รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด ปี 2558

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในการจัดการดิน

กิจกรรมย่อย : การพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การทดลองที่ 2.5.1 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณประสิทธิภาพและการจำแนกสกุลและชนิดของปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Research and development of method to analyze quality of phosphate solubilizing bio fertilizer.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นายอธิปัตย์ คลังบุญครอง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	: นางสุปรานี มั่นหมาย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	: นางภาวนา ลิกขนานนท์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

ศึกษาวิธีการตรวจนับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ต่างกัน 4 ตัวอย่าง จากการใช้ diluent แตกต่างกัน พบว่า diluent ที่เหมาะสมคือ น้ำเกลือ ที่ระยะเวลา 10 นาที เหมาะสำหรับตรวจนับ *Bacillus sp.* และ diluent คือ น้ำกลั่น ที่ระยะเวลา 5 นาที สำหรับตรวจนับ *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.* เมื่อศึกษาการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ในการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้แก่ GMBA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *Bacillus sp.* อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *Lactobacillus sp.* และอาหารเลี้ยงเชื้อ NA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.* การศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตสามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya medium เพื่อศึกษาการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

Abstract

Plate counting parameters were studied for 4 phosphate solubilizing microorganism from phosphate solubilizing biofertilizers. The proper diluent for plate counting of *Bacillus sp.* was normal saline for 10 minute and 5 minute of distilled water was the proper diluent for plate

counting of *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* and *Pantoea sp.* The effect of mediums for plate counting of phosphate solubilizing microorganism were studied, the results showed that the proper medium for *Bacillus sp. Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* and *Pantoea sp.* were GMBA, PCA respectively and NA for *Pseudomonas sp.* and *Pantoea sp.* The phosphate solubilizing were investigated with Pikovskaya medium.

6. คำนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่สำคัญของพืช โดยพืชสามารถดูดฟอสเฟตทางรากในรูปของ $H_2PO_4^-$ และ HPO_4^{-2} แต่ในดินที่แตกต่างกันจะเกิดการตรึงฟอสเฟตในรูปแบบต่างๆ ทำให้พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ในดินกรด HPO_4^{-2} จะถูกตรึงในรูปของ $Al(OH)_2$ H_2PO_4 ซึ่งละลายน้ำยาก ในดินด่าง $H_2PO_4^-$ จะถูกตรึงในรูปของ $Ca_3(PO_4)_2$ ในสารละลายดินหรือคอลลอยด์ของแร่ดินเหนียว ฟอสเฟตจะแลกเปลี่ยนกับ hydroxyl group (OH^-) ของดินเหนียว หรือแลกเปลี่ยนกับแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ ที่ดูดยึดอยู่ที่ผิวของอนุภาคดินเหนียว ตลอดจนถูกดูดซับอยู่ตามผิวของอนุภาคดินเหนียวที่ยังมีประจุบวกค้างอยู่ การตรึงฟอสฟอรัสรูปแบบต่างๆ เหล่านี้ทำให้พืชขาดธาตุฟอสฟอรัส เนื่องจากไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เพราะอยู่ในรูปฟอสฟอรัสอนินทรีย์ (ธงชัย, 2550) จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต สามารถเปลี่ยนรูปของฟอสฟอรัสที่พืชใช้ไม่ได้ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถใช้ได้ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มฟอสฟอรัสให้แก่พืช ช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น Sundara *et al*. (2002) ใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต *Bacillus megatherium var. Phosphaticum* 10 kg/ha ในการเพิ่มผลผลิตอ้อย พบว่าฟอสฟอรัสที่พืชนำไปใช้ได้ และปริมาณจุลินทรีย์ที่ใส่ลงไปมีค่าเพิ่มสูงขึ้นบริเวณรอบรากอ้อย ส่งผลให้ผลผลิตอ้อยเพิ่มสูงขึ้น 12.6% เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใส่เชื้อ และช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมีฟอสเฟตลงได้ถึง 25%

จากประโยชน์ที่กล่าวมาของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ทำให้การตรวจสอบคุณภาพของปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตเป็นสิ่งจำเป็น เพราะจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในปุ๋ยชีวภาพอาจมีปริมาณและกิจกรรมละลายฟอสเฟตที่คงทนยาวนาน หรือปริมาณลดลงเมื่อผ่านขั้นตอนการขนส่ง เก็บรักษา จนปริมาณไม่เพียงพอการใช้งาน หรืออาจสูญเสียความสามารถในการละลายฟอสเฟตไป จนไม่สามารถละลายฟอสเฟตให้แก่พืชได้เพียงพอ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีชีวิต และกิจกรรมการละลายฟอสเฟต ให้สามารถเจริญและแสดงกิจกรรมให้ปรากฏจึงมีความจำเป็นมาก การคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เหมาะสม จะช่วยให้ขั้นตอนนี้มีประสิทธิภาพมากขึ้น Amit *et al* (2012) ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต 5 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PVK, AYG, NBRIY และ NBRIP ซึ่งความแตกต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้ความสามารถในการละลายฟอสเฟตมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้แหล่งของไนโตรเจน คาร์บอน ฟอสฟอรัส ตลอดจนอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ล้วนส่งผลต่อความสามารถในการละลายฟอสเฟต Sapsirisopa *et al*. (2009) พบว่าในสภาพเกลือสูง *Bacillus megaterium* A12ag ยังคงส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวได้ดี แสดงให้เห็นถึงลักษณะพิเศษที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเครียดจากเกลือ ซึ่งจุลินทรีย์อื่นๆ จะมีกิจกรรมที่ลดลง นอกจากนี้การใช้ diluent ที่เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ จะช่วยให้การตรวจนับมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น King and Hurst (1963) ศึกษาการใช้ diluent ที่เหมาะสมกับแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ พบว่า 0.1% (w/v) peptone solution มีความเหมาะสมมากที่สุด ในขณะที่ Tap water ที่มีส่วนประกอบของ 0.1% (w/v) sodium thiosulphate ก็ให้ผลที่ดี แต่ tap water, tap water ที่ผ่าน charcoal, quarter-strength Ringer's solution, 0.85% (w/v) sodium chloride solution และ glass distilled water สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ Thampuran (1985) ทดสอบ diluent สำหรับตรวจปริมาณจุลินทรีย์จากเนื้อปลาแช่แข็ง ได้แก่ distilled water, seawater, normal saline (85%w/v NaCl), phosphate buffer, peptone water (1%) และ Ringer's solution พบว่า normal saline และ phosphate buffer เหมาะสมสำหรับตรวจนับจุลินทรีย์จากตัวอย่างปลาแช่แข็ง ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และ

diluent จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพราะตรวจสอบการคงอยู่ของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตด้วยเช่นกัน

เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เจริญได้แล้วนั้น การตรวจความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้อย่างรวดเร็วและง่ายต่อการปฏิบัติงานเป็นขั้นตอนต่อไปที่มีความจำเป็น Edi-Premono *et al*. (1996) ใช้ค่า Solubilization Index (SI) เพื่อศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas putida* ซึ่งมีความง่ายต่อการปฏิบัติงานและตรวจการมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้แม่นยำ Buddhi and Min-Ho (2013) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต PSB-1, PAB-5, PSB-8, PSB-13 และ PSB-15 ด้วยค่า Solubilization Index ณ ระยะเวลาต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท มีค่า Solubilization Index ณ เวลาต่างกัน จึงต้องมีการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจ นอกจากนี้ยังศึกษาการมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทสของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต พบว่าการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทสที่สูงในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงจำทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่กิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูง จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทสต่ำ ดังนั้นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทสของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจึงเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อการศึกษา

7.วิธีดำเนินการ

1. ศึกษา diluent ที่เหมาะสมต่อการตรวจนับจุลินทรีย์ โดยใช้ diluent ได้แก่ น้ำกลั่น, น้ำเกลือ (0.85% NaCl), น้ำเปปโตน (1%) และ 1M $MgSO_4$ มาทดสอบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต 4 ชนิด คือ ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus sp., Lactobacillus sp, Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp*. คัดเลือก diluent ที่เหมาะสมต่อปุ๋ยชีวภาพแต่ละชนิด

2. ศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการตรวจนับจุลินทรีย์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ดังนี้ ชีวภาพตัวอย่างที่ 1 ระบุเป็น *Bacillus sp.* ดังนั้นจึงกำหนดอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการแยก และนับปริมาณแบคทีเรียในสกุล Bacillus คือ Nutrient Agar (NA), Nutrient Agar+ NaCl (NAS), Plate count Agar (PCA), Luria Agar (LA) และ Glucose mineral base agar (GMBA)

ปุ๋ยชีวภาพตัวอย่างที่ 2 ระบุเป็น ชนิด *Lactobacillus spp.* จึงกำหนดอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการแยกและนับปริมาณจุลินทรีย์ คือ Nutrient Agar (NA), Nutrient Agar+ NaCl (NAS), Plate count Agar (PCA), MRS (de Man, Rogosa Sharpe) Luria Agar (LA) และ Glucose mineral base agar (GMBA)

ปุ๋ยชีวภาพตัวอย่างที่ 3 ระบุเป็น ชนิด *Pseudomonas sp.* และปุ๋ยชีวภาพตัวอย่างที่ 4 ระบุเป็น ชนิด *Pantoea sp.* จึงกำหนดอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการแยก และนับปริมาณจุลินทรีย์ คือ Nutrient Agar (NA), Plate count Agar (PCA) และ Luria Agar (LA)

3. ศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ด้วยค่า Solubilization Index (SI : SI = (เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส+เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี)/เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี) โดยการทำ spot

inoculation เชื้อจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ pikovskaya medium ตรวจผลที่ระยะเวลา 1 3 5 7 9 11 13 และ 15 วัน และศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ฟอสฟาเทส โดยศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ที่ทราบความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง เพื่อใช้ในการตรวจปริมาณเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตผลิตได้ โดยการถ่ายเอนไซม์ลงในบัฟเฟอร์ที่มี p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP) จากนั้นตรวจสอบการเปลี่ยน p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP) เป็น p-nitrophenol ของเอนไซม์ alkaline phosphatase ด้วยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาผลของ diluent ต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตพบว่าได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 1 ผลของ diluent ต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Bacillus sp.* ณ เวลาต่างๆ

Diluent	ระยะเวลา (นาที)		
	2 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่น	3.6×10^{8}	3.2×10^{8}	4.3×10^{8}
น้ำเกลือ 0.85%	4.7×10^{8}	5.2×10^{8}	6×10^{8}
น้ำเปปโตน 1%	5.8×10^{8}	5.4×10^{8}	6.3×10^{8}
1M MgSO4	2.2×10^{8}	3.4×10^{8}	5.5×10^{8}

ตารางที่ 2 ผลของ diluent ต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Lactobacillus sp.* ณ เวลาต่างๆ

Diluent	ระยะเวลา (นาที)		
	2 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่น	3.5×10^{8}	6.2×10^{8}	6.5×10^{8}
น้ำเกลือ 0.85%	1.6×10^{8}	5.8×10^{8}	5.9×10^{8}
น้ำเปปโตน 1%	1.7×10^{8}	5.9×10^{8}	6.1×10^{8}
1M MgSO4	3.3×10^{8}	4.1×10^{8}	4.9×10^{8}

ตารางที่ 3 ผลของ diluent ต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Pseudomonas sp.* ณ เวลาต่างๆ

Diluent	ระยะเวลา (นาที)

	2 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่น	2.9×10^{8}	4.7×10^{8}	4.9×10^{8}
น้ำเกลือ 0.85%	1.4×10^{8}	5.1×10^{8}	4.8×10^{8}
น้ำเปปโตน 1%	2.8×10^{8}	4.6×10^{8}	4.9×10^{8}
1M MgSO4	1.1×10^{8}	4.3×10^{8}	4.4×10^{8}

ตารางที่ 4 ผลของ diluent ต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Pantoea sp.* ณ เวลาต่างๆ

Diluent	ระยะเวลา (นาที)		
	2 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่น	1.1×10^{8}	6.3×10^{8}	6.6×10^{8}
น้ำเกลือ 0.85%	1.7×10^{8}	5.9×10^{8}	6.1×10^{8}
น้ำเปปโตน 1%	1.9×10^{8}	4.7×10^{8}	4.6×10^{8}
1M MgSO4	3.4×10^{8}	4.6×10^{8}	4.2×10^{8}

จากผลการทดลองพบว่าการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *Bacillus sp.* การใช้น้ำเกลือและน้ำเปปโตนเป็น diluent ที่ระยะเวลา 10 นาที มีความเหมาะสม เพราะสามารถตรวจนับจุลินทรีย์ได้สูงกว่า diluent อื่น และระยะเวลาอื่นๆ ในขณะที่การตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตจากจุลินทรีย์ *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.* พบว่าที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที ปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจนับได้ ไม่เพิ่มขึ้นมากนัก โดยมีเพียง 1 M $MgSO_4$ ที่ตรวจนับจุลินทรีย์ได้น้อยกว่า diluent อื่นๆ เล็กน้อย ดังนั้นสำหรับ *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.* จึงสามารถเลือกใช้ diluent คือ น้ำกลั่น น้ำเกลือและน้ำเปปโตน ที่ระยะเวลา 5 นาที เป็น diluent ที่เหมาะสมได้ จากขั้นตอนนี้จึงเลือกใช้ diluent คือ น้ำเกลือ ที่ระยะเวลา 10 นาที สำหรับตรวจนับ *Bacillus sp.* และเลือกใช้ diluent คือ น้ำกลั่น ที่ระยะเวลา 5 นาที สำหรับตรวจนับ *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.*

เมื่อคัดเลือก diluent ที่เหมาะสมได้แล้ว ขั้นตอนต่อมาคือการคัดเลือกอาหารที่มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต โดยมีผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 5 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Bacillus sp.*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu/g)	
	3 วัน	5 วัน
NA	7.9×10^{8}	9.0×10^{9}
NAS	4.0×10^{9}	4.2×10^{9}
PCA	6.5×10^{9}	6.6×10^{9}

LA	3.7×10^{10}	3.9×10^{10}
GMBA	3.3×10^{10}	3.4×10^{10}

ตารางที่ 6 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Lactobacillus sp.*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu/g)	
	3 วัน	5 วัน
NA	6.9×10^{7}	7.1×10^{7}
NAS	3.0×10^{7}	3.3×10^{7}
PCA	4.6×10^{8}	4.7×10^{8}
MRS	4.7×10^{8}	5.0×10^{8}
LA	5.2×10^{7}	5.5×10^{7}
GMBA	3.5×10^{7}	3.6×11^{7}

ตารางที่ 7 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Pseudomonas sp.*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu/g)	
	3 วัน	5 วัน
NA	14.8×10^{8}	15.5×10^{8}
PCA	13.6×10^{8}	14.2×10^{8}
LA	13.9×10^{8}	14.4×10^{8}

ตารางที่ 8 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Pantoea sp.*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu/g)	
	3 วัน	5 วัน
NA	23.6×10^{8}	24.8×10^{8}
PCA	25.8×10^{8}	26.6×10^{8}

LA	24.9×10^{8}	25.8×10^{8}

จากการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต พบว่าในด้านของระยะเวลาจาก 3 วันเป็น 5 วัน การเพิ่มขึ้นของโคโลนีไม่มากจนเปลี่ยน log cycle ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 1-6 โคโลนีเท่านั้น ดังนั้นที่ระยะเวลา 3 วัน จึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์

ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Bacillus sp.* พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LA และ GMBA สามารถตรวจนับจำนวนได้สูงที่สุด จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจนับ *Bacillus sp.* จากตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Lactobacillus sp.* พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ MRS สามารถตรวจนับจำนวนได้สูงที่สุด จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจนับ *Lactobacillus sp.* จากตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการตรวจนับจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพ *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.* พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, PCA และ LA สามารถตรวจนับจำนวนได้ใกล้เคียงกัน จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจนับ *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.* จากตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

จากขั้นตอนดังกล่าวนี้ จึงคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ GMBA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *Bacillus sp.* อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *Lactobacillus sp.* และอาหารเลี้ยงเชื้อ NA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.*

นำจุลินทรีย์ที่แยกจากปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตมาทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตด้วยค่า Solubilization Index ณ ระยะเวลาต่างๆ โดยมีผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 9 ค่า Solubilization Index ณ ระยะเวลาต่างๆ ของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

วัน	Solubilization Index			
	Bacillus sp.	*Lactobacillus sp.*	*Pseudomonas sp.*	*Pantoea sp.*
1	2.20	2.20	2.80	2.80
3	2.40	2.20	3.17	3.33
5	2.67	2.50	3.29	3.57

7	2.71	2.57	3.22	3.50
9	2.44	2.50	3.00	3.00
11	2.33	2.45	3.00	2.88
13	2.43	2.27	3.00	2.68
15	2.37	2.20	2.50	2.64

จากการศึกษาค่า Solubilization Index (SI) ณ ระยะเวลาต่างๆ ของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต พบว่าช่วงวันที่ 5-7 เป็นช่วงที่ค่า SI ของจุลินทรีย์ที่ทดสอบมีค่าสูง จึงมีความเหมาะสมต่อการใช้เพื่อตรวจสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากปุ๋ยชีวภาพ

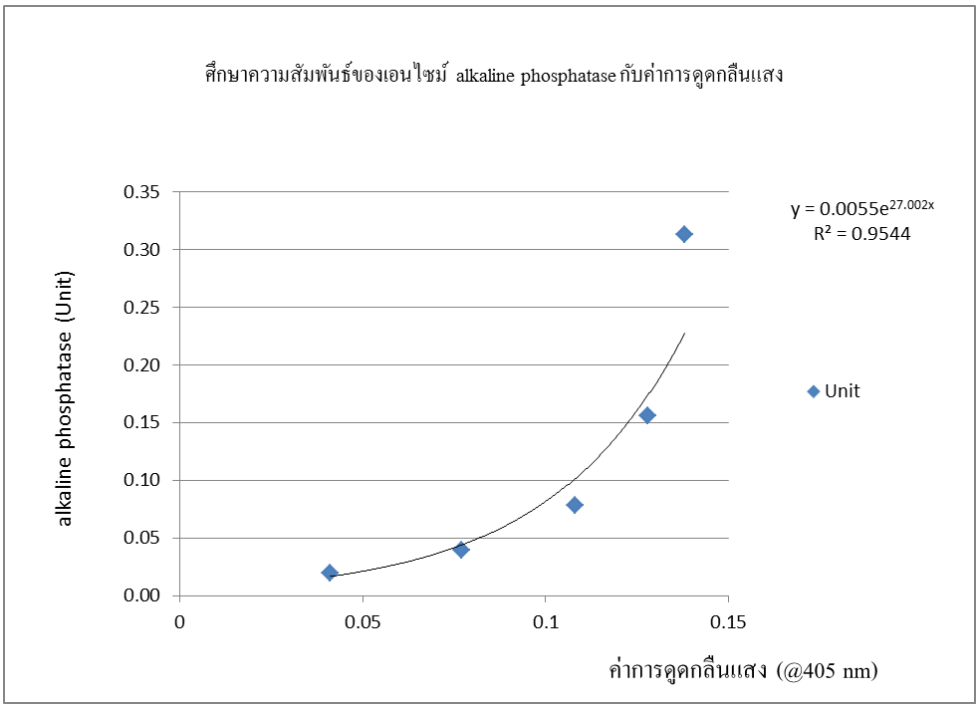
นอกจากศึกษาค่า Solubilization Index (SI) แล้ว การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทส จะช่วยให้ทราบว่าจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทสหรือไม่ ซึ่งจะช่วยให้ทราบกลไกการละลายฟอสเฟตที่มากขึ้น

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทสเริ่มจากศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase กับค่าการดูดกลืนแสงได้ผลดังนี้

ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase กับค่าการดูดกลืนแสง

ค่าการดูดกลืนแสง (405 nm)	**unit**
0.141	5.00
0.141	2.50
0.141	1.25
0.142	0.63
0.138	0.31
0.128	0.16
0.108	0.08
0.077	0.04
0.041	0.02

พบว่าช่วงที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ alkaline phosphatase คือที่ค่าการดูดกลืนแสง (405 nm) ระหว่าง 0.041-0.138



ด้วยข้อมูลดังกล่าวนี้ จะช่วยให้สามารถตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่จุลินทรีย์ผลิตได้ โดยช่วงที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์คือที่ค่าการดูดกลืนแสง (405 nm) ระหว่าง 0.041-0.138 หากมีค่าสูงกว่านี้ต้องทำการเจือจางก่อนการตรวจวัด

เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ alkaline phosphatase ของจุลุนทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า *Bacillus sp.* (21 x 10^8 cfu/ml) และ *Lactobacillus sp.* (44 x 10^8 cfu/ml) มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.011 และ 0.09 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าช่วงที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบ จึงเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ alkaline phosphatase ในขณะที่ *Pseudomonas sp.* (12 x 10^8 cfu/ml) และ *Pantoea sp.* (36 x 10^8 cfu/ml) พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.087 และ 0.1 ตามลำดับ หรือมีการผลิตเอนไซม์ประมาณ 0.12 unit/ml และ 0.16 unit/ml ตามลำดับ

9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตต้องคำนึงถึงความสามารถในการตรวจนับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพทั้งหมดที่มีอยู่ในปุ๋ยชีวภาพ จึงต้องพิจารณาถึง diluent ที่สามารถดึงจุลินทรีย์ออกมาจากตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ และต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เซลล์สามารถเจริญเติบโตขึ้นมาได้อย่างเต็มที่ หากอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดการตรวจนับที่ผิดพลาด ส่งผลให้การควบคุมคุณภาพปุ๋ยชีวภาพผิดพลาดตามไปด้วย จากการทดลองนี้พบว่าสามารถเลือกใช้ diluent คือ น้ำเกลือ ที่ระยะเวลา 10 นาที สำหรับตรวจนับ *Bacillus sp.* และเลือกใช้ diluent คือ น้ำกลั่น ที่ระยะเวลา 5 นาที สำหรับตรวจนับ *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.* และเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GMBA สำหรับใช้ใน

การตรวจนับ *Bacillus sp.* อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *Lactobacillus sp.* และอาหารเลี้ยงเชื้อ NA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp.*

เมื่อสามารถตรวจนับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้ว การตรวจสอบกิจกรรมการละลายฟอสเฟตเป็นขั้นตอนที่ช่วยยืนยันว่าปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตนั้นยังคงมีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์อยู่ การตรวจสอบวงใสของการละลายฟอสเฟตด้วยอาหาร pikovskaya medium เป็นวิธีที่มีความสะดวก ง่ายต่อการปฏิบัติงาน และการกำหนดค่า Solubilization Index (SI) จะช่วยให้เป็นข้อเปรียบเทียบกิจกรรมการละลายฟอสเฟตเบื้องต้นได้อย่างดี นอกจากนี้การตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทส จะช่วยยืนยันความสามารถในการละลายฟอสเฟตอีกทางหนึ่งด้วย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถเลือกใช้ diluent และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการตรวจนับ *Bacillus sp., Lactobacillus sp, Pseudomonas sp.* และ *Pantoea sp*. จากตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และตรวจกิจกรรมการละลายฟอสเฟตเบื้องต้นได้ นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางสำหรับศึกษาการตรวจปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่ใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตชนิดอื่นๆ ในการผลิต

11. เอกสารอ้างอิง

ธงชัย มาลา. 2550. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ : เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 300 หน้า

Amit S., K. Priyanka, N. A. Anju and K. Ashwani. 2012. Media optimization for inorganic phosphate solubilizing. International of life science and pharma research. 2: 245-255.

Edi-Premono, Moawad MA, Vleck PLG (1996). Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Ind. J. Crop Sci. 11:13-23.

King W. L. and A. Hurst. 1963. A note on the survival of some bacteria in different diluents. Jour Appl Bacteriol. 504-506.

Sapsirisopa Sujunya, Kannika Chookietwattana, Kedsukon Maneewan and Phirayot Khaengkhan. 2009. Effect of salt-tolerant Bacillus inoculum on rice KDML 105 cultivated in saline soil. As. J. Food Ag-Ind. Special Issue, 69-74.

Sundara, B., V. Natarajan and K. Hari. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. Field Crops Research. 77(1): 43–49.

Thampuran, N.; Iyer, H.K.; Iyer, K.M. 1985. Selection of suitable diluents for bacteriological examination of fishery products. Society of Fisheries Technologists. 22(1) : 40-44.

ภาคผนวก

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

Glucose mineral base agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) :

glucose	10
$(NH_4)_2SO_4$ หรือ KNO_3	5
KH_2PO_4	0.8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
$CaSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01
Agar	12

เมื่อผสมส่วนประกอบครบแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหมอนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนดตอตารางนิ้ว นาน 20 นาที

Luria Agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) :

Casein enzymic hydrolysate	10.000
Yeast extract	5.000
Sodium chloride	5.000
Agar	15.000
pH (ที่ 25°C)	7.0±0.2

เมื่อผสมส่วนประกอบครบแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหมอนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนดตอตารางนิ้ว นาน 20 นาที

Plate Count Agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) :

Peptone	5
yeast extract	2.5
glucose	1
agar	15
pH (ที่ 25°C)	7.0±0.2

Nutrient agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) :

Beef extract	3
Peptone	5
Agar	15

กรณีเตรียมอาหาร NaS ให้เติม Sodium chloride เพิ่มลงไป5.000 กรัม

เมื่อผสมส่วนประกอบครบแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหมอนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนดตอตารางนิ้ว นาน 20 นาที

Pikovskayas Agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) :

Yeast extract	0.500
Dextrose	10.000
Calcium phosphate	5.000
Ammonium sulphate	0.500
Potassium chloride	0.200
Magnesium sulphate	0.100
Manganese sulphate	0.0001
Ferrous sulphate	0.0001
Agar	15.000

เมื่อผสมส่วนประกอบครบแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหมอนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนดตอตารางนิ้ว นาน 20 นาที

MRS Agar

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) :

Proteose Peptone	10.0
Beef Extract	10.0
Yeast Extract	5.0
Dextrose	20.0
Polysorbate	801.0
Ammonium Citrate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Magnesium Sulfate	0.1
Manganese Sulfate	0.05
Dipotassium Phosphate	2.0
Agar	15.0

เมื่อผสมส่วนประกอบครบแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหมอนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนดตอตารางนิ้ว นาน 20 นาที