รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

กิจกรรม :

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) **การศึกษาการมีชีวิตรอดของพีจีพีอาร์ในวัสดุพาปลอดเชื้อ**

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study on survival of plant growth promoting rhizobacteria in sterile carrier

5. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง

ผู้ร่วมงาน : กัลยกร โปร่งจันทึก ประไพ ทองระอา สุธารัตน์ ประภารัตน์ พันศักดิ์ สุขทัศน์ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

6. บทคัดย่อ

การศึกษาการมีชีวิตรอดของพีจีพีอาร์ในวัสดุพาปลอดเชื้อ ได้ดำเนินการศึกษาเปรียบเทียบการอยู่รอดของเชื้อในกลุ่มพีจีพีอาร์ 2 สกุลในปุ๋ยชีวภาพ ได้แก่ 1) *Azospirillum brasilense* TS29 และ 2) *Burkholderia vietnamensis* S45 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวในประเทศไทย โดยเปรียบเทียบวัสดุพาฆ่าเชื้อ 3 แบบ และอุณหภูมิเก็บรักษา 2 แบบ วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี คือ 1) วัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ เก็บอุณหภูมิห้อง 2) วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อ เก็บอุณหภูมิห้อง 3) วัสดุพาฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา 25 KGy. เก็บอุณหภูมิห้อง 4) วัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 5) วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 6) วัสดุพาฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา 25 KGy. เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเก็บข้อมูลโดยการนับการมีชีวิตรอดของเชื้อดังกล่าวในปุ๋ยชีวภาพด้วยวิธี MPN ผลการทดลองพบว่าการมีชีวิตรอดของ *Azospirillum* ที่เก็บในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อ *Azospirillum* มีชีวิตรอดสูงกว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิอากาศธรรมดาอย่างชัดเจน โดยกรรมวิธีที่ใช้วัสดุพาฉายรังสีแกรมม่า 25 KGy เชื้อรอดสูงที่สุด มีปริมาณสูงกว่ากรรมวิธีไม่นึ่งฆ่าเชื้อและกรรมวิธีนึ่งฆ่าเชื้อ จนถึง 240 วัน การเก็บในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ช่วยทำให้การมีชีวิตรอดของเชื้อ *Azospirillum* ในวัสดุพาทั้งสามแบบเกินเกณฑ์ขั้นต่ำตาม พรบ.ปุ๋ย จนถึง 360 วัน ขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิอากาศธรรมดา ปริมาณเชื้อ *Azospirillum* ลดลงต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำ ตั้งแต่อายุ 90 วัน ขณะที่วัสดุพาที่นึ่งฆ่าเชื้อ มีปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำตั้งแต่อายุ 30 วัน ส่วนเชื้อ *Burkholderia* พบว่าการมีชีวิตของ *Burkholderia* ในปุ๋ยชีวภาพเมื่ออายุ 0 วัน ใกล้เคียงกันทุกกรรมวิธี คือ 10^8 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพสด ผลการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกันพบว่าการเก็บปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่ห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อ *Burkholderia* มี

ชีวิตรอดสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิอากาศอย่างชัดเจน โดยกรรมวิธีที่ใช้วัสดุพาฉายรังสีแกมมา 25 KGy การมีชีวิตรอดของเชื้อดีที่สุด มีปริมาณเชื้อสูงกว่ากรรมวิธีไม่นึ่งฆ่าเชื้อและกรรมวิธีนึ่งฆ่าเชื้อจนถึงอายุการเก็บรักษา 240 วัน โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ช่วยทำให้การมีชีวิตรอดของเชื้อ *Burkholderia* ในวัสดุพาทั้งสามแบบเกินเกณฑ์ขั้นต่ำตาม พรบ.ปุ๋ย จนถึง 240 วัน ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิอากาศมีปริมาณเซลล์ลดลงเร็วกว่าและทำให้เชื้อ *Burkholderia* มีปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำตั้งแต่ 30 วัน ขณะที่กรรมวิธีที่วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อและฉายรังสี มีปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำตั้งแต่อายุเก็บรักษาครบ 150 วัน

ผลผลิตจากการทดลองนี้ทำให้ได้เทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบปลอดเชื้อที่สามารถยืดอายุการเก็บเชื้อได้นานกว่าเดิม 2 สกุล คือ *Azospirillum* และ *Burkholderia* อย่างน้อย 1 เทคโนโลยี เพื่อนำไปแก้ปัญหาการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ให้สามารถพัฒนาการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม ให้ได้ตามเกณฑ์ขั้นต่ำที่กำหนดใน พรบ.ปุ๋ย ต่อไป

Abstract

Study on survival of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sterile carrier biofertilizer was conducted for study the survival of rhizobacteria 2 genera. First was *Azospirillum brasilense* TS29 and second was *Burkholderia vietnamensis* S45 which were isolated from rice in Thailand. The experimental design was in RCBD in 4 replications, 6 treatments. The carrier sterilized treatments and kept condition were 1) non-sterile kept at air temperature, 2) autoclave kept at air temperature, 3) sterilized by gamma irradiation 25 KGy kept at air temperature 4) non-sterile kept at cooling room at 25 °C, 5) autoclave kept at kept at cooling room at 25 °C, 3) sterilized by gamma irradiation 25 KGy kept at cooling room at 25 °C. The survival of *Azospirillum* and *Burkholederia* were enumerated at every 30 days by serial dilution and MPN method. The result showed that the survival of *Azospirillum* and *Burkholderia* kept at air condition room 25 °C, the survival cell was higher significant different with treatment that kept at air temperature room. Which kept at air temperature room treatment for *Azospirillum* the survival below the fertilizer act limit at 90 days and *Burkholderia* at 30 days. Effect of sterilized carrier by gamma ray 25 KGy was significant different from non-sterilized carrier. It was extended the survival of Azospirillum and Burkholderia to 240 days. However, the 25 KGy sterilized carrier and kept at 25 °C air condition room was the best technic for PGPR biofertilizer production due to extended survival of *Azospirillum* and *Burkholederia* over the minimum population limited by fertilizer act 10^6 CFU/g biofertilizer for 360 and 240 days respectively. The output of this experiment

discovered the sterile carrier technic and preserve condition for production of PGPR biofertilizer from *Azospirillum* and *Burkholederia* 1 technology for sole limiting of biofertilizer production in factory scale to pass control system of fertilizer act in Thailand.

7. คำนำ

ปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เป็นปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ทั้งบริเวณดินรอบๆราก ผิวราก ภายในราก ต้นและใบพืช โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้ด้วยการสร้างธาตุอาหารหรือเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชบางชนิด (Sessitsch at al. 2002; Sturz et al. 2000; Jacoud et al. 1999; Meunchang et al. 2004) มีแบคทีเรียหลายชนิดที่พบว่าอาศัยอยู่ใน ดิน ราก และต้น โดยประโยชน์ที่สำคัญของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ที่อาศัยอยู่รอบๆรากพืชเหล่านี้ คือ การตรึงไนโตรเจน (Boddy *et al.*, 1995; Meunchang *et al.*, 2004) ผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid (IAA) (Meunchang *et al.*, 2004) ช่วยให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้นมีผลช่วยให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (Jacoud *et al*. 1999) และยังช่วยให้อนุภาคดินจับกันเป็นเม็ดดินที่สมบูรณ์ จึงช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดิน และลดการศักยภาพการพังทลายของดิน

ปัจจุบันได้มีความสนใจศึกษาประโยชน์ของแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณรอบๆรากพืชเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพบว่ามีศักย ภาพในการนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ (Diem. 1978; Bashan and Levanony 1990) โดยทั่วไปประสิทธิภาพในการใช้ปุ๋ยชีวภาพแต่ละพื้นที่นั้นมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สกุลและสายพันธุ์แบคทีเรีย ชนิดของพืช สมบัติของดิน ประชากรจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ และเงื่อนไขทางสภาพแวดล้อม เช่น ความชื้นในดิน โดยทั่วไปหลังการใส่ปุ๋ยชีวภาพปริมาณแบคทีเรียจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากความไม่สม่ำเสมอของสภาพแวดล้อมซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ จึงมักพบว่าผลการทดลองในสภาพปลอดเชื้อกับในสภาพธรรมชาติมักมีความแตกต่างกันมาก (Bashan and Levanony, 1988)

การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Azospirillum brasilense* TS29 และ *Burkholderia viertnamensis* S45 ในวัสดุพาปลอดเชื้ออื่นๆปนเปื้อนและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษา เพื่อรักษาปริมาณการอยูรอดของเชื้อทังสองสกุลในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ข้าวที่กรมวิชาการเกษตรพัฒนาขึ้นให้สามารถผลิตเชิงอุตสาหกรรมได้อย่างถูกต้องตามกฎหมาย

8. วิธีการดำเนินงาน

- อุปกรณ์

1. เชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทู (ข้าว) 2 สกุล คือ *Azospirillum brasilense* TS29 และ *Burkholderia viertnamensis* S45
2. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
3. สารเคมีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 2 สกุล,

4. วัสดุพา ปุ๋ยหมักเปลือกไม้ผสมดินเหนียวชุดองค์รักษ์บดละเอียดผ่านตะแกรง 0.50 มิลลิเมตร

5. เครื่องฉายรังสี แกมมา และอิเลคตรอนบีม โดยความร่วมมือจากสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียแห่งชาติ (องค์กรมหาชน)

6. ห้องเก็บเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

-วิธีการ

กรรมวิธีการทดลอง

แผนการทดลอง เป็นการศึกษาเปรียบเทียบการอยู่รอดของพีจีพีอาร์ทั้ง 2 สกุล ในวัสดุพาฆ่าเชื้อ 3 แบบ และอุณหภูมิเก็บรักษา 2 แบบ รวมทั้งสิ้น 6 กรรมวิธี แต่ละวิธีทำ 4 ซ้ำ โดยเก็บรักษาตั้งแต่ 0-360 วัน

กรรมวิธีที่ 1. วัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ เก็บอุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 2. วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อ เก็บอุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 3. วัสดุพาฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา 25 KGy. เก็บอุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 4. วัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 5. วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 6. วัสดุพาฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา 25 KGy. เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การเตรียมวัสดุพา ใช้ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผ่านตะแกรง 0.5 มิลลิเมตร ผสมกับดินชุดองค์รักษ์บดละเอียดเช่นเดียวกัน สัดส่วน 3:1 โดยน้ำหนัก ชั่งแบ่งใส่ถุงพลาสติก โพลีโพรไพรีน (PP) โดยบรรจุวัสดุถุงละ 150 กรัม ซีนปิดปากถุงให้มิดชิดไม่มีรอยรั่ว

2. แบ่งเป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 สำหรับกรรมวิธีที่ไม่ฆ่าเชื้อ ชุดที่ 2 นึ่งฆ่าเชื้อ และชุดที่ 3 ฉายรังสีด้วยแกมมา 25 KGy.

3. เพาะขยายเชื้อทั้ง 2 สกุลเพาะขยายในอาหารเหลว Nfb เหลว Dobeireiner. (1995) ใส่ yeast extract 1 กรัมต่อลิตร ใช้หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ใช้ถังเพาะเชื้อขนาด 2 ลิตร .ใส่อาหารเหลว 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อเหลว 3.1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิตร

4. ฉีดเชื้อใส่ถุงวัสดุพาจากข้อ 2 โดยการใส่เชื้อเหลวจากข้อ 3 เชื้อละ 1 ถุงๆละ 50 มิลลิลิตร เพื่อให้ความชื้นภายในถุงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังนั้นจะได้ ตัวอย่างทดลองแยกเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 เชื้อ Azospirillum 24 ถุง ชุดที่ 2 เชื้อ Burkholderia 24 ถุง ตามลำดับ

5. แยกเก็บรักษาเป็น 2 แบบ คือ กรรมวิธีที่ 1 เก็บที่อุณหภูมิห้องที่มีอุณหภูมิเท่าอากาศภายนอก กรรมวิธีที่ 2 เก็บที่ห้องแอร์ติดเครื่องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ($\pm$ 2 องศาเซลเซียส) ตลอด 24 ชั่วโมง

6. การศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อทั้ง 2 สกุล ดำเนินการนับการมีชีวิตรอด Azospirillum ตั้งแต่ 0-360 และ Burkholederia ตั้งแต่ 0-240 วัน โดย Azospirillum นับด้วยวิธี MPN โดยใช้อาหาร N-free semisolid medium สูตร Dobeireiner. (1980). ส่วน Burkholederia นับโดยวิธี plate count โดย

ใช้อาหาร SRSM ชนิดแข็งใส่ Ca_3PO_4 เป็นแหล่งฟอสเฟต บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ห้องนาน 3 วัน ตรวจนับและคำนวณปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดในวัสดุพาแต่ละชนิดและการเก้บรักษา

7. เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในแต่ละช่วงอายุการเก็บรักษาด้วยการใช้กราฟเส้น

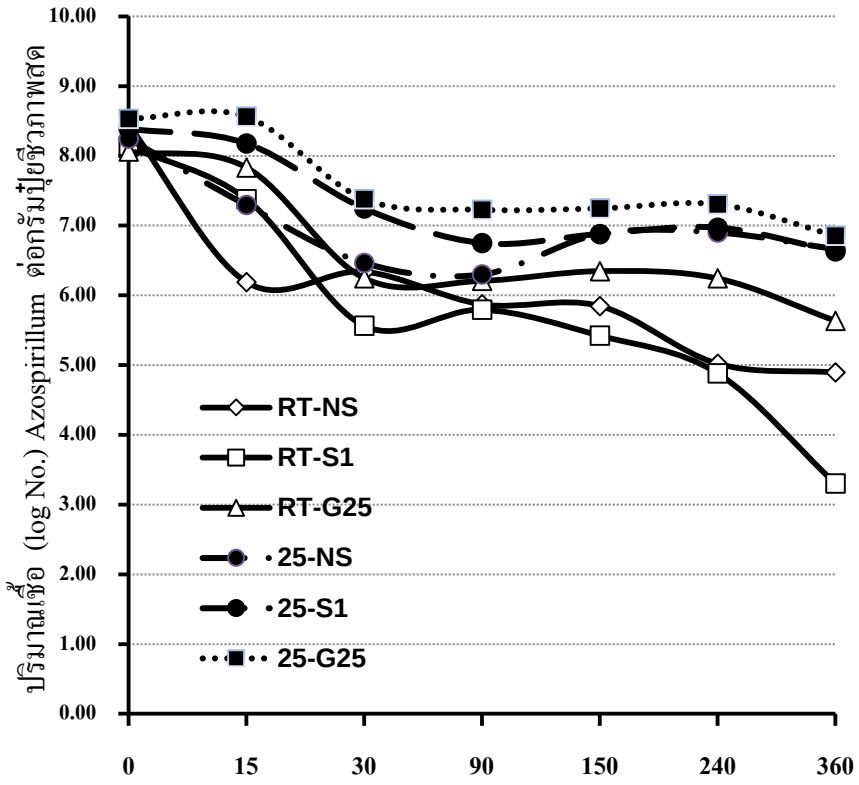
- **ระยะเวลาดำเนินการ** ปีที่เริ่มต้น (เดือน/ปี) 2556-2558
  กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
  กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. **ผลการทดลองและวิจารณ์**

การมีชีวิตรอดของ *Azospirillum brasilense* TS29

ผลการทดลองศึกษาการมีชีวิตรอดของ Azospirillum ในวัสดุพาปลอดเชื้อ เป็นการศึกษาการมีชีวิตรอดของ Azospirillum ในวัสดุพาและการเก็บรักษาในรูปแบบต่างๆ ผลการทดลองพบว่า ในช่วงเริ่มต้น อายุ 0 วัน การใส่เชื้อ Azospirillum เริ่มต้นมีปริมาณการมีชีวิตรอดของเชื้อในวัสดุพาทุกชนิดใกล้เคียงกัน คือ 10^8 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สด เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อ Azospirillum มีชีวิตรอดสูงกว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องธรรมดาอย่างชัดเจน โดยกรรมวิธีที่ใช้วัสดุพาฉายรังสีแกรมม่า 25 KGy ทำให้การมีชีวิตรอดของเชื้อดีที่สุด มีปริมาณเชื้อสูงกว่ากรรมวิธีไม่นึ่งฆ่าเชื้อและกรรมวิธีนึ่งฆ่าเชื้อ จนถึงอายุการเก็บรักษา 240 วัน อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ช่วยทำให้การมีชีวิตรอดของเชื้อ Azospirillum ในวัสดุพาทั้งสามแบบเกินเกณฑ์ขั้นต่ำตาม พรบ.ปุ๋ย(ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 จนถึง 360 วัน ซึ่งปริมาณเชื้อยังสูงกว่า 1×10^6 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สด ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิอากาศธรรมดา ปริมาณเซลล์ Azospirillum จะลดลงเร็วกว่า โดยทำให้เชื้อมีปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำตั้งแต่ 90 วัน ขณะที่วัสดุพาที่นึ่งฆ่าเชื้อ มีปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำตั้งแต่อายุ 30 วัน และกรรมวิธีที่ใช้วัสดุพาฉายรังสีแกรมม่า ปริมาณเชื้อสูงกว่าทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมาแล้ว โดยปริมาณเชื้อเริ่มต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำ เมื่อเก็บรักษาครบ 360 วัน (ภาพ 1)

ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นผลของการเก็บรักษาและการฆ่าเชื้อในวัสดุพาปลอดเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ ด้วยการฉายรังสีแกรมม่า 25 KGy ซึ่งปรากฏว่าเชื้อที่ใส่ในวัสดุพาฉายรังสีแกรมม่าและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเชื้อที่มีชีวิตรอดนานกว่าเชื้อที่ผลิตและเก็บรักษารูปแบบอื่นๆ อาจเป็นเพราะการมีเชื้อปนเปื้อนร่วมกับสภาพอุณหภูมิห้องซึ่งเท่าอุณภูมิอากาศภายนอก กิจกรรมของเชื้อในธรรมชาติที่ปนเปื้อนในวัสดุพามีผลกระทบต่อการอยู่รอดของเชื้อ Azospirillum เป้าหมายที่ใส่เพื่อให้เป็นหัวเชื้อในปุ๋ยชีวภาพ ทั้งการแย่งอาหารและผลิตสารยับยั้งการเจริญและมีชีวิตรอด ผลลัพธ์จากการทดลองนี้ทำให้ได้วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ปลอดเชื้ออื่นๆ 1 วิธี และวิธีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ข้าวให้ได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดใน พรบ.ปุ๋ย ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 ต่อไป

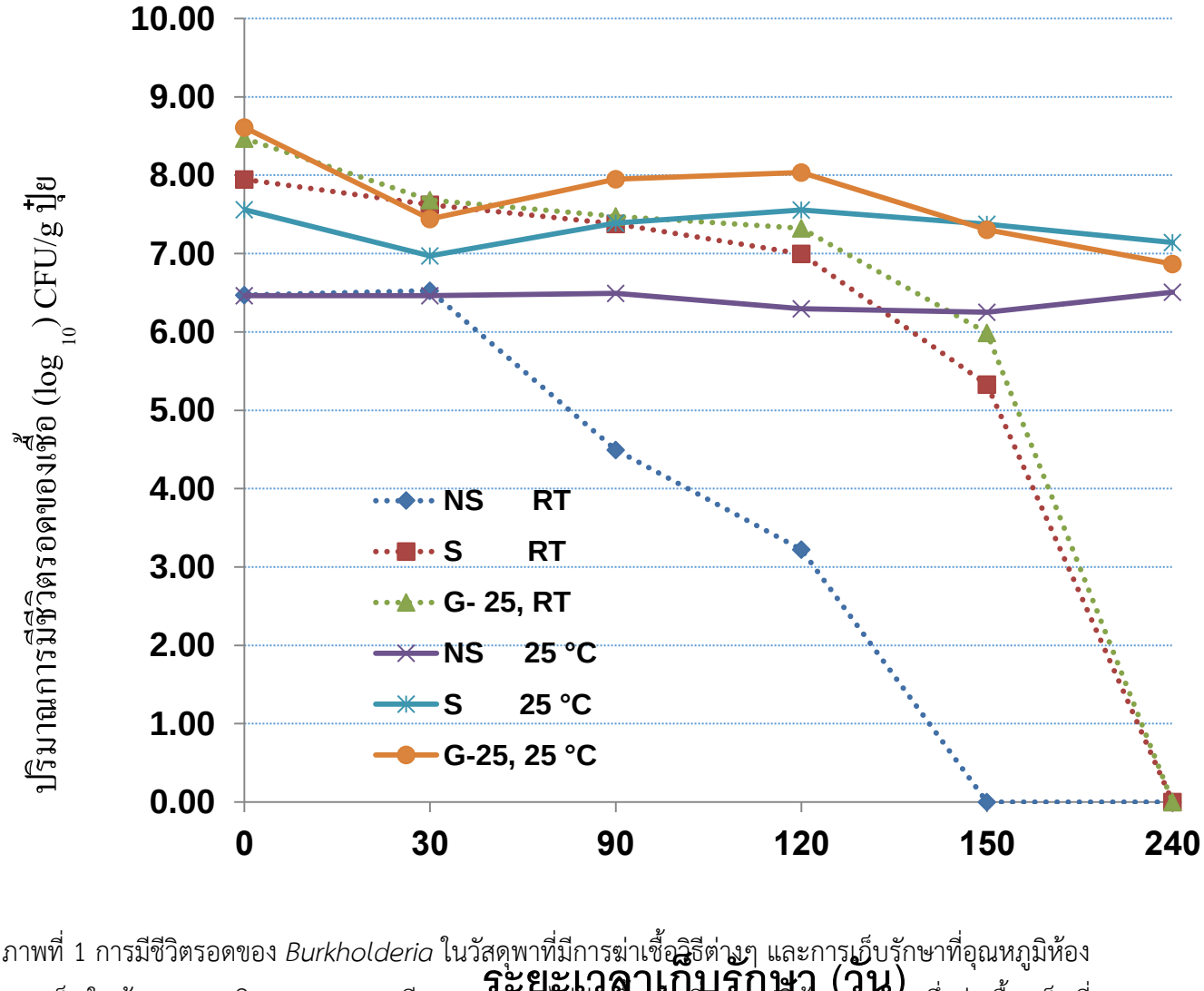


ภาพที่ 1 การมีชีวิตรอดของ *Azospirillum* ในวัสดุพาปลอดเชื้อ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน) และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และเก็บในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (RT- NS ไม่ฆ่าเชื้อเก็บที่อุณหภูมิห้อง RT-S1 นึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง RT-G25 ฆ่าเชื้อด้วยแกรมม่า 25 KGy เก็บที่อุณหภูมิห้อง 25-NS ไม่ฆ่าเชื้อเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส 25-S1 นึ่งฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส 25-G25 ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกรมม่า 25 KGy เก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส) ตั้งแต่ 0-360 วัน

การมีชีวิตรอดของ *Burkholderia vietnamensis* S45

ผลศึกษาการมีชีวิตรอดของ *Burkholderia* ในวัสดุพาปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Burkholderia* ในวัสดุพาและวิธีการเก็บรักษาในรูปแบบต่างๆในช่วงอายุการเก็บรักษาตั้งแต่ 0-240 วัน ผลการทดลองพบว่า ในช่วงเริ่มต้น อายุ 0 วัน การใส่เชื้อ *Burkholderia* เริ่มต้นทำให้ปริมาณการมีชีวิตรอดของเชื้อในวัสดุพาทุกชนิดใกล้เคียงกัน คือ 10^8 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพสด เมื่อนำเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อ *Burkholderia* มีชีวิตรอดสูงกว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องอุณหภูมิเท่าอุณหภูมของอากาศภายนอกอย่างชัดเจน โดยกรรมวิธีที่ใช้วัสดุพาฉายรังสีแกมมา 25 KGy ทำให้การมีชีวิตรอดของเชื้อดีที่สุด มีปริมาณเชื้อสูงกว่ากรรมวิธีไม่นึ่งฆ่าเชื้อและกรรมวิธีนึ่งฆ่าเชื้อจนถึงอายุการเก็บรักษา 240 วัน อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ช่วยทำให้การมีชีวิตรอดของเชื้อ *Burkholderia* ในวัสดุพาทั้งสามแบบเกินเกณฑ์ขั้นต่ำตาม พรบ.ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 จนถึง 240 วัน โดยปริมาณเชื้อยังมากกว่า 1×10^6 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยสด ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณ

เซลล์จะลดลงเร็วกว่า โดยทำให้เชื้อ *Burkholderia* มีปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำตั้งแต่ 30 วันในกรรมวิธีวัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ขณะที่กรรมวิธีที่วัสดุพานึ่งฆ่าเชื้อและฉายรังสี มีปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำตั้งแต่อายุ 150 วัน (ภาพ 1) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นผลของการเก็บรักษาและการฆ่าเชื้อในวัสดุพาปลอดเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ ด้วยการฉายรังสีแกมมา 25 KGy ซึ่งปรากฏว่าเชื้อที่ใส่ในวัสดุพาฉายรังสีแกมมาและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเชื้อที่มีชีวิตรอดนานกว่าเชื้อที่ผลิตและเก็บรักษารูปแบบอื่นๆ ทำให้ได้วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ปลอดเชื้อจากเชื้อ *Burkholderia* อีก 1 ชนิด และได้วิธีการเก็บรักษาในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพให้ได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดใน พรบ.ปุ๋ย ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 เชิงอุตสาหกรรมต่อไป



ภาพที่ 1 การมีชีวิตรอดของ *Burkholderia* ในวัสดุพาที่มีการฆ่าเชื้อวิธีต่างๆ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและเก็บในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (NS RT) ไม่ฆ่าเชื้อเก็บที่อุณหภูมิห้อง (S RT) นึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง (G25 RT) ฆ่าเชื้อด้วยแกมมา 25 KGy เก็บที่อุณหภูมิห้อง (NS RT) ไม่ฆ่าเชื้อเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส (NS 25°C) นึ่งฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส (S 25°C) ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา 25 KGy เก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส (G25 25°C) ตั้งแต่ 0-240 วัน

8. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ:

ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นผลของการเก็บรักษาและการฆ่าเชื้อในวัสดุพาปลอดเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ ด้วยการฉายรังสีแกมมา 25 KGy ซึ่งปรากฏว่าเชื้อที่ใส่ในวัสดุพาฉายรังสีแกมมาและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเชื้อที่มีชีวิตรอดนานกว่าเชื้อที่ผลิตและเก็บรักษารูปแบบอื่นๆ ทำให้ได้วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ปลอดเชื้อจากเชื้อ *Burkholderia* อีก 1 ชนิด และได้วิธีการเก็บรักษาในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพให้ได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดใน พรบ.ปุ๋ย ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 ต่อไป

9. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสนับสนุนการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ข้าวเชิงอุตสาหกรรม โดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ให้ธาตุอาหารพืชเพิ่มเติมได้เพียงบางส่วน ดังนั้นการนำไปใช้ประโยชน์เกษตรกรต้องใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีในปริมาณที่เหมาะสม ก็จะทำให้ได้ผลผลิตที่ดีและมีรายได้เหมาะสม

10. **เอกสารอ้างอิง**

Bashan, Y, and H. Levanony. 1988. Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. J.Gen. Microbiol. 134: 1811-1820

Bashan, Y, and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36, 591-608.

Boddey RM, de Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FL, Baldani VLD, J Döbereiner .1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. Plant Soil 174:195–209

Diem, G. 1978. Colonization of rice roots by diazotroph bacteria. In Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria. Edited by U.Granhall. Ecol. Bull. (Stockholm) 26, 305-311.

Dobereiner J, Baldani VLD, VM Reis. 1995. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non Leguminous crops. In: Fendrik J, del Gallo M, Vanderleyden J, deZamaroczy M (eds) Azospirillum VI and related micro-organisms. Springer-Verland, Berlin, pp 3–14

Döbereiner J, Pimentel JP, Olivares FL, S Urquiaga. 1990. Bactérias diazotróficas podem ser endofíticas ou fitopato-gênicas? An Acad Bras Cienc 62:319

Jacoud. C. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. Can. J. Microbiol. 45, 339-342.

Meunchang, S., Panichsakpatana, S., Ando, S., Yokoyama, T. 2004. Phylogenetic and physiological characterization of indigenous *Azospirillum* isolates in Thailand. Soil Sci. plant Nutr., 50 (3), 413-421

Sessitsch A, Howieson JG, Perret X, Antoun H, Martínez-Romero E. 2002. Advances in rhizobium research. Crit Ver Plant Sci 21:323–378

Sturz AV, Christie BR, Nowak J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of Crop production. CRC Crit Rev Plant Sci 19:1–30