด้วยวิธี Modified drop collapse (MDC) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต M57 และ M59 มีความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ ทั้งนี้ วิธี MDC เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วต่อการคัดกรองเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพอื่นๆ ต่อไป เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต M57 และ M59 มีความใกล้เคียงกับ *Pseudomonas aeruginosa* strain EH8 และ *P. aeruginosa* strain G1 โดยแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้ ได้รับการจำแนกชนิดเพื่อใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายไขมันที่เพาะเลี้ยงได้ และการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียรอบรากดอกกล้วยไม้ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้

ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อก่อโรครากเน่าด้วยวิธี Agar well diffusion

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *Sclerotium rolfsii* จำนวน 2 สายพันธุ์ สาเหตุโรครากเน่าในพริกและมะเขือเทศ ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยการนำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว WATM และอาหารสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาทดสอบ พบว่า คาร์ตมิวงไสยับยั้งการเจริญเติบโตน้ำเลี้ยงจากไอโซเลต M1 ไอโซเลต M14 และไอโซเลต M53 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว WATM สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้เท่ากับ 0.1 ± 0.1 เซนติเมตร 0.23 ± 0.07 เซนติเมตร และ 0.07 ± 0.07

เซ็นติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุม (Cycloheximide) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ในขณะที่น้ำเลี้ยงที่ได้จากอาหารเหลวสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ (ตารางที่ 2)

อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ทั้งสองสายพันธุ์พบว่า น้ำเลี้ยงที่ได้จากอาหารเหลว WATM จำนวน 15 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับคาร์ตมีวงใส (เซ็นติเมตร) ทั้งนี้ผลทดสอบน้ำเลี้ยงที่ได้จากอาหารเหลวสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แสดงให้เห็นว่า น้ำเลี้ยงจากแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ ไอโซเลต M57 ยังแสดงผลบวกเมื่อทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี MDC อีกด้วย จากผลการวิจัยดังกล่าว สามารถเป็นแนวทางไปสู่การศึกษาถึงชนิดโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา รวมถึงแนวทางการทดลองในระดับโรงเรือน

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii*

คาร์ตมีวงใสยับยั้ง (เซ็นติเมตร) เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง †

ไอโซเลต	น้ำเลี้ยงจากอาหาร WATM			น้ำเลี้ยงจากอาหารในการทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ		
	R [‡]	S1	S2	R	S1	S2
ชุดควบคุม [§]	0.6 ± 0.06 ^a	0.6 ± 0.06 ^a	0.7 ± 0.06 ^a	0.6±0.06	0.6 ± 0.06 ^a	0.7 ± 0.06 ^a
M1	0.1 ± 0.1 ^b	0.6 ± 0.06 ^{ab}	0.2 ± 0 ^{bc}	-	-	-
M3	-	0.37 ± 0.89 ^{abc}	0.07 ± 0.03 ^c	-	-	-
M4	-	0.3 ± 0.588 ^{bc}	0.2 ± 0.1 ^{bc}	-	-	-
M9	-	0.27 ± 0.89 ^{ab}	0.23 ± 0.15 ^{bc}	-	-	-
M14	0.23 ± 0.07 ^b	0.27 ± 0.15 ^{bc}	0.4 ± 0.21 ^{abc}	-	0.43 ± 0.07 ^{ab}	0.47 ± 0.20 ^{ab}
M17	-	0.3 ± 0.17 ^{abc}	0.13 ± 0.09 ^{bc}	-	-	-
M18	-	0.43 ± 0.33 ^{ab}	0.23 ± 0.12 ^{bc}	-	-	-
M20	-	0.43 ± 0.67 ^{ab}	0.1 ± 0.06 ^{bc}	-	0.27 ± 0.09 ^{bc}	0.2 ± 0 ^{bc}
M39	-	-	-	-	0.2 ± 0.06 ^{bc}	0.37 ± 0.03 ^{bc}
M44	-	0.5 ± 0.12 ^{ab}	0.3 ± 0.06 ^{bc}	-	-	-
M45	-	0.3 ± 0.15 ^{abc}	0.47 ± 0.15 ^{ab}	-	-	-

ค่ารัศมีวงใสยับยั้ง (เซ็นติเมตร) เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง †

ไอโซเลต	น้ำเลี้ยงจากอาหาร WATM			น้ำเลี้ยงจากอาหารในการทดสอบ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ		
	R [‡]	S1	S2	R	S1	S2
M53	0.07 ± 0.07 ^b	0.53 ± 0.07 ^{ab}	0.23 ± 0.15 ^{bc}	-	-	-
M54	-	0.57 ± 0.07 ^{ab}	0.23 ± 0.12 ^{bc}	-	0.13 ± 0.09 ^{bc}	0.3 ± 0.27 ^{bc}
M57	-	0.4 ± 0.06 ^{abc}	0.13 ± 0.07 ^{bc}	-	0.37 ± 0.09 ^{bc}	0.17 ± 0.07 ^{bc}
M59	-	0.33 ± 0.6 ^{abc}	0.33 ± 0.03 ^{bc}	-	-	-
M92	-	0.1 ± 0 ^c	0.2 ± 0.15 ^{bc}	-	-	-
M93	-	-	-	-	0.4 ± 0.06 ^c	0.3 ± 0.07 ^c

† ค่าเฉลี่ยตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test ($P \leq 0.05$)

‡ เชื้อสาเหตุโรคที่ใช้ทดสอบ (R คือ *Rhizoctonia solani* S1 คือ *Sclerotium rolfsii* สายพันธุ์ที่ 1 และ S2 คือ *S. rolfsii* สายพันธุ์ที่ 2)

§ ชุดควบคุม คือ Cycloheximide

ผลการทดสอบการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในอาหารเหลว Pikovskaya's medium

จากการศึกษาวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธี molybdenum blue method พบว่า ไอโซเลต M43 มีความสามารถละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด โดยพบปริมาณฟอสเฟตที่ละลายน้ำคือ 288.48 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ไอโซเลต M59 ไอโซเลต M14 และไอโซเลต M39 ซึ่งพบปริมาณฟอสเฟตที่ละลายน้ำคือ 282.57, 269.36 และ 205.58 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาลำดับเบสของยีนในบริเวณ 16S rDNA พบว่า ไอโซเลต M43 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bacillus* sp. 7B-635 ในขณะที่ไอโซเลต M59 ไอโซเลต M14 และไอโซเลต M39 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Pseudomonas aeruginosa* strain G1, *P. aeruginosa* SP16 และ *Bacillus megaterium* WR19A ตามลำดับ

แบคทีเรียที่แยกได้จากการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า จีโนส *Bacillus* และ *Pseudomonas* มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตและคุณสมบัติการละลายฟอสเฟตช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ เมื่อวัดค่า pH ของน้ำเลี้ยงส่วนใสหลังการบั่นเหวี่ยง พบว่า ค่า pH ที่ได้จากน้ำเลี้ยงส่วนใสของแบคทีเรียมีส่วนใหญ่มักมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับค่า pH ของอาหารเหลวก่อนทำการบ่มเลี้ยงเชื้อ แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลตดังกล่าวสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ ซึ่งกรดอินทรีย์เหล่านี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย

ไอโซเลต	ค่า pH ของน้ำเลี้ยงจากอาหาร PVK		ฟอสเฟตที่ละลายได้ (mg/L) [‡]
	ก่อนการเลี้ยงเชื้อ	หลังการเลี้ยงเชื้อ	
ชุดควบคุม (อาหารเหลว PVK)	6.83	6.54	54.99 ± 0.26 ^m
M1	6.83	5.83	66.67 ± 0.28 ⁱ
M3	6.83	5.67	65.49 ± 0.20 ^{ij}
M4	6.83	6.54	181.00 ± 3.31 ^e
M9	6.83	6.48	57.56 ± 0.39 ^{klm}
M13	6.83	6.58	58.26 ± 0.15 ^{klm}
M14	6.83	6.87	269.36 ± 0.32 ^c
M17	6.83	6.22	62.72 ± 0.34 ^{ijk}
M18	6.83	6.18	62.89 ± 0.52 ^{ijk}
M20	6.83	5.91	54.57 ± 0.39 ^m
M39	6.83	5.13	205.58 ± 1.50 ^d
M43	6.83	6.13	288.48 ± 6.80 ^a
M44	6.83	6.52	96.48 ± 0.78 ^f
M45	6.83	6.44	67.32 ± 0.45 ^{hi}
M48	6.83	6.52	60.68 ± 0.22 ^{kl}
M53	6.83	5.85	81.76 ± 0.52 ^g
M54	6.83	5.62	72.45 ± 0.22 ^h
M57	6.83	6.15	67.93 ± 0.22 ^{hi}
M59	6.83	5.98	282.57 ± 0.24 ^b
M92	6.83	5.66	56.45 ± 0.27 ^{lm}
M93	6.83	6.43	67.12 ± 0.45 ⁱ

[‡] ค่าเฉลี่ยตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test ($P \leq 0.05$)

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษากิจกรรมทางชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในแหล่งเกษตรกรรมที่มีประวัติการฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชในเขตจังหวัดกำแพงเพชร ชัยนาท พิษณุโลกและพิจิตร จำนวน 115 ไอโซเลต พบว่า แบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต M57 และไอโซเลต M59 มีความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวเมื่อทดสอบด้วยวิธี Modified drop collapse (MDC) นอกจากนี้ ยังมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณที่ทำการเกษตรกรรม ซึ่งเชื่อกันว่ามีแหล่งอาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช บริเวณที่มีการฉีดพ่นสารเคมี รวมถึง พื้นที่ในแปลงปลูกทั่วไป (Perneel et al., 2007; Singh et al., 2009; Kruijt et al., 2009; Sekhon et al., 2011) ทั้งนี้ Wattanaphon et al. (2007) ได้คัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวด้วยวิธี MDC จากดินที่ทำการเกษตรกรรมที่มีการฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชและดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน พบว่า *Burkholderia cenocepacia* BSP3 มีศักยภาพในการลดแรงตึงผิวและช่วยละลายสารกำจัดศัตรูพืชที่ปนเปื้อนได้ ทั้งนี้ แบคทีเรียที่นำมาศึกษาคุณสมบัติสารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่ มักมีแหล่งจากดินที่ปนเปื้อนไนโตรเจนและไฮโดรคาร์บอน (Arutchevli and Doble, 2010; Lahkar et al., 2015) แหล่งน้ำมันดิบ (Borah et al., 2016) รวมถึงแหล่งน้ำจืด ทะเล และแหล่งน้ำเสีย (Yin et al., 2009; Paul and Sinha, 2017; Cheng et al., 2017) ซึ่งแบคทีเรียจากแหล่งอาศัยต่างกันย่อมเหมาะสมต่อการประยุกต์แตกต่างกัน หนึ่ง ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการใช้สารเคมีในพื้นที่เกษตรกรรมสูงและก่อให้เกิดสารตกค้างในผลผลิต การใช้แบคทีเรียในการบำบัดสารพิษที่ปนเปื้อนในระบบนิเวศทางการเกษตรจึงเป็นสิ่งที่ควรให้ความสำคัญ อีกทั้งยังต้องตระหนักถึงความอยู่รอดของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่มีการใช้งานอีกด้วย

การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพทางการเกษตรนั้น จัดเป็นหนึ่งในวิถีเคมีสีเขียว เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีประโยชน์ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในทางอ้อม เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดยังสามารถออกฤทธิ์ต้านจุลชีพได้อีกด้วย จากผลการวิจัยนี้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion method พบว่า น้ำเลี้ยงในอาหาร WATM จากไอโซเลต M57 และ M59 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากเน่าในพริกและมะเขือเทศได้ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวนั้น กลับพบว่า ไอโซเลต M57 เพียงชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ ผลการวิจัยดังกล่าว สันนิษฐานได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรียทั้งสองนั้นมีคุณสมบัติแตกต่างกัน เมื่อศึกษาลำดับเบสของยีนในบริเวณ 16S rDNA พบว่า ไอโซเลต M57 และไอโซเลต M59 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Pseudomonas aeruginosa* strain EH8 และ *P. aeruginosa* strain G1 ตามลำดับ

จีโนม *Pseudomonas* เป็นแหล่งสำคัญในการผลิตสารลดแรงตึงผิว Rhamnolipids ซึ่งสารนี้ ได้จัดอยู่ในกลุ่ม Glycolipids (Dhanarajan and Sen, 2014) มีการรายงานว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ในอาหารที่แตกต่างกัน แบคทีเรียดังกล่าว สามารถผลิต Rhamnolipids ที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันมากกว่า 28 โครงสร้าง นอกจาก *P. aeruginosa* จะมีการรายงานประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวแล้ว ยังมีการศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพได้อีกด้วย (Benincasa et al., 2004; El-Sheshtaway and Doheim, 2014; Lahkar et al., 2015) จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาและข้อมูลเบื้องต้นในการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า ดินที่ทำการเกษตรกรรมที่มีการฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืช เหมาะสมต่อการศึกษา

แบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดสารพิษตกค้างในพื้นที่ทำการเกษตร ทั้งนี้แบคทีเรียไอโซเลต M57 และไอโซเลต M59 ควรได้รับการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวต่อไป

ในแหล่งที่ทำการเกษตรกรรม ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช ทั้งนี้ฟอสฟอรัสรูปที่ไม่ละลายน้ำหรือตกตะกอน รวมถึงรูปที่ถูกยึดมีมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดินซึ่งพืชนำไปใช้ได้ยาก เช่น สารประกอบฟอสเฟตที่ตกตะกอนของ Ca, Fe และ Al เป็นต้น (ปัทมา, 2533) ดังนั้น จึงมีการศึกษาวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับการคัดกรองแบคทีเรียเพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพสำหรับส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและเพิ่มปริมาณผลผลิต จากผลงานวิจัยนี้ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตคือ M14 ไอโซเลต M39 ไอโซเลต M43 และไอโซเลต M59 มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูง โดยมีค่ากิจกรรมการละลายฟอสเฟตได้ตั้งแต่ 205.58 ถึง 288.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดกลูโคนิก กรด 2-คีโตกลูโคนิก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต (Stella and Halimi, 2015) ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของค่า pH หลังจากรวมเชื้อ จึงบ่งบอกได้ว่า มีการผลิตกรดอินทรีย์ของจุลินทรีย์ระหว่างที่มีการเจริญในอาหารเหลว PVK ได้ นอกจากการผลิตกรดอินทรีย์แล้ว แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Enterobacter*, *Pantoea* และ *Pseudomonas* มีการผลิตเอนไซม์ phosphatases ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตอีกด้วย (Jorquera et al., 2008)

ในช่วงเวลาที่ผ่านมา ได้มีรายงานการศึกษาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตที่แยกได้จากบริเวณรอบรากพืช เช่น อ้อย ไม้ รวมถึงดินในนาข้าวและแม่น้ำ แบคทีเรียดังกล่าวจัดอยู่ในจีโนส *Bacillus*, *Burkholderia*, *Buttiauxella*, *Enterobacter*, *Pantoea* และ *Pseudomonas* ซึ่งมีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตได้ตั้งแต่ 38 ถึง 219 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไตรธานี และคณะ 2555; Ruangsanka, 2014; เกตน์ธนิภา และสมภาพ 2557; Pual and Sinha, 2017) จากการศึกษาของ Pual and Sinha (2017) พบว่า นอกจาก *P. aeruginosa* KUPSB12 จะมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูงแล้ว (219.64 ± 0.330 มิลลิกรัมต่อลิตร) ยังสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งชนิดกรัมบวกและกรัมลบเมื่อศึกษาด้วยวิธี Agar well diffusion method ได้อีกด้วย ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานที่ผ่านมา ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ดินที่แยกได้จากแหล่งเกษตรกรรมเป็นแหล่งที่มีศักยภาพ เหมาะสมต่อการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สรุปได้ว่าดินจากแหล่งเกษตรกรรมที่นำมาศึกษา พบแบคทีเรีย 3 กลุ่มใหญ่ๆ ซึ่งจัดอยู่ในจีโนส *Bacillus*, *Brevibacillus* และ *Pseudomonas* จากผลการวิจัย เสนอแนะได้ว่าแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลตคือ M14, M39, M43, M57 และ M59 เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาชนิดและโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้สูงสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในระดับโรงเรียนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ R2558C163 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

- เกตน์ณินภา วันชัย และสมภาพ เรืองสังข์. (2557). ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ตรึงอยู่บนขี้เถ้า
กลบต่อการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ กข47. ว. วิทย. กษ. 45(2) ฉบับพิเศษ: 513-516.
- กุศล ถมมาและ พิศาล ศิริธร. (2556). ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์ *Bacillus subtilis* B076 เพื่อการ
เคลือบเมล็ดและพ่นทางใบเพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. แก่น
เกษตร 41: 339-345.
- ไทรธานี เยี่ยมอ่อน, นันทวัน ฤทธิเดช, ประสิทธิ์ ใจคิด และโสภณ บุญลือ. (2555). การส่งเสริมการ
เจริญเติบโตของอ้อยด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ในสภาพเรือนทดลอง: แก่นเกษตร 40 ฉบับ
พิเศษ 3: 185-193.
- นิจกาล การอำนวยการ. (2550). การศึกษาความหลากหลายและประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. ในการ
ละลายฟอสเฟตอินทรีย์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ปัทมา วิทยากร. 2533. ดิน: แหล่งธาตุอาหารของพืช. ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 215 หน้า.
- Arutchelvi, J., & Doble, M. (2010). Characterization of glycolipid biosurfactant from
Pseudomonas aeruginosa CPCL isolated from petroleum contaminated soil. Letters in
applied microbiology, 51(1), 75-82.
- Afzal, I., Iqar, I., Shinwari, Z. K., & Yasmin, A. (2017). Plant growth-promoting potential of
endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. Plant Growth
Regulation, 81(3), 399-408.
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., & Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface
properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas*
aeruginosa LBI from soapstock. Antonie Van Leeuwenhoek, 85(1), 1-8.
- Bodour, A. A., & Miller-Maier, R. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique
for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms.
Journal of Microbiological Methods, 32(3), 273-280.
- Borah, S. N., Goswami, D., Sarma, H. K., Cameotra, S. S., & Deka, S. (2016). Rhamnolipid
biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of
Maize. Frontiers in microbiology, 7, 1505.
- Chandel, S., Allan, E. J., & Woodward, S. (2010). Biological control of *Fusarium oxysporum* f.
sp. *lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. Journal of Phytopathology, 158(7-8),
470-478.
- Cheng, T., Liang, J., He, J., Hu, X., Ge, Z., & Liu, J. (2017). A novel rhamnolipid-producing
Pseudomonas aeruginosa ZS1 isolate derived from petroleum sludge suitable for
bioremediation. AMB Express, 7(1), 120.

- De Oliveira, E. J., Rabinovitch, L., Monnerat, R. G., Passos, L. K. J., & Zahner, V. (2004). Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6657-6664.
- Dhanarajan, G., & Sen, R. (2014). Cost analysis of biosurfactant production from a scientist's perspective. *Biosurfactants*, 159, 153.
- El-Sheshtawy, H. S., & Doheim, M. M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Petroleum*, 23(1), 1-6.
- Jorquera, M. A., Hernández, M. T., Rengel, Z., Marschner, P., & de la Luz Mora, M. (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of soils*, 44(8), 1025.
- Khan, M. S., & Rahman, M. S. (Eds.). (2017). *Pesticide Residue in Foods: Sources, Management, and Control*. Springer.
- Kiran, G. S., Thomas, T. A., Selvin, J., Sabarathnam, B., & Lipton, A. P. (2010). Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresource technology*, 101(7), 2389-2396.
- Kruijt, M., Tran, H., & Raaijmakers, J. M. (2009). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *Journal of applied microbiology*, 107(2), 546-556.
- Lahkar, J., Borah, S. N., Deka, S., & Ahmed, G. (2015). Biosurfactant of *Pseudomonas aeruginosa* JS29 against *Alternaria solani*: the causal organism of early blight of tomato. *BioControl*, 60(3), 401-411.
- Maier, R. M., & Soberon-Chavez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(5), 625-633.
- Mulligan, C. N., Sharma, S. K., & Mudhoo, A. (Eds.). (2014). *Biosurfactants: research trends and applications*. CRC press.
- Napompeth, B. (1990). Use of natural enemies to control agricultural pests in Thailand. *Extension Bulletin-ASPAC, Food & Fertilizer Technology Center*, 303.
- Nollet, L. M., & Rathore, H. S. (Eds.). (2015). *Biopesticides handbook*. CRC Press.
- Prasanna, L., Eijsink, V. G., Meadow, R., & Gåseidnes, S. (2013). A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(4), 1601-1611.

- Panda, A. K., Bisht, S. S., DeMondal, S., Kumar, N. S., Gurusubramanian, G., & Panigrahi, A. K. (2014). *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), 623-639.
- Paul, D., & Sinha, S. N. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*, 15(1), 130-136.
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, J. M., De Vos, P., & Höfte, M. (2007). Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. *Journal of applied microbiology*, 103(4), 1007-1020.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 34(6), 1037-1062.
- Ruangsanka, S. (2014). Identification of phosphate-solubilizing bacteria from the bamboo rhizosphere. *Science Asia*, 40, 204-211.
- Raper, K. B., & Thom, C. (1949). *A manual of the Penicillia*. A manual of the Penicillia.
- Sekhon, K. K., Khanna, S., & Cameotra, S. S. (2011). Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. *Microbial cell factories*, 10(1), 49.
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459.
- Singh, P. B., Sharma, S., Saini, H. S., & Chadha, B. S. (2009). Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. *Letters in applied microbiology*, 49(3), 378-383.
- Song, Z., Liu, Q., Guo, H., Ju, R., Zhao, Y., Li, J. and Liu, X. (2012). Tostadin, a novel antibacterial peptide from an antagonistic microorganism *Brevibacillus brevis* XDH. *Bioresource technology*, 111, 504-506.
- Stella, M., & Halimi, M. (2015). Gluconic acid production by bacteria to liberate phosphorus from insoluble phosphate complexes. *J Trop Agric Food Sci*, 43(1), 41-53.
- Swain, M. R., & Ray, R. C. (2009). Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological research*, 164(2), 121-130.
- Tian, B., Li, N., Lian, L., Liu, J., Yang, J., & Zhang, K. Q. (2006). Cloning, expression and deletion of the cuticle-degrading protease BLG4 from nematophagous bacterium *Brevibacillus laterosporus* G4. *Archives of microbiology*, 186(4), 297-305.

- Van Driesche, R. G., & Bellows, T. S. (1996). Biology of arthropod parasitoids and predators. In *Biological control* (pp. 309-336). Springer, Boston, MA.
- Wattanaphon, H. T., Kerdsin, A., Thammacharoen, C., Sangvanich, P., & Vangnai, A. S. (2008). A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. *Journal of applied microbiology*, 105(2), 416-423.
- Yin, H., Qiang, J., Jia, Y., Ye, J., Peng, H., Qin, H., ... & He, B. (2009). Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry*, 44(3), 302-308.