

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ
ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร
กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ
กิจกรรมย่อย : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื่อมผสม
3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : ทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในห้องปฏิบัติการ
ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Selection of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Laboratory
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : นางสุปราณี มั่นหมาย
ผู้ร่วมงาน : นายอธิปัตย์ คลังบุญครอง
: นางสาวศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต
: นางภาวนา ลิกขนานนท์
สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินและรากพืช จำนวน 150 ตัวอย่าง ได้จุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน CaHPO_4 จำนวน 228 ไอโซเลท คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลาย CaHPO_4 ที่ระดับ 5 (วงใสมากกว่า 9 มิลลิเมตร) ได้ 8 ไอโซเลท จำแนกเบื้องต้น เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และ *Pseudomonas* ราในจีนัส *Penicillium* และ *Aspergillus* จากนั้นทำการเก็บรักษาเชื้อบนอาหารที่เหมาะสมเพื่อทำการทดลองต่อไป

6. คำนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากธาตุอาหารนี้จำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและฟอสโฟไลปิดส์ของเซลล์สิ่งมีชีวิต ฟอสฟอรัสปรากฏในธรรมชาติในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในดินอยู่ในช่วง 0.02-0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (Barber, 1984) และส่วนใหญ่อยู่ในรูปออร์โทฟอสเฟต แต่บางครั้งอยู่ในรูปฟอสฟิน และฟอสโฟเนท ในด้านธาตุอาหารพืชฟอสฟอรัสในดิน โดยทั่วไปสามารถจำแนกได้เป็น (ก) ฟอสฟอรัสในสารละลายดิน (ข) อนินทรีย์ฟอสฟอรัส และ (ค) อินทรีย์ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสในสารละลายดินที่จัดว่าเป็นประโยชน์ต่อพืชมีปริมาณน้อยมาก เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบต่างๆในดินได้ดี ดังนั้นดินที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยจึงมีฟอสฟอรัสในสารละลายดินประมาณ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือพบน้อยมากที่จะเกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลิตร (Ozanne, 1980) ส่วนอนินทรีย์ฟอสฟอรัสในสารละลายดินอยู่ในรูปของออร์โทฟอสเฟต (H_2PO_4^-) และ

HPO_4^{2-}) ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สำหรับอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดินทั่วไปนั้นพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 30-50 เปอร์เซ็นต์ ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน (Paul and Clark, 1989) โดยอาจจะมากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ในดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูง (Barber, 1984) และประพิศ (2534) รายงานว่าดินไร้ของประเทศไทยมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสอยู่ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน ซึ่งฟอสฟอรัสรูปนี้จะเป็นประโยชน์ต่อพืชเมื่อถูกปลดปล่อยออกมาโดยจุลินทรีย์ในดิน ดินส่วนใหญ่มีอินทรีย์ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่ไม่ละลายจึงเป็นฟอสฟอรัสที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช ในขณะที่ดินส่วนใหญ่มีแหล่งสำรองของธาตุฟอสฟอรัส แต่ฟอสฟอรัสในแหล่งสำรองนี้คงอยู่ในสภาพที่เป็นประโยชน์น้อยเพราะถูกดินดูดตรึงเอาไว้ และด้วยเหตุที่ฟอสฟอรัสมีปฏิกิริยาทางเคมีมาเกี่ยวข้องกับหลายประการ จึงมีฟอสฟอรัสน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ที่เข้าสู่วัฏจักร พืช สัตว์ ดังนั้นการขาดฟอสฟอรัสจึงเป็นปัญหาที่พบอย่างกว้างขวาง การใส่ปุ๋ยฟอสเฟตจึงจำเป็นเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงปัจจุบัน ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตของกรมวิชาการเกษตรผลิตจากจุลินทรีย์ประเภทเชื้อราในจีนัส *Penicillium sp.* เมื่อเกษตรกรนำไปใช้ได้ผลเป็นพึงพอใจในระดับหนึ่ง ผลิตภัณฑ์ยังมีความจำเพาะเจาะจงกับพืชบางชนิดและยังไม่สามารถใช้ได้อย่างแพร่หลาย ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่มุ่งเน้นให้ได้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดใหม่เพิ่มขึ้นมา โดยพัฒนาให้ได้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในรูปแบบเชื้อผสม เพื่อจะได้นำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น จึงทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมไว้จากโครงการอนุรักษ์จุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรและที่คัดแยกได้ใหม่จากแหล่งของเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการทดลองผลิตให้อยู่ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพต่อไป

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด ในการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้ประโยชน์ด้านปุ๋ยกำลังเป็นที่สนใจของเกษตรกร เพราะประชากรจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบหลักของระบบ ดิน-พืช การที่ประชากรจุลินทรีย์มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์นี้จะมีผลต่อการพัฒนาของพืช ยกตัวอย่างเช่น ผลการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ดินหลายชนิดสามารถละลายไอออนฟอสเฟตจากสารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัส ทำให้ฟอสฟอรัสเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามการใช้กระบวนการที่ จุลินทรีย์เป็นตัวการสำคัญนี้ไปสนับสนุนด้านธาตุอาหารของพืชยังต้องศึกษาเพิ่มเติม เพราะฟอสเฟตไอออนรูปที่ละลายออกมานี้จะถูกดินตรึงไว้อีกครั้งก่อนที่จะถึงผิวรากพืช อย่างไรก็ตามในกรณีของ การใช้หินฟอสเฟตซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสต้นทุนต่ำ พบว่ามีปัญหาของการใช้คือประสิทธิภาพในการใช้ต่ำ ใช้ไม่ได้ผลในดินที่มีค่า pH สูงกว่า 5.5-6 แม้ว่ามีสภาพแวดล้อมอื่นๆเหมาะสม ทำให้ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าพืชได้รับจากปุ๋ยเคมีฟอสเฟตที่ละลายได้อื่นๆ (Khasawneh and Doll, 1979) การใช้หินฟอสเฟตเป็นปุ๋ยโดยตรงจึงไม่แพร่หลาย ได้มีความพยายามหาวิธีการหลายวิธีที่ทำให้ฟอสฟอรัสในหินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นเช่นวิธีการทางเคมี (วิศิษฐ์ และมนูเวทย์, 2520) วิธีทางกายภาพ โดยนำเอาหินฟอสเฟตไปเผาไฟหรือบดให้ละเอียด (ลัดดาวัลย์ และคณะ, 2529) นอกจากนี้พบว่ามี จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถละลายหินฟอสเฟตออกมาเป็นประโยชน์ได้ (Sperber, 1958; Louw and Weble, 1959; Gerretsen, 1984) ดังนั้นการทำให้ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นจากหินฟอสเฟตจากกระบวนการของจุลินทรีย์ จึงเป็นแนวทางที่น่าจะนำไปถึงจุดมุ่งหมายในการทำการเกษตรอย่างยั่งยืนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำเกษตรอินทรีย์ โดยมีรายงานว่าจุลินทรีย์สามารถปลดปล่อยกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆออกมา ทำให้หินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดอินทรีย์โมเลกุลต่ำสามารถเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลายโดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับ chelation และปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน (Fox and Comerford, 1990; Gerkel, 1992) จึงมีการนำเชื้อ

ราเส้นใยมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดอินทรีย์อย่างแพร่หลาย (Matte, 1992; Vassilev and Vassileva, 1992) เฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp. บางสายพันธุ์ โดยมีการศึกษาในระบบหมัก ร่วมกับหินฟอสเฟต หรือโดยการเพาะเชื้อโดยตรงเพื่อให้ไปละลายหินฟอสเฟต (Kucey, 1987; Asea et al,1988; Cerezine et al,1988; Cunningham and Kuiak, 1992)

7. วิธีดำเนินการ

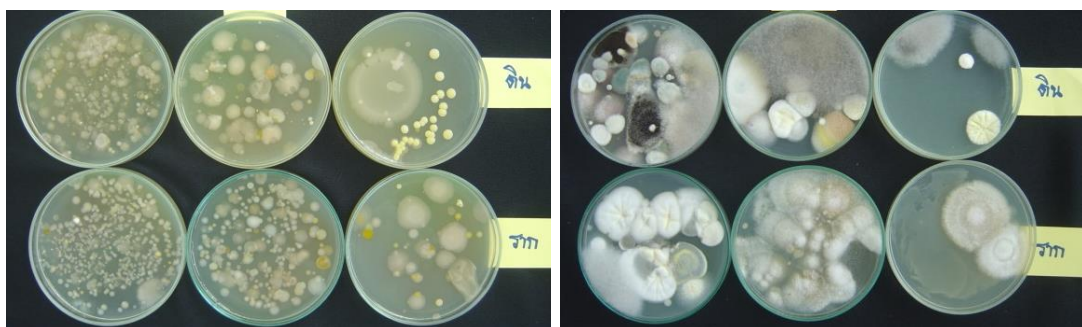
เก็บตัวอย่างดินและรากพืช จากแหล่งที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต วิธีปฏิบัติการทดลอง แบ่งการดำเนินงานออกเป็น 2 ขั้นตอนด้วยกันคือ

1) ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่แยกเลี้ยงเชื้อได้มาจากตัวอย่างดินและพืช ทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตโดยเพาะจุลินทรีย์แบบจุด (Spot inoculation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar medium นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิตู้บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดวงใส (Clear zone) รอบโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ ตามวิธีของ Katznelson and Boss (1959) ร่วมกับการวัดปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาจาก $Ca_3(PO_4)_2$ โดยวิธี Tony's blue method เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายเพื่อการทดลองต่อไป

2) ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการพัฒนาราก โดยทำสารละลายเชื้อแล้วเพาะลงบนเมล็ด/ตาของพืช ตรวจนับจำนวนเมล็ดที่งอกวัดความยาวของราก บันทึกระยะเวลาที่รากงอกภายหลังการเพาะเชื้อ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

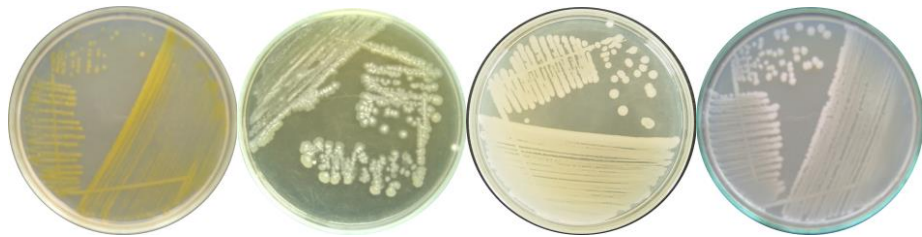
เก็บตัวอย่างดินและรากพืชจากแหล่งที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตอาศัยอยู่ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินและพืชโดยวิธีนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable plate count) จากตัวอย่างดินและรากพืช จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร Nutrient Agar (NA) และ Potato Dextrose Agar (PDA) ได้จุลินทรีย์ประมาณ 2,000 ไอโซเลท



รูปที่ 1 แบคทีเรียที่แยกจากดินและรากพืช

รูปที่ 2 ราที่แยกจากดินและรากพืช

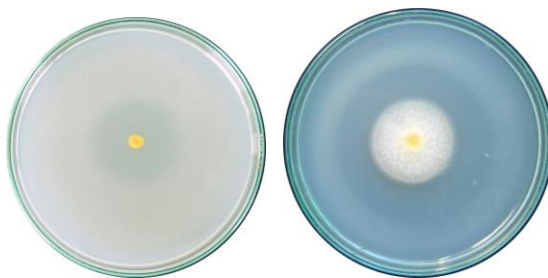
แยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการละลายตะกอน CaHPO_4 ได้จุลินทรีย์จำนวน 228 ไอโซเลท คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลาย CaHPO_4 ที่ระดับ 5 (วงใสมากกว่า 9 มิลลิเมตร) ได้ 8 ไอโซเลท เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ไปวัดปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาจาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ โดยวิธี Tony's blue method โดยใช้หินฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสเฟต พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้สามารถละลายหินฟอสเฟตออกมาได้



รูปที่ 3 แบคทีเรียที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินและรากพืช



รูปที่ 4 ราที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินและรากพืช



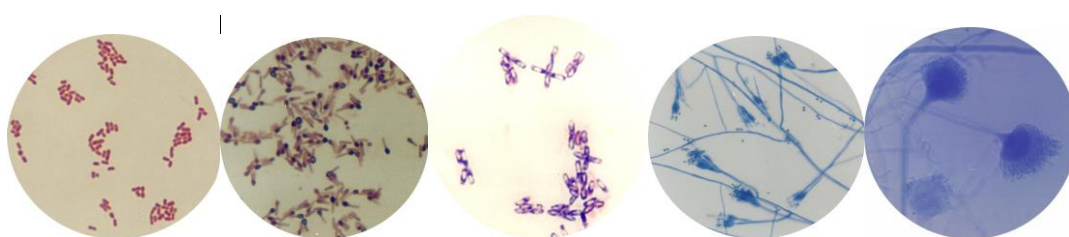
รูปที่ 5 การละลายตะกอน CaHPO_4 ได้วงใสรอบโคโลนี

ตารางที่ 1 ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาจาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต	ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาจาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (mg/kg)	
	แหล่งที่ 1	แหล่งที่ 2
Control	0.698	0.546
RPS 101B	1.476	1.845
RPS 102B	1.676	1.632

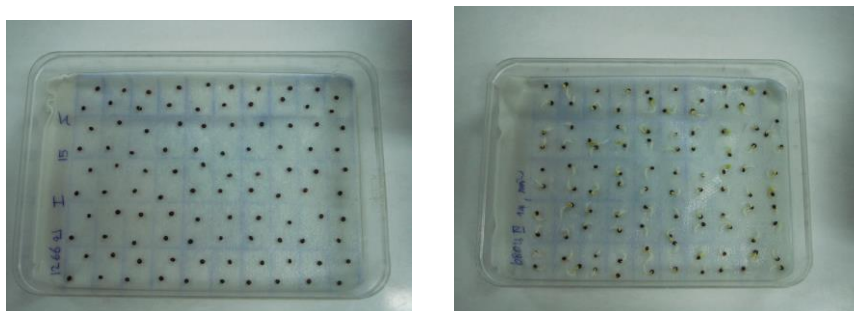
RPS 103B	1.804	1.528
RPS 104B	1.575	1.235
RPS 105B	1.593	1.485
RPS 106F	1.824	1.259
RPS 107F	1.659	1.456
RPS 108F	1.863	1.752

จำแนกเบื้องต้น เป็นแบคทีเรียในจีส Bacillus และ Pseudomonas ราในจีส Penicillium และ Aspergillus ทำการต่อเชื้อและเก็บรักษาเพื่อทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 6 ย้อมสีแกรมจุลินทรีย์เพื่อจำแนกเบื้องต้น

ศึกษาประสิทธิภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตกับพืช ต่อการงอกของเมล็ดพืช โดยใช้เมล็ดพืช 4 ชนิดคือ กะหล่ำปลี ผักกาดขาว คะน้า กวางตุ้ง พบว่าจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ไม่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดพืช ทั้ง 4 ชนิด



รูปที่ 7 ผลของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตต่อการงอกของเมล็ดพืช

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเมื่อเพาะร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย

เมล็ดพืช	เปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืช				
	RPS-101B	RPS-102B	RPS-1033B	RPS-104B	RPS-105B

	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ
พริก	70	75	69	72	79	84	76	74	71	79
ผักบุ้ง	85	82	87	85	87	88	86	88	81	85
กะหล่ำปลี	90	83	94	92	92	92	94	90	92	92
ผักกาดขาว	95	90	85	89	86	86	92	95	89	89
คะน้า	90	90	93	90	88	88	85	95	86	95
กวาดั่ง	89	91	93	89	94	85	93	89	88	87

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพืชเมื่อเพาะร่วมกับเชื้อรา

เมล็ดพืช	เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพืช					
	RPS-106F		RPS-107F		RPS-108F	
	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ
พริก	70	82	79	75	77	69
ผักบุ้ง	85	84	85	86	85	87
กะหล่ำปลี	95	92	90	85	94	94

ผักกาดขาว	90	86	89	89	82	85
คะน้า	89	88	90	86	87	93
กวาดั่ง	90	95	88	79	80	93

9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

คัดแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินและรากพืช จำนวน 150 ตัวอย่าง แยกจุลินทรีย์ได้ประมาณ 2,000 ไอโซเลท ได้จุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน CaHPO_4 จำนวน 228 ไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่คัดแยกได้ โดยการละลายตะกอนแคลเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (CaHPO_4) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับการละลาย คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลาย CaHPO_4 ที่ระดับ 5 (วงใสมากกว่า 9 มิลลิเมตร) ได้ 8 สายพันธุ์ จำแนกเบื้องต้น เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และ *Pseudomonas* ราในจีนัส *Penicillium* และ *Aspergillus* จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกไว้ไม่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดพืช ทำการต่อเชื้อและเก็บรักษาเพื่อการทดลองต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพเบื้องต้นในสภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถนำไปผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง

ลัดดาวัลย์ มีสุข, เพ็ญศรี ชูรวเวช, ยุพิน สรวิสูตร, จันทิรา อริยธัช, เรวดี ดีมาก และภาวนาภู เสมรสุต. 2529.

การเพิ่มประสิทธิภาพของหินฟอสเฟตโดยเฝ้าที่อุณหภูมิต่ำ. วารสารวิชาการเกษตร 4 (1) :17-24.

ประพิศ แสงทอง. 2534. อนินทรีย์และอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดินไร่, วารสารดินและปุ๋ย 13(2): 142-152

วิศิษฐ์ โขลิตกุล และมนูเวทย์ ศรีเสน. 2520. ปุ๋ยฟอสเฟตและโพแทสเซียม. รายงานการสัมมนาทางวิชาการเรื่อง
อุตสาหกรรมปุ๋ยกับการเกษตร หน้า 85-130.

Asea, P.E.A., R.M.N. Kucey and J.W.B. Stewart. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two
Penicillium species in solution culture and soil. *Soil Biol. Biochem* 20: 459-464.

Barber, S.A. 1984. *Soil Nutrient Bioavailability*, John Wiley and Sons. New York.

- Cerezine, P.C., E., Nahas and D.A. Ban Zatto. 1988. Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluoapatite. *Appl Microbiol Biotechnol* 29: 501-505.
- Cunningham J.E. and C. Kuiak. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaji* *Appl Environ Microbiol* 52: 1451-1458.
- Fox, T. and N. Comerford. 1990. Low-molecular weight acids in selected forest soils of the southeastern USA.. *Soil Sci Soc Am J* 54: 1139-1144.
- Gerkel. 1992. Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. *Pflanzenernahr Bodenk.* 155: 339-343.
- Gerretsen, F.C. 1984. The influence of microorganisms on the phosphate uptake by plant. *Plant Soil*, 1: 51-81.
- Katznelson, H. and B. Boss. 1959. Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots: rhizosphere and non-rhizosphere soil. *Can. J. Microbiol.* 5: 79-85.
- Khasawneh, F.E. and E.C. Doll. 1979. The use of phosphate rock for direct application to soils. *Adv. Agron* 30:159-206.
- Kucey, R.M.N. 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilajii* and with mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 55: 2699-2703.
- Louw, H.A. and Weble. 1959. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. *J. Appl. Bacteriol.* 22: 171-196.
- Matte, M. 1992. The production of organic acids. *Rev Biotechnol.* 12: 87-132
- Ozanne, P. G. 1980. *The Role of Phosphorus in Agriculture.* Am.Soc. of Agron. Madison, Wisc.
- Paul, E.A. and F.E. Clark. 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry.* Academic Press, New York.
- Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soli. *Aust.. J. Agriic. Res.* 9: 778-781.
- Vassilev, N. and M. Vassileva. 1992. Production of organic acids by immobilized filamentous fungi. *Mycol Res* 96: 563-570.