รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด ปี 2558

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

กิจกรรมย่อย : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การศึกษาวิธีการผลิตจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพ (2557-2558)

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Production technology development on mixed-culture-phosphate solubilizing bio-fertilizer

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสุปรานี มั่นหมาย กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นายอธิปัตย์ คลังบุญครอง กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

: นางภาวนา ลิกขนานนท์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

ศึกษาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบผสม โดยใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตประเภทแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ RPS 0081B และ RPS 0034B โดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต 2 สายพันธุ์นี้สามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่เป็นปฏิปักษ์กัน ศึกษาการเลี้ยงขยายเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NB ทำให้มีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่ระยะเวลา 7 วัน มีปริมาณมากที่สุด 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร จึงเลือกอาหาร NB สำหรับเลี้ยงขยายจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ RPS 0081B และ RPS 0034B เพื่อผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ใช้ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียด และซีโอไลท์เป็นวัสดุพา ศึกษาการเก็บรักษาในสภาพตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และภาพอุณหภูมิห้อง ตรวจนับอัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ที่ระยะเวลา 0 7 15 30 60 90 120 150 180 240 360 วัน พบว่า ในทุกๆระยะเวลาที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง พบว่าปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม มีมีปริมาณจุลินทรีย์ลดลงเมื่อเวลา 60 วัน ต่ำกว่า $1x10^8$ เซลล์ต่อกรัม ส่วนที่เก็บรักษาในสภาพตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้ถึง 150 วัน จุลินทรีย์จึงเริ่มลดลงต่ำกว่า $1x10^8$ เซลล์ต่อกรัม ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยชีวภาพ จึงควรเก็บปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตขึ้นมาในตู้เย็น เพื่อยืดระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยชีวภาพ ทำการทดสอบประสิทธิภาพปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสมที่ผลิตขึ้นมา

กับข้าวโพด ในกระถางทดลองโดยใช้ชุดดินสตึกที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ พบว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสมทำให้ข้าวโพดมีการเจริญเติบโตด้านความสูง และผลผลิตข้าวโพดสูงกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว

Abstract:

The aim of the study was to achieve a phosphate bio-fertilizer in the form of co-culture. Some effective strains of the phosphate solubilizing bacteria were tested for antagonism in order to be used in the experiment. Then, two strains of those without antagonistic nature were separately tested in suitable media, The highest number of viable cells of each bacterial strain was recorded according to the date of the incubation time. Both of the bacterial strains were then mixed into a carrier and incubated at room temperature and in a refrigerator. The viable cell number of each strain was counted on a proper medium according to the incubation times. The bio-fertilizer produced co-cultured was finally tested for its efficiency on enhancing plant growth in a pot condition.

The result showed that the strains of the phosphate solubilizing bacteria named RPS 0081B and RPS 0034B were used in the experiment. They were found not to be antagonistic. The suitable medium for growing both bacteria was Nutrient broth because it could provide viable cells of RPS 0081B and RPS 0034B at 7 days of incubation as 8.90×10^{10} and 7.50×10^{10} cfu/ml, respectively. After mixing both bacteria with its proper carrier as ground cow-dung compost mixed with zeolite, the number of each bacterial strain in the carrier was counted. It was also found that keeping the bio-fertilizer in a refrigerator could maintain the number of viable cells of both strains as 10^8cfu/g until 150 days when compared to that at room temperature 60 days. The result in a pot experiment also showed that the fresh weight of ears of maize from the treatment with phosphate bio-fertilizer produced co-culturally were not different from that with a phosphate fertilizer.

6. คำนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากธาตุอาหารนี้จำเป็น

ต่อการสังเคราะห์กรดนิวคลิอิคและฟอสโฟไลปิดส์ของเซลล์สิ่งมีชีวิต ฟอสฟอรัสปรากฏในธรรมชาติในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในดินอยู่ในช่วง 0.02-0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (Barber, 1984) และส่วนใหญ่อยู่ในรูปออร์โทฟอสเฟต แต่บางครั้งอยู่ในรูปฟอสฟีน และฟอสโฟเนท ในด้านธาตุอาหารพืชฟอสฟอรัสในดิน โดยทั่วไปสามารถจำแนกได้เป็น (ก) ฟอสฟอรัสในสารละลายดิน (ข) อนินทรีย์ฟอสฟอรัส และ (ค) อินทรีย์ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสในสารละลายดินที่จัดว่าเป็นประโยชน์ต่อพืชมีปริมาณน้อยมาก เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบต่างๆในดินได้ดี ดังนั้นดินที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยจึงมีฟอสฟอรัสในสารละลายดินประมาณ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือพบน้อยมากที่จะเกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลิตร (Ozanne, 1980) ส่วนอนินทรีย์ฟอสฟอรัสในสารละลายดินอยู่ในรูปของออร์โทฟอสเฟต ($H_2PO_4^{-1}$และ HPO_4^{-2}) ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สำหรับอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดินทั่วไปนั้นพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 30-50 เปอร์เซ็นต์ ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน (Paul and Clark, 1989) โดยอาจจะมีถึง 50 เปอร์เซนต์ในดินที่มีอินทรียวัตถุสูง (Barber, 1984) และประพิศ (2534) รายงานว่าดินไร่ของประเทศไทยมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสอยู่ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน ซึ่งฟอสฟอรัสรูปนี้จะเป็นประโยชน์ต่อพืชเมื่อถูกปลดปล่อยออกมาโดยจุลินทรีย์ในดิน ดินส่วนใหญ่มีอนินทรีย์ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่ไม่ละลายจึงเป็นฟอสฟอรัสที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช ในขณะที่ดินส่วนใหญ่มีแหล่งสำรองของธาตุฟอสฟอรัส แต่ฟอสฟอรัสในแหล่งสำรองนี้คงอยู่ในสภาพที่เป็นประโยชน์น้อยเพราะถูกดินดูดตรึงเอาไว้ และด้วยเหตุที่ฟอสฟอรัสมีปฏิกิริยาทางเคมีมาเกี่ยวข้องหลายประการ จึงมีฟอสฟอรัสน้อยกว่า 10 เปอร์เซนต์ที่เข้าสู่วัฏจักร พืช สัตว์ ดังนั้นการขาดฟอสฟอรัสจึงเป็นปัญหาที่พบอย่างกว้างขวาง การใส่ปุ๋ยฟอสเฟตจึงจำเป็นเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงปัจจุบัน ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตของกรมวิชาการเกษตรผลิตจากจุลินทรีย์ประเภทเชื้อราในจีนัส *Penicillium sp.* เมื่อเกษตรกรนำไปใช้ได้ผลเป็นพึงพอใจในระดับหนึ่ง ผลิตภัณฑ์ยังมีความจำเพาะเจาะจงกับพืชบางชนิดและยังไม่สามารถใช้ได้อย่างแพร่หลาย ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่มุ่งเน้นให้ได้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดใหม่เพิ่มขึ้นมา โดยพัฒนาให้ได้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในรูปแบบเชื้อผสม เพื่อจะได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น จึงทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมไว้จากโครงการอนุรักษ์จุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรและที่คัดแยกได้ใหม่จากแหล่งของเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการทดลองผลิตให้อยู่ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพต่อไป

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด ในการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้ประโยชน์ด้านปุ๋ยกำลังเป็นที่สนใจของเกษตรกร เพราะประชากรจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบหลักของระบบ ดิน-พืช การที่ประชากรจุลินทรีย์มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์นี้จะมีผลต่อการพัฒนาของพืช ยกตัวอย่างเช่น ผลการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ดินหลายชนิดสามารถละลายไอออนฟอสเฟตจากสารประกอบอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ทำให้ฟอสฟอรัสเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามการใช้กระบวนการที่ จุลินทรีย์เป็นตัวการสำคัญนี้ไปสนับสนุนด้านธาตุอาหารของพืชยังต้องศึกษาเพิ่มเติม เพราะฟอสเฟตไอออนรูปที่ละลายออกมานี้จะถูกดินตรึงไว้อีกครั้งก่อนที่จะถึงผิวรากพืช อย่างไรก็ตามในกรณีของ การใช้หินฟอสเฟตซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสต้นทุนต่ำ พบว่ามีปัญหาของการใช้คือประสิทธิภาพในการใช้ต่ำ ใช้ไม่ได้ผลในดินที่มีค่า pH สูงกกว่า 5.5-6 แม้ว่ามีสภาพแวดล้อมอื่นๆเหมาะสม ทำให้ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าพืชได้รับจากปุ๋ยเคมีฟอสเฟตที่ละลายได้อื่นๆ (Khasawneh and Doll, 1979) การใช้หินฟอสเฟตเป็นปุ๋ยโดยตรงจึงไม่แพร่หลาย ได้มีความพยายามหาวิธีการหลายวิธีที่ทำให้

ฟอสฟอรัสในหินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นเช่นวิธีการทางเคมี (วิศิษฐ์ และมนูเวทย์, 2520) วิธีทางกายภาพ โดยนำอาหินฟอสเฟตไปเผาไฟหรือบดให้ละเอียด (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) จึงมีการนำเชื้อราเส้นใยมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดอินทรีย์อย่างแพร่หลาย (Matte, 1992; Vassilev and Vassileva, 1992) เฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา Aspergillus niger และ Penicillium sp. บางสายพันธุ์ โดยมีการศึกษาในระบบหมักร่วมกันกับหินฟอสเฟต หรือโดยการเพาะเชื้อโดยตรงเพื่อให้ไปละลายหินฟอสเฟต (Kucey, 1987; Asea et al,1988; Cerezine et al,1988; Cunningham and Kuiak, 1992)

ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตของกรมวิชาการเกษตรเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพที่เกษตรกรนำไปใช้ โดยนำไปใช้กับพืชที่ปลูก ในชุดดิน ในสภาพแวดล้อม การเขตกรรม ที่แตกต่างกัน จึงทำให้ประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต/หินฟอสเฟตของจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในปุ๋ยชีวภาพในแต่ละครั้งแตกต่างกันไป เพื่อให้ได้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเป็นประโยชน์สูงสุด จึงทดลองผลิตเชื้อในรูปแบบผสม คือในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพมีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมากกว่า 1 สายพันธุ์อยู่ร่วมกันและส่งเสริมกันในการมีกิจกรรมละลายฟอสเฟตและกิจกรรมเสริมสร้างสารช่วยในการเจริญเติบโตแก่พืช

7.วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 ชุดดินสตึก และ ตาคลี

7.1.2 สารเคมี คือ streptomycin sulfate, chloramphenicol, cycloeximide, nystatin, NaOH, HCI, $BaCl_2$ และ Phenolphthalein

7.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อคือ NA PDA YG โดยเพิ่ม antibiotic actidio, chloramphinical

7.1.4 เครื่องแก้วคือ จานเพาะเชื้อ แท่งแก้วสามเหลี่ยม ขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หลอดแก้วบรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บิ๊กเกอร์ แท่งแก้วคนสาร

7.1.5 ไมโครปิเปต

7.1.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

7.1.7 ตู้อบ

7.1.8 เครื่องชั่งอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

7.1.9 เครื่องผสมสารเคมีแบบปั่น (vortex)

7.1.10 กระถางดินเผา

7.1.11 เมล็ดข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3

7.1.12 ปุ๋ยเคมีได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ทริปเปิลซูเปอร์ฟอสเฟต และโพแทสเซียมคลอไรด์

7.1.13 วัสดุพาปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียด ซีโอไลท์

7.2 วิธีการ

- ศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีต่อกัน การละลายฟอสเฟตในธรรมชาติเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์หลายประเภทและหลายชนิดในดิน เมื่อจะผลิตปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบเชื้อผสม จำเป็นต้องศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อกันของเชื้อโดยวิธีการ co-inoculation ของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

- ศึกษาวิธีการเลี้ยงขยายปริมาณจุลินทรีย์ เมื่อคัดเลือกได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพและไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกันแล้ว จำเป็นต้องหาวิธีการเลี้ยงขยายเชื้อให้ได้ปริมาณสูงและอยู่ในรูปแบบที่เหมาะต่อการใช้ผลิต โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการมีกิจกรรมของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ (ก) ความต้องการในเรื่องธาตุอาหารทำการเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารสูตรต่างๆ เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ข) ขนาดที่เหมาะสมของเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงขยายในถังหมัก

- ศึกษาหาวัสดุพาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตแต่ละไอโซเลทที่จะนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ มีความแฉพาะเจาะจงในเรื่องวัสดุพาเชื้อแตกต่างกัน จึงทดลองหาวัสดุพาเชื้อโดยเพาะสารละลายเชื้อที่มีปริมาณตั้งต้นเดียวกันลงในวัสดุอินทรีย์ที่ใช้ทดลองเป็นวัสดุพาที่ปลอดเชื้ออื่นปนเปื้อน ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตแต่ละไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามระยะเวลาที่กำหนด

- ศึกษาผลของปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพด

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

- ศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีต่อกัน โดยวิธีการ co-inoculation ของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

- ศึกษาวิธีการเลี้ยงขยายปริมาณจุลินทรีย์

เลี้ยงขยายปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB B2 และ LB โดยให้ปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า 150 rpm. ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 3 และ 7 วัน

- ศึกษาหาวัสดุพาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

คลุกผสมจุลินทรีย์เข้ากับวัสดุพาที่ใช้ในการทดลอง ตามกรรมวิธีการทดลอง เก็บบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และในตู้เมื่อครบระยะเวลี่กำหนด 0 7 15 30 60 90 120 150 180 240 360 วัน สุ่มตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต

- ศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสมต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพด วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 8 วิธีการทดลอง 4 ซ้ำ คือ

  1. ควบคุม
  2. N-P-K
  3. N-P-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยคลุกเมล็ด
  4. N-1/2P-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยคลุกเมล็ด
  5. N-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยคลุกเมล็ด
  6. N-P-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยรองก้นหลุม
  7. N-1/2P-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยรองก้นหลุม
  8. N-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยรองก้นหลุม

การบันทึกข้อมูล

1) ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ
2) ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดในวัสดุพา
3) การเจริญเติบโตและน้ำหนักฝักข้าวโพด

เวลาและสถานที่

ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์และจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ตุลาคม 2557 – ตุลาคม 2558

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ในสภาพห้องทดลอง

เป็นการเอาเชื้อปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้ เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการการเจริญร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ว่าสามรถอยู่ร่วมกันได้ และยังคงมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต ซึ่งถ้ามีการยับยั้งเกิดขึ้น จะเห็นบริเวณใส (clear zone) ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ แสดงว่า การยับยั้งเกิดขึ้น จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต RPS 0081B และ RPS 0034B ไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน จึงสามารถนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพร่วมกันได้

ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

ปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต สายพันธุ์ RPS 0081B และ RPS 0034B เมื่อเลี้ยงขยายในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB B2 และ LB ที่ระยะเวลา 3 และ 7 วัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ทำให้มีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่ระยะเวลา 3 วัน มีปริมาณมากที่สุด 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1) จึงเลือกอาหาร NB สำหรับเลี้ยง

ขยายจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต สายพันธุ์ RPS 0081B และ RPS 0034B เพื่อผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสมต่อไป

ตารางที่ 1 ปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ RPS 0081B และ RPS 0034B บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

ระยะเวลา / อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณ RPS 0081B (CFU/กรัม)		ปริมาณ RPS 0034B (CFU/กรัม)	
	3 วัน	7 วัน	3 วัน	7 วัน
NB	7.9×10^9	8.9×10^{10}	5.5×10^9	3.9×10^{10}
B2	1.0×10^9	3.7×10^9	3.0×10^9	2.5×10^9
LB	2.0×10^8	3.3×10^9	3.7×10^8	3.0×10^9

ผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม เป็นจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ RPS 0081B และ RPS 0034B ใช้ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียด และซีโอไลท์เป็นวัสดุพา โดยมีประสิทธิภาพการละลายตะกอน $Ca_2 HPO_4$ ที่ระดับ 5 ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ที่ระยะเวลา 0 7 15 30 60 90 120 150 180 240 360 วัน พบว่า ในทุกๆระยะเวลาที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง พบว่าปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม มีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ปริมาณเท่ากับ 7.57×10^8 เซลล์ต่อกรัม และมีปริมาณจุลินทรีย์ลดลงเมื่อเวลา 60 วัน ต่ำกว่า 1×10^8 เซลล์ต่อกรัม ส่วนที่เก็บรักษาในสภาพตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณเชื้อเมต้นปริมาณเท่ากับ 5.37×10^8 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งสามารถเก็บได้ถึง 150 วัน จุลินทรีย์จึงเริ่มลดลงต่ำกว่า 1×10^8 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยชีวภาพ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาต่างๆ

ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต	ปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต (เซลล์ต่อกรัม) ที่ระยะเวลา (วัน)										
	0	7	15	30	60	90	120	150	180	240	360
เก็บในสภาพอุณหภูมิห้อง											
RPS 0081B	$3.15x10^8$	$1.64x10^8$	$6.97x10^8$	$6.33x10^8$	$4.47x10^8$	$1.13x10^7$	$2.66x10^7$	$2.12x10^6$	$7.13x10^6$	$3.15x10^6$	$3.17x10^4$
RPS 0034B	$4.42x10^8$	$2.75x10^8$	$1.36x10^8$	$9.50x10^8$	$7.66x10^8$	$5.56x10^6$	$5.35x10^6$	$4.70x10^5$	$4.42x10^5$	$9.77x10^5$	$1.42x10^3$
เก็บในสภาพอุณหภูมิตู้เย็น											
RPS 0081B	$2.25x10^8$	$2.14x10^8$	$2.75x10^8$	$3.35x10^8$	$3.25\ x10^8$	$2.13x10^8$	$2.25x10^8$	$3.32x10^7$	$3.33x10^7$	$2.15x10^6$	$1.17x10^5$
RPS 0034B	$3.12x10^8$	$2.32\ x10^8$	$2.35\ x10^8$	$4.50x10^8$	$3.33\ x10^8$	$2.36x10^8$	$2.75x10^8$	$3.75\ x10^8$	$3.42x10^7$	$5.75x10^6$	$2.25\ x10^5$

ศึกษาผลของปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดในสภาพกระถางทดลองวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินที่ใช้ในการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ก่อนปลูกพบว่ามีจุลินทรีย์ประมาณ 3.6×10^8 เซลล์ต่อกรัมดิน พบจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตประมาณ 3.2×10^3 เซลล์ต่อกรัมดิน และไม่พบจุลินทรีย์ชนิดเดียวกับที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 3 สมบัติทางเคมีของดินก่อนปลูกพืช

ความลึก (cm)	**pH**	**OM**	**Bray II -P**	**Exch.K**
0-20	7.33	2.15	8.9	233
20-50	7.22	2.08	3.9	193

วัดการเจริญเติบโตของข้าวโพดด้านความสูงที่ระยะเวลา 30 60 และ 110 วัน พบว่าที่ระยะเวลา 30 วัน การใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม ทำให้ความสูง สูงที่สุดเท่ากับ 19.75 เซนติเมตร แตกต่างกับการไม่ใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และการใช้ปุยเคมีเพียงอย่างเดียว ซึ่งสูงเท่ากับ 11.5 และ 12.75 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกับการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสมโดยการคลุกเมล็ดและรองก้นหลุม ส่วนที่ระยะเวลา 60 วัน และ 110 วัน ผลการเจริญเติบโตเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับที่ระยะเวลา 30 วัน คือการใช้ปุ๋ยเคมี ร่วมกับปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม ทำให้ข้าวโพดมีการเจริญเติบโตสูงกว่ากรรมวิธีไม่ใช้ปุ๋ยและการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว ด้านน้ำหนักฝักข้าวโพดพบว่าการใช้ปุ๋ยเคมี N P K ร่วมกับ ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยรองก้นหลุมให้น้ำหนักฝักสูงที่สุด เท่ากับ 45.25 กรัม แตกต่างจากกรรมวิธี

การไม่ใช้ปุ๋ยเคมีและไม่ใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม และกรรมวิธีการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว ซึ่งเท่ากับ19.75 และ 25.25 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 1 เดือน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่ใช้ในการทดลองยังคงมีชีวิตรอดและยังคงมีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตที่ระดับ 5 พบ จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตประมาณ 3.7×10^5 เซลล์ต่อกรัมดิน

จากผลการทดลองในสภาพกระถางจะพบว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ทำให้การเจริญเติบโตด้านความสูง และผลผลิตข้าวโพดสูงกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4 ความสูงข้าวโพดที่ระยะเวลา 30 60 และ 110 วัน (เซนติเมตร) และน้ำหนักฝักข้าวโพด (กรัม)

การใช้ปุ๋ยชีวภาพ	**ความสูงข้าวโพด (ซม.)**			**นน. ฝักข้าวโพด (กรัม)**
	30 วัน	**60 วัน**	**110 วัน**	
1. ควบคุม	11.50b	35.50b	73b	19.75b
2. N-P-K	12.75b	57.75ab	90.25ab	25.25ab
3. N-P-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยคลุกเมล็ด	17.50ab	58.75ab	96.00ab	30.50ab
4. N-1/2P-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยคลุกเมล็ด	16.25ab	55.00ab	97.25ab	41.25a
5. N-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยคลุกเมล็ด	19.75a	80.75a	103.00b	42.75a
6. N-P-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยรองก้นหลุม	19.25a	74.00a	100.25a	45.25a
7. N-1/2P-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยรองก้นหลุม	19.75a	90.25a	97.50ab	43.25a
8. N-K + ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ใส่โดยรองก้นหลุม	19.25a	73.75ab	101.25a	39.50a
CV(%)	12.6	7.4	8.7	8.4

ความสูงระหว่างค่าเฉลี่ยของการใช้ปุ๋ยชีวภาพ ที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม โดยใช้จุลินททรีย์ละลายฟอสดฟตสายพันธุ์ RPS0081B และ RPS 0034B ใช้ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียด และซีโอไลท์เป็นวัสดุพา ทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดที่มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อกรัม ที่ระยะเวลา 60 วัน ส่วนที่เก็บในตู้เย็นทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดที่มากกว่า 10^8 เซลล์ต่อกรัม ที่ระยะเวลา 150 วัน ซึ่งการเก็บรักษาปุ๋ยชีวภาพและอายุการเก็บรักษาปุ๋ยชีวภาพถือว่าเป็นคุณภาพของปุ๋ยชีวภาพหากต้องการให้เชื้อมีชีวิตรอดเป็นระยะเวลานานควรหาวัสดุพาชนิดใหม่เพิ่มเติม และควรเก็บไว้ตู้เย็นอาจทำให้อายุการเก็บรักษายาวนานขึ้น

2. การใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสม ทำให้การเจริญเติบโตด้านความสูง และผลผลิตข้าวโพดสูงกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว จึงควรนำปุ๋ยชีวภาพรูปแบบเชื้อผสมนำไปทดสอบต่อในสภาพแปลงทดลองต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ต้นแบบการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม ที่สามารถนำไปผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง

ลัดดาวัลย์ มีสุข, เพ็ญศรี ชูวรเวช, ยุพิน สรวิสูตร, จันทิรา อริยธัช, เรวดี ดีมาก และภาวนาฏ เสมรสูต. 2529. การเพิ่มประสิทธิภาพของหินฟอสเฟตโดยเผาที่อุณหภูมิต่ำ. วารสารวิชาการเกษตร 4 (1) :17-24.

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

วิศิษฐ์ โชลิตกุล และมนูเวทย์ ศรีเสน. 2520. ปุ๋ยฟอสเฟตและโพแทสเซียม. รายงานการสัมมนาทาง วิชาการเรื่อง 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.