รายงานโครงการวิจัย

การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

Research and Development on Biofertilizer, Compost, Organo-chemical Fertilizer and Agriculture Decomposers Production Technology and Analysis

นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง

PHATCHAYAPHON MEUNCHANG

2558

รายงานโครงการวิจัย

การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

Research and Development on Biofertilizer, Compost, Organo-chemical Fertilizer and Agriculture Decomposers Production Technology and Analysis

นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง

PHATCHAYAPHON MEUNCHANG

2558

คำปรารภ

ปัจจุบันปุ๋ยชีวภาพเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่เกษตรกร ในขณะเดียวกันนั้นได้มีการออกพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ได้มีการแก้ไขเพิ่มเติมระบุชนิดแห่งปุ๋ย เป็น 3 ประเภทด้วยกัน ซึ่งหนึ่งในสามก็คือ ปุ๋ยชีวภาพ ทำให้หน่วยงานต่าง ๆ ของ กรมวิชาการเกษตรที่รับผิดชอบเกี่ยวกับเรื่องปุ๋ยชีวภาพโดยตรง ต้องมีการวิจัยและพัฒนารูปแบบวิธีการเก็บ ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพให้มีมาตรฐานเทียบเท่ามาตรฐานสากล เนื่องจากปุ๋ยชีวภาพมีความแตกต่างจากปุ๋ยประเภทอื่น รวมไปถึงการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพให้ทันสมัยมากขึ้น เพื่อรองรับการเข้าสู่มาตรฐานสากล และลดข้อขัดแย้งระหว่างบริษัท ผู้ผลิตปุ๋ยชีวภาพเกี่ยวกับกระบวนการเก็บตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ย เนื่องจากหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรต้องเป็นผู้รับรองการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพเพื่อการขึ้นทะเบียนตามปุ๋ยชีวภาพตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ซึ่งมี 5 ชนิด คือ ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

ซึ่งแต่ละชนิดมีจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้วิธีการเก็บรักษาปุ๋ยชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการเก็บตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ รวมไปถึงวิจัยและพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพแต่ละชนิดที่มีมาตรฐานเทียบเท่ามาตรฐานสากล ประกอบกับการรณรงค์และส่งเสริมให้เกษตรกรปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ ทำให้เกษตรกรรู้จักคุ้นเคยและหันมานิยมใช้ปุ๋ยอินทรีย์มากขึ้น เนื่องจากกระแสเกษตรอินทรีย์ที่กำลังเป็นที่นิยมขณะนี้ จากที่ได้แจ้งกับกรมวิชาการเกษตรในปี 2543 เป็นจำนวนนับ 100 ราย การผลิตมีหลายรูปแบบให้เลือกมีทั้งชนิดผง , ชนิดน้ำ , และชนิดเม็ด บ้างก็อยู่ในรูปของปุ๋ยเคมีผสมปุ๋ยอินทรีย์ ทำให้สะดวกในการซื้อ การขนย้าย การเก็บรักษาและการใช้ เพราะมีการบรรจุในภาชนะ เช่น กระสอบ หรือภาชนะบรรจุพลาสติก พร้อมทั้งระบุสรรพคุณมากมาย ซึ่งอาจจะทำให้เกษตรกรหลงเชื่อหรือเข้าใจผิด เพราะราคาค่อนข้างแพงเมื่อเทียบกับสิ่งที่จะได้รับตอบแทน

ในปัจจุบันมีการผลิตปุ๋ยอินทรีย์รูปแบบต่างๆ ทั้งชนิดผง ชนิดเม็ด และชนิดน้ำ กันอย่างแพร่หลาย โดยมีทั้งผลิตใช้เองและผลิตเพื่อการค้า ประกาศกรมวิชาการเกษตรจึงปรับปรุงแนวทางการกำกับ ควบคุมทั้งปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งได้ร่างเกณฑ์กำหนดต่างๆไว้ แต่มีปุ๋ยจำนวนไม่น้อยที่ไม่สามารถผลิตให้มีคุณสมบัติตรงตามเกณฑ์ได้ จึงต้องมีการวิจัยโครงการผลิตปุ๋ยหมักที่มีคุณภาพสูงและได้มาตรฐานและปุ๋ยหมักที่มีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มีการปรับแต่งธาตุอาหารที่สามารถควบคุมการละลายให้มีการสูญเสียน้อยที่สุดและปุ๋ยอินทรีย์เคมีน้ำที่สามารถใช้ได้ทั้งทางดินและทางใบเพื่อแก้ปัญหาการขาดธาตุอาหารและปัญหาโรคแมลงในขณะเดียวกัน นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ ในการทำปุ๋ยหมัก

สารบัญ หน้า

ผู้วิจัย ข
บทนำ ค
บทคัดย่อ จ
1. กิจกรรมที่ 1 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ 1
2. กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ของประเทศไทย 11
3. กิจกรรมที่ 3 วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี 30
4. กิจกรรมที่ 4 การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ในการจัดการดิน 38
บทสรุปและข้อเสนอแนะ 54
บรรณาณุกรม 55

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ	นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้ากิจกรรมที่ 1	นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้ากิจกรรมที่ 2	นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้ากิจกรรมที่ 3	นายพีรพงษ์ เชาวนพงษ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้ากิจกรรมที่ 4	นางสุปรานี มั่นหมาย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางอัจฉรา นันทกิจ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวสุภาพร ธรรมสุระกุล	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางภาวนา ลิกขนานนท์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายสมบูรณ์ ประภาพรรณพงศ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวศิริลักษณ์ จิตรอักษร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางประไพ ทองระอา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางศรีสุดา รื่นเจริญ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวลาวัลย์ จันทร์อัมพร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายรัฐกร สืบคำ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวทิวาพร ผดุง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวธูปหอม พิเนตรเสถียร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวนิศารัตน์ ทวีนุต	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางมณฑิกานธิ์ สังข์น้อย	ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา
	นางสาวศศิษา สังวิเศษ	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น
	นางสาวกัลยกร โปร่งจันทึก	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายอธิปัตย์ คลังบุญครอง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายมนต์ชัย มนัสสิลา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทนำ

ปัจจุบันการเกษตรส่วนใหญ่เป็นระบบการเกษตรที่ใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมีมากขึ้นซึ้งส่งผลต่อต้นทุนการผลิตและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะปุ๋ยเคมีและสารเคมี มีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ จึงมีการใช้ปัจจัยการผลิตที่ทำมาจากจุลินทรีย์และสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้กันมากขึ้น เช่น การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม สามารถทดแทนปุ๋ยไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ปุ๋ยชีวภาพไมโคไรซ่าสามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมีในไม้ผลได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 1 สามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมีในข้าวโพดและข้าวฟ่างได้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตเพิ่มประสิทธิภาพการใช้หินฟอสเฟตได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องการมีชีวิตรอดของเชื้อ รูปแบบที่เหมาะสมกับการนำไปใช้ประโยชน์ และบางชนิดยังไม่มีผลิตภัณฑ์ ในด้านการผลิตและการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ผ่านมานั้น มีการผลิตใช้ประโยชน์เป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าวโดยผลิตเชื้อเหลวคลุกเคล้ากับวัสดุพา (carrier) ทำการปั้นเม็ดและนำไปใช้ในนาข้าว แต่เนื่องจากในการผลิตผลิตภัณฑ์ให้มีเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินรอดชีวิตในปริมาณสูง นั้นทำได้ยาก ทำให้เมื่อนำไปใช้ในสภาพนาข้าวจริงเห็นผลน้อย การนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไปใช้ประโยชน์เป็นปุ๋ยสำหรับพืชโดยวิธีการอื่นๆ นั้นยังไม่มีการศึกษา ส่วนปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายโพแทสเซียม ยังไม่มีการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายโพแทสเซี่ยมในประเทศไทยมาก่อน ซึ่งธาตุโพแทสเซียมมีความสำคัญเช่นกันเนื่องจากเกี่ยวข้องถึงคุณภาพของผลผลิตพืช ปุ๋ยที่ให้ธาตุโพแทสเซียมหรือปุ๋ยโพแทช ได้แก่ โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมซัลเฟต นั้นมีราคาสูงจึงทำให้การปลูกพืชมีต้นทุนสูงตามราคาปุ๋ยโพแทช ดังนั้นจึงควรวิจัยหาวิธีการใช้ประโยชน์จากแหล่งอื่นของโพแทสเซียมที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยโพแทชเพื่อลดต้นทุนการผลิต ในปัจจุบันกรมวิชาการเกษตรได้มีผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าออก จำหน่ายซึ่งมีการยอมรับจากเกษตรกรมากขึ้นเรื่อยๆ รวมทั้งนักวิชาการทั่วไป จนกระทั้งมียอดจำหน่ายมากกว่า 5 ตันต่อปี โดยผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปดินผงทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่ายเมื่อนำไปใช้ในสภาวะการเลี้ยงพืชแบบปลอดเชื้อ ได้แก่ การขยายพืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงพืชแบบไฮโดรโพนิกส์ เป็นต้น ซึ่งการขยายพืชและเลี้ยงพืชแบบปลอดเชื้อนี้มีผู้นิยมทำกันแพร่หลาย ทั้ง

เอกชนทั่วไปและนักวิชาการ จึงจำเป็นต้องวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและการใช้ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ดินอื่น เพื่อให้ทันสนองตอบการผลิตพืชแบบปลอดเชื้อ

แหนแดงมีคุณสมบัติที่มีศักยภาพและเหมาะสมที่จะพัฒนา และส่งเสริมให้เกษตรกรใช้เพื่อการปรับปรุงบำรุงดิน เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตต่ำ สามารถผลิตได้เอง และไม่จำเป็นต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ แหนแดงสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ทำให้มีน้ำหนักสดสูงถึง 3 ตันต่อไร่ ภายในระยะเวลา 30 วัน ด้วยอัตราเริ่มต้นของแหนแดงเพียง 100 กิโลกรัมต่อไร่ (ประยูร, 2530) แหนแดงมีอัตรา C:N ต่ำ (ประมาณ 10) จึงย่อยสลายตัวและปลดปล่อยธาตุไนโตรเจนออกมาให้พืชใช้ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้แหนแดงมีความสามารถในการดูดซับโพแทสเซียมได้สูง(2-3.5 %K, (Lui, 1987)) และปลดปล่อยให้กับพืชในดินที่ขาดโพแทสเซียม และจากการที่แหนแดงสามารถเพิ่มมวลชีวภาพได้อย่างรวดเร็ว ให้น้ำหนักเพิ่มขึ้นหนึ่งเท่าตัวได้ภายในเวลา 3-6 วัน (Watanabe และ Ramirez, 1984) เป็นการช่วยเพิ่มอินทรียวัตถุในดิน สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งปุ๋ยอินทรีย์ที่มีธาตุไนโตรเจนและโพแทสเซียมสูง รวมถึงมีโปรตีนและกรดอะมิโนต่างๆ เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง และราคาต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด

ปัจจุบันมีการผลิตปุ๋ยอินทรีย์รูปแบบต่างๆทั้งชนิดผง ชนิดเม็ด และชนิดน้ำ กันอย่างแพร่หลาย โดยผลิตใช้เองและผลิตเพื่อการค้า กรมวิชาการเกษตรจึงได้ปรับปรุง พรบ.ปุ๋ยให้มีขอบข่ายควบคุมทั้งปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งได้ร่างเกณฑ์กำหนดต่างๆไว้ แต่มีปุ๋ยจำนวนไม่น้อยที่ไม่สามารถผลิตปุ๋ยให้มีคุณสมบัติตรงตามเกณฑ์ได้ ประกอบกับความเข้าใจผิดของผู้ใช้ที่ว่าปุ๋ยจะต้องเป็นเม็ดเท่านั้น ทำให้มีความพยายามที่จะทำปุ๋ยอินทรีย์เม็ดโดยไม่คำนึงถึงคุณภาพ ทำให้ปุ๋ยอินทรีย์เม็ดที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ไม่ได้คุณภาพ ได้มีการศึกษาการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เม็ดที่มาจากวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการหมักและอบไอน้ำแล้ว พบว่าสามารถผลิตได้แต่ลักษณะของเม็ดเป็นท่อนสั้นๆ ไม่สวยงาม ไม่เป็นที่นิยมของเกษตรกร และไม่สามารถนำไปใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีในรูปของปุ๋ยผสมแบบไม่เป็นเนื้อเดียวกันได้ เนื่องจากมีรูปทรงต่างกัน ไม่เหมือนปุ๋ยที่ผลิตเป็นเม็ดกลม ดังนั้นจึงต้องหาวิธีปั้นเม็ดจากวัสดุที่มีการย่อยสลายโดยสมบูรณ์และวัสดุที่มีสมบัติคล้ายดิน แต่มีปริมาณอินทรียวัตถุสูงมาเป็นส่วนผสมโดยตรง และมีสมบัติเป็นตัวดูดซับอนุภาคปุ๋ย และอุ้มน้ำได้ และไม่มีการย่อยสลายที่จะเป็นอุปสรรคต่อการเข้ากันได้ของวัตถุดิบ จึงได้เลือกใช้วัตถุดิบที่เป็นสารเสริมสภาพดังกล่าวร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ประเภทมูลสัตว์ วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม หรือในสภาพปุ๋ยหมัก โดยได้เลือกปุ๋ยอินทรีย์ที่มีสัดส่วนธาตุอาหารสูงๆมาผสม ให้ได้ปุ๋ยอินทรีย์ประเภทคุณภาพสูง ตลอดจนการใช้ปุ๋ยเคมีเป็นตัวปรับสมดุลธาตุอาหาร เลือกใช้วัตถุดิบที่มีความเหมาะสมทั้งทางเคมีและกายภาพ เป็นทางเลือกให้เกษตรกรหรือผู้ประกอบการนำไปใช้ได้จริง อนึ่งการใช้ปุ๋ยอินทรีย์น้ำประเภทปุ๋ยน้ำหมัก Bio Extract และ Compost tea ที่เป็นผลจากการย่อยสลายจนได้สาร Metabolite (ฮอร์โมน วิตามิน สารปฏิชีวนะและอื่นๆ) ตลอดจนธาตุอาหารต่างๆที่สามารถนำไปใช้ในปรับสภาพดินและบำรุงการเจริญเติบโตของแก่พืชได้อย่างยั่งยืนและสามารถปรับแต่งธาตุอาหารให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับชนิดดินและพืชได้ จึงได้ดำเนินการวิจัยโครงการผลิตปุ๋ยหมักที่มีคุณภาพสูงและได้มาตรฐานและปุ๋ยหมักที่มีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ประกอบกับปัจจุบันเรามุ่งเน้นให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่สูง ทำให้มีการใช้ปัจจัยการผลิตในปริมาณมากทั้งปุ๋ยเคมี สารปรับปรุงดิน สารเคมีกำจัดแมลงและวัชพืช ซึ่งการใช้ปัจจัยการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตพืชต่างๆนั้น ส่งผลกระทบต่อคุณภาพดิน ทั้งทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของดิน และส่งผลต่อเนื่องทำให้ผลิตภาพของดินลดลง ส่งเหล่านี้จะส่งผลกระทบโดยตรงต่อจุลินทรีย์ในดินซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างยิ่งต่อผลิต

ภาพของดิน การศึกษาจุลินทรีย์ในดินโดยมุ่งเน้นไปที่โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดินที่ปลูกพืชต่างชนิดกัน หรือชุดดินที่แตกต่างกัน หรือการศึกษาเพื่อหากลุ่มจุลินทรีย์ที่จะมาช่วยลดสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตซึ่งมีตกค้างอย่างมากในประเทศไทย รวมถึงกิจกรรมจุลินทรีย์ในดินเพื่อย่อยสลายเศษวัสดุพืชในไร่นา หรือกิจกรรมจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอกที่ใส่ลงไปเพื่อเพิ่มผลผลิตนั้นเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะฟื้นฟูและเพิ่มผลิตภาพของดินอย่างยั่งยืน

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์ และจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาเทคโนโลยีการผลิตและตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยอินทรีย์เคมี ให้มีประสิทธิภาพรวมทั้งการหาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ เพื่อการจัดการดิน โดยดำเนินการระหว่างปี 2554-2558 ทั้งในห้องปฏิบัติการ เรือนทดลอง และแปลงทดลอง วิธีการดำเนินงานประกอบด้วย 4 กิจกรรมหลัก กิจกรรมที่ 1 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพของประเทศไทย กิจกรรมที่ 3 การวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมักและปุ๋ยอินทรีย์เคมี และกิจกรรมที่ 4 การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ในการจัดการดิน ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมที่ 1 ได้วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ 6 วิธี กิจกรรมที่ 2 พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพได้ 4 ชนิด กิจกรรมที่ 3 ได้เทคนิคในการผลิตปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี ทั้งชนิดแข็งและชนิด

ที่เป็นของเหลว 3 แบบ และกิจกรรมที่ 4 ได้ข้อมูลในการใช้จุลินทรีย์ในการจัดการดิน 2 รูปแบบ ผลการวิจัยในโครงการวิจัยสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการผลิตและการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพให้มีมาตรฐาน รวมทั้งได้วิธีการพัฒนาปรับปรุงการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ อินทรีย์เคมี และการจัดการดินทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตพืช

Abstract

Research and development on biofertilizer, compost, organo-chemical fertilizer and agriculture decomposers production technology and analysis were conducted in this experiment. The objective for explore biofertilizer production and analytical technologies, chemical organic and organic fertilizers production technology and decomposing microbial utilization for soil management. This project contained 4 parts 1) biofertilizer production, 2) technique of Biofertilizer analysis research 3) chemical organic and organic fertilizers production technology research and 4) decomposing microbial utilization for soil management research. The results of this project found; 6 biofertilizer production methods, 4 biofertilizers analytical method, 2 chemical organic and organic fertilizers production technologies and 2 decomposing microbial utilization methods for soil management. These technologies will be continuous develop for use on agricultural production system to sustainable reduce production cost.

กิจกรรมที่ 1

การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง ประไพ ทองระอา ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต กัลยกร โปร่งจันทึก ศิริลักษณ์ จิตรอักษร
มณฑิกานธิ์ สังข์น้อย สุปรานี มั่นหมาย อธิปัตย์ คลังบุญครอง ภาวนา ลิกขนานนท์

คำสำคัญ การผลิตปุ๋ยชีวภาพ ปุยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ปุ๋ยชีวภาพมัยคอร์ไรซ่า ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

บทคัดย่อ

การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ ได้ดำเนินการวิจัยพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพ 5 ชนิด ซึ่งแยกดำเนินการเนินวิจัยเป็น 5 กิจกรรมย่อย ประกอบด้วย 1) การศึกษาหาวิธีการนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ไปใช้ประโยชน์ในรูปสารสกัดเซลล์ 2) การวิจัยและพัฒนาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม 3) การวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อน 4) การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและการใช้ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น 5) การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม 6) การศึกษาวิจัยและพัฒนาวัสดุพาจากแหนแดงสำหรับผลิตปุ๋ยชีวภาพ ผลการทดลองพบว่า สามารถพัฒนาปุ๋ยชีวภาพแบบใหม่ได้ 6 วิธี คือ 1) ได้วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและการใช้ในรูปสารสกัดจากเซลล์สาหร่าย 1 วิธี 2) พัฒนาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม 1 วิธี 3) ได้เทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อน 1 วิธี 4) ได้เทคโนโลยีการผลิตและการใช้ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น 1 วิธี 5) ได้เทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม 1 วิธี 6) ได้วิธีการใช้วัสดุพาจากแหนแดงสำหรับผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตและปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ซึ่งจะได้มีการนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดและผลิตขยายผลให้เกษตรกรได้ใช้ในการผลิตพืชต่อไป

Keyword biofertilizer production, blue green algae biofertilizer, potassium solubilizer biofertilizer, plant growth promoting rhizobacteria biofertilizer, phosphate solubilizing biofertilizer, mycorrhizal biofertilizer and rhizobium biofertilizer

Abstract

Biofertilizer production research and development technology conducted on 5 types of bioferilizer. They was divided to 5 experiments. 1) study on utilization of cell extract of nitrogen fixing blue green algae, 2) potassium biofertilizer production research and development, 3) pure plant growth promoting bacteria research and development, 4) reduce contamination of buscular mycorrhizal biofertilizer production technology research and development, 5. mixed inoculum phosphate solubilizing biofertilizer production technology research anddevelopment, and 6. use azolla as carrier of biofertilizer production research and development. The result could developed 6 biofertilizer production methods. 1) blue green algae biofertillizerproduction and use it cell extract for reduction 25 percent of nitrogen in vegetable production, 2) potassium biofertilization production to reduce use of potash chemical fertilizer application, 3) sterile carrier plant growth promoting biofertilizer production to reduce 25 percent of chemical nitrogen, phosphate and potash fertilizers in rice production, 4 low contamination granular abuscular mycorrhizal biofertilizer production technology to reduce phosphate. We can use this research results for improved our bioferilizer production technology in Department of agriculture and extent to privet sector or intend farmers.

บทนำ

ปุ๋ยชีวภาพเป็นปุ๋ยชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติหลักต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ให้ธาตุอาหารพืช มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ ปัจจุบันปุ๋ยชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการเกษตร นอกจากจะสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตแล้ว ยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย และเมื่อกล่าวถึงปุ๋ยชีวภาพ ทุกคนจะนึกถึงปุ๋ยที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ช่วยตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสฟอรัส หรือคุณสมบัติอื่นๆ มีลักษณะเป็นผงใช้ในการคลุกเมล็ดหรือใส่ลงในดิน (Mostsara et al., 1995 และ Gandhi and Sivakumar, 2010) นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) กลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่ที่ดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระ โดยจะเป็นประโยชน์แก่พืชได้เมื่อเซลล์ถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนในรูปที่พืชดูดใช้ได้ ความเป็นประโยชน์แก่พืชจะมากหรือน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสกุล ชนิด และสายพันธุ์ของสาหร่ายที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ นอกจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะให้ไนโตรเจนแก่พืชแล้ว สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังมีประโยชน์ด้านอื่นๆอีกด้วย เช่น สามารถสังเคราะห์สารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนาการเจริญเติบโตของพืช กลุ่มออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน วิตามิน โพลีเปปไทด์ และ กรดอะมิโน เป็นต้น (Whitton, 2000; Sekar *et al*., 1995) ซึ่งสารเหล่านี้จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชได้จึงมีการนำสารสกัดเซลล์สาหร่ายมาใช้ในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว และช่วยเร่งการงอกของเมล็ดพืชต่างๆ ซึ่งได้มีการทดสอบทั้งระดับเรือนทดลองและสภาพไร่นาในข้าวและพืชผักอื่นๆ (Roger, 1995) ปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน

หรือจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เป็นปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ทั้งบริเวณดินรอบๆราก ผิวราก ภายในราก ต้นและใบพืช โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วยการสร้างธาตุอาหารหรือเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชบางชนิด ซึ่งมีแบคทีเรียหลายชนิดที่พบว่าอาศัยอยู่ในดิน ราก และต้นพืช (Mehnaz *et al*. 2001) โดยประโยชน์ที่สำคัญของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่อาศัยอยู่รอบๆรากพืชเหล่านี้ คือ การตรึงไนโตรเจน (Meunchang *et al*. 2004) ผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid (IAA) (Boddey *et al*. 1995 และ Meunchang *et al*. 2004) ทั้งยังช่วยให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ส่งผลช่วยให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (Jacoud *et al*. 1999) ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพนิยมใช้ดินพีท ลิกไนต์ ถ่านหิน หรือดินที่มีเนื้อละเอียด เป็นวัสดุพา (carrier) ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง มีขนาดเล็ก เนื้อละเอียดทำให้มีพื้นที่ผิวมากซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี (Gandhi and Sivakumar, 2010) โดยทั่วไปวัสดุพาที่ดีควรมีอินทรียวัตถุสูง มีไนโตรเจนเหมาะสม ไม่เป็นพิษกับจุลินทรีย์ ราคาไม่แพงและหาง่าย แม้พีทจะเป็นวัสดุที่ดีแต่ปัจจุบันในประเทศไทยหาได้ยากมาก นักวิจัยจึงมีความพยายามวิจัยเพื่อใช้วัสดุอื่นๆ มาทดแทน เช่น ดินเหนียว มูลสัตว์ ปุ๋ยหมัก และวัสดุอินทรีย์อื่นๆ (Stephens and Rask, 2000) ในประเทศไทยมีวัสดุอินทรีย์ราคาถูกจำนวนมาก แต่เมื่อนำมาใช้ในเป็นวัสดุพากับประสบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และสารพิษที่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ด มีรายงานว่าปุ๋ยหมักที่มีการหมักสมบูรณ์มีความเหมาะสำหรับการใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพราะสามารถช่วยในการคงจำนวนจุลินทรีย์ได้ดี (Gandhi and Sivakumar, 2010) แต่งานวิจัยที่เกี่ยวกับเรื่องนี้ยังมี ดังนั้นในกิจกรรมนี้ จึงมีความประสงค์จะศึกษาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพในประเทศไทยเพื่อให้ได้วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพชนิดต่างๆที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการผลิตพืช

ระบียบวิธีการวิจัย

1. การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการผลิตสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ไปใช้ประโยชน์ในรูปสารสกัดเซลล์ โดยดำเนินการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสร้างโปรตีนและมวลชีวภาพสูง การศึกษาวิธีการสกัดสารละลายเซลล์แซบ และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการ การศึกษาผลการใช้สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของผักกาดหอม และวิธีการเก็บรักษาสารสกัดที่มีประสิทธิภาพ
2. การวิจัยพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พีจีพีอาร์ที่มีประสิทธิภาพสูง การคัดเลือกวัสดุพาที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่ปราศจากการปนเปื้อนอื่นๆ การวิจัยพัฒนาเทคนิคการฆ่าเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ การศึกษาการมีชีวิตรอดของพีจีพีอาร์ในวัสดุพาปลอดเชื้ออื่นๆ การวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ปลอดเชื้อปนเปื้อนเชื้ออื่นเชิงอุตสาหกรรม
3. การคัดเลือกสายพันธุ์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่สร้างสปอร์อยู่ในรากพืชเป็นปริมาณมาก ศึกษาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเป็นแบบเม็ดลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น
4. การทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในห้องปฏิบัติการ การศึกษา

ประสิทธิภาพในการเข้าครอบครองรากของเชื้อจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกไว้ ศึกษาวิธีการผลิตจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพ การจำแนก genus และ species ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

5. เพิ่มปริมาณแหนแดงเพื่อการผลิตวัสดุพาสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ ของแหนแดงเพื่อใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

6. การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของแหนแดงที่ใช้เป็นวัสดุพาสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของแหนแดงที่ใช้เป็นวัสดุพาสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1.1 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการผลิตสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ไปใช้ประโยชน์ในรูปสารสกัดเซลล์

สามารถคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสร้างโปรตีนและน้ำหนักแห้งได้ดี จำนวน 4 สกุล ได้แก่ สกุล *Anabaena, Calothrix, Hapalosiphon* และ *Nostoc* โดยมีปริมาณโปรตีน และน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 200.5-298.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.80-1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสายพันธุ์ที่สร้างโปรตีนและน้ำหนักแห้งได้สูงสุดมีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Anabaena cylindrica* DASH N01101 และ *Hapalosiphon* sp. DASH N05101 และเมื่อนำสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์มาทดสอบหาวิธีการสกัดสารละลายเซลล์แซบที่เหมาะสม พบว่า วิธีการสกัดเย็นทำให้ได้ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนสูงกว่าวิธีการสกัดร้อน ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่พบในทะเลซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Azra and Pirzada, 2004) และสายพันธุ์ที่สามารถสร้างโปรตีนและน้ำหนักแห้งได้สูงสุดมีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Anabaena cylindrica* DASH N01101 และ *Hapalosiphon* sp. DASH N05101 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเซลล์ของสาหร่าย 2 สายพันธุ์ พบว่าวิธีการสกัดเย็นทำให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนในรูป Total amino และ free amino มากกว่าวิธีการสกัดร้อน โดยปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ให้ผลไปในทางเดียวกันในสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ (*Hapalosiphon* sp.DASH N05101 และ *Anabaena cylindrica* DASH N01101) ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้น พบว่ามีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับสารสกัดเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* (Shaaban *et al.,* 2001) ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ในสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้น พบว่า วิธีการสกัดเย็นและวิธีการสกัดร้อนทำให้ได้ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ใกล้เคียงกัน แต่ถ้าเปรียบเทียบกับปริมาณธาตุอาหารในสารสกัดสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* (Shaaban *et al.,* 2001) พบว่ามีน้อยกว่า และน้อยกว่าสารสกัดสาหร่ายทะเล *Sargassum wightii* (Sivasankari *et al*., 2006; Zodape *et al.,* 2009) และเมื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ *Hapalosiphon* sp. DASH N05101 ไปใช้ผลิตสารสกัดเซลล์สาหร่ายเพื่อใช้ในการทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตของผักกาดหอม ผลการทดลองในสภาพกระถาง เมื่อปลูกผักกาดหอมในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และฉีดพ่นสารสกัดสาหร่ายระดับ

ความเข้มข้นต่างๆ อย่างเดียว สัปดาห์ละ 2 ครั้ง พบว่าสารสกัดสาหร่ายที่ระดับความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้แก่ผักกาดหอมได้สูงที่สุด ส่วนผลการทดลองในสภาพแปลงทดลอง พบว่า การใช้สารสกัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ฉีดพ่นร่วมกับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม อัตรา 75 เปอร์เซ็นต์ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน มีผลทำให้ผักกาดหอมเจริญเติบโตและมีผลผลิตเทียบเท่ากับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม อัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดินปกติ หรือสามารถลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ได้ 25 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังกล่าวให้ผลไปในทางเดียวกันกับการทดลองในสภาพกระถาง และให้ผลสอดคล้องไปในทางเดียวกันกับ Shaaban (2001) ที่รายงานผลการฉีดพ่นสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียว (chlorella extract) ร่วมกับการใช้ปุ๋ยทางดินกับข้าวสาลี พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรสารสกัดเซลล์เข้มข้นในน้ำ) ทำให้ข้าวสาลีมีน้ำหนักแห้งของต้นเพิ่มขึ้นจากการฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าอย่างเดียว ถึง 81.41 เปอร์เซ็นต์ ในด้านผลการเก็บรักษาสารสกัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีประสิทธิภาพ นั้น พบว่า วิธีการเก็บรักษาโดยใช้สารเคมีโซเดียมเบนโซเอทร่วมกับการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสามารถรักษาปริมาณกรดอะมิโนรวม และปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ ให้คงสภาพอยู่และมีปริมาณใกล้เคียงกันกับปริมาณของสารสกัดสาหร่ายฯ ที่ระยะเวลาตั้งต้น โดยสามารถเก็บรักษาได้นาน 7 วัน

1.2 การวิจัยและพัฒนาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

ผลการแยกบริสุทธิ์แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมจากดินในประเทศไทย ศึกษาลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์และการติดสีแกรม พบว่า ไอโซเลทของแบคทีเรียมีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น สีเหลืองอ่อนและสีเหลือง รูปร่างเซลล์เป็นท่อน มีทั้งชนิดติดสีแกรมบวกและแกรมลบ ทำการสุ่มเลือกจำนวน 30 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความเหมาะสมกับชนิดของแหล่งโพแทสเซียมวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ 30 กรรมวิธี ใช้ไอโซเลทแทนกรรมวิธีการทดลองแบ่งเป็น 4 ชุด โดยชนิดของแหล่งโพแทสเซียมแทนชุดการทดลอง ได้แก่ แร่เฟลด์สปาร์ขนาด -40 แร่ไมกาขนาด -40 แร่ไมกาขนาด +40 และใช้ K_2HPO_4 เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ พบว่าแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญโดยใช้แหล่งโพแทสเซียมชนิดเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติและไอโซเลทเดียวกันก็มีความสามารถในการใช้แหล่งโพแทสเซียมต่างชนิดในการเจริญที่แตกต่างกัน ยกเว้น ไอโซเลท K01026 K02017 K05080 K05082 K06008 และ *Bacillus circulans* ที่ใช้แหล่งโพแทสเซียมได้ไม่แตกต่างกัน ไอโซเลท K01026 K02004 และ K06009 เจริญเพิ่มจำนวนได้สูงให้ค่า log number ระหว่าง 8.505-8.614 CFUต่อมิลลิลิตร (10 เท่า) เมื่อใช้แร่เฟลด์สปาร์ขนาด -40 เป็นแหล่งโพแทสเซียม บางไอโซเลทสามารถใช้แร่ไมกาขนาด -40 ได้ เช่น ไอโซเลท K01026 K02001 K02004 K06005 K06008 และ K06009 เพิ่มจำนวนได้ค่า log number ระหว่าง 8.430-8.618 CFUต่อมิลลิลิตร ไอโซเลท K02004 ใช้แหล่งโพแทสเซียมจากแร่ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีกว่าการใช้ K_2HPO_4 และไอโซเลท K01026 มีความเหมาะสมกับแหล่งโพแทสเซียมทุกชนิดที่ทดสอบให้ค่า log number มากกว่า 8.515 CFUต่อมิลลิลิตร

ส่วนใหญ่แบคทีเรียมีโคโลนีสีเหลืองซึ่งสันนิษฐานได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ผลิตสารออกฤทธิ์เป็นกรดในการย่อยสลายแร่เฟลด์สปาร์เพื่อให้ได้โพแทสเซียมและนำมาใช้ในการเจริญ (Mueller, 1996; Styriakova and

Styriak, 2002) ส่วนไอโซเลทกลุ่มที่ 5 ซึ่งเกิดโคโลนีสีขาวนั้นบอกเป็นนัยว่าใช้กลไกที่สำคัญในการย่อยสลายแร่เฟลด์สปาร์แตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มแรก เช่น สร้างสารอินทรีย์ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารคีเลตไอออนของโพแทสเซียมเพื่อให้อยู่ในรูปที่ละลายได้ ดังเช่น ผลงานวิจัยของ Vandevivere et al. (1994) ที่รายงานการใช้แบคทีเรีย 17 ไอโซเลทและทดสอบความสามารถในการละลายแร่ซิลิเกตแบคทีเรียที่สามารถละลายซิลิกอนออกมาจากแร่ซิลิเกตได้ คือ ไอโซเลทที่ผลิต gluconate เป็นต้น การทดลองนี้ได้ผลทำนองเดียวกับผลงานวิจัยของ Sugumaran and Janarthanam (2007) ที่พบว่า *Bacillus mucilaginosus* MCRCp1 มีความสามารถในการละลายแร่ที่มีโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบได้ไม่เท่ากัน กล่าวคือ สามารถละลายโพแทสเซียมจาก muscovite mica ได้ 42.29 มิลลิกรัมต่อลิตร microcline mineral ได้ 1.26 มิลลิกรัมต่อลิตร และ orthoclase ได้เพียง 0.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏชัดเจนว่าไอโซเลท K02004 ใช้แหล่งโพแทสเซียมจากแร่ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีกว่าการใช้ K_2HPO_4 และไอโซเลท K01026 มีความเหมาะสมกับแหล่งโพแทสเซียมทุกชนิดที่ทดสอบให้ค่า log number มากกว่า 8.515 CFUต่อมิลลิลิตร

1.3 การวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อน

การวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อน ได้ดำเนินการโดยการพัฒนาสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียฉายรังสี หาสูตรวัสดุพาที่เหมาะสม หาวิธีการฆ่าเชื้อโดยการฉายรังษี ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพาปลอดเชื้อ และการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม ผลการทดลองพบว่า ได้วิธีการฉายรังสีด้วยอิเลคตรอนบีม ที่ 120-150 Gy ซึ่งทำให้เชื้อสกุล Azospirillum สามารถลดปริมาณเชื้อลง 1 log (D10) และคัดเลือกเชื้อบางสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจากเชื้อเดิม ส่วนในการทดลองหาสูตรวัสดุที่เหมาะสมในการใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ พบว่า ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์เป็นวัสดุพาที่เหมาะสมสำหรับผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มากที่สุดเนื่องจากปุ๋ยหมักมีสภาพเป็นด่าง เมื่อใช้ดินเหนียวชุดองค์รักษ์ซึ่งเป็นกรดจัดเพราะมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบมาก ทำให้วัสดุพาสูตรใหม่มีสภาพเป็นกลางทำให้มีความเหมาะสมสำหรับเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ซึ่งเชื้อที่เป็นองค์ประกอบชอบสภาพปฏิกริยา กรด-ด่าง ประมาณ 6-7.5 การฆ่าเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาพบว่าการฉายรังสีแกมม่า 25 KGy จะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อปนเปื้อนเกือบทั้งหมด ให้ผลเทียบเท่ากับการนึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 60 นาที แต่อย่างไรก็ตามการอยู่รอดของเชื้อ *Azospirillum brasilense* TS29 และ *Burkholderia vietnamensis* S45 สามารถอยู่รอดได้ดีกว่าในวัสดุพา นึ่งฆ่าเชื้อ และไม่นึ่งฆ่าเชื้อ ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง แต่อย่างไรก็ตามการเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ก็จะยิ่งทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้นานขึ้นถึง 1 ปี ผลการศึกษาการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมพบว่าการขยายหัวเชื้อในถังเพาะเลี้ยงขนาด 200 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ลิตร ใช้หัวเชื้อ 6 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ปริมาณเชื้อ *Azospirillum brasilense* TS29 และ *Burkholderia vietnamensis* S45 สูงถึง 10^9 และ 10^8 ตามลำดับ และสามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาพการเก็บรักษาในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และในวัสดุพาฆ่าเชื้อโดยการฉายรังษีได้นาน ถึง 1 ปี ผลการทดสอบประสิทธิภาพปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่ผลิตเชิงอุตสาหกรรมในแปลงทดลอง ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ปลอดเชื้อปนเปื้อนต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าว โดย

ดำเนินการในดินร่วนทราย ในแปลงทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ในฤดูนาปรัง ปี พ.ศ. 2558 โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยอัตรา 1 เท่าของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน (18-0-6 N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่) กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน อัตรา 0.5 เท่าของอัตราแนะนำฯ (9-0-6 N-P_2O_5-K_2O) กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน อัตรา 0.5 เท่า (9-0-6 N-P_2O_5-K_2O)+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อกรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน อัตรา 0.5 เท่า (9-0-6 N-P_2O_5-K_2O)+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน อัตรา 0.5 เท่า (9-0-6 N-P_2O_5-K_2O)+ ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพาที่ปลอดเชื้ออื่นด้วยการฉายรังสี 25 KGy เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กรรมวิธีที่ 7 ใส่ปุ๋ยอัตรา 0.75 เท่า (13.5-0-4.5 N-P_2O_5-K_2O) กรรมวิธีที่ 8 ใส่ปุ๋ยอัตรา 0.75 เท่า (13.5-0-4.5 N-P_2O_5-K_2O) +ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ กรรมวิธีที่ 9 ใส่ปุ๋ยปุ๋ยอัตรา 0.75 เท่า (13.5-0-4.5 N-P_2O_5-K_2O)+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กรรมวิธีที่ 10 ใส่ปุ๋ยอัตรา 0.75 เท่า (13.5-0-4.5 N-P_2O_5-K_2O)+ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพาที่ปลอดเชื้ออื่นด้วยการฉายรังสี 25 KGy. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยดำเนินการปลูกข้าวแบบนาหว่านน้ำตม ใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวอัตรา 15 กิโลกรัมต่อไร่ โดยใช้ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 กรรมวิธีที่คลุกปุ๋ยชีวภาพดำเนินการคลุกเมล็ดข้าวกับปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่ผลิตและเก็บรักษาไว้ 30 วันโดยใช้อัตรา 500 กรัมต่อเมลดพันธุ์ข้าว 15 กิโลกรัม ก่อนหว่านให้กระจายทั่วทั้งแปลงทดลอง เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตและผลผลิตเมื่อข้าวอายุ 120 วัน ผลการทดลองพบว่า การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์รูปแบบต่างๆร่วมกับปุ๋ยเคมีทุกอัตรา ไม่มีผลทำให้ ความสูง การแตกกอ และองค์ประกอบผลผลิตของข้าวมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) แต่มีผลทำให้ผลผลิตตอซังและผลิตเมล็ดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมี 0.75 เท่าและใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพาที่ปลอดเชื้ออื่นด้วยการฉายรังสี 25 KGy และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตตอซังข้าวและผลผลิตเมล็ดสูงสุด 697 และ 746 กก./ไร่ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพาที่ปลอดเชื้ออื่นด้วยการฉายรังสี 25 KGy และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการลดการใช้ปุ๋ยเคมีในการปลูกข้าวได้ร้อยละ 25 ดีกว่าปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ข้าวเดิมในวัสดุพาไม่ฆ่าเชื้อ ทำให้ได้วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ข้าวสูตรใหม่ 1 สูตร ซึ่งประกอบด้วย เชื้อสายพันธุ์ไทย 2 สกุล คือ *Azospirillum brasilense*. TS29 และ *Burkholderia vietnarmensis* S44 ในวัสดุพาปลอดเชื้ออื่นด้วยการฉายรังสี 25 KGy และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

1.4 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและการใช้ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโครไรซ่า แบบลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น

วิธีการผลิตราอาบัสคูลาไมโครไรซ่าเป็นแบบเม็ดลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพรูปแบบใหม่ คือ แบบเม็ดซึ่งผลิตด้วยวิธีการตรึงเซลล์ และใช้ราอาบัสคูลาไมโครไรซ่า สกุล *Glomus intraradices* ที่อยู่ในชิ้นรากพืชเป็นหัวเชื้อ จากนั้นนำอาบัสคูลาไมโครไรซ่าแบบเม็ดมาวัดปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนบนอาหาร Potato dextrose agar และบนอาหาร Nutrient agar ด้วยวิธี plate count เปรียบเทียบกับการผลิตปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบเดิม (แบบผง) พบว่า ชิ้นรากพืชที่ใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 20 กรัม สามารถผลิตอา

บัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ดได้น้ำหนักรวม 125 กรัม เม็ดเจลที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในดิน พบว่าดินที่ใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์แบบผงมีการปนเปื้อนเชื้อราบนอาหาร Potato dextrose agar โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 3.6×10^{5} cfuต่อกรัม และจำนานแบคทีเรียบนอาหาร Nutrient agar โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 5.5×10^{5} cfuต่อกรัม ส่วนผลิตภัณฑ์แบบเม็ดพบมีการปนเปื้อนเชื้อราบนอาหาร Potato dextrose agar โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 4.76×10^{3} cfuต่อกรัม และจำนานแบคทีเรียบนอาหาร Nutrient agar โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 5.1×10^{3} cfuต่อกรัม การผลิตแบบเมล็ดจึงลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้มากกว่าแบบผงเดิม Entrapment เป็นวิธีที่สามารถใช้ตรึงเซลล์ได้ดี และเป็นวิธีที่ใช้อย่างกว้างขวางกับเซลล์จุลินทรีย์ (Shuler and Kargi, 2002) โดยเซลล์จะเข้าไปอยู่ในโครงร่างตาข่ายของแอลจิเนต ซึ่งเป็นการเกิดเจลแบบไอโอโทรปิก (ionotropic gel) ของโมเลกุลแอลจิเนต กับ multivalent cation (Fukuda,1995) จากการทดลองการตรึงเซลล์เพื่อผลิตอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ด พบว่า ชิ้นรากพืชที่ใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 20 กรัม สามารถผลิตอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ดได้น้ำหนักรวม 125 กรัม เม็ดเจลที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5.7 มิลลิเมตร

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในดินด้วยวิธี plate count พบว่าดินที่จะใช้ผลิตภัณฑ์แบบผงมีการปนเปื้อนเชื้อราที่เลี้ยงบน Potato Dextrose Agar โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 3.6×10^{5} cfuต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่เลี้ยงบน Nutrient agar Agar เท่ากับ 5.5×10^{5} cfuต่อกรัม ส่วนผลิตภัณฑ์แบบเม็ดพบมีการปนเปื้อนเชื้อราที่เลี้ยงบน Potato Dextrose Agar โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 4.76×10^{3} cfuต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียที่เลี้ยงบน Nutrient agar Agar เท่ากับ 5.1×10^{3} cfuต่อกรัม ขบวนการผลิตแบบผงมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มากกว่าการผลิตแบบเม็ด เนื่องจากการผลิตแบบผง จะใช้ดินที่ขยายโดยใช้พืชอาศัยนี้เป็นหัวเชื้อ ถึงแม้ดินนี้ก่อนนำมาขยายเชื้อจะมีการทำให้ปลอดเชื้อแล้วก็ตาม แต่การปนเปื้อนของจุลินทรีย์อาจจะปนเปื้อนมากับน้ำ และอากาศ ช่วงระหว่างที่ขยายในพืชอาศัย ดังนั้นการผลิตแบบเม็ดจึงมีปริมาณการปนเปื้อนน้อยกว่าซึ่งเป็นผลมาจากที่มีการทำความสะอาด และการล้างฆ่าเชื้อของชิ้นรากที่จะนำมาใช้ผลิตหัวเชื้อ อีกทั้งขบวนการผลิตยังดำเนินการในที่ปลอดเชื้อ

1.5 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม

การวิจัยและพัฒนาเทคโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต จึงทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและรากพืช จำนวน 150 ตัวอย่าง ได้จุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน$CaHPO_4$ 228 ไอโซเลท คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลาย $CaHPO_4$ ที่ระดับ 5 (วงใสมากกว่า 9 มิลลิเมตร) ได้ 9 ไอโซเลท ผลการจำแนกเบื้องต้น พบว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. *Pseudomonads* sp. ราสกุล *Penicillium* sp. *Trichoderma* sp. และ *Aspergillus* sp. ผลการศึกษาการเข้าครอบครองราก ของเชื้อ *Pantoea dispersa* PSB0012 สายพันธุ์ที่ทนสารปฏิชีวนะ โดยใช้สารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี sand soil method ด้วยการเพาะเมล็ดข้าวโพดและท่อนพันธุ์อ้อย พบว่าปริมาณเชื้อต่อเมล็ดข้าวโพดมีค่าเฉลี่ย 1.41×10^{6} เซลล์ต่อเมล็ด ปริมาณเชื้อที่รากข้าวโพดมีค่าเฉลี่ย 1.48×10^{4} เซลล์ต่อกรัมของราก และที่รากอ้อยเฉลี่ย 1.04×10^{4} เซลล์ต่อกรัมของราก และประสิทธิภาพในการละลาย

ฟอสฟเฟตคงเดิม การศึกษาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบผสม โดยใช้แบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ RPS 0081B และ RPS 0034B ซึ่งไม่เป็นปฏิปักษ์กัน พบว่า nutrient broth บ่ม 7 วัน เป็นอาหารที่ทำให้มีปริมาณเซลล์สูงที่สุด การศึกษาเพื่อหาวัสดุพาที่เหมาะสมในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต โดยใช้ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียดและซีโอไลท์เป็นวัสดุพา และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษา โดยเปรียบเทียบการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง พบว่า การเก็บที่อุณหภูมิห้องเชื้ออยู่รอดได้แค่ 60 วันก็ต่ำกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำกรมวิชาการเกษตร ขณะที่การเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาให้เชื้ออยู่รอดสูงกว่าเกณฑ์ขั้นต่ำได้ถึง 150 ผลการทดสอบประสิทธิภาพปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม กับข้าวโพด ในกระถางทดลอง ในชุดดินสตึกที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ พบว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสมทำให้ข้าวโพดมีความสูงและผลผลิตฝักสูงกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว

ผลจากการทดลองนี้จึงทำให้ได้ เชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพ วิธีการผลิตและเก็บรักษาปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตแบบเชื้อผสมและผลการใช้ในการผลิตพืช 1 เทคโนโลยี

1.6 **การศึกษาวิจัยและพัฒนาวัสดุพาจากแหนแดงสำหรับผลิตปุ๋ยชีวภาพ**

ผลการทดลองเพิ่มปริมาณแหนแดงเพื่อการผลิตวัสดุพาสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพในบ่อทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร เพื่อหาอัตราที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแหนแดง โดยใช้แหนแดงในอัตราเริ่มต้น 100 200 และ 300 กิโลกรัมต่อไร่ และเก็บเกี่ยวเมื่อแหนเต็มบ่อทดลอง พบว่าเมื่อใช้แหนแดงอัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ มีแนวโน้มให้ผลผลิตแหนแดงสดสูงที่สุดในแต่ละครั้งที่เก็บเกี่ยว และสามารถเก็บเกี่ยวได้ 6 ครั้ง ภายในระยะเวลา 3 เดือน คือ 2,046 2,016 2,076 2,154 2,003 และ 2,130 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ ในขณะที่การใช้แหนแดงอัตรา 200 และ 100 กิโลกรัมต่อไร่ เก็บเกี่ยวได้ 5 และ 4 ครั้ง ในระยะเวลา 3 เดือน ตามลำดับ และเมื่อทดลองเก็บเกี่ยวแหนแดงในระยะเวลาทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยใส่แหนแดงในอัตราเริ่มต้น คือ 100 200 และ 300 กิโลกรัมต่อไร่ จำนวน 6 ครั้งหลังเก็บเกี่ยวแหนแดงในบ่อทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 เซ็นติเมตร พบว่า การใส่แหนแดงอัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ให้น้ำหนักรวมสูงที่สุด คือ 12,907 กรัมต่อตารางเมตร รองลงมาได้แก่ อัตรา 200 กิโลกรัมต่อไร่ ให้น้ำหนักรวม 9,029 กรัมต่อตารางเมตร ส่วนการใส่แหนแดงอัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ ให้น้ำหนักรวมเท่ากับ 5,375 กรัมต่อตารางเมตร

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และสมบัติทางกายภาพของแหนแดง เพื่อใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพแหนแดง พบว่า แหนแดง (*Azolla microphylla* Kaulf.) ที่ใช้ในการศึกษามีปริมาณ ไนโตรเจนทั้งหมด 4.62 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 0.65 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด 5.27 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ แคลเซียมทั้งหมด 2.54 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแมกนีเซียมทั้งหมด 0.37 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเหล็กทั้งหมด 0.18 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ แมงกานีสทั้งหมด 0.17 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณทองแดงทั้งหมด 15.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณสังกะสีทั้งหมด 66.22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโน พบว่าแหนแดงมีปริมาณกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สูง เช่น ปริมาณ Aspartic acid, Glycine, Threonine, Glutamic acid, Proline, Methionine, Lysine, Arginine และ Tryptophan 1,931, 1,043, 989, 2,886, 951, 329, 1,023, 1,149 และ 266 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนัก ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของแหน

แดง (A) และวัสดุพาชนิดอื่น ซึ่งได้แก่ ปุ๋ยหมักมูลวัว (C) และ ซีโอไลท์ (Z) ประกอบด้วยความสามารถซึมได้ของน้ำในวัสดุพา (Permeability) พร้อมการจัดชั้น (Class) และ ความหนาแน่นรวม (Bulk Density) พบว่าแหนแดงมีความสามารถซึมได้ของน้ำต่ำกว่าปุ๋ยหมักมูลวัว และ ซีโอไลท์ ส่วนชั้นความสามารถซึมได้ของน้ำในวัสดุพา พบว่าแหนแดงมีคุณสมบัติในการให้น้ำซึมผ่านได้ต่ำ ส่วนปุ๋ยหมักมูลวัว และ Zeolite มีคุณสมบัติในการให้น้ำซึมผ่านได้ปานกลาง และเมื่อนำวัสดุพาทั้ง 3 ชนิด มาผสมกัน ดังนี้ 1. A:C:Z (1:1:1) 2. A:C:Z (2:1:1) 3. A:C:Z (3:1:1) 4. A:C (1:1) 5. A:Z (1:1) 6. C:Z (1:1) 7. A:Z (2:1) พบว่า มีคุณสมบัติในการให้น้ำซึมผ่านได้ปานกลาง และเมื่อนำแหนแดงไปผสมกับวัสดุพาทั้งสองชนิดทำให้วัสดุพามีความสามารถซึมได้ของน้ำสูงขึ้นทั้งปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์

เมื่อนำแหนแดงมาใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต โดยทดลองใช้แหนแดงแห้งร่วมกับปุ๋ยหมักมูลโค โดยผสมแหนแดงแห้งผสมกับปุ๋ยหมักมูลโคสัดส่วน 1:3 และ 1:5 ตามลำดับ พบว่าวัสดุพาแหนแดงสามารถทำให้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมีปริมาณสูงกว่าเกณฑ์ปริมาณจุลินทรีย์รับรองของ พรบ. ปุ๋ยชีวภาพ ตามที่ พรบ.ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ซึ่งกำหนดให้ปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในวัสดุพาไม่น้อยกว่า $1.0x10^{8}$ CFUต่อกรัม โดยในวัสดุพาแหนแดงมีปริมาณ จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต $1.6x10^{8}$ CFUต่อกรัม ที่ 180 วันหลังการบ่ม และในการบ่มจุลินทรีย์ในวัสดุพาแหนแดงมีแนวโน้มทำให้ปริมาณสูงขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ 30 วันหลังการเก็บรักษา โดยมีปริมาณเพิ่มสูงถึง $1.3x10^{11}$ CFUต่อกรัม ถึงแม้เก็บรักษาไว้นาน 90 วัน ปริมาณจุลินทรีย์ก็ยังสูง คือ $1.1x10^{10}$ CFUต่อกรัม ในขณะที่วัสดุพาชนิดอื่น คือ ปุ๋ยหมักมูลโค และแหนแดงผสมปุ๋ยหมักมูลโคอัตรา 1:3 และ 1:5 มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีแนวโน้มลดลง และลดต่ำกว่า $1 x10^{8}$ CFUต่อกรัม เมื่อระยะเวลาผ่านไป 180 วัน ซึ่งการใช้แหนแดงเป็นวัสดุพานั้นมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้เพื่อทดแทนพีทได้ดี

สำหรับการศึกษาการใช้แหนแดงเป็นวัสดุพาเพื่อใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม โดยทดลองใช้แหนแดงแห้ง ปุ๋ยหมักมูลโค แหนแดงแห้งผสมกับปุ๋ยหมักมูลโคสัดส่วน 1:3 1:5 1:10 1:25 และ 1:50 ตามลำดับ พบว่าวัสดุพาแหนแดงสามารถทำให้เชื้อไรโซเบียมมีปริมาณตามระยะเวลาที่พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ซึ่งกำหนดไว้ที่ $1 x10^{6}$ CFUต่อกรัม โดยในวัสดุพาแหนแดงร่วมกับปุ๋ยหมักมูลโคสัดส่วนตั้งแต่ 1:5 1:10 และ 1:25 มีปริมาณเชื้อไรโซเบียมสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดคือ $1 x10^{6}$ CFUต่อกรัม ที่ 180 วันหลังการบ่ม และยังคงปริมาณเชื้อไว้ได้ถึง 270 วัน

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยในกิจกรรมนี้ ทำให้ได้ วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพใหม่ 6 ชนิด ประกอบด้วย 1) ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 2) ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม 3) ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต 4) ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 5) การใช้แหนแดงเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตและ 6) การใช้แหนแดงเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

สามารถใช้ผลการทดลองในกิจกรรมนี้ไปต่อยอดได้ทั้งการวิจัยต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการทดสอบประสิทธิภาพในการใช้ในการผลิตพืชทั้งในระดับกระถางและการทดลอง บางการทดลองสามารถนำ

ผลงานวิจัยไปต่อยอดได้ในเชิงอุตสาหกรรม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับงานวิจัยและเป้าหมายในการใช้ประโยชน์และบางงานวิจัยยังมีความจำเป็นต้องมีการวิจัยและพัฒนาเพิ่มเติม

กิจกรรมที่ 2

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพของประเทศไทย

มนต์ชัย มนัสสิลา ศศิษา สังวิเศษ ศิริลักษณ์ จิตรอักษร อัจฉรา นันทกิจ อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง กัลยกร โปร่งจันทึก ประไพ ทองระอา ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต มณฑิกานธิ์ สังข์น้อย นิศารัตน์ ทวีนุต สุพาพร ธรรมสุระกุล สุปรานี มั่นหมาย อธิปัตย์ คลังบุญครอง ธูปหอม พิเนตรเสถียร ภาวนา ลิกขนานนท์

คำสำคัญ ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ปุ๋ยชีวภาพมัยคอร์ไรซ่า ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

บทคัดย่อ

ปุ๋ยชีวภาพมีความแตกต่างจากปุ๋ยประเภทอื่น รวมไปถึงการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพให้ทันสมัยมากขึ้น เพื่อรองรับการเข้าสู่มาตรฐานสากล และลดข้อขัดแย้งระหว่างบริษัทผู้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ หน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรมีภารกิจเป็นผู้รับรองการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพเพื่อการขึ้นทะเบียนตามพระราชบัญญัติปุ๋ย ได้แก่ ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการจำแนกสกุลและชนิดปุ๋ยชีวภาพการใช้เทคนิคทางอณู พันธุศาสตร์ ด้วยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ยีน ที่ความยาวมากกว่า 1,400 bp เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่สามารถจำแนกสกุลและชนิดของเชื้อไรโซเบียม แต่ถ้าต้องการความจำเพาะเจาะจงเพิ่มต้องมีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 ยีนในการจำแนก

การทดสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณเชื้อในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่ขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร และที่มีการจำหน่ายให้เกษตรกร การใช้ diluents ระหว่างการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ กับ สารละลายแร่ธาตุในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบวิธีการนับ 3 วิธี ประกอบด้วยวิธี plate counting drop plate และ drop plate MPN ผลการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาได้กับปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ที่ผลิตและจำหน่ายในท้องตลาด การใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเจือจางทำให้ *Azotobacter* มีชีวิตรอดน้อยกว่าในสารละลายแร่ธาตุอาหารเลี้ยงเชื้อ ในทุกกรรมวิธีการนับ และการนับโดยวิธี plate counting ในทุกสารละลายเจือจางให้ผลการวิเคราะห์ที่มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าวิธี drop plate และ drop plate –MPN ซึ่งวิธี drop plate ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการวิจัยการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เพราะมีต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงเชื้อและค่าแรงงานในการดำเนินการวิเคราะห์ต่ำกว่าวิธี plate counting และไม่ยุ่งยาก วิธีการจำแนกเชื้อด้วยวิธี 16S rDNA sequencing เป็นวิธีที่ทำให้ทราบผลการจำแนกสกุลได้อย่างแม่นยำ

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าด้วยวิธี MPN โดยใช้ดินผสมทรายเป็นตัวเจือจางที่เหมาะสม และวิธีการจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าด้วยวิธีการจำแนกด้วยวิธี phylogenetic โดยใช้ตำแหน่งยีน 18S rRNA สามารถจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าได้ในถึงระดับชนิดมี

ความถูกต้องและแม่นยำ และสามารถจำแนกได้ถึงระดับชนิดได้ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการจำแนกชนิดเชื้อราและเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ

การตรวจสอบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตต้องคำนึงถึงความสามารถในการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพทั้งหมดที่มีอยู่ในปุ๋ยชีวภาพ สามารถเลือกใช้ diluent คือ น้ำเกลือ ที่ระยะเวลา 10 นาที สำหรับตรวจนับ *Bacillus* sp. และ น้ำกลั่น ที่ระยะเวลา 5 นาที สำหรับตรวจนับ *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Pantoea* sp. และเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GMBA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *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

เมื่อเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วยวิธี BioLog system กับ partial 16S rDNA sequencing พบว่าหากเป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิดไม่สร้างสปอร์การใช้วิธี Biolog system จะได้ผลตรงกับการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรมเมื่อค่า similiarity มากกว่า 0.588 แต่หากเป็น จีนัส *Brevibacterium* ควรจำแนกโดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

Keyword **biofertilizer production, blue green algae biofertilizer, potassium solubilizer biofertilizer, plant growth promoting rhizobacteria biofertilizer, phosphate solubilizing biofertilizer, mycorrhizal biofertilizer and rhizobium biofertilizer**

Abstract

Bioertilizer were different from other types of fertilizers including research and development, technical analysis fertilizer more stylish and devoted to the international standards. And reduce conflict between fertilizer manufacturers. Department of Agriculture, whose mission were the guaranteed analysis fertilizer for fertilizer registration under the act. Biofertilizers such as rhizobium biofertilizer, arbuscular mycorrhiza biofertilizer, PGPR biofertilizer, cyanobacteria biofertilizer, phosphate solubilization biofertilizer and potassium solubilization biofertilizer. Research and development of techniques to identify the genus and species of fertilizer techniques in molecular genetics by reading the sequence of nucleotide of the 16S rRNA gene is longer than the 1,400 bp compared to a database that is able to classify the currency as well for the type of rhizobium. To increase specificity nucleotide sequences of more than one gene were used to identification.

Testing method of spreading in PGPR biofertilizer registered with the Department of Agriculture abd sold to farmers using diluents, the use distilled water and sterile solution of minerals in food culture. Comparison of three methods to include plate counting drop plate and drop plate MPN test analytical methods developed with PGPR biofertilizer. Produced and sold in the market using distilled water, a dilute solution makes *Azotobacter* survives less than minerals in solution culture. In the process of counting by plate count and counting in a dilute solution of all analytical results were less convincing than the drop plate and drop plate – MPN. Drop plate method, which was a method commonly used in research, manufacture fertilizer. Because the cost of the medium and the labor to complete the analysis under way plate counting and hassle. How to identify the infection by 16S rDNA sequencing was a way to know the precise classification currency.

How to determine the amount of arbuscular mycorrhiza biofertilizer products by using MPN method. This method using soil mixed with sand was suitable diluent. And how to identify arbuscular mycorrhiza biofertilizer by phylogenetic classification. Using 18S rRNA gene, the fungus can be classified arbuscular mycorrhiza in the level of accuracy and precision and can be classified as a species, which was the same method that widely used in the identification of fungi, and was recognized internationally.

Monitoring biological phosphate solubilization biofertilizer regardless of their ability to counter microbial solubilize phosphate efficiency all exist in fertilizer. You can use saline diluent is a 10-minute period for counting *Bacillus* spp., and distilled water for a period of 5 minutes count *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. and *Pantoea* spp. use culture media for use in

counting GMBA *Bacillus* spp. PCA agar for the count. *Lactobacillus* spp. And NA culture medium for use in the detection of *Pseudomonas* spp., And *Pantoea* spp. When counting microorganisms from phosphate solubilization biofertilizer and phosphate solubilization efficiently. Monitoring activities phosphate was a step that confirm solubilization remains. Phosphate solubilization activities of microbes were checking clear of foods with pikovskaya medium as a way to ease. Easy to operated and configuration Solubilization Index (SI) allows comparison phosphate solubilization preliminary activities as well. In addition, the activity of the phosphatase enzyme synthase it confirms the ability of phosphate another way.

To comparing the results of classifying potassium solubilization biofertilizer by BioLog system with partial 16S rDNA sequencing found that Gram-positive non-spore using Biolog system will not meet the classification of the genes on. the similarity than 0.588, but genus *Brevibacterium* should be classified by genotype.

บทนำ

ปัจจุบันการเกษตรส่วนใหญ่เป็นระบบการเกษตรที่ใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมีมากขึ้นซึ่งส่งผลต่อต้นทุน การผลิตและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะปุ๋ยเคมีและสารเคมีมีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงมีการใช้ปัจจัยการผลิตที่ผลิตจากจุลินทรีย์และสารสกัดจากธรรมชาติมากขึ้น ปัจจุบันปุ๋ยชีวภาพเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่เกษตรกร การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสามารถทดแทนปุ๋ยไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันนั้นพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ได้มีการแก้ไขเพิ่มเติมระบุชนิดแห่งปุ๋ย เป็น 3 ประเภทด้วยกัน ซึ่งหนึ่งในสามก็คือ ปุ๋ยชีวภาพทำให้หน่วยงานต่าง ๆ ของกรมวิชาการเกษตรที่มีภารกิจเกี่ยวข้องกับเรื่องปุ๋ยชีวภาพโดยตรง ต้องมีการวิจัยและพัฒนารูปแบบวิธีการเก็บตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพให้มีมาตรฐานเทียบเท่ามาตรฐานสากล เนื่องจากปุ๋ยชีวภาพมีความแตกต่างจากปุ๋ยประเภทอื่น รวมไปถึงการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพให้ทันสมัยมากขึ้น เพื่อรองรับการเข้าสู่มาตรฐานสากล และลดข้อขัดแย้งระหว่างบริษัทผู้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ หน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรมีภารกิจเป็นผู้รับรองการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพเพื่อการขึ้นทะเบียนตามพระราชบัญญัติปุ๋ย ปุ๋ยชีวภาพตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ได้กำหนดชนิดปุ๋ยชีวภาพไว้ 6 ชนิด คือ ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม ซึ่งแต่ละชนิดประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้วิธีการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพแต่ละชนิดให้มีมาตรฐานเทียบเท่ามาตรฐานสากล

การจำแนกสกุลและชนิดของจุลินทรีย์นอกจากจะใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาแล้วยังมีวิธีจำแนกโดยใช้ carbon source utilization pattern หรือ BioLog system และวิธี rDNA sequencing และ phylogenetic analysis ซึ่งวิธีจำแนกโดยใช้ carbon source utilization pattern นั้นได้รับความนิยมสูงเนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้งนี้ยังมีความรวดเร็วและให้ความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง โดยการใช้ถาดหลุมที่เคลือบสารอาหารซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้ง 95 ชนิด (BioLog microplate) ติดฉลากกับ tetrazolium violet เมื่อเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้อาหารจะทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชั่นซึ่งจะเปลี่ยนสารติดฉลากเป็นสีม่วง จากนั้นวิเคราะห์ปฏิกิริยาการเกิดสีและประมวลผลโดยเปรียบเทียบกับรูปแบบการใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ในฐานข้อมูล (กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา, 2551) ส่วนวิธี rDNA sequencing และ phylogenetic analysis นั้นใช้หลักการที่กล่าวว่าสิ่งมีชีวิตสองชนิดอาจไม่ใกล้ชิดมากพอที่จะมี DNA คล้ายกันมาก แต่ยังมีไรโบโซมที่คล้ายกัน ด้วยความคลายคลึงกันนี้สามารถใช้เป็นเครื่องมือวัดความใกล้ชิดกันระหว่างจุลินทรีย์ได้แต่เพียงแค่ในระดับสกุล ตระกูล หรืออันดับ (Young, 1996) นอกจากนั้นการจำแนกชนิด (species) ของจุลินทรีย์ๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene เหมือนกันมากกว่า 97 % จะถูกจำแนกเป็นชนิดเดียวกัน (Berkum and Eardly1998) เชื้อจุลินทรีย์ตระกูล *Bradyrhizobiaceae* ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ 9 สกุลได้แก่ *Bradyrhizobium, Afipia, Agromonas, Blastobacter, Nitrobacter, Oligotropha, Rhodopseudomonas, Rhodoblastus*, และ *Bosea* จากศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเชื้อจุลินทรีย์ตระกูล

Bradyrhizobiaceae มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดตามรายงานของ van Berkum (2006) ทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ เช่น atpD, recA, dnaK, glnII, gyrB และ rpoB จึงเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อไรโซเบียมในสกุล *Bradyrhizobium* (Rivas, 2009)

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิธีการวิจัยประกอบด้วย 6 ประเด็นหลัก คือ 1) การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม 2) การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 3) การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 4) การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า 5) การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต 6) การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

1 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

วิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเชื้อไรโซเบียมพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วเหลืองฝักสด เป็นต้น แยกเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์จากปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม บนอาหาร Yeast manitol บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์เพื่อทำการศึกษาต่อไป เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากเชื้อไรโซเบียม เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene, atpD gene, recA gene และ nodA gene ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่ว โดยใช้เทคนิค BOXAIR-PCR และ TP-RAPD อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene, atpD gene, recA gene และ nodA gene ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank จากเว็บไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene, atpD gene, recA gene และ nodA gene ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.0 การจำแนกเชื้อไรโซเบียมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี phylogenetic tree analysis ด้วยโปรแกรม Quantity One® - Bio-Rad

2 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

คัดเลือกแบคทีเรียคล้ายสกุล *Azotobacter Beijerinckia Azospirillum Burkholderia Herbaspirillum Curtobacterium* และ *Gluconacetobacter* ใช้วิธีการวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay ดำเนินการศึกษา diluents ที่เหมาะสมในการเจือจางปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยเชื้อสกุล *Azotobacter Beijerinckia Azospirillum Burkholderia Herbaspirillum Curtobacterium* และ *Gluconacetobacter* ศึกษาเปรียบเทียบการนับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระสกุล *Azotobacter Beijerinckia Azospirillum Burkholderia Herbaspirillum Curtobacterium* และ *Gluconacetobacter* ด้วยวิธี Plate

count, Drop plate และ MPN การจำแนกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระสกุล *Azotobacter Beijerinckia Azospirillum Burkholderia Herbaspirillum Curtobacterium* และ *Gluconacetobacter* ด้วยวิธี 16 rDNA sequencing

3 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

จัดซื้อสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ จำนวน 8 สกุล จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง ศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้สารละลายเจือจาง 2 ชนิดคือน้ำกลั่นและน้ำเกลือ 0.85% ต่อผลของการนับปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* TISTR8012 *, Nostoc* sp.*, และ Hapalosiphon welwitchii* TISTR เตรียมตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดน้ำสกุล *Anabaena Calothrix Cylindrospermum Hapalosiphon Nostoc Scytonema* และ *Tolypothri*x ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นับปริมาณตามกรรมวิธีที่กำหนด และนับปริมาณโดยวิธี Dilution Plate วิเคราะห์ข้อมูลและ คัดเลือกวิธีที่ให้ปริมาณโคโลนีรอดชีวิตมากกว่าวิธีมาตรฐานและเหมาะสมต่อการปฏิบัติงานจริงสำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแต่ละสกุล ทำการแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16S rDNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ และทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้สะอาด ดำเนินการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อทราบสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

4 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

เตรียมวัสดุในการทดลอง ได้แก่ ทราย ดิน ดินผสมทราย และเพอร์ไลท์ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยการอบไอน้ำนาน 1 ชั่วโมง เมื่ออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงทำการอบไอน้ำเวลาและอุณหภูมิเท่าเดิมซ้ำอีก 1 ครั้งหลังจากนั้นจะต้องทิ้งไว้อย่างน้อย 1 สัปดาห์จึงจะนำไปใช้ทดลอง เตรียมผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า โดยการเพิ่มปริมาณสปอร์ในดินให้ได้อย่างน้อย 75 สปอร์ ต่อกรัม จำนวนอย่างน้อย 10 กิโลกรัม ด้วยการปลูกข้าวโพดลงในกระถางซึ่งมีวัสดุผสมที่นึ่งฆ่าเชื้อและใส่อาบัสคูลาไมโคไรซ่า จากนั้นดูแลรดน้ำป้องกันกำจัดศัตรูพืช จนอายุครบประมาณ 4 เดือนจึงสุ่มดินมาตรวจด้วยวิธี Wet Seiving and Decanting / Centrifugation ตรวจนับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบสเตอริโอ แล้วคัดเลือกกระถางที่มีจำนวนสปอร์อย่างน้อย 75 สปอร์ต่อกรัมนำไปใช้ในการทดลองต่อไป หา diluent ที่เหมาะสมโดยผสมปุ๋ยชีวภาพไมโคไรซ่าที่ได้กับทรายในอัตราชุด 4-fold dilution ทำ 6 dilution level แต่ละ level ทำ 5 ซ้ำ ใส่ในกระถางแล้วปลูกข้าวโพด ดูแลรักษาให้น้ำ ให้ปุ๋ย และกำจัดศัตรูพืชตามความจำเป็นจนกระทั่งเก็บเกี่ยว ประมาณ 2-3 เดือน หลังจากปลูกการทดลองดำเนินการแก้ไขจากอัตราชุด 4 fold dilution ทำ 6 dilution level เป็น 10 dilution level แทนโดยแต่ละ level ทำ 5 ซ้ำ เนื่องจากต้องการความละเอียดเพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้ MPN ที่แม่นยำขึ้น แต่ผลการทดลองที่ได้จะตามกำหนด เก็บรากข้าวโพดทั้งชุด 10 dilution level แต่ละ level ทำ 5 ซ้ำ มาล้างน้ำให้สะอาดจากนั้น

ทำการย้อมรากและตรวจการเข้าอาศัยของเชื้อไมโคไรซ่าในรากข้าวโพด ได้ผลตามตารางนี้ในชุด diluent ดินผสมทราย สกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ของอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างด้วยด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ต่างๆ ได้แก่ VANS1-NS21, VANS1-VAGLO, VANS1-VAACAU, VANS1-VAGIGA, NS31-AM1, AMV4.5NF-AMV4.5NR, VANS1-VALETC ITS1 – ITS4 NS1-NS4 AML1- AML2 และ NS12-ARCH208 พร้อมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นที่ได้จากวิธี PCR ด้วยวิธี และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SSUmAf – LSUmAr และ SSUmCf – LSUmBr ตามลำดับ วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Phylogenetic analysis เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับวิธีตรวจสอบสปอร์ทางสัณฐานต่อไป

- การผลิตปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

เพิ่มปริมาณหัวเชื้อ (*Glomus* sp.) ในกระถาง (pot culture method) โดยใช้กระถางสะอาดและวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยอบด้วยไอน้ำ 3 ครั้งๆ ละ 3 ชั่วโมง ที่ความร้อน 80 องศาเซลเซียส วัสดุปลูกที่เหมาะคือดินผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 ใส่ลงในกระถาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 นิ้ว ให้ระดับต่ำจากปากกระถางประมาณ 2 นิ้ว แล้วโรยหัวเชื้อให้กระจายทั่วพื้นที่หน้าตัดของกระถางปริมาณสปอร์ที่ใช้ประมาณ 200 สปอร์ต่อกระถาง เมื่อโรยหัวเชื้อแล้วกลบด้วยดินประมาณ 1 นิ้ว พืชอาศัยที่ดี ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง พืชตระกูลหญ้าและถั่วเหลือง ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดพืชอาศัยก่อนปลูกด้วยการแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3-5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้เมล็ดประมาณ 5-10 เมล็ด โรยให้กระจายหลังจากนั้นกลบเมล็ดด้วยดินอีกครั้ง รดน้ำทันทีด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ รดน้ำทุกวัน ใส่ Modified Hoagland's solution ความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง 3 ครั้ง/สัปดาห์ เมื่อพืชอาศัยอายุ 3 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างดินนับปริมาณสปอร์ เก็บเกี่ยวเฉพาะกระถางที่มีปริมาณสปอร์ในดิน 25 สปอร์ต่อน้ำหนักดิน 1 กรัม โดยการตัดพืชบริเวณเหนือดินและปล่อยให้ดินแห้งในร่ม หลังจากดินแห้งคลุกดินแต่ละกระถางให้ทั่ว เก็บหัวเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องในถุงพลาสติก ใช้ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า (สุภาพร, 2549)

- วิธีการศึกษาวัสดุเจือจาง

ชั่งปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่ผลิตได้ น้ำหนัก 50 กรัม ผสมกับตัวทำเจือจางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 กรัม ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า เพื่อให้ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่ากระจายอย่างสม่ำเสมอ นาน 30 นาที จะได้ปุ๋ยชีวภาพที่มีการเจือจาง 2^{-1} จากนั้น ชั่ง 50 กรัม ผสมกับตัวเจือจาง 50 กรัม จะได้ปุ๋ยชีวภาพที่มีการเจือจาง 2^{-2} ทำให้เจือจางเป็นชุดระดับแบบ two-fold serial dilution ความเข้มข้นของตัวเจือจางต่อเชื้อราใช้อัตราส่วน 1:1, 1:$^{1}/_{2}$, 1:$^{1}/_{4}$, 1:$^{1}/_{8}$, 1:$^{1}/_{16}$, 1:$^{1}/_{32}$, 1:$^{1}/_{64}$, 1:$^{1}/_{128}$ โดยใช้ดินเป็นตัวเจือจาง ชั่งปุ๋ยชีวภาพแต่ละระดับความเจือจางตั้งแต่ 2^{-1} ถึง 2^{-8} น้ำหนัก 5 กรัม แต่ละระดับทำ 5 ซ้ำใส่ถุงพลาสติก เตรียมวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว น้ำหนัก 300 กรัม ใส่แก้วเพาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร จำนวน 40 แก้วเพาะต่อ 1 ตัวเจือจาง ทำให้เกิดหลุมกลางแก้วเพาะโดยตักวัสดุปลูกออก 3 กรัม นำปุ๋ยชีวภาพแต่ละระดับความเจือจาง (ข้อ 2) ใส่ลงหลุมใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนคีบเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว จำนวน 5 เมล็ด ลงในแก้วเพาะใช้วัสดุปลูกที่ตักออก 3 กรัม กลบเมล็ด รดน้ำทันทีด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางไว้ในโรงเรือนกระจก ทำตามขั้นตอน 1-6 แต่เปลี่ยนตัวเจือจางเป็น ทราย ดินผสมทราย และเวอมิคูไลท์

- การศึกษาวิธีการนับเพื่อคำนวณปริมาณแบบ MPN

เมื่ออายุครบ 6 สัปดาห์ วัดปริมาณเข้าอาศัยในราก โดยวิธีของ Philips และ Hayman (1970) โดยนำรากมาล้างดินออกแล้วต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้รากใสเห็นเซลล์รากได้ชัดเจนขึ้น ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง แล้วย้อมสีรากด้วย trypan blue lactic –glycerol solution ตรวจสอบการเข้าอาศัยในราก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยวิธี slide method (Giovanetti and Mosse, 1980) นับจำนวนแก้วเพาะ ค่าที่ได้เป็นโอกาสการเข้าอาศัยหรือไม่การเข้าหรือไม่เข้าอาศัยในรากของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า นำไปอ่านผลในตารางดัชนี MPN โดยใช้ตาราง VIII2 ของ Fisher และ Yates (Fisher and Yates, 1963)

การศึกษาวิธีการนับแบบ direct count

- นับจำนวนสปอร์ในปุ๋ยชีวภาพระดับความเจือจาง 2^{-1}- 2^{-8} นำมาร่อนแยกสปอร์โดยวิธี Wet Sieving and Decanting (Gerdemann, 1975) ปริมาณ 100 กรัม ใส่บีกเกอร์และเทน้ำกรองปริมาตร 500 มล. คนสารละลายตัวอย่างไปทางเดียวเป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 วินาที เทสารละลายลงในตะแกรงขนาด 425 ไมครอน และไหลผ่านลงมายังตะแกรงขนาด 45 ไมครอน ซึ่งเรียงซ้อนอยู่ด้านล่าง ตะกอนที่ยังเหลือในบีกเกอร์ให้ทำซ้ำโดยเติมน้ำลงไป 400 มิลลิลิตร แล้วคนไปทางเดียวเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วินาที เทสารละลายลงในตะแกรงขนาด 425 ไมครอน และ 45 ไมครอน ซึ่งเรียงซ้อนกันอยู่ จากนั้นฉีดน้ำล้าง ตะกอนบนตะแกรงขนาด 425 ไมครอน จนแน่ใจว่าตะกอนขนาดเล็กได้หลุดผ่านลงไปในตะแกรงขนาด 45 ไมครอน นำตะกอนบนตะแกรงขนาด 425 ไมครอน เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อพร้อมน้ำ แล้วนำไปตรวจสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

- ตะกอนบนตะแกรงขนาด 45 ไมครอนนำไปใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำเชื่อม 50% จนครบ 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ตะกอนละลายผสมกับน้ำเชื่อม นำไป ปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นจะเกิดการตกตะกอน เทสารละลายส่วนบน ลงใตะแกรง ขนาด 45 ไมครอน เทตะกอนที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง ใช้น้ำฉีดล้างตะกอนบนตะแกรงขนาด 45 ไมครอน 3-4 ครั้ง จนน้ำที่ผ่านตะแกรงใส เทตะกอนบนตะแกรงที่ได้ลงในจานเพาะเชื้อพร้อมน้ำ แล้วนำไปตรวจสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

การจำแนกสกุลและชนิดราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

- เตรียมสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

นำตัวอย่างสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่แยกด้วยวิธีของ Gerdemann (1975) และคัดเลือกสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

- ฆ่าเชื้อบริเวณผิวสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

นำสปอร์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 5.1 ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. ซึ่งภายในมีน้ำนึ่งฆ่าจำนวน 10 มล. จากนั้นใส่ tween 20 จำนวน 1 หยด นำไปแช่ในเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำทิ้ง ใส่ Chloramine T และ Streptomycin + Gentamycin อย่างละ

1 มล. เขย่าเบาๆ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อีก 1 นาที เทน้ำทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง

- การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้ forceps ขนาดเล็กคีบสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอใสในหลอดขนาด 0.2 มล. ซึ่งภายในบรรจุ ultrapure water นึ่งฆ่าจำนวน 5 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตทิปกดสปอร์ราให้แตกออก จะได้ DNA template

- การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank จากเวปไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เลือก ที่ BLAST แล้วเลือกที่ Nucleotide BLAST (blastn) จากนั้นใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จะแสดงตามลำดับความคล้ายคลึงกันจากมากไปหาน้อย

5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

ตรวจเอกสาร ค้นหาวัสดุที่สามารถใช้เป็น Diluent ทางจุลชีววิทยา จัดหา/เก็บตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่จำหน่ายจ่ายแจกในท้องตลาดได้จำนวน 5 ตัวอย่าง กำหนดวัสดุที่ทดลองใช้เป็น Diluent สำหรับการเลี้ยงแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตแต่ละประเภท มีน้ำกลั่น น้ำเกลือ 0.85 % และ น้ำเป็ปโตน 1% จัดหาตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่มีจำหน่ายในท้องตลาดจำนวน 3 ตัวอย่าง เป็นปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตประเภทแบคทีเรีย 2 ตัวอย่าง (แกรม + และ แกรม -) และประเภทราเส้นใย 1 ตัวอย่าง ใช้อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ประเภทแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจำนวน 3 สูตร คือ NA YG และ B2 จัดหา/เก็บตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่จำหน่ายจ่ายแจกในท้องตลาดได้จำนวน 2 ตัวอย่าง เป็นชนิดแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 1 ตัวอย่าง ชนิดแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 1 ตัวอย่าง นำปริมาณจุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้นำไปทดสอบประสิทธิภาพการละลาย $CaHPO_4$ ในอาหาร Pikovskaya's media และการเปลี่ยนสีอาหาร NBRI จัดหา/เก็บตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่จำหน่ายจ่ายแจกในท้องตลาดได้จำนวน 2 ตัวอย่าง นำตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพชนิดราทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์โดยใช้อาหารต่าง ๆ จำนวน 3 ชนิด คือ PDA MY และ SDA นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต เก็บรักษาไว้เพื่อทำการหาวิธีการจำแนกโดยวิธีหาลำดับเบสยีน 16S rRNA สำหรับจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย และ 18S rRNA สำหรับจุลินทรีย์ประเภทรา ซึ่งจะดำเนินการทดลองต่อไป การศึกษาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น Diluent ในการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในผลิตภัณฑ์ ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต สารละลายที่ทดลองใช้เป็น Diluent ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในขั้นตอนการเลี้ยงแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต จากผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตประเภทแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus megaterium*) จำนวน 1 ชนิด คือ น้ำกลั่น น้ำเกลือ 0.85% น้ำเป็ปโตน 1% และ 0.1 M $MgSO_4$ (โดยกำหนดให้ NA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์) สารละลายที่ทดลองใช้เป็น Diluent ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในขั้นตอนการเลี้ยงแยก จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต จากผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตประเภทแบคทีเรียแกรมลบ (*Pseudomonas sp.*) จำนวน 1 ชนิด คือ น้ำกลั่น น้ำเกลือ 0.85% น้ำเป็ปโตน 1% และ 0.1 M $MgSO_4$ (โดยกำหนดให้ NA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์) ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับ

การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus sp.* 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 ศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการตรวจนับจุลินทรีย์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ 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

6 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

รวบรวมแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียมได้ในระดับต่ำและสูง จำนวน 50 ไอโซเลท เพื่อทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ เลือกไอโซเลทของแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของกลุ่มที่มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียมได้ในระดับ < 1.5 $\%K_2O$ ระดับ 1.5-2.0 $\%K_2O$ และระดับ > 2.0 %K2O ศึกษาความสามารถในการละลายของกลุ่มระดับ < 1.5 $\%K_2O$ จำนวน 5 ไอโซเลท พบว่า % K2O ที่วัดได้ในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิ 37^0Cทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม จำนวน 30 ไอโซเลท ที่ระดับอุณหภูมิ 3 ระดับโดยนับจำนวนโคโลนีเรียบร้อยแล้วและเก็บสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายได้ ศึกษาแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และแมนนิทอล ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม เลือกแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย หาปริมาณที่เหมาะสมของแร่เฟลด์สปาร์ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ทดสอบความสามารถในการทนทานต่อโลหะหนัก

- การพัฒนาเทคนิคการจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

เลือกแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการจำแนกแบคทีเรียด้วย BioLog System

วิเคราะห์ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมโดยจัดเตรียมเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่จำเป็นในการวิเคราะห์ ทำการสกัดแยกดีเอ็นเอของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วยวิธีหาลำดับเบสบนสาย 16S rRNA

การจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วยลักษณะทางพันธุกรรม แบบ Partial analysis (Genotypic tests) ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียและเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพร์เมอร์สายสั้น คือ f 5’- AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG-3’ และ r 5’-ACG GGC GGT GTG TRC-3’ เพื่อจำแนกแบบ Partial analysis หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR products ด้วยวิธี gel electrophoresis จะได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 600 bp (partial) นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rDNA จากการทำ 16S rRNA sequence

analysis และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยวิธี Blast search เพื่อจำแนกว่าเป็นแบคทีเรียสกุลหรือชนิดใด

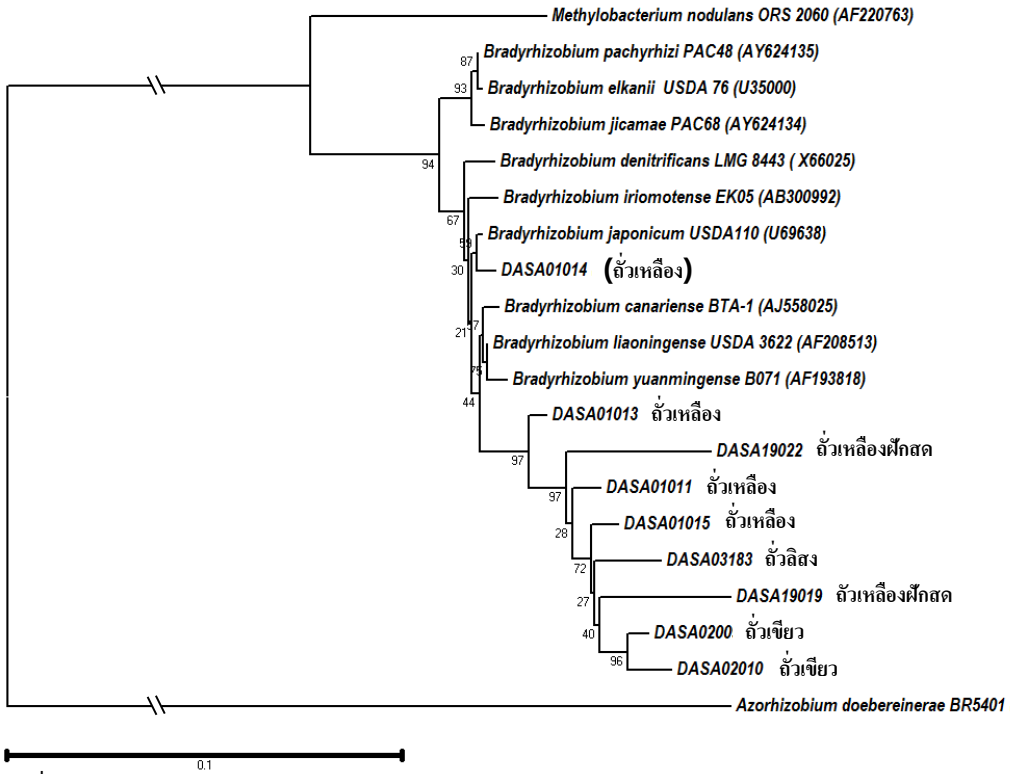
การจำแนกชนิดแบคทีเรียตามสมบัติทางชีวเคมีด้วย BioLog system โดยอ่านผลที่ระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาแตกต่างกันและ เปรียบเทียบกับเวลาที่กำหนดตามคู่มือ โดยเลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญด้วยอาหารจำเพาะ (แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด) ตามคู่มือการจำแนกแบคทีเรียอย่างรวดเร็วด้วย BioLog System และบ่มปฏิกิริยาที่เวลาแตกต่างกันจากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลชนิดของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม BioLog Microlog 4.20.05

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

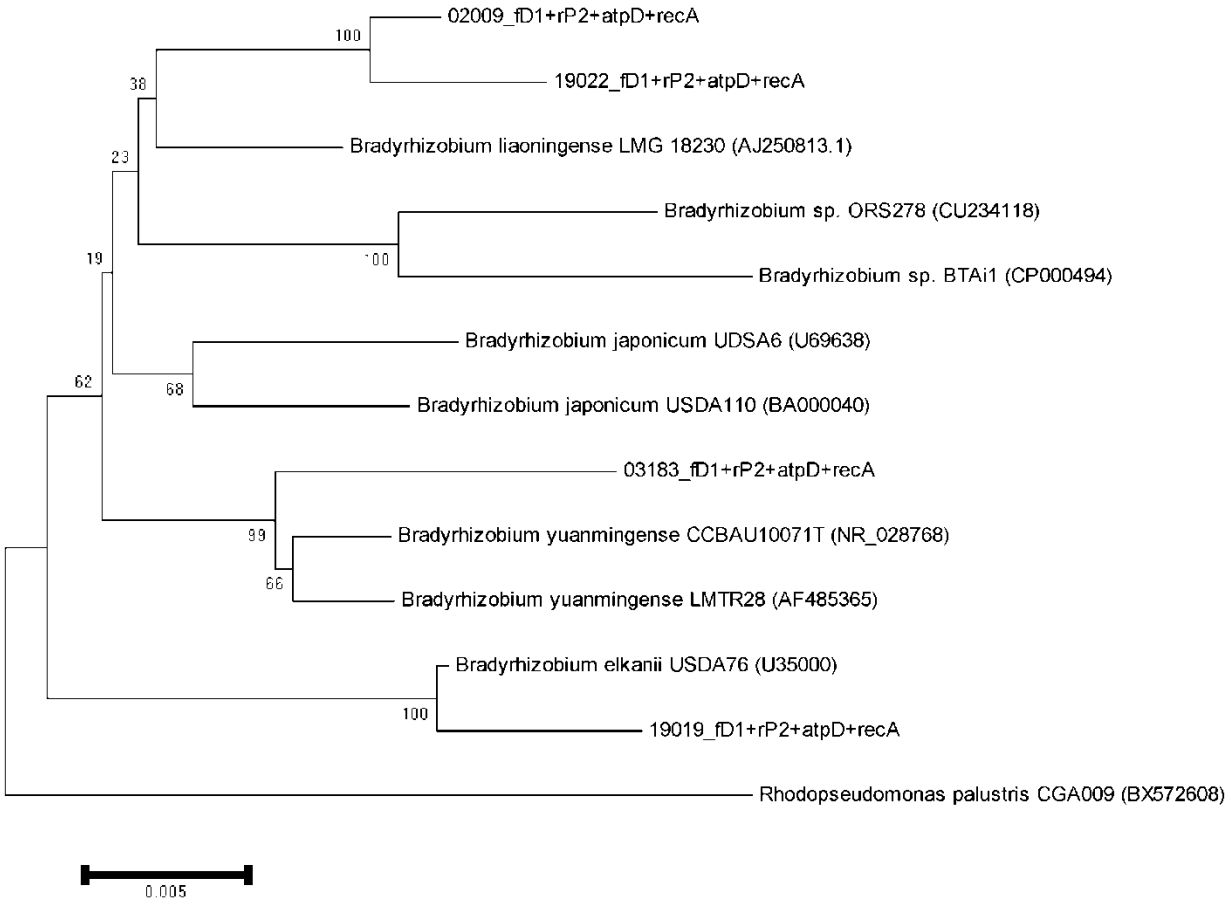
1 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

การศึกษา diluents ที่เหมาะสมในการเจือจางปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมที่ประกอบไปด้วยเชื้อไรโซเบียมสกุล *Bradyrhizobium* spp. เป็นไรโซเบียมชนิดโตช้า ประกอบด้วยกรรมวิธีใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เปรียบเทียบกับการใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 10 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่า การใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อและการใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เป็น diluents สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากการนับปริมาณไรโซเบียม มีปริมาณเท่ากันในทั้งสองกรรมวิธี และให้ผลที่เที่ยงตรงและแม่นยำทั้งสองกรรมวิธี ดังนั้น การนับปริมาณไรโซเบียมชนิดที่โตช้าของห้องปฏิบัติการไรโซเบียมสามารถใช้ diluents ทั้งสองชนิดนี้ได้

การจำแนกโดยวิธีการหาลำดับเบสและวิเคราะห์ phylogenetic tree analysis ของยีน 16S rRNA (ภาพที่ 1) จากผลการทดลองแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.0 แสดงดังภาพที่ 1 พบว่า การจำแนกโดยวิธีการหาลำดับเบสและวิเคราะห์ phylogenetie ของยีน 16S rRNA ขนาด 850 basepair (bp) พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง พบว่าเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 01011 DAS 01013 และ DASA 01015 ที่เป็นเชื้อไรโซเบียมที่จำเพาะเจาะจงกับถั่วเหลือง มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท DASA 02009 DASA 02010 และ DASA 03183 ซึ่งเป็นไรโซเบียมที่จำเพาะเจาะจงกับถั่วเขียว และถั่วลิสงตามลำดับ และยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับ DASA 19022 ซึ่งเป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองฝักสด และมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium japonium* และ *B. liaoningense* และ *Mesorhizobium* spp. ซึ่งเป็นสกุลที่ไม่ใช่สกุล *Bradyrhizobium* ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ phylogenetie ของยีน 16S rRNA ที่ขนาด 1400 bp ต่อไป ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2 พบว่าเมื่อจำนวนนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นความสัมพันธุ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลืองฝักสด มีความชัดเจนขึ้น โดยจะเห็นได้ว่า DASA 01011 DASA 01013 DASA 01015 DASA 02009 DASA 02010 DASA 03183 และ DASA 19019 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium liaoningeses* อย่างชัดเจนมากขึ้น



ภาพที่ 1 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน 16S rRNA 1400 bp แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุ์กรรมระหว่างเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง



ภาพที่ 2 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน 16S rRNA gene ร่วมกับ atpD gene และ recA gene แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง

การนำ 16S rRNA gene + atpD gene + recA gene ที่ความยาว ~2,400 bp มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ทำให้การวิเคราะห์หรือการจำแนกชนิดของเชื้อไรโซเบียมในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม กรมวิชาการเกษตร มีความชัดเจนขึ้นกว่าการใช้เฉพาะ 16S rRNA gene การใช้ลำดับเบสของ nodA ยีน ที่ความยาวประมาณ 628-633 bp มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อไรโซเบียมด้วยวิธี Neighbor-joining phylogenetic tree พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วที่เป็นพืชอาศัย การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ โดยใช้ primer BOXAIR พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย primer TP-RAPD ประกอบด้วย primer คู่ที่ 1 8F-1509R คู่ที่ 2 8F-1522R คู่ที่ 3 849F-1522R และ คู่ที่ 4 849F-1522R พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ จากการใช้ primer คู่ที่ 1 2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกันเมื่อใช้ คู่ที่ 4 (849F-1522R)

2 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

การตรวจสอบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสกุล *Azotobacter* spp. และ *Beijerinckia* spp. ได้ diluents ที่เหมาะสมในการใช้เจือจาง สำหรับนับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระ 2 สกุล ดังนี้สกุล *Azotobacter* spp. สารละลายแร่ธาตุอาหาร LG ทำให้การอยู่รอดของเชื้อสูงกว่าสายละลายชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับ *Beijerinckia* spp. ที่สารละลายแร่ธาตุอาหาร Bei ทำให้การอยู่รอดของเชื้อสูงกว่าสายละลายชนิดอื่นๆ ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการนับเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระสกุล *Azotobacter* และ *Beijerinckia* พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 3 วิธี คือ วิธี Plant count, Drop plate และ MPN แต่มีแนวโน้มว่าวิธี plate count จะมีจำนวน cell ที่นับได้ต่ำกว่าวิธีอื่นๆ ได้ชนิดสารละลายเจือจางที่เหมาะสมกับ *Azospirillum* spp. 1 ชนิด คือ peptone 0.1% ได้ชนิดสารละลายเจือจางที่เหมาะสมกับ *Gluconacetobacter* spp. 1 ชนิด คือ สารละลายแร่ธาตุ LGI ได้ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการนับพีจีพีอาร์สกุล *Gluconacetobacter* spp. พบว่า วิธี MPN ในอาหารกึ่งเหลวปราศจากไนโตรเจน ให้ปริมาณสูงสุด ตามด้วย Drop LGI MPN plate count LGI และ Drop plate LGI ได้ชนิดสารละลายเจือจางที่เหมาะสมกับ *Burkholderia* spp. 1 ชนิด คือ SRSM-Mineral ได้วิธีการนับพีจีพีอาร์สกุล *Burkholderia* spp. ด้วยวิธี plate count Drop plate และ Drop plate-MPN ได้ชนิดสารละลายเจือจางที่เหมาะสมกับ *Herbaspirillum* spp. 1 ชนิด คือ JNFB-Mineral ได้วิธีการนับพีจีพีอาร์สกุล *Herbaspirillum* spp. ด้วยวิธี plate count, Drop plate และ Drop plate-MPN ได้สารละลายเจือเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อ *Curtobacterium* spp. คือสารละลาย JNFB-mineral และ สารละลาย peptone 0.1% ได้วิธีการนับเชื้อ *Curtobacterium* spp. ด้วยวิธี plate count drop plate MPN และ MPN semisolid

ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank จากเวปไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เลือก ที่ BLAST แล้วเลือกที่ Nucleotide BLAST (blastn) จากนั้นใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จะแสดงตามลำดับความคล้ายคลึงกันจากมากไปหาน้อย ได้วิธีการจำแนกเชื้อ *Azotobacter* spp. *Beijerinckia* spp *Azospirillum* spp. *Gluconacetobacter* spp. *Burkholderia* spp. *Herbaspirillum* spp. และ *Curtobacterium* spp. โดยใช้วิธี phylogenetic analysis โดยใช้ลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA

3 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ได้ตัวอย่างสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบริสุทธิ์ที่ทราบสกุลและรหัสอ้างอิงพร้อมนำไปทดสอบผลการเปรียบเทียบการใช้สารละลายเจือจาง 2 ชนิด คือ น้ำกลั่นและน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ นับปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* TISTR 8012 *Nostoc* sp., และ *Hapalosiphon welwitchii* TISTR โดยวิธี Dilution Plate ผลการทดลองพบว่าการใช้น้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 %ในการทำสารละลายเจือจางในขั้นตอนการนับปริมาณนั้นทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณลดลง ได้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Calothrix* และ *Cylindrospermum* ที่จำแนกเชื้อโดยวิธีสัณฐานวิทยาและทราบรหัสอ้างอิงจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยรวม 3 สายพันธุ์ คือ *Calothrix marchica* TISTR8016, *Calothrix weberi* TISTR8102 และ *Cylindrospermum* sp. TISTR8158 และทราบลักษณะสัณฐานวิทยาของ

สาหร่าย 3 สายพันธุ์ ได้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Hapalosiphon* sp.TISTR8284 และ *Stigonema* sp. TISTR8984 ที่จำแนกเชื้อโดยวิธีสัณฐานวิทยา จำแนกเชื้อโดยวิธีชีวโมเลกุลพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ยีน 16S rRNA ได้ โดยใช้ไพร์เมอร์ 16S 27f, 1389r และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,350 bp เมื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน16S rRNA ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ *Hapalosiphon* sp. TISTR8284 พบว่า ตรงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Fischerella muscicola* SAG 2027 โดยมีเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 92% ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Stigonema* sp. TISTR8984 ให้ผลตรงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Westiellopsis* sp. โดยมีเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 98%

4 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

ผลการศึกษาสารเจือจางในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไมโคไรซ่าพบว่าจำนวนราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่ประเมินได้ จากการใช้วัสดุเจือจางต่างชนิดกัน คือ ดินผสมทราย ดิน ทราย และเวอมิคูไลท์ ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MPN จำนวน 160 ตัวอย่าง ทำให้ได้ปริมาณราต่างกัน การใช้ดินผสมทรายเป็นตัวเจือจางทำให้ได้ปริมาณราสูงที่สุด รองลงมาคือ ดิน ทราย และเวอมิคูไลท์ 605 176 152 และ 152 ต่อกรัม ตามลำดับ

วิธีการนับปริมาณจำนวนสปอร์ของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่ประเมินได้จากวิธี direct count จำนวน 16 ตัวอย่าง จากการใช้ตัวเจือจางต่างชนิดกัน คือ ดินผสมทราย ดิน ทราย และเวอมิคูไลท์ มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 15 14 12 และ 2 สปอร์ต่อน้ำหนักดิน 1 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การประเมินปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในดินด้วยวิธี MPN ผลการประเมินจะมีค่ามากกว่าการนับจำนวนสปอร์โดยตรงเนื่องจากรวมส่วนขยายพันธุ์ (สปอร์ เส้นใย และชิ้นส่วนรากที่มีราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเข้าอาศัย) ทั้งหมดในดิน (Porter,1979; Powell,1980; Daniels *et al*., 1981) ทำให้ได้ค่าใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่าการนับจำนวนสปอร์ (Porter,1979) การประเมินด้วยวิธี MPN พบว่าการทดลองที่ดีควรเพิ่มจำนวนซ้ำและลดจำนวนอัตราส่วนลง และมีปัจจัยมากมายที่ส่งผลต่อวิธี MPN (Wilson and Trinick, 1982; Morton, 1985; Adelman and Morton, 1986; Graham and Fardelmann, 1986; Morton, 1985; Adelman and Morton, 1986; Graham and Fardelmann, 1986; An *et al.*, 1990; O' Donnell *et al.*, 1992) การประเมินจำนวนราด้วยเทคนิค MPN เป็นการประมาณส่วนขยายพันธุ์ที่มีชีวิต ปัจจัยที่ส่งผลต่อวิธี MPN คือสภาพแวดล้อมในช่วงทำการทดลองทั้งอุณหภูมิ และระยะเวลาในการเจริญในพืชอาศัย มีผลต่อการประเมิน เพราะมีผลทั้งการเจริญของรากพืชอาศัย และการเข้าอาศัยของรา (Wilson 1982) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ประเมินด้วย MPN ของเชื้อ *G. monosporus* ค่าที่ประเมินต่ำใน 2 สัปดาห์แรก แต่จะสูงสุดเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ ถ้า 15 องศาเซลเซียส ค่า MPN เพิ่มก็ต่อเมื่อให้เวลาเพิ่มขึ้นแต่ 2 สัปดาห์ไม่พบในเชื้อ *G. tenuis* ทั้งอุณหภูมิ 15 และ 20c (Wilson 1982) วิธีนี้ยังขึ้นกับระดับความเจือจางทีเลือกใช้ Wilson and Trinick, 1982

การศึกษาการจัดจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าด้วยวิธีการจำแนกด้วยวิธี phylogenetic โดยใช้ตำแหน่งยีน 18S rRNA จากการสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ NS1 NS4 AML1 และ AML2 ที่จำเพาะในการจำแนกสกุล-ชนิดของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า พบว่าสามารถจำแนกได้ในระดับชนิด (species level) คือ *Glomus etunicatum* และในระดับสกุล (genus) ได้แก่ *Glomus* sp. และ *Acaulospora* sp. (ภาพที่ 4) Lee *et al*.

(2008) รายงานการศึกษาการจัดจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า (Glomeromycota) จากตัวอย่างรากพืช 3 ชนิดที่ใช้ล่อให้ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเข้าอาศัย (trap cultures) พบว่าไพรเมอร์ AML1 และ AML2 ซึ่งมีความจำเพาะกับไฟลั่ม Glomeromycota และสามารถจำแนกราได้ 23 ชนิด และ Krüger *et al.* (2009) ศึกษาการสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์และรากพืช โดยใช้ไพรเมอร์ SSUmAf และ LSUmAr ในการทำ PCR รอบแรก และ SSUmCf และ LSUmBr ในการทำ Nested PCR ใช้เป็น barcoding primer สำหรับราในไฟลั่ม Glomeromycota

5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

เลี้ยงแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต โดยใช้ Diluent คือ น้ำกลั่น น้ำเกลือ 0.85% และเป็ปโตน พบว่า Diluent ทั้ง 3 ชนิด ให้ปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ทั้ง แกรม + และแกรม – จากตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตไม่แตกต่างกันทางสถิติ การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์โดยใช้อาหารต่าง ๆ จำนวน 3 ชนิด คือ NA YG และ B2 ผลการทดลองพบว่าปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดแบคทีเรีย แกรมบวกเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด พบจำนวนจุลินทรีย์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อใช้อาหาร NA ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์มากที่สุด แตกต่างทางสถิติกับจุลินทรีย์ในอาหารสูตร YG และ B2 ปริมาณจุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ นำไปทดสอบประสิทธิภาพการละลาย $CaHPO_4$ ในอาหาร Pikovskaya's media และการเปลี่ยนสีอาหาร NBRI-BPB มีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในปริมาณเล็กน้อย และบางตัวอย่างไม่พบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์โดยใช้อาหารต่าง ๆ จำนวน 3 ชนิด คือ PDA MY และ SDA ผลการทดลองพบว่าปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดรา เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด พบจำนวนจุลินทรีย์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปริมาณ *Bacillus megaterium* ไม่แตกต่างกันเมื่อใช้ diluent ชนิดต่าง ๆ ในการตรวจนับ ที่ระยะเวลาการปั่นเชื้อ 2 5 และ 10 นาที ปริมาณ *Pseudomonas sp.* ใน diluents ที่ใช้ในทดลองไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกับแบคทีเรียแกรมบวก

อาหาร LA และ BA สามารถเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* ให้มีการเจริญได้มากกว่าอาหารอื่นๆ แต่ลักษณะโคโลนีที่ได้จะมีขนาดต่างกันคือ โคโลนีบนอาหาร LA จะมีขนาด 4-6 มิลลิเมตร แต่บนอาหาร BA จะมีขนาด 4-6 มิลลิเมตร โดยโคโลนีบนอาหารทั้งสองชนิดจะไม่เยิ้มมากในขณะที่การเจริญบนอาหาร PCA จะได้โคโลนีที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 4-7 มิลลิเมตร และโคโลนีค่อนข้างเยิ้ม อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA MY และ Sab ให้ปริมาณจุลินทรีย์ราละลายฟอสเฟต *Penicillium* spp. 2 ไอโซเลท ไม่แตกต่างกัน อาหาร PCA สามารถเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus spp.* ให้มีการเจริญได้มากกว่าอาหารอื่นๆ แต่ลักษณะโคโลนีที่ได้จะมีขนาดต่างกันคือ โคโลนีบนอาหาร PCA จะมีขนาด 4-6 มิลลิเมตร และโคโลนีค่อนข้างเยิ้ม แต่บนอาหาร NA NA+NaCl B2 LA และ BA จะมีขนาด 1-3 มิลลิเมตร โดยโคโลนีบนอาหารทั้ง5 ชนิดจะไม่เยิ้มมาก

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.

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

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเทสเริ่มจากศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase กับค่าการดูดกลืนแสงพบว่าช่วงที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ alkaline phosphatase คือที่ค่าการดูดกลืนแสง (405 nm) ระหว่าง 0.041-0.138 สามารถตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่จุลินทรีย์ผลิตได้ โดยช่วงที่เหมาะสมต่อการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์คือที่ค่าการดูดกลืนแสง (405 nm) ระหว่าง 0.041-0.138 หากมีค่าสูงกว่านี้ต้องทำการเจือจางก่อนการตรวจวัด

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

6 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมทุกไอโซเลทที่ทดสอบมีจำนวนโคโลนีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารซิลิเกตแบคทีเรียที่ใส่แร่เฟลด์สปาร์จำนวน 0.175 กรัมซึ่งมากกว่าการใส่ แร่เฟลด์สปาร์ จำนวน 0.27 กรัม หรือการใส่ KH_2PO_4 เป็นแหล่งของโพแทสเซียม โดยแบคทีเรียทุกไอโซเลท ยกเว้น K05074 มีจำนวนเพิ่มขึ้น 10 เท่า ภายหลังบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน การทดสอบความสามารถในการทนทานต่อโลหะหนักบางชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม พบว่า ไอโซเลทแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมมีระดับความทนทานต่อโลหะหนักแตกต่างกันวิเคราะห์โดยบันทึกการเพิ่มขึ้นของจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย

ความสามารถในการทนทานต่อสารประกอบ $ZnCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ แบคทีเรียไอโซเลท K02004 มีความสามารถทนทานต่อ $ZnCl_2$ ได้ระดับสูงสุดและมีจำนวนโคโลนี สูงสุด 7.4×10^7 cfu/ml และมีเพียงไอโซเลท K05074 เดียวที่อ่อนแอต่อสารประกอบ $ZnCl_2$ ที่ระดับ 1,600 µg/ml แบคทีเรียไอโซเลท K02004 K05080 และ K06005 มีความทนทานต่อสารประกอบ $CuCl_2$ ตั้งแต่ระดับ 25-1,600 µg/ml แต่ไอโซเลท K05074 และ *Bacillus circulans* อ่อนแอต่อสารประกอบ $CuCl_2$ ทุกระดับที่ทดสอบ

ปริมาณแร่เฟลด์สปาร์และชนิดโลหะหนักในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมอย่างมีนัยสำคัญโดย *Bacillus circulans* ที่เลี้ยงในอาหารที่ใส่แร่เฟลด์ปาร์ 0.175 กรัมต่ออาหาร 50 มิลลิลิตรมีจำนวนโคโลนีสูงสุด $1.39x10^8$ cfu/ml และการใส่โลหะหนัก $ZnCl_2$, $CdCl_2$ และ MoO_3 ทำให้แบคทีเรียมีจำนวนโคโลนีมากกว่าการใส่โลหะหนักชนิดอื่นโดยเฉลี่ย 2.05x108-2.16x108 cfu/ml ปริมาณแร่เฟลด์สปาร์และชนิดโลหะหนักในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมไอโซเลท K02004 อย่างมีนัยสำคัญ ไอโซเลท K02004 ไม่เจริญในอาหารที่มีส่วนผสมของ $ZnCl_2$+MoO_3 และการใส่ $CuCl_2$ หรือ $CdCl_2$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แร่เฟลด์สปาร์เป็นแหล่งโพแทสเซียม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งโพแทสเซียมพบว่าการใส่แร่เฟลด์สปาร์ 0.09 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไอโซเลท K02004 มีจำนวนโคโลนีสูงสุด $1.22x10^8$ cfu/ml และการใส่ $ZnCl_2$ ทำให้มีจำนวนโคโลนี $1.47x10^8$ cfu/ml มากกว่าการใส่โลหะหนักชนิดอื่น

ปริมาณแร่เฟลด์สปาร์และชนิดโลหะหนักในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมไอโซเลท K05074 อย่างมีนัยสำคัญ ไอโซเลท K05074 ไม่เจริญในอาหารที่มีส่วนผสมของ $ZnCl_2$+MoO_3 และการใส่ $CuCl_2$ หรือ $CdCl_2$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แร่เฟลด์สปาร์เป็นแหล่งโพแทสเซียม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งโพแทสเซียมพบว่าการใส่แร่เฟลด์สปาร์ 0.09 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไอโซเลท K05074 มีจำนวนโคโลนีสูงสุด $9.93x10^7$ cfu/ml และการใส่ $ZnCl_2$ ทำให้มีจำนวนโคโลนี $2.03x10^8$ cfu/ml มากกว่าการใส่โลหะหนักชนิดอื่น ปริมาณแร่เฟลด์สปาร์และชนิดโลหะหนักในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมไอโซเลท K05080 อย่างมีนัยสำคัญ ไอโซเลท K05080 ไม่เจริญในอาหารที่มีส่วนผสมของ $ZnCl_2$+MoO_3 และการใส่ $CuCl_2$ หรือ $CdCl_2$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แร่เฟลด์สปาร์เป็นแหล่งโพแทสเซียม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งโพแทสเซียมพบว่าการใส่แร่เฟลด์สปาร์ 0.175 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไอโซเลท K05080 มีจำนวนโคโลนีสูงสุด $5.27x10^7$ cfu/ml และการใส่ MoO_3 ทำให้มีจำนวนโคโลนี $2.31x10^7$ cfu/ml มากกว่าการใส่โลหะหนักชนิดอื่น

ปริมาณแร่เฟลด์สปาร์และชนิดโลหะหนักในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมไอโซเลท K06005 อย่างมีนัยสำคัญ ไอโซเลท K06005 ไม่เจริญในอาหารที่มีส่วนผสมของ $CuCl_2$ หรือ $CdCl_2$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แร่เฟลด์สปาร์เป็นแหล่งโพแทสเซียม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งโพแทสเซียมพบว่าการใส่ K_2HPO_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไอโซเลท K06005 มีจำนวนโคโลนีสูงสุด $2.36x10^8$cfu/ml และการใส่ $ZnCl_2$ ทำให้มีจำนวนโคโลนี $3.49x10^8$ cfu/ml มากกว่าการใส่โลหะหนักชนิดอื่น

ปริมาณแร่เฟลด์สปาร์และชนิดโลหะหนักในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตอย่างมีนัยสำคัญ โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตไม่เจริญในอาหารที่มีส่วนผสมของ $CuCl_2$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งโพแทสเซียมพบว่าการใส่ K_2HPO_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีจำนวนโคโลนีสูงสุด $2.79x10^8$ cfu/ml และการใส่ $ZnCl_2$ ทำให้มีจำนวนโคโลนี $2.92x10^8$ cfu/ml มากกว่าการใส่โลหะหนักชนิดอื่น

แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่ทดสอบมีความสามารถในการเจริญได้ในอาหารที่ใช้ K_2HPO_4 เป็นแหล่งโพแทสเซียมที่มีการใส่ $CuCl_2$ 100 µg/ml ในขณะที่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตไม่สามารถเจริญได้ในอาหารดังกล่าว และการใส่ $ZnCl_2$ 100 µg/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมมีการเจริญได้สูงกว่าการใส่โลหะหนักชนิดอื่น และใช้แร่เฟลด์สปาร์ 0.09 กรัม ทดแทนK_2HPO_4

แบคทีเรียละลายโพแทสเซียม จำนวน 7 ไอโซเลตที่ทดสอบ ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้นแข็งซิลิเกตแบคทีเรียสามารถจัดได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 โคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus circulans* กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก ได้แก่ ไอโซเลต K05075 K05078 K05085 และ K05122 กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ รูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก ได้แก่ ไอโซเลต K07002 กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens*

แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่ทดสอบมีความสามารถในการเจริญเพิ่มจำนวนได้ในอาหารสูตรดัดแปลงที่แตกต่างกัน โดยภาพรวมแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทดสอบ ยกเว้น ไอโซเลต K07002 (สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A3) สามารถเจริญและมีชีวิตรอดสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C ภายหลังเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง โดยไอโซเลต K05078 มีจำนวนโคโลนีสูงสุด $5.28x10^7$ cfu/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตร C1 และส่วนใหญ่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C2 และ C3 ทำให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนโคโลนี ($x10^6$ cfu/มิลลิลิตร) ได้มากกว่าสูตร C1

ปริมาณ $\%K_2O$ ในส่วนเหลวของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยภาพรวมพบว่าการเลี้ยงแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมทุกไอโซเลตที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C2 หรือ C3 ทำให้ตรวจพบปริมาณ $\%K_2O$ สูง มีค่าเฉลี่ย 3.91-4.28 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต K07002 สามารถละลายให้ $\%K_2O$ สูงสุด 4.28 เปอร์เซ็นต์

- การจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมได้ 6 ไอโซเลทและอยู่ระหว่างดำเนินการศึกษาปัจจัยด้านอุณหภูมิและระยะเวลาของการบ่มปฏิกิริยาที่มีเหมาะสมต่อการจำแนกแบคทีเรียด้วย BioLog System ได้สภาวะการเลี้ยงเชื้อและการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์แบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างและไม่สร้างสปอร์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียมสูง และกำลังดำเนินการขั้นตอนการจำแนกด้วย BioLog System ได้สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR) ของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมแกรมลบ โดยใช้ไพรเมอร์สายสั้นที่ให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 400-500 เบส แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมแกรมบวกที่ใช้ศึกษา คือ *Bacillus circulans* ไอโซเลท K05074 และ K05075 แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมแกรมลบที่ใช้ศึกษา คือ ไอโซเลท K01005, K02001 และ K02004 เมื่อนำ *Bacillus circulans* มาจำแนกด้วย BioLog System พบว่าเป็น species ID: *Bacillus circulans* มีค่า probability 97%, Similarity 0.93% และ Distance 2.46 และเมื่อจำแนกด้วย partial 16S rDNA sequencing ขนาด 500 bp พบว่ามี similarity 100% กับ *Bacillus circulans*

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์ด้วยวิธี BLAST analysis กับ NCBI GenBank database พบว่าไอโซเลท K01026 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับ

ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulomonas flavigena* 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K02018 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Corynebacterium nitrilophilus* 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K05078 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Corynebacterium nitrilophilus* 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K06009 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulosimicrobium cellulans* 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท K07002 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulosimicrobium cellulans* 100 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท K07009 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulosimicrobium cellulans* 99 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการจำแนกสกุลและชนิดปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมด้วยการใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ ด้วยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ยีน ที่ความยาวมากกว่า 1,400 bp เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่สามารถจำแนกสกุลและชนิดของเชื้อไรโซเบียมได้แม่นยำ แต่ถ้าต้องการความจำเพาะเจาะจงเพิ่มต้องมีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 ยีนในการจำแนก นอกจากนี้การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จาก primer BOXAIR และ TP-RAPD fingerprinting โดยใช้ primer 849F-1522R สามารถใช้แยกความแตกต่างของ เชื้อไรโซเบียมได้ แต่ไม่สามารถใช้จำแนกสกุลและชนิดของเชื้อไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมได้ อย่างไรก็ตามเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มีวิธีการดำเนินงานที่ประกอบด้วยขั้นตอนและกรรมวิธีที่ซับซ้อน ซึ่งผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้และความเข้าใจอย่างถ่องแท้ จึงจะสามารถทำการจำแนกได้อย่างถูกต้อง

การทดสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณเชื้อในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่ขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร และที่มีการจำหน่ายให้เกษตรกร โดยตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่ทดสอบเป็นปุ๋ยชีวภาพชนิดเหลว มีเชื้อแบคทีเรียสกุล Azotobacter โดยเปรียบเทียบเพื่อยืนยันผลงานวิจัยการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาไว้ในปี 2554 กำหนดลำดับขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้ขั้นตอนที่ 1 เปรียบเทียบผลการใช้ diluents ระหว่างการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ กับ สารละลายแร่ธาตุในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter* และขั้นตอนที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการนับ 3 วิธี ประกอบด้วยวิธี plate counting drop plate และ drop plate MPN ผลการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาได้กับปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สกุล *Azotobacter* ที่ผลิตและจำหน่ายในท้องตลาด พบว่าการใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเจือจางทำให้ *Azotobacter* มีชีวิตรอดน้อยกว่าในสารละลายแร่ธาตุอาหารเลี้ยงเชื้อ ในทุกกรรมวิธีการนับ และการนับโดยวิธี plate counting ในทุกสารละลายเจือจางให้ผลการวิเคราะห์ที่มีปริมาณเชื้อน้อยกว่า วิธี drop plate และ drop plate –MPN ซึ่งวิธี drop plate ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการวิจัยการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เพราะมีต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงเชื้อและค่าแรงงานในการดำเนินการวิเคราะห์ต่ำกว่าวิธี plate counting และไม่ยุ่งยาก วิธีการจำแนกเชื้อด้วยวิธี 16S rDNA sequencing เป็นวิธีที่ทำให้ทราบผลการจำแนกสกุลได้อย่างแม่นยำ

ผลการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าด้วยวิธี MPN โดยใช้ดินผสมทรายเป็นตัวเจือจางมีจำนวนราอาบัสคูลาไมโคไรซ่ามีความน่าจะเป็นคือ 605 ต่อ

กรัม และวิธีการจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าด้วยวิธีการจำแนกด้วยวิธี phylogenetic โดยใช้ตำแหน่งยีน 18S rRNA สามารถจำแนกราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าได้ในถึงระดับชนิด

ดังนั้นผลจากการทดลองนี้ทำให้ได้ดินผสมทรายเป็นตัวเจือจางที่เหมาะสมในการนับปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า ในการวิเคราะห์ปริมาณปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าโดยวิธี MPN จำนวน 1 ชนิด และได้วิธีการจัดจำแนกด้วยวิธีวิเคราะห์ phylogenetic 1 วิธี การจัดจำแนกที่ได้จากวิธีชีวโมเลกุลก็ยังสามารถจำแนกในระดับสกุลได้เจาะจงมากกว่าวิธีทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นหากมีการเตรียมการวิเคราะห์ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น จะทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีไฟโลเจเนติกมีความถูกต้องและแม่นยำ และสามารถจำแนกได้ถึงระดับ species ได้ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการจำแนกชนิดเชื้อราและเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ

การตรวจสอบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตต้องคำนึงถึงความสามารถในการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพทั้งหมดที่มีอยู่ในปุ๋ยชีวภาพ จึงต้องพิจารณาถึง diluent ที่สามารถดึงจุลินทรีย์ออกมาจากตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ และต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ หากอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดการตรวจนับที่ผิดพลาด ส่งผลให้การควบคุมคุณภาพปุ๋ยชีวภาพผิดพลาดตามไปด้วย จากการทดลองนี้พบว่าสามารถเลือกใช้ diluent คือ น้ำเกลือ ที่ระยะเวลา 10 นาที สำหรับตรวจนับ *Bacillus* sp. และ น้ำกลั่น ที่ระยะเวลา 5 นาที สำหรับตรวจนับ *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Pantoea* sp. และเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GMBA สำหรับใช้ในการตรวจนับ *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

เมื่อเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วยวิธี BioLog system กับ partial 16S rDNA sequencing พบว่าหากเป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิดไม่สร้างสปอร์การใช้วิธี Biolog system จะได้ผลตรงกับการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรมเมื่อค่า similiarity มากกว่า 0.588 แต่หากเป็น จีนัส *Brevibacterium* ควรจำแนกโดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

กิจกรรมที่ 3
วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี
Research and Development of Compost Production and Organic-Chemical Fertilizer Production Technology

พีรพงษ์ เชาวนพงษ์ สมบูรณ์ ประภาพรรณพงศ์ สุปรานี มั่นหมาย ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต ศรีสุดา รื่นเจริญ รัฐกร สืบคำ ทิวาพร ผดุง ลาวัณย์ จันทร์อัมพร ธูปหอม พิเนตรเสถียร ภาวนา ลิกขนานนท์

คำสำคัญ (Key words) ปุ๋ยหมัก (Compost) ปุ๋ยอินทรีย์ (Organic Fertilizer) ปุ๋ยอินทรีย์เคมี (Organic Chemical Fertilizer) การปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจน (Nitrogen Mineralization)

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี วิธีการวิจัยประกอบด้วย 1) การศึกษาและวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมัก 2) การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพโดยการเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ 3) ศึกษาความเข้ากันได้ของวัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมีควบคุมการละลาย 4) ศึกษาการปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์เคมีควบคุมการละลาย 5) ศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยอินทรีย์เคมีควบคุมการละลาย และ 6) ศึกษาความเข้ากันได้ของวัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดเหลว 7) ศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดเหลว ผลการวิจัยพบว่า 1) ได้วิธีการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพ โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ น้ำกากส่าเข้มข้น, ฮิวมัส(ของเหลือทิ้งจากโรงงานผงชูรส), ลีโอนาไดท์, กากตะกอนโรงงานผงชูรส และกากตะกอนน้ำกากส่า ในสัดส่วน 5-25 เปอร์เซ็นต์ มาผสมกับปุ๋ยหมักที่มีสมบัติผ่านเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ตาม พรบ.ปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พรบ. ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550 แล้วผ่านกระบวนการหมักต่ออีก 30 วัน 2) ได้จุลินทรีย์จำนวน 4 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์เสริมสร้างความต้านทานเชื้อโรคพืช จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผลิต จุลินทรีย์เปลี่ยนรูปธาตุอาหารพืช และจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต เมื่อนำมาผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่เพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์มีประสิทธิภาพต่อการรอดชีวิตของกล้ามะเขือเทศ การออกดอกของมะเขือเทศ มากกว่าการใส่ปุ๋ยเคมี และการไม่ใส่ปุ๋ยเคมี และมีแนวโน้มว่าทำให้มะเขือเทศมีความสูง และผลผลิต มากกว่าปุ๋ยหมักที่ไม่เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ 3) ได้วัตถุดิบ ได้แก่ ดินเหนียว มูลวัว ปุ๋ยหมัก กากตะกอนอ้อย และลีโอนาไดท์ ที่มีความเข้ากันได้กับปุ๋ยเคมี สำหรับการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมีแบบผสมเป็นเนื้อเดียวกัน สูตร 10-5-5 โดยการใช้ปุ๋ยหมักผสมให้ธาตุอาหารหลักรวมมากที่สุด 4) ได้ข้อมูลอัตราการปลดปล่อยไนโตรเจนของปุ๋ยอินทรีย์เคมี พบว่า ปุ๋ยอินทรีย์เคมี สูตร 10-5-5 ที่ ใช้วัสดุดังกล่าวผสมสามารถปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ 6-17เปอร์เซ็นต์ และ 13-14 เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบ ในดินร่วนทราย และดินร่วนเหนียว ตามลำดับ โดยปุ๋ยอินทรีย์เคมี สูตร 10-5-5 ที่ใช้ดินเหนียว มูลวัว ปุ๋ยหมัก กากตะกอนอ้อย และลีโอนาไดท์ เป็นวัตถุดิบผสมปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนรวมสูงกว่าปุ๋ยเคมีสูตร 10-5-5 ในดินทั้งสองชนิด 5) ประสิทธิภาพปุ๋ยอินทรีย์เคมีควบคุมการละลาย ทำให้ดินมีการสะสมไนโตรเจน

ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมสูงขึ้น นอกจากนี้การใส่ปุ๋ยอินทรีย์เคมียังช่วยการดูดใช้ธาตุอาหารได้ดีกว่าปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว 6) วัตถุดิบที่ใช้ผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดเหลว คือ ปุ๋ยอินทรีย์น้ำที่ผลิตจากพืช และผลิตจากสัตว์ สามารถเข้ากันได้โดยไม่มีการตกตะกอนของแม่ปุ๋ยเมื่อทำการผสม 7) ประสิทธิภาพของปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดเหลว พบว่าให้ผลผลิตและการเจริญเติบโตของคะน้าไม่แตกต่างกัน

Abstract

Study on compost and chemical organic fertilizer production technology were conducted on 1) Research and development of composting technology, 2)Improve Organic fertilizer quality by supplement benefit microbial, 3) Study on mixed of materials and the production technology of organic chemical fertilizer, 4) Study on release of nutrients from organic chemical fertilizers, 5) Efficiency of organic chemical fertilizers in growth and crop yield, 6) Study on mixed of materials and production technology of liquid organic chemical fertilizers, 7) Study on mineralization of liquid organic chemical fertilizer. The results showed that 1) 5 types of organic byproducts from agro-industrial which for four species of microbial could enhanced the resistance to some diseases in crops production. 3) Found Microbial effective substances promote the growth of plants. 4) The microbial enhanced phosphate use efficiency then increased soil microbial population and benefit to efficiency of tomato flowering rather than chemical fertilizer and no chemical fertilizer treatments. 5) Effect of Raw material including clay, cow dung, compost, filter cake and leonadite that has compatibility with chemical fertilizers. 4) For the production of organic chemical fertilizer formula 10-5-5 homogeneous mixture by using compost mix had nutrients include most knowledge base of nitrogen mineralization from organic chemical fertilizer 10-5-5 formula used such material mixture used which about 6-17 percent and 13-14 percent of total nitrogen content in organic chemical fertilizer can be released as inorganic nitrogen and available for plant in the soil is loamy clay and sandy loam soil, respectively. 5) Effective of organic chemical fertilizer dissolved soil with nitrogen, phosphorus and potassium to accumulate higher. In addition to uptake the nutrients better than chemical fertilizers alone. Organic materials both from plant and animal and chemical fertilizer were good dissolved in liquid organic chemical fertilizer. However, efficiency test of liquid organic chemical fertilizer on growth and yield of kale did not show in significant different with control.

บทนำ

ปัจจุบันมีการผลิตปุ๋ยอินทรีย์รูปแบบต่างๆทั้งชนิดผง ชนิดเม็ด และชนิดน้ำ กันอย่างแพร่หลาย โดยผลิตใช้เองและผลิตเพื่อการค้า กรมวิชาการเกษตรจึงได้ปรับปรุง พรบ.ปุ๋ยให้มีขอบข่ายควบคุมทั้งปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งได้ร่างเกณฑ์กำหนดต่างๆไว้ แต่มีปุ๋ยจำนวนไม่น้อยที่ไม่สามารถผลิตปุ๋ยให้มีคุณสมบัติตรงตามเกณฑ์ได้ ประกอบกับความเข้าใจผิดของผู้ใช้ที่ว่าปุ๋ยจะต้องเป็นเม็ดเท่านั้น ทำให้มีความพยายามที่จะทำปุ๋ยอินทรีย์เม็ดโดยไม่คำนึงถึงคุณภาพ ทำให้ปุ๋ยอินทรีย์เม็ดที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ไม่ได้คุณภาพ ได้มีการศึกษาการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เม็ดที่มาจากวัสดุอินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการหมักและอบไอน้ำแล้ว พบว่าสามารถผลิตได้แต่ลักษณะของเม็ดเป็นท่อนสั้นๆ ไม่สวยงาม ไม่เป็นที่นิยมของเกษตรกร และไม่สามารถนำไปใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีในรูปของปุ๋ยผสมแบบไม่เป็นเนื้อเดียวกันได้ เนื่องจากมีรูปทรงต่างกัน ไม่เหมือนปุ๋ยที่ผลิตเป็นเม็ดกลม ดังนั้นจึงต้องหาวิธีปั้นเม็ดจากวัสดุที่มีการย่อยสลายโดยสมบูรณ์และวัสดุที่มีสมบัติคล้ายดิน แต่มีปริมาณอินทรียวัตถุสูงมาเป็นส่วนผสมโดยตรง และมีสมบัติเป็นตัวดูดซับอนุภาคปุ๋ย และอุ้มน้ำได้ และไม่มีการย่อยสลายที่จะเป็นอุปสรรคต่อการเข้ากันได้ของวัตถุดิบ จึงได้เลือกใช้วัตถุดิบที่เป็นสารเสริมสภาพดังกล่าวร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ประเภทมูลสัตว์ วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม หรือในสภาพปุ๋ยหมัก โดยได้เลือกปุ๋ยอินทรีย์ที่มีสัดส่วนธาตุอาหารสูงๆมาผสม ให้ได้ปุ๋ยอินทรีย์ประเภทคุณภาพสูง ตลอดจนการใช้ปุ๋ยเคมีเป็นตัวปรับสมดุลธาตุอาหาร เลือกใช้วัตถุดิบที่มีความเหมาะสมทั้งทางเคมีและกายภาพ เป็นทางเลือกให้เกษตรกรหรือผู้ประกอบการนำไปใช้ได้จริง อนึ่งการใช้ปุ๋ยอินทรีย์น้ำประเภทปุ๋ยน้ำหมัก Bio Extract และ Compost tea ที่เป็นผลจากการย่อยสลายจนได้สาร Metabolite (ฮอร์โมน วิตามิน สารปฏิชีวนะและอื่นๆ) ตลอดจนธาตุอาหารต่างๆที่สามารถนำไปใช้ในปรับสภาพดินและบำรุงการเจริญเติบโตของแก่พืชได้อย่างยั่งยืนและสามารถปรับแต่งธาตุอาหารให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับชนิดดินและพืชได้ จึงได้ดำเนินการวิจัยโครงการผลิตปุ๋ยหมักที่มีคุณภาพสูงและได้มาตราฐานและปุ๋ยหมักที่มีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มีการปรับแต่งธาตุอาหารที่สามารถควบคุมการละลายให้มีการสูญเสียน้อยที่สุดและปุ๋ยอินทรีย์เคมีน้ำที่สามารถใช้ได้ทั้งทางดินและทางใบเพื่อแก้ปัญหาการขาดธาตุอาหารและปัญหาโรคแมลงในขณะเดียวกัน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีการศึกษาวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ อินทรีย์เคมีเม็ด และอินทรีย์เคมีน้ำโดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ปุ๋ยอินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป หรือแม้แต่ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดเดียวกันก็อาจมีระดับปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกันได้ แต่การผลิตปุ๋ยอินทรีย์เพื่อการค้านั้นจำเป็นต้องผลิตให้มีคุณภาพตรงเกณฑ์ที่กำหนดตามประกาศกรมวิชาการเกษตรในราชกิจจานุเบกษา ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550 การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ให้ผ่านเกณฑ์มาตรฐานนั้น ผู้ผลิตจะต้องมีความรู้เกี่ยวกับคุณสมบัติของวัสดุอินทรีย์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต เพื่อคัดเลือกชนิดของวัสดุอินทรีย์และสัดส่วนที่ใช้ในให้เหมาะสม การผลิตปุ๋ยอินทรีย์อาจเพิ่มประสิทธิภาพในด้านอื่นเข้าไปอีกได้ เช่น ปุ๋ยอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการเสริมสร้างความแข็งแรงแก่พืชโดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์บางชนิด Nelson (1997) รายงานว่าจุลินทรีย์ประเภทแอคติโนมัยซีสสามารถสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อโรคพืชบางสายพันธุ์ได้ Hoitink (1991) พบว่าเมื่อใส่ปุ๋ยหมักในการปลูกพืช เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นต้นเหตุของโรคโคนเน่าและรากเน่าที่มีต้นตอจากเชื้อในดินจะถูกกำจัดไปได้ และการใช้ปุ๋ยหมักให้ผลในการกำจัดโรคถั่วที่เกิดจากราที่เรียกว่าโรค Macrophomina และสามารถใช้แทนสารกำจัดเชื้อราหรือสารที่ใช้รมดินฆ่าเชื้อ

ราได้บางส่วน โดยแปลงถั่วที่ไม่ใช้ปุ๋ยหมักมีโรคระบาดรุนแรงกว่า Logsdon (1993) ประสบผลสำเร็จในการใช้ปุ๋ยหมักเพื่อยับยั้งโรคพืช โดยพบว่าความรุนแรงของโรค clover tired ในถั่วแอลฟาฟ่าลดลง ซึ่งอาจเป็นผลทางอ้อมโดยการใช้ปุ๋ยหมักทำให้รากและลำต้นของถั่วเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้ยังรายงานว่าการใช้ปุ๋ยหมัก 40 ตันต่อเอเคอร์ สามารถควบคุมโรคโคนเน่า รากเน่า จากรา *Phytophthora* ของถั่วเหลืองได้

ปุ๋ยอินทรีย์สามารถผลิตได้จากวัสดุอินทรีย์หลากหลายชนิด ดังนั้นปุ๋ยอินทรีย์แต่ละชนิดจึงมีคุณสมบัติแตกต่างกันในด้านปริมาณธาตุอาหารพืชที่เป็นองค์ประกอบ ความสามารถในการปลดปล่อยธาตุอาหาร และการนำไปใช้ประโยชน์ ปุ๋ยอินทรีย์หลังจากใส่ลงไปในดินเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น มีความชื้นพอเหมาะ ธาตุอาหารส่วนที่ละลายน้ำได้ในปุ๋ยอินทรีย์จะถูกปลดปล่อยออกมาให้พืชและจุลินทรีย์นำไปใช้ได้ ในขณะที่สารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว ส่วนสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลค่อนข้างซับซ้อนก็จะถูกย่อยสลายอย่างช้า ๆ การสลายตัวของวัสดุอินทรีย์เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของปุ๋ย/วัสดุอินทรีย์ ได้แก่พวก heterotroph คือพวกที่ต้องได้รับแหล่งพลังงานและคาร์บอนจากอินทรียสาร และในระหว่างการสลายตัวจะมีคาร์บอนส่วนหนึ่งถูกปลดปล่อยออกมาในรูปของก๊าซ CO_2 คาร์บอนบางส่วนจะถูกจุลินทรีย์นำไปใช้ในการสร้างเซลล์ และที่เหลือก็เป็นส่วนหนึ่งของอินทรียวัตถุในดิน (Stevenson, 1986) ในสภาพที่ดินมีการถ่ายเทอากาศดี พบว่า ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ถึง 40เปอร์เซ็นต์ ของคาร์บอนจากปุ๋ย/วัสดุอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนของเซลล์จุลินทรีย์ ส่วนที่เหลือจะเปลี่ยนเป็น CO_2 และสารประกอบอื่น การสลายตัวและการปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์หรือวัสดุอินทรีย์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น คุณสมบัติของวัสดุอินทรีย์ และสภาพแวดล้อม เช่นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ความชื้น การระบายอากาศ อุณหภูมิ และพีเอชของดิน เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาการปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์จะได้ทำการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับใช้ในการสร้างความเข้าใจให้กับผู้ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อให้สามารถนำปุ๋ยอินทรีย์ไปใช้ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไปได้

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้วิธีการผลิตปุ๋ยอินทรีย์คุณภาพตรงตามเกณฑ์มาตรฐานสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการส่งเสริมการผลิตและการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ให้แก่เกษตรกร และเพื่อให้ได้ข้อมูลการปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์เคมีรวมทั้งข้อมูลประสิทธิภาพของปุ๋ยอินทรีย์เคมี ทั้งชนิดที่เป็นของแข็ง และของเหลว สำหรับนำไปใช้ในการสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยอินทรีย์เคมี เพื่อให้สามารถใช้ปุ๋ยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิธีการวิจัยประกอบด้วย 3 ประเด็นหลัก คือ 1) การศึกษาและวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมัก 2) การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพโดยการเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ 3) ศึกษาความเข้ากันได้ของวัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมี ชนิดของแข็ง และของเหลว การปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดของแข็ง และศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดของแข็ง และของเหลว

1. การศึกษาและวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมัก

นำปุ๋ยหมักที่ผลิตได้โดยวิธีการกองปุ๋ยหมักและรดน้ำกองปุ๋ยหมักให้มีความชื้นประมาณ 60% กลับกองปุ๋ยทุกสัปดาห์หมักปุ๋ยนาน 3 เดือน และผ่านมาตรฐานตาม พรบ.ปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พรบ. ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550 มาผสมกับวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรม จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ น้ำกากส่าเข้มข้น, ฮิวมัส(ของเหลือทิ้งจากโรงงานผงชูรส), ลีโอนาไดท์, กากตะกอนโรงงานผงชูรส และกากตะกอนน้ำกากส่า แล้วกองหมักต่อกลับกองปุ๋ยทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 30 วัน เก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักที่ผลิตเสร็จแล้วมาวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), ค่าการนำไฟฟ้า (EC), ปริมาณอินทรียวัตถุ (OM), ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio), ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (T-N), ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (T-P_2O_5), ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด (T-K_2O) และดัชนีการงอกของเมล็ด (GI)

2. การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพโดยการเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์

การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพโดยการเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมไว้ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม fluorescent pseudomonads เช่น *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ King's B medium และ P-1 medium ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งก่อให้เกิดโรคโคนและรากเน่ากับพืชเศรษฐกิจ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YG agar โดยวิธี co-inoculation และทดสอบการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืช โดยการเพาะสารละลายเชื้อลงบนเมล็ดพืช/ส่วนของพืชทดสอบ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด การงอกของราก วัดความยาวราก บันทึกระยะเวลาตั้งแต่เพาะเชื้อจนเมล็ดหรือรากงอก และศึกษาประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ ในการทดลองนี้ใช้มะเขือเทศเป็นพืชทดสอบ การทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักต่อการเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่พืชทดลองปลูกมะเขือเทศ

3. ศึกษาความเข้ากันได้ของวัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมี ชนิดของแข็ง และของเหลว การปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดของแข็ง และศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดของแข็ง และของเหลว

3.1 ศึกษาความเข้ากันได้ของวัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมี ชนิดของแข็ง และของเหลว นำแม่ปุ๋ยเคมี ยูเรีย (46-0-0) ปุ๋ยไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (18-46-0) และปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60) มาผสมกับวัสดุอินทรีย์ ได้แก่ มูลวัว ปุ๋ยหมัก กากตะกอนอ้อย ลีโอนาไดต์ เป็นตัวเติมเต็ม (filler) ให้ได้100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ให้ได้ปุ๋ยอินทรีย์เคมีสูตร 10-5-5 แล้วนำไปอัดเป็นเม็ด และนำปุ๋ยอินทรีย์ชนิดเหลวที่ผลิตได้จากพืช และจากสัตว์มาผสมกับแม่ปุ๋ยเกร็ด ได้แก่ ยูเรีย (46-0-0) โมโนแอมโมเนียมฟอสเฟต (12-60-0) และโพแทสเซียมซัลเฟต (0-0-50) ให้ได้ปุ๋ยเคมีสูตร 4-4-4 และ 8-4-4 โดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดเหลวเป็นตัวเติมเต็ม (filler) ให้ได้100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เก็บตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่ผลิตแล้วเสร็จมาศึกษาความเข้ากันได้ (Compatibility) และวิเคราะห์สมบัติต่างๆ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), ปริมาณอินทรียวัตถุ (OM), ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio), ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (T-N), ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Available P_2O_5) ปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายน้ำ (Water Soluble K_2O)

3.2 ศึกษาการปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์เคมีควบคุมการละลาย ทำการทดลองในดินร่วนทรายและดินร่วนเหนียว โดยปรับความชื้นของดินให้อยู่ที่ 60เปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เก็บตัวอย่างที่ระยะการบ่มต่างๆมาวิเคราะห์แอมโมเนียม ไนเตรท และดักจับคาร์บอนไดออกไซด์

3.3 ศึกษาประสิทธิภาพของปุ๋ยอินทรีย์เคมี ชนิดของแข็ง และของเหลว โดยนำปุ๋ยอินทรีย์เคมีทั้ง 2 ชนิดที่ผลิตได้ไปทดลอบประสิทธิภาพในแปลงทดลองกับผักคะน้า โดยทำการทำลองในพื้นที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ซึ่งเนื้อดินเป็นดินร่วนทราย เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การศึกษาและวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมัก

การผลิตปุ๋ยหมักกับวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรม คือ น้ำกากส่าเข้มข้น, ฮิวมัส, ลิโอนาไดท์, กากตะกอนโรงงานผงชูรส และกากตะกอนน้ำกากส่า ในสัดส่วน 5-25 เปอร์เซ็นต์ แล้วหมักต่ออีก 30 วัน จะได้ปุ๋ยหมักที่มีสมบัติผ่านเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ตาม พรบ.ปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พรบ. ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550 โดยปุ๋ยหมักกับน้ำกากส่าเข้มข้น เพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุ (OM) และปริมาณโพแทชทั้งหมด (Total K_2O) ปุ๋ยหมักกับฮิวมัส เพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุ (OM) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ปุ๋ยหมักกับลิโอนาไดท์ เพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุ (OM) ปุ๋ยหมักกับกากตะกอนโรงงานผงชูรส และปุ๋ยหมักกับกากตะกอนน้ำกากส่า เพิ่มปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N)

2. การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพโดยการเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์

2.1 ได้จุลินทรีย์จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ RPS 0034B เป็นจุลินทรีย์เสริมสร้างความต้านทานเชื้อโรคพืช RPS 0081B เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผลิต IAA DC 1102B เป็นจุลินทรีย์เปลี่ยนรูปธาตุอาหารพืช RPS 003F เป็นจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักมูลโค และปุ๋ยหมักเปลือกไม้ ที่มีการเพิ่มและไม่เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อการรอดชีวิตของกล้ามะเขือเทศ พบว่าการใช้ปุ๋ยหมักมูลโค และปุ๋ยหมักเปลือกไม้ ที่มีการเพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ อัตรา 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทำให้กล้ามะเขือเทศมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำปุ๋ยหมักที่มีการเพิ่มและไม่เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์มาทดสอบกับมะเขือเทศทำให้มะเขือเทศมีความสูง การออกดอกของมะเขือเทศ มากกว่าการใส่ปุ๋ยเคมี และการไม่ใส่ปุ๋ยเคมี และมีแนวโน้มว่าปุ๋ยหมักที่เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทำให้มะเขือเทศมีความสูง และผลผลิต มากกว่าปุ๋ยหมักที่ไม่เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์

3. ศึกษาความเข้ากันได้ของวัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมี ชนิดของแข็ง และของเหลว การปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดของแข็ง และศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดของแข็ง และของเหลว

1.1 ศึกษาความเข้ากันได้ของวัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมี ชนิดของแข็ง และของเหลว วัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมี ชนิดของแข็ง และของเหลว ผลการศึกษามีความเข้ากันได้ (Compatibility) ของแม่ปุ๋ยเคมี ยูเรีย (46-0-0) ปุ๋ยไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (18-46-0) และปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60) มาผสมกับวัสดุอินทรีย์ ได้แก่ มูลวัว ปุ๋ยหมัก กากตะกอนอ้อย ลีโอนาไดต์ เป็นตัวเติมเต็ม (filler) ให้ได้100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ให้ได้ปุ๋ยอินทรีย์เคมีสูตร 10-5-5 แล้วนำไปอัดเป็นเม็ด และปุ๋ยอินทรีย์ชนิดเหลวที่ผลิตได้จากพืช และจากสัตว์มาผสมกับแม่ปุ๋ยเกร็ด ได้แก่ ยูเรีย (46-0-0) โมโนแอมโมเนียมฟอสเฟต (12-60-0) และโพแทสเซียมซัลเฟต (0-0-50) ให้ได้ปุ๋ยเคมีสูตร 4-4-4 และ 8-4-4 โดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดเหลวเป็นตัวเติมเต็ม (filler) ให้ได้100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Compatibility) และผลวิเคราะห์สมบัติของปุ๋ยเคมีอินทรีย์ ชนิดของแข็ง และของเหลว ได้ตรงตามสูตรที่ผสม คือ 10-5-5 และ 8-4-4

1.2 การปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์เคมี ในดินร่วนทราย ปุ๋ยอินทรีย์เคมี 10-5-5 (ปุ๋ยหมัก) มีอัตราการปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนสูงสุด 17 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าปุ๋ยอินทรีย์เคมี 10-5-5 ที่ผสมกับวัสดุชนิดอื่นๆ ในดินเหนียว ปุ๋ยอินทรีย์เคมี 10-5-5 (ลีโอนาไดต์) มีอัตราการปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนสูงสุด 15 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าปุ๋ยอินทรีย์เคมี 10-5-5 ที่ผสมกับวัสดุชนิดอื่นๆ ซึ่งปุ๋ยอินทรีย์เคมีทุกชนิดมีการปลดปล่อยแอมโมเนียมไนโตรเจนและไนเทรตไนโตรเจนมากกว่าปุ๋ยเคมี และช่วยรักษาระดับไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ในดินให้มีปริมาณสม่ำเสมอได้นานกว่า ในทั้งดินร่วนทราย และดินร่วนเหนียว

1.3 ศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดของแข็ง ปุ๋ยอินทรีย์เคมีทำให้ผักคะน้าที่ปลูกในดินร่วนทรายได้รับธาตุอาหารเพียงพอจึงทำให้มีผลผลิตคะน้าและการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน และยังพบว่า การใส่ปุ๋ยอินทรีย์เคมีมีการสะสมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในดินสูงขึ้น นอกจากนี้การใส่ปุ๋ยอินทรีย์เคมียังช่วยให้ผักคะน้าดูดใช้ธาตุอาหารได้ดีกว่าปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว และประสิทธิภาพของปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดเหลว พบว่าเมื่อนำไปใช้ทดลองฉีดพ่นกับพืชผักคะน้า ปุ๋ยเคมีชนิดเหลว 8-4-4 และปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดเหลว 8-4-4 จะให้ผลผลิตและการเจริญเติบโตของคะน้าไม่แตกต่างกัน ดังนั้น ปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดเหลวไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ฉีดพ่นให้กับพืชผักเพราะจะทำให้ไม่คุ้มทุน

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยทำให้ได้เทคโนโลยีการผลิตหมัก โดยการกำหนดอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปุ๋ยหมักที่มีสมบัติผ่านเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ตาม พรบ.ปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พรบ. ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 กับวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรม เพื่อให้ได้ปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพด้านธาตุอาหารตรงตามเกณฑ์มาตรฐานซึ่งสามารถนำไปใช้ในการให้คำแนะนำการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ให้แก่เกษตรกรหรือผู้สนใจทั่วไปที่ต้องการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เพื่อการค้า

การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพโดยการเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ ได้จุลินทรีย์จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ RPS 0034B เป็นจุลินทรีย์เสริมสร้างความต้านทานเชื้อโรคพืชในจีนัส Bacillus spp. RPS 0081B เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผลิต IAA DC 1102B เป็นจุลินทรีย์เปลี่ยนรูปธาตุอาหารพืช RPS 003F เป็นจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ปุ๋ยอินทรีย์เมื่อมีการเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ทำให้กล้ามะเขือเทศ

มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าไม่เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และทำให้มะเขือเทศมีความสูง การออกดอกของมะเขือเทศ มากกว่าการใส่ปุ๋ยเคมี และการไม่ใส่ปุ๋ย รวมทั้งมีแนวโน้มว่าปุ๋ยหมักที่เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทำให้มะเขือเทศมีความสูงมากกว่าปุ๋ยหมักที่ไม่เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์

ศึกษาความเข้ากันได้ของวัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมี ชนิดของแข็ง และของเหลว วัตถุดิบและการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมี ชนิดของแข็ง และของเหลว มีความเข้ากันได้ (Compatibility) ของแม่ปุ๋ยเคมีกับวัสดุผสมที่เป็นของแข็ง และของเหลว

การปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์ ที่ใช้วัสดุอินทรีย์ ดินเหนียว มูลวัว ปุ๋ยหมัก กากตะกอนอ้อย และ ลีโอนาไดต์ ช่วยรักษาระดับไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ในดินให้มีปริมาณสม่ำเสมอได้นานกว่า ในทั้งดินร่วนทราย และดินร่วนเหนียว

ประสิทธิภาพปุ๋ยอินทรีย์เคมีสูตร 10-5-5 มีการสะสมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในดินสูงขึ้น และประสิทธิภาพของปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดเหลวสูตร 8-4-4 ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ฉีดพ่นเพียงอย่างเดียว

ปุ๋ยหมักที่มีคุณสมบัติผ่านเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ตาม พรบ.ปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พรบ. ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550 เมื่อนำมาผสมกับวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมทั้ง 5 ชนิด ตั้งแต่ 5-25% แล้วผ่านกระบวนการหมักต่ออีก 30 วัน มีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ตาม พรบ.ปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พรบ. ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550 ซึ่งสมบัติของปุ๋ยหมักเปลี่ยนแปลงไปตามสมบัติของวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมที่นำมาใช้ผสม ควรใช้วัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมที่มีสมบัติทางเคมีที่สูงกว่าปุ๋ยหมักที่นำมาผสม

การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพโดยการเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ สามารถนำวิธีการผลิตปุ๋ยหมักคุณภาพโดยเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณธาตุอาหารให้แก่พืช และป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดได้ สามารถนำไปถ่ายทอดให้แก่เกษตรกรและผู้ที่สนใจนำไปผลิตใช้ได้ โดยเฉพาะระบบเกษตรอินทรีย์

ปุ๋ยอินทรีย์เคมี ที่ใช้วัสดุอินทรีย์มาผสม เพื่อศึกษาการเข้ากันได้ และความเป็นประโยชน์ในดิน ยังไม่พบวัสดุที่เหมาะสมในการทดลองนี้ จึงควรมีการดำเนินการศึกษาเพื่อหาวัสดุชนิดอื่นมาผสมต่อไป ปุ๋ยอินทรีย์เคมีชนิดเหลว จากการทดลองนี้ ให้ผลไม่แตกต่างจากการไม่ใส่ปุ๋ยชนิดใดเลย

กิจกรรมที่ 4

การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในการจัดการดิน

สุปรานี มั่นหมาย ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต อธิปัตย์ คลังบุญครอง และ ภาวนา ลิกขนานนท์

คำสำคัญ (Key words) แหล่งคาร์บอน (carbon source) โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดิน (microbial community structure) จุลินทรีย์ย่อยสลาย (decomposer microbial)

บทคัดย่อ

การทดลองการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืช โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลไรโบส (Ribose) และน้ำตาลแมนนิทอล (Mannital) พบว่าจุลินทรีย์ในดินรอบรากไม่ว่าจะใช้น้ำตาลชนิดใด ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ดินมีมากกว่าจุลินทรีย์บนผิวราก โดยจุลินทรีย์ในดินรอบรากพริก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนจำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากรากแขนง และรากฝอยเป็นแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ในดินรอบรากพริก ถึงแม้ว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มว่าการใส่น้ำตาลทุกชนิด ให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่าการไม่ใส่น้ำตาล ทั้งบริเวณผิวรากแขนงและรากฝอย การเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตรได้แก่จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ RPS 0081B ทำให้พริกมีการเจริญเติบโตด้านความสูงและผลิตพริก มากกว่าการไม่ใส่จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตและการใส่น้ำตาล ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Streptomyces* และ *Paenibacillus* แบบผงแห้ง และหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ของกรมวิชาการเกษตร ทำการทดลอง 5 กรรมวิธี เพื่อเปรียบเทียบการใส่และไม่ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองแบบ พบว่าในกระบวนการเป็นปุ๋ยหมัก กรรมวิธีที่มีการใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์มีค่า C/N ratio ที่ลดลงเร็วกว่า และมีค่าน้อยกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ แสดงให้เห็นถึงความสามารถของหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในการย่อยสลายองค์ประกอบของซังข้าวโพดได้ดีกว่าเมื่อไม่ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์

Abstract

The aim of the experiment was to investigate the effect of carbon sources on the microbial structures in the soils both in a microcosm level and as a pot experiment. The carbon sources used were glucose, ribose, maltose and manitol. It was found in the microcosm study that the amount of microorganisms in the rhizospheric soil of Satuk and Taklee soil series inoculated with all carbon sources was higher than that in the rhizoplane of chilli. The rhizospheric bacteria were gram positive bacteria superior to gram negative ones. Contrarily, the rhizoplane bacteria were gram negative bacteria superior to gram positive ones. In the pot experiment with chilli plants, the addition of sugars (carbon source) to soil gave more weight of chilli than without addition of sugars. For Microbial organic degradation inoculums from DOA, dry powder of *Streptomyces* sp. and *Paenibacillus* sp. were compared in composting process. Compost that microbial organic degradation inoculum was added show the C/N ratio decrease and lower than the compost that no adding of microbial organic degradation inoculum when corn cob was used as the organic material for composting.

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม พื้นที่ประมาณ 70% ของ พื้นที่ทั้งประเทศ มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ พื้นที่ส่วนใหญ่ของประเทศไทยมีอินทรียวัตถุต่ำมาก มีจุลินทรีย์ต่ำ การปลูกพืชได้ผลผลิตไม่ดีเท่าที่ควร การเพิ่มอินทรียวัตถุในดินอย่างสม่ำเสมอมีผลทำให้ผลผลิตพืชเพิ่มขึ้น ซึ่งอินทรียวัตถุเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องใช้อินทรียวัตถุเป็นแหล่งอาหาร และพลังงานเพื่อการสร้างเซลล์ ดินที่มีอินทรียวัตถุสูงมักมีจุลินทรีย์สูงด้วย (Paul and Clark, 1996) ดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์มักมีจุลินทรีย์ต่ำ และเมื่อมีอินทรียวัตถุมากในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ อินทรียวัตถุก็จะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณจุลินทรีย์ จะเพิ่มปริมาณสูงในช่วงที่ใส่ และลดปริมาณลงอย่างรวดเร็วตามปริมาณอาหารที่หมดไป ซึ่งต่างจากจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตอยู่ใกล้ราก จะได้รับอาหารที่ถูกปล่อยจากรากอยู่ตลอดเวลา กิจกรรมและปริมาณจุลินทรีย์ในบริเวณรากพืช จึงสูงอย่างต่อเนื่อง แหล่งคาร์บอนบริเวณไรโซสเฟียร์จึงได้รับความสนใจในปัจจุบันแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์มีหลายชนิดมีทั้งอยู่ในรูปสารอินทรีย์และอนินทรีย์ จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์มีปริมาณสูงรอบๆ รากพืชเพราะจุลินทรีย์ในดินและรากพืชเอื้อเฟื้อซึ่งกันและกันในด้านอาหาร จุลินทรีย์บริเวณใกล้รากพืชจุมีมากกว่าบริเวณที่อยู่ไกลออกไป (D.A. Barber and J.M. Lynch, 1997 และ R. Merckx, J.H. Van Ginkel, J. Sinnaeve and A. Cremers, 1986) รากพืชมีการหลั่งสารออกมาและสารเหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ เช่น น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอลล์ polysaccharind กรดอินทรีย์ (A.D. Rovira, 1969 และ E.A. Curl and B., 1986) นอกจากนี้ยังมีวัสดุอินทรีย์บริเวณรากพืช เชน เศษใบไม้ รากพืชที่ตายแล้ว หากเรานำเอาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เหล่านี้ใส่ลงไปในดินชนิดต่างๆ ที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ ก็น่าจะเกิดจุลินทรีย์หลากหลายและเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินได้ ดังนั้นการจัดการดินโดยวิธีนี้แล้วปลูกพืช จึงน่าจะส่งเสริมการเจริญเติบโตและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินอย่างยั่งยืน และมีผลทำให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชเพิ่มขึ้น

การเกษตรในปัจจุบันมุ่งเน้นให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่สูง ทำให้มีการใช้ปัจจัยการผลิตในปริมาณมากทั้งปุ๋ยเคมี สารปรับปรุงดิน สารเคมีกำจัดแมลงและวัชพืช ซึ่งการใช้ปัจจัยการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตพืชต่างๆ นั้น ส่งผลกระทบต่อคุณภาพดิน ทั้งทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของดิน และส่งผลต่อเนื่องทำให้ผลิตภาพของดินลดลง ส่งเหล่านี้จะส่งผลกระทบโดยตรงต่อจุลินทรีย์ในดินซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างยิ่งต่อผลิตภาพของดิน การศึกษาจุลินทรีย์ในดินโดยมุ่งเน้นไปที่โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดินที่ปลูกพืชต่างชนิดกัน หรือชุดดินที่แตกต่างกัน หรือการศึกษาเพื่อหากลุ่มจุลินทรีย์ที่จะมาช่วยลดสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตซึ่งมีตกค้างอย่างมากในประเทศไทย รวมถึงกิจกรรมจุลินทรีย์ในดินเพื่อย่อยสลายเศษวัสดุพืชในไร่นา หรือกิจกรรมจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอกที่ใส่ลงไปเพื่อเพิ่มผลผลิตนั้นเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะฟื้นฟูและเพิ่มผลิตภาพของดินอย่างยั่งยืน

กรมวิชาการเกษตรได้ผลิตผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ เพื่อการจำหน่ายจ่ายแจกแก่เกษตรกรไว้ใช้ประโยชน์ในการทำปุ๋ยหมัก หัวเชื้อจุลินทรีย์ฯประกอบด้วยจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่และเป็นจุลินทรีย์พวกที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) โดยใช้ดินพีทเป็นวัสดุพา จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซิส จากการเก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสตามกิจกรรมการสำรวจรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ดินที่ผ่านมา ได้จุลินทรีย์จำนวนหนึ่ง ที่มีประสิทธิภาพ และมี

จุลินทรีย์ที่แสดงกิจกรรมการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส โปรตีนและไขมัน ประกอบกับการที่ไม่สามารถหาดินพีทที่มีคุณภาพมาใช้เป็นวัสดุพาเชื้อในขั้นตอนการผลิตได้ จึงทำให้มีความจำเป็นต้องพัฒนาการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์เพื่อใช้ช่วยในขั้นตอนการทำปุ๋ยหมัก และเพื่อให้ได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ฯที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่นการผลิตปุ๋ยอินทรีย์น้ำ การย่อยสลายตอซังข้าว ฯลฯ ในสภาพธรรมชาติจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ก่อให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย ซึ่งมักจะเป็นเศษวัสดุพืชเป็นส่วนมาก กระบวนการเป็นปุ๋ยหมัก (composting) เป็นกระบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ของวัสดุอินทรีย์ในรูปที่เป็นของแข็ง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายในสภาพใช้อากาศและต้องผ่านระยะที่อุณหภูมิขึ้นสูง (Finstein and Morris, 1975) มีการศึกษาจำนวนมากที่ชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่เฉพาะเจาะจงที่มีอยู่ในกองปุ๋ยหมักมีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของปุ๋ยหมักหรือมีผลเร่งอัตราการย่อยสลายเป็นปุ๋ยหมัก (Nakasaki and Uehara, 1996; Requena et al., 1996; Kuo-Shu et al., 1998; Badr El-Din et al., 2000) จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นสารประกอบที่มีมากในพืชได้ โดยผ่านกระบวนการทางเอนไซม์เซลลูเลสที่จุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่นเกิดจากกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง ซึ่งส่วนมากคือแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* spp. (Strom, 1985) เชื้อราและแอคติโนมัยซิสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลส ลิกนิน และวัสดุที่ย่อยสลายยากอื่นๆ เชื้อแอคติโนมัยซิสสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้เพียงเล็กน้อยและย่อยสลายได้น้อยกว่า เชื้อรา แต่จะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เชื้อรามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสมากกว่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อแอคติโนมัยซิสที่มักพบจากกองปุ๋ยหมักอยู่ในจีนัส *Streptomyces* spp. และ *Thermoactinomyces* spp. ส่วนเชื้อราอยู่ในจีนัส *Aspergillus* spp. (Strom, 1985) ดังนั้นหากมีการศึกษาถึงแนวทางการลดปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช การศึกษาถึงความหลากหลายและกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ในดินและหาแนวทางเพื่อเพิ่มจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ รวมถึงการเร่งให้เกิดกระบวนการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ ก็อาจจะเป็นแนวทางที่ยั่งยืนในการจัดการดินทางชีวภาพเพื่อเพิ่มผลิตภาพของดิน

จุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์นั้นต้องมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของพืช โดยทั่วไปต้องมีกิจกรรมของ cellulolytic enzyme จุลินทรีย์ *Paenibacillus* เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจ Yan *et al.* (2014) ทำการคัดแยก cellulolytic bacteria จากพื้นที่เขตร้อนในประเทศจีน พบว่ามี 22 ไอโซเลทที่มีความสามารถดังกล่าว โดยสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงที่สุดคือ *Paenibacillus terrae* ME27-1Andre *et al*. (2011). คัดแยก cellulolytic bacteria จาก ปลาดุก *Parotocinclusmaculicauda* ได้จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของ cellulolytic enzyme สูงถึง 0.154 U/ml ภายในวันแรกของการเพาะเลี้ยง คือ *Paenibacillus sp*. ซึ่งอาจจะเป็นเชื้อ species ใหม่ Raul*et al.*คัดแยก cellulolytic bacteria จากอินทผลัม พบว่าเป็น *Paenibacillus* ที่เป็น species ใหม่ ซึ่งจำแนกได้เป็น *Paenibacillus cellulosilyticus sp*. nov. จุลินทรีย์ *Streptomyces* เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีกิจกรรมของ cellulolytic enzyme โดย Feng et al. (2013) คัดแยก *Streptomyces griseorubens* JSD-1 ซึ่งมีกิจกรรมของ CMCase, FPase, Xylanase, Pectinase และสามารถย่อยสลายฟางข้าวได้ 76% ภายใน 30 วัน นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการต้านโรค Sclerotinia rot ในเมล่อน Feng *et al*. (2012) แยก *Streptomyces griseoaurantiacus* ZQBC691 จากปุ๋ยหมักยอดไผ่ พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีกิจกรรม

cellulolytic enzyme ที่ดี คือ สามารถผลิตเอนไซม์ endoglucanase37.38 IU/ml โดยมี pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส Kuo-Shu *et al*. (2007) คัดแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรม cellulolytic และ proteolytic activities สูงที่สุดได้ 3 สายพันธุ์คือ *Streptomyces thermonitrificans* NTU-88, *Streptococcus* sp. NTU-130 และ *Aspergillus fumigatus* NTU-132 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ ซึ่งสามารถช่วยลดระยะเวลาการเป็นปุ๋ยหมักให้สั้นลงได้ ดังนั้นการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์เพื่อปรับปรุงคุณภาพปุ๋ยหมัก ตลอดจนลดระยะเวลาการหมักจึงเป็นสิ่งที่ควรพัฒนาอย่างต่อเนื่อง Balasundaran (2009) พัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์จากจุลินทรีย์ 14 ไอโซเลท โดยมี 6 ไอโซเลท ที่มีประชากรเด่นขึ้นมาในระหว่างการหมัก คือ *Streptoverticillium viridoflavum, S. reticulum, Streptomyces celluloflavus, S. albicans, Bacillus subtilis* และ *Humicola* sp. จากการทดลองพบว่าในการใช้หัวเชื้อในการทำ weed compost, ayurvedic herbal waste compost และ coir pith compost ค่า C/N ratio สามารถลดลงได้ถึง 9.78 10.31 และ 18.6 ตามลำดับ ซึ่งได้ผลเป็นปุ๋ยหมักที่คุณภาพดี แต่ในการทำ sawdust compost ด้วยค่า C/N ratio ที่สูงทำให้การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ไม่ช่วยในการพัฒนาการเป็นปุ๋ยหมัก จะเห็นได้ว่าแม้ว่าจะคัดแยกได้จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายสลายที่ดี แต่ในการปฏิบัติงานกับวัสดุอินทรีย์ชนิดต่างๆ ก็อาจไม่ได้รับผลสำเร็จตามที่ต้องการได้ ดังนั้นการพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์อย่างต่อเนื่อง จะช่วยให้ได้องค์ความรู้ที่มากขึ้น เพื่อพัฒนาใช้กับวัสดุอินทรีย์ที่หลากหลายขึ้น ด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่หลากหลายชนิดขึ้น

ระเบียบวิธีการวิจัย

การจัดการดินทางชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตของดิน

1. เก็บดินชนิดต่างๆ คือ ชุดดินยโสธร ชุดดินตาคลี ชุดดินกาญจนบุรี ชุดดินสตึก ชุดดินน้ำพอง ชุดดินนครปฐม แล้วนำมาตากให้แห้งในที่ร่มจากนั้นบดดินให้ละเอียดร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติก วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design มี กรรมวิธีเท่ากับน้ำตาลชนิดต่างๆ บ่มในดิน ดิน 10 กรัม จำนวน 3 ซ้ำ

2. เตรียมวัสดุอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ให้อยู่ในรูปแบบที่พร้อมนำไปใช้ โดยนำใบพืชมาอบให้แห้งแล้วบดให้ละเอียด ขนาด 1 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องบดพืช

3. วิเคราะห์ตัวอย่างดินก่อนทำการทดลอง แล้วดำเนินการทดลองกับตัวอย่างดินชนิดต่างๆ กับแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส เศษใบไม้แห้ง และ control โดยนำดินที่เตรียมไว้ บรรจุในหลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 10 กรัม หลอดที่ 1 เป็น control ไม่ใส่แหล่งคาร์บอน หลอดที่ 2 ผสมกับแหล่งคาร์บอนคือกลูโคส 0.2000 กรัม และหยอดที่ 3 ผสมกับแหล่งคาร์บอนคือเศษใบไม้ 0.2000 กรัม อีก 1 หลอดเป็น control เติมน้ำกลั่นปรับระดับให้เป็น field capacity ทุกหลอด จากนั้นปิดปากหลอดทดลองด้วยพาราฟินด์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วบ่มที่ระยะเวลา 1 วัน 2 วัน และ 3 วัน ทำ 3 ซ้ำ ทุกกรรมวิธีใช้ดินน้ำพอง บรรจุในหลอดทดลอง 4 หลอดๆ ละ 10 กรัม หลอดที่ 1 ผสมแหล่งคาร์บอนคือ glucose 0.4000 กรัม หลอดที่ 2 ผสมแหล่งคาร์บอนคือ citric acid

1.1670 กรัม หลอดที่ 3 ผสมแหล่งคาร์บอนคือ ascorbic acid 0.9770 กรัม และหลอดที่ 4 สมแหล่งคาร์บอนคือ manitol 1.0120 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับระดับให้เป็น field capacity ทุกหลอด แล้วปิดปากหลอดทดลองด้วยพาราฟินต์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง บ่มเป็นระยะเวลา 4 วัน ทำ 3 ซ้ำ

4. เลือกกรรมวิธีที่ให้ผลดีกว่า control มาทำการทดลองโดยชั่งตัวอย่างละ 150 กรัม และผสมตัวอย่างดิน กับแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดย

1. ดินชุดน้ำพองผสม manitol 1.0120 กรัม
2. ดินชุดตาคลีผสม ribose 1.0000 กรัม
3. ดินชุดชุมพรผสมรากพืช 0.9000 กรัม
4. ดินชุดนครปฐมผสม fumaric acid 0.9600 กรัม
5. ดินชุดยโสธรผสมรากพืช 0.9000 กรัม
6. ดินชุดสตึกผสมกับรากพืช 0.9000 กรัม
7. ดินชุดสตึกผสมกับ manitol 1.0120 กรัม

นำตัวอย่างที่ผสมเสร็จแล้ว 7 ตัวอย่างใส่ลงไปในขวดแก้วตัวอย่างละขวด ปรับระดับความชื้นของแต่ละขวดให้เป็น field capacity เติม 1 N NaOH 15 มิลลิลิตร ลงในบิ๊กเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร 8 บิ๊กเกอร์ แล้วนำไปวางบนผิวดินตัวอย่างที่ผสมแล้วในขวดเตรียมไว้ 7 ขวด ปิดฝาให้แน่น วางบิ๊กเกอร์ที่บรรจุ 1N NaOH 15 มิลลิลิตร อีก 1 บิ๊กเกอร์ ในขวดแก้วที่ว่างเปล่า แล้วปิดฝาให้แน่น บ่มที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น 3 วัน ตรวจสอบ CO_2 โดยเปิดฝาขวดแก้วทั้ง 8 ขวดออก แล้วยกบิ๊กเกอร์ที่บรรจุ NaOH ออกอย่างระมัดระวัง จากนั้นเติม 3N $BaCl_2$ 1.0 มิลลิลิตร ลงในแต่ละบิ๊กเกอร์ เพื่อ Precipitate คาร์บอเนต เป็นสารประกอบ $BaCO_3$ ซึ่งไม่ละลายน้ำ แล้วเติมฟินอฟธาลีน 2-3 หยด ไตรเตรทสารละลายในบิ๊กเกอร์ด้วย 1.0 N HCl ไตรเตรทช้าๆและคนสารเบาๆด้วย glass rod จนกระทั่งสีชมพูปรากฏ ทำการไตรเตรททั้ง 8 บิ๊กเกอร์

5. การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดิน ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการ และสภาพกระถางทดลอง ซึ่งจัดเป็นระบบนิเวศน์วิทยาจำเพาะ(microcosm) ตรวจนับจุลินทรีย์เริ่มต้นก่อนทำการทดลอง และตามระยะเวลาที่กำหนด ตามช่วงอายุของพืชที่ปลูก ใส่วัสดุอินทรีย์ และน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่จะทำการศึกษา เป็นระยะเวลา 2 ปี โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างก่อนทำการทดลอง และทุก 3 เดือน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด พร้อมทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดิน ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ดิน เช่น pH, EC, OM เป็นต้น ศึกษากิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ดิน เช่น กิจกรรมของเอนไซม์ในดิน กิจกรรมการละลายฟอสเฟต กิจกรรมการตรึงไนโตรเจน เป็นต้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจะทำให้ทราบถึงความแตกต่างของกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ดินในระบบนิเวศวิทยาในช่วงนั้นๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาการใช้ปุ๋ยชีวภาพชนิดต่างๆ ให้เหมาะสมในระบบนิเวศวิทยาจำเพาะ (microcosm) การเพิ่มผลผลิตพืช

6. ชุดดินสตึกปลูกพริกในกระถางที่จัดทำเป็นระบบนิเวศน์วิทยาจำเพาะ เพื่อติดตามการงอกของรากพริก จากนั้น เตรียมดินชุดดินสตึกและคลุกผสมแหล่งของคาร์บอนที่ใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ คือ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลไรโบส (Ribose) และ น้ำตาลแมนนิทอล (Mannital) แผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 4 ซ้ำ 1.ไม่ใส่น้ำตาล 2. น้ำตาล glucose 3. น้ำตาล ribose 4. น้ำตาล mannitol และชุดดินตาคลีปลูกพริกใน

กระถางที่จัดทำเป็นระบบนิเวศน์วิทยาจำเพาะ เพื่อติดตามการงอกของรากพริก จากนั้นเตรียมดินชุดดินตาคลีและคลุกผสมแหล่งของคาร์บอนที่ใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ คือ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลไรโบส (Ribose) และ น้ำตาลแมนนิทอล (Mannital) ในการทดลองครั้งนี้มีการเพิ่มจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ RPS 0081 B วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 7 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ1.ไม่ใส่เชื้อ 2.ไม่ใส่เชื้อ + น้ำตาล Ribose 3.ไม่ใส่เชื้อ + น้ำตาล Glucose 4.ไม่ใส่เชื้อ + น้ำตาล Mannitol 5.ใส่เชื้อ + น้ำตาล Ribose 6.ใส่เชื้อ + น้ำตาล Glucose 7.ใส่เชื้อ + น้ำตาล Mannitol

การพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์

1. นำจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ที่เก็บรวบรวมไว้จากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรม จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรและที่ทำการแยกเชื้อใหม่จากแหล่งของเชื้อ เช่นจากกองปุ๋ยหมักที่ระยะ mesophilic และ thermophilic มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อปลดปล่อยออกมาโดยวิธีการทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายกระดาษกรอง Whatman No. 1 ตามวิธีการของ Mandels and Weber (1969) แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944) คำนวณปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส การวัดอัตราการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ที่มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบเช่น เศษพืชจากแปลง โดยตรวจสอบการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำหนักเศษพืชที่หายไป แล้วคัดเลือกจุลินทรีย์โดยประเมินจากกิจกรรมที่เกิดขึ้น

2. ทดสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมไว้ในกิจกรรมการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาเนส โดยจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายไซแลนที่เป็นองค์ประกอบที่พบมากในเฮมิเซลลูโลส โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Somogyi-Nelson คำนวณปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

3. ทดสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการใช้ไขมันโดยการเลี้ยงขยายเชื้อจนมีอายุได้ 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการเขี่ยเชื้อแบบ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติม tributyrin ความเข้มข้น 1% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง ถ้ามีการย่อยไขมันจะเกิดวงใส (Clear zone) รอบโคโลนีเชื้อ (Michael and Pelezar, 1995)

4. จัดเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ โดยการนำจุลินทรีย์ *Streptomyces sp*. และ *Paenibacillus sp*. สำหรับเตรียมผลิตเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์แบบที่ 2 (กำหนดให้ผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ของกรมวิชาการเกษตรเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์แบบที่ 1) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวnutrient broth จนมีปริมาณเซลล์ไม่ต่ำกว่า 10^9 cfu/ml แล้วคลุกกับ zeolite อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก อบแห้งจนกระทั่งมีความชื้นต่ำกว่า 18 เปอร์เซ็นต์

5. เตรียมบ่อหมักหมักขนาด 0.8 x1.0 x1.5 เมตรสำหรับการทดสอบหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ตามกรรมวิธีที่กำหนด โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุอินทรีย์ เพราะมี cellulose และ organic matter ประมาณ 40.50% และ 94.40% ตามลำดับ (ณิชตา และคณะ, 2556) ซังข้าวโพดจึงเป็นวัสดุอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความเหมาะสมต่อการทำปุ๋ยหมัก วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ดังนี้

1. ซังข้าวโพด + ยูเรีย (อัตราส่วน 100:1)

2. ซังข้าวโพด + มูลวัว (อัตราส่วน 100:20)
3. ซังข้าวโพด + มูลวัว + หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฯ แบบที่ 1
4. ซังข้าวโพด + มูลวัว + หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฯ แบบที่ 2
5. ซังข้าวโพด + หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฯ แบบที่ 1+หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฯ แบบที่ 2

ทำการหมักซังข้าวโพดในบ่อหมักจำนวน 70 กิโลกรัมต่อบ่อ ใส่ปุ๋ยหมักมูลวัว และหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฯ ตามกรรมวิธีการทดลอง อัตราส่วน 1 กรัม ต่อวัสดุอินทรีย์ 1 กิโลกรัม ให้ความชื้นที่ระดับ 60 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การจัดการดินทางชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตของดิน

การทดลองใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสและเศษใบไม้ ในชุดดินน้ำพอง ยโสธร สตึก ตาคลีและกาญจนบุรีแล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 1 วัน 2 วัน และ 3 วัน พบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันส่วนการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแอลกอฮอลล์ แมนนิทอล และกรดอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาคือ ascorbic acid และ citric acid ในดินน้ำพอง แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีแมนนิทอล เป็นแหล่งคาร์บอน (298.0 x 10^4 เซลล์ต่อกรัม) มีการเจริญเติบโตดีกว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีสกลูโคส (105.0 x 10^4 เซลล์ต่อกรัม) ascorbic acid (51.0 x 10^4 เซลล์ต่อกรัม) และ citric acid (12.0 x 10^4 เซลล์ต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนราพบว่า การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแอลกอฮอลล์แมนนิทอล และกรดอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาคือ ascorbic acid และ citric acid ในดินน้ำพอง รามีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ราที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีกลูโคส และแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน (12.0 x 10^4 เซลล์ต่อกรัม, 17.1 x 10^4 เซลล์ต่อกรัม) และมีการเจริญเติบโตดีกว่าราที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี ascorbic acid เป็นแหล่งคาร์บอน (2.0 x 10^4 เซลล์ต่อกรัม) สำหรับราที่มีการเจริญเติบโตในอาหารที่มี citric acid เป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับราที่มีการเจริญเติบโตในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (9.0 x 10^4 เซลล์ต่อกรัม) ส่วนการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไรโบส กรดอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาเป็น Succinic acid และวัสดุอินทรีย์เป็นรากพืช ในชุดดินตาคลีแล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีไรโบสเป็นแหล่งคาร์บอน (137.0x10^5 เซลล์ต่อกรัม) มีการเจริญเติบโตสูงกว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตใน control (98.33x10^5 เซลล์ต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ ส่วนรา การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไรโบส กรดอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาเป็น Succinic acid และวัสดุอินทรีย์เป็นรากพืช ในชุดดินตาคลีแล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่ารามีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไรโบส และกรดอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาเป็น succinic acid และวัสดุอินทรีย์เป็นรากพืชในดินน้ำพอง แล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 5) แบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีรากพืชเป็นแหล่งคาร์บอน (90.0x10^5 เซลล์ต่อกรัม) จะมีจำนวนใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่เจริญเติบโนใน

control ($157.3x10^5$ เซลล์ต่อกรัม) ส่วนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีไรโบส ($51.0x10^5$ เซลล์ต่อกรัม) และ succinic acid ($50.0x10^5$ เซลล์ต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอนมีจำนวนน้อยกว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตใน control ส่วนรา การทดลองใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไรโบส และกรดอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาเป็น succinic acid และวัสดุอินทรีย์เป็นรากพืชในดินน้ำพอง แล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่ารามีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนการใช้แหล่งคาร์บอนเป็น น้ำตาลซูโครส กรดอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาเป็น fumaric acid และวัสดุอินทรีย์เป็นรากพืช ในดินชุมพร แล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 3 วัน แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีรากพืชเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญเติบโตมากกว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตใน control ($273.3.0x10^4$ เซลล์ต่อกรัม, $266.7.0x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) ส่วนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่เจริญเติบโตใน control ($219.7x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี fumaric acid เป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเติบโตน้อยกว่า control ($72.0x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) ส่วนรา จากผลการทดลอง การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส กรดอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมาเป็น fumaric acid และวัสดุอินทรีย์เป็นรากพืช ในดินชุมพร แล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า รามีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ และการทดลองในดินนครปฐม พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีรากพืชเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่เจริญเติบโตใน control ($263.3x10^5$ เซลล์ต่อกรัม , $289.0x10^5$ เซลล์ต่อกรัม) ส่วนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีซูโครสและ fumaric acid เป็นแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าใน control ($119.33x10^5$ เซลล์ต่อกรัม , $69.0x10^5$ เซลล์ต่อกรัม) ส่วนการทดลองในรา พบว่า รามีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 10) ราที่มีการเจริญเติบโนในอาหารที่มีซูโครสและ fumaric acid เป็นแหล่งคาร์บอน ($191.0x10^2$ เซลล์ต่อกรัม, $217.3x10^2$ เซลล์ต่อกรัม) มีปริมาณใกล้เคียงกับราที่เจริญเติบโตใน control ($188.0x10^2$ เซลล์ต่อกรัม) โดยราที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี fumaric acid เป็นแหล่งคาร์บอนมีแนวโน้มสูงสุด ส่วนราที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีรากพืชเป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าใน control ($127.3x10^2$ เซลล์ต่อกรัม) นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลแมนนิทอล วัสดุอินทรีย์เป็นเศษใบไม้แห้ง รากพืชในดินยโสธรแล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11) แบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีน้ำตาลแมนนิทอล และรากพืช เป็นแหล่งคาร์บอน ($241.33x10^4$ เซลล์ต่อกรัม , $255.7x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) จะมีการเจริญเติบโตสูงกว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตใน control ($204.0x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) ส่วนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีเศษใบไม้เป็นแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าใน control (138.0x104 เซลล์ต่อกรัม) ส่วนรา พบว่า การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลแมนนิทอล วัสดุอินทรีย์เป็นเศษใบไม้แห้ง รากพืชในดินยโสธรแล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่ารามีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลฟรุ๊คโตส น้ำตาลแอลกอฮอลล์เป็นแมนนิทอล วัสดุอินทรีย์เป็นรากพืชในดินสตึกแล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีรากพืช เป็นแหล่งคาร์บอน ($281.33x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) จะมีการเจริญเติบโตสูงกว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโนใน control ($105.2x10^4$ เซลล์ต่อ

กรัม) manitol (97.5x10^4 เซลล์ต่อกรัม) และ fructose (114.3x10^4 เซลล์ต่อกรัม) ตามลำดับ ส่วนรา การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลฟรุ๊คโตส น้ำตาลแอลกอฮอลล์เป็นแมนนิทอล วัสดุอินทรีย์เป็นรากพืชในดินสตึกแล้วบ่มดินเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่ารามีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ราที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี manitol (294.3x10^2 เซลล์ต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเติบโตสูงกว่าราที่เจริญเติบโตในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุ๊คโตส (32.0x10^2 เซลล์ต่อกรัม) control (29.0x10^2 เซลล์ต่อกรัม และราพืช (17.0x10^2 เซลล์ต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองข้างต้นแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น มีผลทำให้กิจกรรมของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของแหล่งคาร์บอน และชนิดของดิน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 กิจกรรมของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของแหล่งคาร์บอน และชนิดของดิน

แหล่งคาร์บอน	กิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน ($mgco_2$/ดิน 100 กรัม)
1. manitol ในดินน้ำพอง	55.44
2. nivose ในดินตาคลี	88.00
3. รากพืชในดินชุมพร	59.40
4. fumaric acid ในดินนครปฐม	62.04
5. รากพืชในดินยโสธร	53.24
6. รากพืชในดินสตึก	12.76
7. manitol ในดินสตึก	50.16

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดิน โดยศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดิน โดยทำการปลูกพริกในกระถางที่จัดทำเป็นระบบนิเวศน์วิทยาจำเพาะ (รูปที่ 1) ในชุดดินสตึก ตามกรรมวิธีที่กำหนด เพื่อติดตามการงอกของรากพริก วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน พบว่าดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในดินก่อนปลูก พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในดินชุดดินสตึกก่อนปลูก เท่ากับ 3.4 x 10^7 cfu/ดิน 1 กรัม เป็นแบคทีเรีย 3.4 x 10^7 cfu/ดิน 1 กรัม และรา 2.2 x 10^4 cfu/ดิน 1 กรัม

รูปที่ 1 กระถางพลาสติกที่จัดทำเป็นระบบนิเวศน์วิทยาจำเพาะ(microcosm)

เมื่อพริกออกดอก วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในดินรอบราก (rhizosphere soil) และจุลินทรีย์บนผิวราก (rhizoplane) ของพริกจากกรรมวิธีที่กำหนด พบว่าจุลินทรีย์ในดินรอบรากไม่ว่าจะใช้น้ำตาลชนิดใด มีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์บนผิวราก โดยจุลินทรีย์ในดินรอบรากพริก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนจำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากรากแขนงและรากฝอยเป็นแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

ในดินรอบรากพริก ถึงแม้ว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มว่าการใส่น้ำตาลทุกชนิด ให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่าการไม่ใส่น้ำตาล (ตารางที่ 2) การใส่น้ำตาลกลูโคสทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ในดินสูงที่สุดเท่ากับ 1.8×10^8 cfu/g.soil ผลเป็นไปในทำนองเดียวกันกับปริมาณแบคทีเรียที่พบบนผิวรากแขนงและรากฝอย การใส่น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่พบบนผิวรากแขนงและรากฝอยสูงกว่าการไม่ใส่น้ำตาล นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนไอโซเลทของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากรากแขนง และรากฝอยเป็นแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในดินรอบรากพริก และจำนวนไอโซเลทแบคทีเรียที่ติดสีแกรม

กรรมวิธี	จุลินทรีย์ทั้งหมด (cfu/g.soil)	แบคทีเรีย (cfu/g.soil)	รา (cfu/g.soil)	การติดสีแกรม	
				+	-
ควบคุม	2.0×10^6	2.0×10^6	1.6×10^4	9	2
น้ำตาลกลูโคส	1.8×10^8	1.8×10^8	2.8×10^3	8	1
น้ำตาลไรโบส	7.9×10^7	7.9×10^7	9.0×10^3	7	2
น้ำตาลแมนนิทอล	7.9×10^7	7.9×10^7	3.2×10^4	9	1
CV (%)	2.3	2.5	2.9		

ปลูกพริกในกระถางที่จัดทำเป็นระบบนิเวศน์วิทยาจำเพาะ ในชุดดินตาคลี ตามกรรมวิธีที่กำหนด เพื่อติดตามการงอกของรากพริก วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน พบว่าดินมีความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในดินก่อนปลูก พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในดินชุดดินตาคลีก่อนปลูกพบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งหมด 6.7×10^7 cfu/g.soil ปริมาณจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย เท่ากับ 6.4×10^7 cfu/ดิน 1 กรัม เป็นจุลินทรีย์ประเภทรารา 3.4×10^6 cfu/ดิน 1 กรัม

เมื่อพริกออกดอก วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในดินรอบราก (rhizosphere soil) และจุลินทรีย์บนผิวราก (rhizoplane) ของพริกจากกรรมวิธีที่กำหนด พบว่าจุลินทรีย์ในดินรอบรากไม่ว่าจะใช้น้ำตาลชนิดใด มีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์บนผิวราก โดยจุลินทรีย์ในดินรอบรากพริก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนจำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากรากแขนงและรากฝอยเป็นแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ในดินรอบรากพริก พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มว่าการใส่น้ำตาลทุกชนิดร่วมกับการเพิ่มจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต RPS 0081 B ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่าการไม่ใส่น้ำตาลและจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต โดยการใส่น้ำตาลทำให้ปริมาณจุลินทรีย์สูงถึง 10^8 cfu/g.soil ผลเป็นไปใน

ทำนองเดียวกันกับปริมาณแบคทีเรียที่พบบนผิวรากแขนงและรากฝอยทำให้ปริมาณจุลินทรีย์สูงถึง 10^7 cfu/1 กรัมราก นอกจากนี้ยังพบว่าการใส่น้ำตาลร่วมกับการใส่จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทำให้พริกมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตพริกสูงที่สุด คือ การใส่จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตร่วมกับน้ำตาลเมนิทอล ทำให้พริกมีความสูงเท่ากับ 58.65 เซนติเมตร และให้ผลผลิตพริกสูงที่สุด 225.85 กรัมต่อกระถาง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในดินรอบรากพริก และจำนวนไอโซเลทแบคทีเรียที่ติดสีแกรม

กรรมวิธี	จุลินทรีย์ทั้งหมด (cfu/g.soil)	แบคทีเรีย (cfu/g.soil)	รา (cfu/g.soil)	การติดสีแกรม	
				+	-
1.ไม่ใส่เชื้อ	4.2×10^6	4.2×10^6	2.6×10^4	11	4
2.ไม่ใส่เชื้อ + น้ำตาล Ribose	2.8×10^8	2.8×10^8	4.8×10^4	12	2
3.ไม่ใส่เชื้อ + น้ำตาล Glucose	4.9×10^8	4.9×10^8	3.0×10^4	11	2
4.ไม่ใส่เชื้อ + น้ำตาล Mannitol	2.2×10^8	2.2×10^8	2.6×10^4	11	4
5.ใส่เชื้อ + น้ำตาล Ribose	3.8×10^8	3.8×10^8	4.8×10^4	12	2
6.ใส่เชื้อ + น้ำตาล Glucose	1.9×10^8	1.9×10^8	3.0×10^4	11	2
7.ใส่เชื้อ + น้ำตาล Mannitol	1.9×10^8	1.9×10^8	4.2×10^4	12	4
CV (%)	5.3	3.5	2.9		

ตารางที่ 4 ความสูงต้นพริกที่ระยะเวลา 45 วัน และน้ำหนักผลพริกในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี	ความสูงที่ระยะเวลา 45 วัน (ซม.)	น้ำหนักพริก (กรัม/กระถาง)
1.ไม่ใส่เชื้อ	31.50	76.00 b
2.ไม่ใส่เชื้อ + น้ำตาล Ribose	35.50	211.00 a
3.ไม่ใส่เชื้อ + น้ำตาล Glucose	48.25	213.27 a
4.ไม่ใส่เชื้อ + น้ำตาล Mannitol	52.50	217.55 a
5.ใส่เชื้อ + น้ำตาล Ribose	55.25	215.00 a
6.ใส่เชื้อ + น้ำตาล Glucose	52.20	218.00 a
7.ใส่เชื้อ + น้ำตาล Mannitol	58.65	225.85 a
CV (%)	15.7	22.6

2. การพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์

เก็บตัวอย่างดินและปุ๋ยหมักต่างๆ ได้ตัวอย่าง จำนวน 80 ตัวอย่าง และคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและไขมัน และทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส และไขมัน ได้จุลินทรีย์จำนวน 45 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายกระดาษกรอง Whatman No. 1 ภายในระยะเวลา 7 วัน จำนวน 12 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 7 สายพันธุ์ และแกรมลบ จำนวน 5 สายพันธุ์ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 สายพันธุ์ รวบรวมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ และจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection เลือกเชื้อแบคทีเรีย ย่อยสลายเซลลูโลส จำนวน 2 สายพันธุ์ มาใช้ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ โดย หาสูตรวัสดุพาที่เหมาะสม และสามารถทำเป็นรูปแบบเม็ด 2 รูปแบบ และตรวจสอบการมีชีวิตอยู่รอดของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ในวัสดุพานี้ โดยรูปแบบที่ 1 ปั้นเม็ดที่มีส่วนผสมของวีทกลูเต็น 0.05 0.5 0.1 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมซีโอไลท์ ตามลำดับ พบว่าวีทกลูเต็น 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำเป็นเม็ดได้ดี และมีปริมาณจุลินทรีย์รอดชีวิตอยู่ในช่วง 5.1 x10^6cfu/g ถึง 2.7 x10^6cfu/g รูปแบบที่ 2 ใช้ยิปซัมผสมหินฟอสเฟต แล้วอัดเม็ดโดยใช้พิมพ์ อคลีลิค ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ยาว 0.5 เซนติเมตร คัดเลือกได้จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส จำนวน 6 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก 1 ไอโซเลท เป็นรา4 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซิส 1 ไอโซเลท จุลินทรีย์ย่อยสลายไซแลน จำนวน 1 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 ไอโซเลท ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

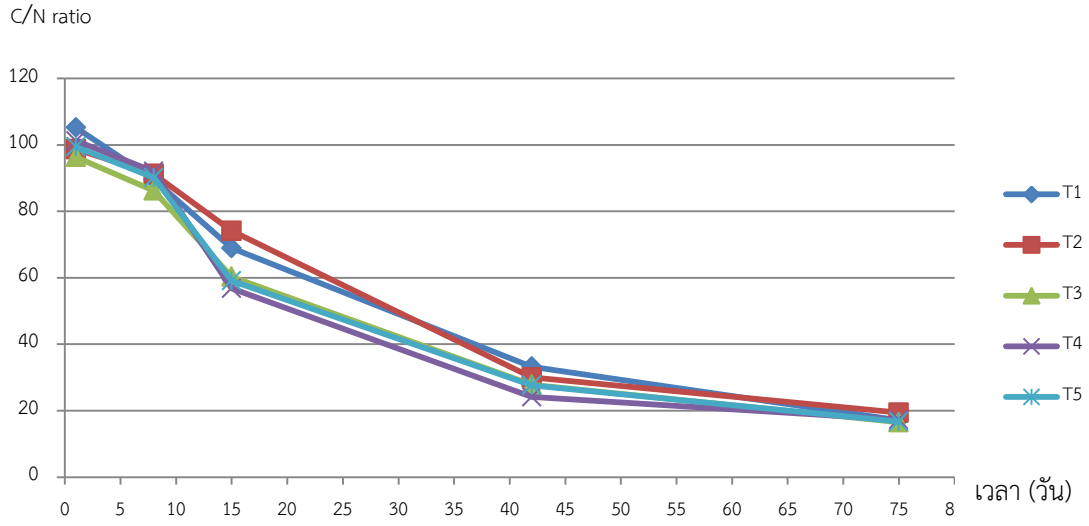
การศึกษาวิธีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบเม็ด คัดเลือกวัตถุดิบที่จะใช้ในการทดลองทำเม็ด ได้แก่ ยิปซัม หินฟอสเฟต ปุ๋ยหมักบดละเอียด สารสกัดจากข้าวสาลี (wheat gluten) และอื่นๆ แล้วทดลองทำเม็ดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตรด้วยแผ่นอะคลิลิคเจาะรู จากนั้นเลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ของกรมวิชาการเกษตร คือ DC 013 B 017 B 046.6 B 070 B และ 1102 B นำเม็ดวัสดุแช่ในสารละลายเชื้อ นาน 3 นาที ผึ่งลม แล้วเก็บในตู้บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ครบกำหนด 0 3 7 15 30 60 90 120 150 180 และ 360 วัน ทำการนับปริมาณเซลล์มีชีวิตปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในการแช่เม็ดวัสดุ ปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสในเม็ดวัสดุขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตรที่ระยะเวลาบ่มต่างๆ พบว่าปริมาณเซลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส DC013 B DC017 B DC046.6 B DC70 B และ DC1102 B มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาบ่ม โดยเฉพาะแบคทีเรีย DC017 B ซึ่งเป็นแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* และแบคทีเรีย DC070B ที่ไม่พบแบคทีเรียมีชีวิตที่ระยะเวลาบ่ม 30 วัน แบคทีเรีย DC013 B ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในสกุล *Pseudomonas* มีปริมาณเซลล์ ลดลงเหลือเพียง 330 DC1102 B และที่ระยะเวลา 60 วัน เหลือเพียง 53 cfu/เม็ด ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าเม็ดวัสดุมีแนวโน้มไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์รูปแบบเม็ด เพราะให้ปริมาณเซลล์ต่ำ และเชื้อมีชีวิตอยู่รอดไม่นาน ส่วน DC 046.6B DC070 B DC1102 B เชื้อมีชีวิตรอดที่ระยะเวลา 150 วัน ประมาณ 10^4-10^5cfu/เม็ด และมีแนวโน้มลดลด ตามระยะเวลา และยังคงมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์

การศึกษาวิธีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบผง นำจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ คือ DC013 B DC017 B DC046.6 B DC070 B และ DC1102 B มาผลิตในรูปแบบผง โดยเพาะเลี้ยงแล้ว

ผสมกับวัสดุคือ ยิปซัม และแป้งมันสำปะหลัง บดให้เป็นผงแล้วบรรจุถุง แล้วซีลปิดปากถุง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และความสามารถในการย่อยสลายวัสดุวัสดุอินทรีย์ที่ 0 3 7 15 30 60 90 120 150 180 และ 360 วัน เบื้องต้นพบว่าที่ 150 วัน DC 013 B 017 B 046.6 B 070 B และ 1102 B ในรูปแบบผงเซลล์ยังมีชีวิตประมาณ 10^4 -10^5cfu/เม็ด และยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส ส่วนการศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ เพื่อการขยายปริมาณจุลินทรีย์ในปริมาณมาก แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลอง ครั้งที่ 1 ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และมอลโตส อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลอง คือ อาหาร Nutrient Broth (NB) จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย DC 013 B DC 46.6B และ DC070B และ อาหาร Malt Yeast Extract Broth (MY) สำหรับจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ประเภทรา DC 0046F ผลการทดลองในแบคทีเรีย พบว่า ที่ระยะเวลาบ่ม 1 วัน อาหาร NB ที่ไม่ใส่น้ำตาล อาหาร NB ที่ใส่น้ำตาล ซูโครส และมอลโตส ให้ปริมาณเซลล์ DC 013 B ที่ 10^9 cfu/ml ในขณะที่อาหารที่ใส่น้ำตาลกลูโคส ให้ปริมาณเซลล์น้อยกว่าที่ 10^4 cfu/ml นอกจากนี้พบว่าเมื่อระยะเวลาบ่มมากขึ้นปริมาณเซลล์ DC 013 B ลดลงจนตรวจไม่พบที่เวลาบ่ม 7วัน ส่วนปริมาณเซลล์ DC 046.6B ที่ระยะเวลาบ่ม 1 วัน ในอาหาร NB ที่ใส่น้ำตาล ซูโครส และมอลโตส เท่ากับ 7.2 x 10^8 และ 2.7 x 10^8cfu/ml. ตามลำดับ ในขณะที่อาหารที่ใส่น้ำตาลกลูโคส ให้ปริมาณเซลล์ที่ 6.7 x 10^5 cfu/ml. และเมื่อระยะเวลาบ่มนานขึ้นปริมาณเซลล์ลดต่ำลงอย่างรวดเร็วจนไม่พบเชื้อที่ระยะเวลาบ่ม 5 วัน ในทุกอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับเชื้อ DC 070B ให้ผลในทำนองเดียวกันกับ DC 013B และ DC 046.6 B ส่วนการทดลองในรา พบว่าการเจริญของรา DC 046 F ในรูปแบบ เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง น้ำตาลซูโครส ให้เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งราสูงกว่าการใส่น้ำตาลกลูโคส และการใส่น้ำตาลมอสโตส จากการทดลองครั้งที่ 1 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีการเจริญสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส เป็น แหล่งคาร์บอนและในกรณีของเชื้อราก็เช่นเดียวกันคือ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้มวลน้ำหนักแห้งสูงสุด จากผลดังกล่าวจึงดำเนินการศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด ตลอดจนระดับ pH ที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถผลิตเซลล์ได้ปริมาณที่มากพอสำหรับเป็นหัวเชื้อในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ DC 013, DC 017, DC 046.6 ลงในอาหารเหลว NB ที่ระดับ pH ต่างกัน ได้ผลดังนี้ ที่ pH 5, pH 6 และ pH 7 เชื้อ DC 013 มีการเจริญค่อนข้างดีในช่วง 72 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง โดยที่pH 7 สามารถเจริญได้ในระดับ 29x10^8cfu/ml ในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง และที่ pH 7 และ pH 8 เชื้อ DC 046.6 มีการเจริญค่อนข้างดีในช่วง 72 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง โดยที่ pH 8 สามารถเจริญได้ในระดับ 6x10^8cfu/ml ในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าที่ pH 7 , pH 8 และ pH 9 เชื้อ DC 070 มีการเจริญค่อนข้างดีในช่วง 96 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง โดยที่ pH 8 สามารถเจริญได้ในระดับ 285x10^7cfu/ml ในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง

การหมักซังข้าวโพดในบ่อหมักจำนวน 70 กิโลกรัมต่อบ่อ ใส่ปุ๋ยหมักมูลวัว และหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลาย ฯ ตามกรรมวิธีการทดลอง ให้ความชื้นที่ระดับ 60 เปอร์เซ็นต์ จากการวัดอุณหภูมิ พบว่าอุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักสูงขึ้นในช่วง 15 วันแรก จากนั้นจึงเริ่มลดลงและค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 75-90 วัน ซึ่งเป็นการบ่งชี้การสิ้นสุดกระบวนการเป็นปุ๋ยหมักได้ในเบื้องต้น และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อ

ไนโตรเจน ณ เวลาต่างๆ พบว่าในช่วง 10 วันแรกการเปลี่ยนแปลง C/N ratio จะลดลงในอัตราที่ใกล้เคียงกัน ต่อมาในช่วงวันที่ 10 ถึงวันที่ 42 กรรมวิธีที่ 1 และ 2 จะลดลงในอัตราที่น้อยกว่ากรรมวิธีที่ 3 4 และ 5 เล็กน้อย ก่อนที่จะมีค่าต่ำกว่า 20 ในวันที่ 75 ซึ่งเป็นการสิ้นสุดการบวนการเป็นปุ๋ยหมัก โดยในวันที่ 15 ของการทำปุ๋ยหมัก ค่า C/N ratio จากน้อยไปมากคือ กรรมวิธีที่ 4 5 3 1 และ 2 ตามลำดับ และในวันที่ 42 ของการทำปุ๋ยหมัก ค่า C/N ratio จากน้อยไปมากคือ กรรมวิธีที่ 4 5 3 2 และ 1 ตามลำดับ (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ดังรูปที่ 2 ส่วนการเปลี่ยนแปลงของ pH ระหว่างการเป็นปุ๋ยหมักในทุกกรรมวิธีมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันคือ ในช่วงสองสัปดาห์แรกพบการลดลงของ pH อย่างต่อเนื่องอันเกิดจากการกิจกรรมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมัก หลังจากนั้น pH จะเพิ่มขึ้น แต่ไม่รวดเร็วนัก นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของค่าอินทรียวัตถุ ระหว่างการเป็นปุ๋ยหมักในทุกกรรมวิธีมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน คือ ลดลงอย่างต่อเนื่องอันเกิดจากการกิจกรรมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมัก ก่อนที่จะลดอัตราเร็วในการลดค่าอินทรียวัตถุในช่วงวันที่ 42 ถึง 75



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ณ เวลาต่างๆ (วัน)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทดลองใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่เหมาะสมกับดินชนิดต่างๆ มีผลทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แตกต่างกัน คือ

1. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาล manitol ในดินน้ำพอง ($298.0x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) มีผลทำให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดีกว่าการใช้กลูโคส ($105.0x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) citric acid ($12.0x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) และ ascorbic acid ($51.0x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนรา การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส ($185.0x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) และ manitol ($188.7x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) มีผลทำให้รามีการเจริญเติบโตดีกว่า ascorbie acid ($85.1x10^4$ เซลล์ต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอน

2. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไรโบสในดินตาคลี (137.0x10^5 เซลล์ต่อกรัม) มีผลทำให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดีขึ้นและดีกว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในแหล่งคาร์บอนที่เป็นรากพืช (123.3x10^5 เซลล์ต่อกรัม) ส่วนการใช้ succinic acid (59.0x10^5 เซลล์ต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตลดลง

3. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรากพืช (273.3x10^4 เซลล์ต่อกรัม) ในดินชุมพรมีผลทำให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดีขึ้นและดีกว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส (219.7x10^4 เซลล์ต่อกรัม) ส่วนการใช้แหล่งคาร์บอนเป็น fumaric acid (72.0x10^4 เซลล์ต่อกรัม) มีผลทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียลดลง

4. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรากพืชในดินนครปฐม (263.3x10^5 เซลล์ต่อกรัม) มีผลทำให้แบคทีเรียมีการเจริญใกล้เคียงกับ ไม่ใส่แหล่งคาร์บอน แบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารที่มี ซูโครส (119.3x10^5 เซลล์ต่อกรัม) fumaric acid (69.0x10^5 เซลล์ต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอนมีผลทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียลดลง ส่วนรา การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส (191.0x10^2 เซลล์ต่อกรัม) และ fumaric acid (217.3x10^5 เซลล์ต่อกรัม) มีผลทำให้การเจริญเติบโตของราใกล้เคียงกับไม่ใส่แหล่งคาร์บอน และการใช้แหล่งของคาร์บอนเป็นรากพืช (127.3x10^5 เซลล์ต่อกรัม) มีผลทำให้การเจริญเติบโตของราลดลง

5. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็น manitol (271.3x10^4 เซลล์ต่อกรัม) และรากพืช (255.7x10^4 เซลล์ต่อกรัม) ในดินยโสธรทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียมากขึ้น ส่วนการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นเศษใบไม้ (138.0x10^4 เซลล์ต่อกรัม) มีผลทำให้การเจริญเติบโนของแบคทีเรียลดลง

6. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรากพืช (281.3x10^4 เซลล์ต่อกรัม) ในดินสตึกมีผลทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นและสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟรุ๊กโตส (97.5x10^4 เซลล์ต่อกรัม) และ manitol (114.3x10^4 เซลล์ต่อกรัม) ส่วนรา การใช้แหล่งคาร์บอนเป็น manitol (294.3x10^2 เซลล์ต่อกรัม) มีผลทำให้การเจริญเติบโตของราเพิ่มขึ้นและสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟรุ๊กโตส (32.0x10^2 เซลล์ต่อกรัม) และรากพืช (17.0x10^2 เซลล์ต่อกรัม)

7. การใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกับชนิดดิน มีผลทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากขึ้น โดยการทดลองใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกับดินชนิดต่างๆ คือ manitol ในดินน้ำพอง, ribose ในดินตาคลี, รากพืชในดินชุมพร fumaric acid ในดินนครปฐม รากพืชในดินยโสธร รากพืชในดินสตึก และ manitol ในดินสตึก มีกิจกรรมจุลินทรีย์เท่ากับ 55.44 mgeco_2ต่อดิน 100 กรัม 88.0 mgco_2ต่อดิน 100 กรัม 59.4 mgco_2ต่อดิน 100 กรัม62.04 mgco_2ต่อดิน 100 กรัม 53.24 mgco_2ต่อดิน 100 กรัม 12.76 mgco_2ต่อดิน 100 กรัม 50.16 mgco_2 ต่อดิน 100 กรัมตามลำดับ

8. การศึกษาผลของน้ำตาลรูปต่าง ๆ คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลมอลโตส และ น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่จุลินทรีย์ดิน ต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืช การใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกับดินชนิดต่างๆ มีผลทำให้การเจริญ ประสิทธิภาพการทำงาน ของจุลินทรีย์ เพิ่มขึ้น ส่งผลให้พืชที่ปลูกมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตที่สูงกว่าการไม่จัดการแหล่งคาร์บอนในดิน โดยพบว่าในดินชุดดินตาคลีที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงกว่าชุดดินสตึกจะมีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นสูงกว่าและมีความหลากหลายของชนิดและปริมาณมากกว่า เมื่อมีการจัดการเพิ่มแหล่งคาร์บอน รวมทั้งการเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต ทำ

ให้ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลให้พริกให้ผลผลิตสูงกว่าการไม่เพิ่มจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอน

9. ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายจำนวน 6 ไอโซเลท คือ DC 013 B, DC 017 B, DC 046.6 B, DC070 B และ DC 1102 B เป็นแบคทีเรีย5 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแอคติโนมัยซิส 1 ไอโซเลท จุลินทรีย์ย่อยสลายไซแลน จำนวน 1 ไอโซเลท และ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 ไอโซเลท เซลลูโลส จำนวน 6 ไอโซเลท

10. การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบเม็ด วัตถุดิบที่จะใช้ในการทดลองทำเม็ด ได้แก่ ยิปซัม หินฟอสเฟต ปุ๋ยหมักบดละเอียด สารสกัดจากข้าวสาลี (wheat gluten) ที่ระยะเวลาบ่ม 60 วัน เซลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส DC 70 B และ DC1102 B เหลือปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ 10^6cfuต่อเม็ด ส่วนสายพันธุ์อื่นมีชีวิตรอดต่ำ

11. การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบผง โดยเพาะเลี้ยงแล้วผสมกับวัสดุคือ ยิปซัม และแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาบ่ม 60 วัน เซลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส DC 013 B, 017 B, 046.6 B, 070 B และ 1102 B เหลือปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ 10^6cfuต่อกรัม

12. ศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ เพื่อการขยายปริมาณจุลินทรีย์ในปริมาณมาก ปริมาณเซลล์มีชีวิตของแบคทีเรีย DC 013 B ที่ระยะเวลาบ่ม 1 วัน อาหาร NB ที่ไม่ใส่น้ำตาล ซูโครส และมอลโตส ให้ปริมาณเซลล์ DC 013 B ที่ 10^9 cfu ต่อมิลลิลิตร DC 046.6 B ที่ระยะเวลาบ่ม 1 วัน ในอาหาร NB ที่ใส่น้ำตาล ซูโครส และมอลโตส เท่ากับ 7.2×10^8 และ 2.7×10^8cfu ต่อมิลลิลิตร DC 070 Bที่ระยะเวลาบ่ม 1วัน อาหารNB ที่ใส่น้ำตาล ซูโครส และมอลโตส ที่ 10^9 และ 10^{10}cfu ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน DC 046 F ที่ระยะเวลาบ่ม 1 และ 2 วัน อาหารที่ใส่น้ำตาลซูโครสให้เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งราสูงกว่าการใส่น้ำตาลกลูโคส และการใส่น้ำตาลมอลโตส

13. การศึกษา pH ต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ DC 013 pH ที่ 7 สามารถเจริญได้ในระดับ $29x10^8$cfuต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 DC 046.6 pH 8 สามารถเจริญได้ในระดับ $6x10^8$cfu ต่อมิลลิลิตร DC 070 ที่ pH 8 สามารถเจริญได้ในระดับ $285x10^7$cfu ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง

14. อุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักสูงขึ้นในช่วง 15 วันแรก จากนั้นจึงเริ่มลดลงและค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 75-90 วัน ซึ่งเป็นการบ่งชี้การสิ้นสุดกระบวนการเป็นปุ๋ยหมักได้ในเบื้องต้น แต่ยังไม่สามารบอกความแตกต่างของแต่ละกรรมวิธีที่ใช้ในการทดลองได้ จึงต้องพิจารณาที่ค่า C/N ratio ซึ่งสามารถใช้ตัดสินว่ากระบวนการเป็นปุ๋ยหมักจบกระบวนการแล้วหรือไม่ ซึ่งค่า C/N ratio ที่ต่ำกว่า 20 จะถือว่าเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่าในช่วง 10 วันแรกการเปลี่ยนแปลง C/N ratio จะลดลงในอัตราที่ใกล้เคียงกัน ต่อมาในช่วงวันที่ 10 ถึงวันที่ 42 กรรมวิธีที่ 1 และ 2 จะลดลงในอัตราที่น้อยกว่ากรรมวิธีที่ 3 4 และ 5 เล็กน้อย ก่อนที่จะมีค่าต่ำกว่า 20 ในวันที่ 75 ซึ่งเป็นการสิ้นสุดการบวนการเป็นปุ๋ยหมัก โดยในวันแรกของการทำปุ๋ยหมัก ค่า C/N ratio จากน้อยไปมากคือ กรรมวิธีที่ 3 มีค่าน้อยที่สุด กรรมวิธีที่ 5 เท่ากับกรรมวิธีที่ 2 ตามมาด้วยกรรมวิธีที่ 4 และ 1 ในวันที่ 15 ของการทำปุ๋ยหมัก ค่า C/N ratio จากน้อยไปมากคือ กรรมวิธีที่ 4 5 3 1 และ 2 ตามลำดับ และในวันที่ 42 ของการทำปุ๋ยหมัก ค่า C/N ratio

จากน้อยไปมากคือ กรรมวิธีที่ 4 5 3 2 และ 1 ตามลำดับ (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ซึ่งจะเห็นได้ว่าช่วงท้ายของกระบวนการเป็นปุ๋ยหมัก กรรมวิธีที่ 4 5 3 ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่มีการใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์มีค่า C/N ratio จากน้อยไปมาก แสดงให้เห็นถึงความสามารถของหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์แบบที่ 2 ที่อาจเหมาะสมต่อการหมักซังข้าวโพดมากกว่ากรรมวิธีอื่นๆ แต่ว่าในกรรมวิธีที่ 5 ซึ่งมีการใช้หัวเชื้อผสมกัน อาจเกิดปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในรูปที่เป็นปฏิปักษ์กันหรือไม่ เป็นเหตุให้กระบวนการเป็นปุ๋ยหมักเกิดได้ช้าลงบ้าง เป็นสิ่งที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมให้มากขึ้น นอกจากนี้ การเกิดของหนอนและไส้เดือนในกองปุ๋ยหมัก ซึ่งพบระหว่างการหมักยังมีส่วนในการเป็นปุ๋ยหมักได้เร็วขึ้น เพราะหนอน หรือไส้เดือนอาจชอนไช ทำให้ซังข้าวโพดสลายได้ง่ายขึ้นในบางกอง เป็นเหตุให้ผลการทดลองอาจคลาดเคลื่อนได้บ้าง แต่อย่างไรก็ตามปุ๋ยหมักที่ผลิตได้ ยังคงมีธาตุอาหารเหลืออยู่ สามารถใช้เป็นปุ๋ยหมักในการเพาะปลูกพืชได้

ข้อเสนอแนะ

การขยายผลสำหรับการทดลองควรมีการทดลองกับดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์มากชนิดและต้องการใช้ประโยชน์ในการปลูกพืช และไม่ควรใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาแพง อาจมีการปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่หาง่ายและราคาถูก เพราะเมื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงดินและปลูกพืชอาจไม่คุ้มทุน และควรหาวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ที่พบในดินเพื่อจะได้มีข้อมูลการจัดการจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มผลผลิตพืช

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลผลิตจากโครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์และจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร ซึ่งมีเป้าหมายให้ได้เทคโนโลยีการผลิตและตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยอินทรีย์เคมีให้มีประสิทธิภาพรวมทั้งการหาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์เพื่อการจัดการดิน ทั้ง 4 กิจกรรมหลัก ได้ผลผลิตจากการทดลองทั้ง 4 กิจกรรม คือ

1) ได้วิธีการใหม่ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ 6 วิธี
2) พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพได้ 4 ชนิด
3) ได้เทคนิคในการผลิตปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี ทั้งชนิดแข็งและชนิดที่เป็นของเหลว 3 แบบ
4) ได้ข้อมูลรูปแบบในการใช้จุลินทรีย์ในการจัดการดิน 2 รูปแบบ

ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการผลิตและการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพให้มีมาตรฐาน รวมทั้งได้วิธีการหรือเทคนิคนำไปพัฒนาปรับปรุงการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ และอินทรีย์เคมีรวมทั้งการจัดการดินทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตพืชในประเทศไทยให้มีการใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อย่างไรก็ตามบางประเด็นหรือเทคนิค ยังแค่เป็นการศึกษาขั้นพื้นฐานอาจต้องนำไปพัฒนาปรับปรุงต่อยอดต่อไป หากจะมีการนำไปใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นต้องประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจเพิ่มเติมอีกด้วย เพื่อให้งานวิจัยสามารถนำไปใช้ในระบบการผลิตได้อย่างจริงจัง

บรรณาณุกรม

กิจกรรมที่ 1

Azra, B. and J. A. S. Pirzada. 2004. Characterization of five marine cyanobacterial species with respect to their pH and salinity requirements. Pak. J. Bot. 36(1): 133-143.

Boddey, R. M., Oliveira, O. C., Urquiaga, S.,Reis, V. M., Olivares, F. S., Baldani, V. L. D. and J. Dobereiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. Plant Soil., 174, 195-209

Fukuda, H. 1995. Immobilized Microorganism Bioreactor. Pages 339-375. In: Bioreactor System Design. J.A. Asenjo and J.C. Merehuk (eds.) Mareel dekker,INC.

Gandhi, A. and K.Sivakumar. 2010. Impact of vermicompost carrier based bioinoculants on the growth, yield and quality of rice (*Oryza sativa* L.) c.v. NLR 145. The Ecoscan 4(1) : 83-88.

Jacoud, C., D. Job, P. Wadoux and R. Bally, 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. Can. J. Microb., 45: 339-342.

Mehnaz, S., Mirza, M. S., Huarat, J., Bally, R., Normand, P. and K. A. Malik. 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol* 47: 110–117.

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

Motsara, M. R., Bhattacharyya, P. and B. Srivastava. 1995. Biofertilizer Technology, Marketting and Usage – A Sourcebook – cum - glossary. Fertilizer Development and Consultation Organization. New Delhi, India. 37-39.

Mueller, R. F. 1996. Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. ***Water Resources*** 30(11):2681-2691.

Roger, P.A. 1995. Biological N_2-fixation and its management in wetland rice cultivation. Fet. Res. 42: 261-276.

Sekar, R., Thangaraju, N. and R. Rengasamy. 1995. Effect of seaweed fertilizer from Ulva lactucaon Vigna unguiculata(L.) Walp.Phykos.34 : 49–53.

Shaaban, M.M. 2001. Green micro water extract as foliar feeding to wheat plants. *Pakistan Journal of Biological Science*. 4(6):628-632

Sivasankari, S., V. Venkatesalu, M. Anantharaj and M. Chandrasekaran. 2005. Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. *Bioresource Technology*. 97:1745-1751

Styriakova, I and I. Styriak. 2002. Iron removal from kaolins by bacteria leaching. ***Ceramic Silikaty*** 44(4):135-141.

Sugumaran, P. and B. Janarthanam. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. ***World Journal of Agricultural Science*** 3(3):350-355.

Vandevivere, P., S. A. Welch, W. j. Ullman and D. L. Kirchman.1994. Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. ***Microbial Ecology*** 27:241-251.

Zodape, S. T., S. Mukherjee, M.P. Reddy and D. R. Chaudhary. 2009. Effect of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) ex silva. extract on grain quality, yield and some yield components of wheat(*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Plant Production*. 3(2): 97-101

Whitton, B. A. 2000. Soils and rice-fields, pp.233-255. *In* B. A. Whitton and M. Potts(eds). The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers

Shuler, M.L. and F. Kargi. 2002. Bioprocess Engeneering. Prentice Hall, Inc., USA. Strullu, D.G. and C. Plenchette. 1990. Encapsulation de la forme intraracinaire de Glomus dans I'alginate et utilization des capsules comme inoculums. Comptes Rendus de I'Academie des Sciences, Ser. III, 310: 447-452.

Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. ***World Journal of Agricultural Science*** 3(3):350-355.

Vandevivere, P., S. A. Welch, W. j. Ullman and D. L. Kirchman.1994. Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. ***Microbial Ecology*** 27:241-251.

กิจกรรมที่ 2

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา (2551) คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. 45 หน้า

Berkum V. P. and Eardly D. B. (1998). Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae.* In H. P. Spaink, A. Kondorosi and P. J. J. Hooykaas. The Rhizobiaceae, Molecular biology of model plant-associated bacteria. Natherlands: Kluwer Acadamic Publishers. 635 pp.

Liu X. Y., Wu W., Wang E. T., Zhang B., Macdermott J. and Chen W. X. (2011). Phylogenetic relationships and diversity of β-rhizobia associated with *Mimosa* species grown in Sishuangbanna, China. Int J Syst Evol Microbiol. 61: 334-342

Manassila M., Nuntagij A., Kotepong S., Boonkerd N., and Teaumroong N. (2007). Characterization and monitoring of selected rhizobial strains isolated from tree legumes in Thailand. African Journal of Biotechnology, 6: 1393-1402.

Noisangiam R., Nuntagij A., Pongsilp N., Boonkerd N., Denduangboripant J., Ronson C., and Teaumroong N. (2010). Heavy metal tolerant *Metalliresistens boonkerdii* gen. nov., sp. nov., a new genus in the family Bradyrhizobiaceae isolated from soil in Thailand. Syst. Appl. Microbiol. Nov; 33 :374-382

Sadowsky M. J., Kinkel L. L., Bowers J. H. and Schottel J. L. (1996). Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3489-3493.

Somasegaran, P. and Hoben, H. J. (1994). Handbook for Rhizobia: Method in Legume Rhizobium Technology. New York: Spring-Verlag. 585 pp.

Rivas R., Velázquez E., Valverde A., Mateos P. F. and Martínez-Molina E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species.

Rivas R., Marten M., de Lajudie P. and Willems A. (2009). Multilocus sequence analysis of the genus Bradyrhizobium. Syst. Appl. Microbiol. 32: 101–110.

van Berkum P., Elia P. and Eardly B.D. (2006). Multilocus sequence typing as and approach for population analysis of Medicago-nodulating rhizobia. J. Bacteriol. 188: 5570–5577.

Young J. P. W. (1996). Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant and Soil. 186: 45-52.

กิจกรรมที่ 3

กรมวิชาการเกษตร. 2544. คู่มือการวิเคราะห์ดินและพืช ISBN: 974-436-054-2. กลุ่มงานวิจัยเคมีดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 164 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2548. คู่มือการวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ ISBN: 974-436-452-1. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 45 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2548. วัสดุอินทรีย์และปุ๋ยคอกในพื้นที่ทำการเกษตร ISBN: 974-436-521-8. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 216 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2552. พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. ๒๕๑๘ แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๐. ฝ่ายปุ๋ยเคมี ส่วนใบอนุญาตและขึ้นทะเบียน สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 66 หน้า.

เข็มพร เพชราภรณ์. 2549. การสลายตัวและการปลดปล่อยธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์ฮิวมิไฟด์ในดินไร่และดินนา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 63 น.

ศุภกาญจน์ ล้วนมณี, ประไพ ชัยโรจน์, สรัตนา เสนาะ. 2548ก. การใช้สารฮิวมัสจากมูลสุกรและกากตะกอนน้ำเสียเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมี: การปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในดินจากผลของการใส่กากตะกอนน้ำเสียที่เร่งให้เป็นฮิวมัส กากตะกอนน้ำเสียตากแห้ง และมูลไก่. ผลงานฉบับเต็ม กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

Anonymous. 1980. Fertilizer manual. United Nations Industrial Development Organization. Vienna.

Anthonis, G. 1994. Standard for organic fertilizer. Agro-Chemicals News In Brief. 17 (2): 12 – 15.

Bell, R.G. 1971. The role of compost and composting in modern agriculture. Compost Science, V.14, No.6, p.14.

Mandels, M and J. Weber. 1969. Cellulase and their application. Advances in Chemistry Series. 95: p.391

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Soomogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380

Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1990. Virginia, USA. 684p.

Stevenson, F.J. 1986. Cycles of Soil Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley&Sons, Inc. U.S.A. 380 p.

Zaman M. Di H.J., K. Sakamoto, S. Goto, H. Hayashi and K. Inubushi. 2002. Effects of sewage sludge compost and chemical fertilizer application on microbial biomass and N mineralization rates. Soil Sci. Plant Nutr. 48(2): 195-201.

กิจกรรมที่ 4

ณิชตา เป็งทินา, จิรวัฒน์ พัสระ, อภิชาติ ศรีภัย และ เสาวลักษณ์ แย้มหมีนอาจ. ผลของการปรับปรุงคุณภาพของเปลือกและซังข้าวโพดโดยใช้จุลินทรีย์และสารเคมีต่อการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของโคขาวลำพูน. ว. วิทย. กษ. 44 :1 (พิเศษ) : 43-46

A.D. Rovira, Plant root exudates. Bot Rev. 35:35 (1969)

André L. M. de Castro, E. V Renata, R. S. Peixoto1, A. L. Grigorevski-Lima, R. R. R. Coelho, E. P.S. Bon, A. S. Rosadoand L. Seldin. 2011. Cellulolytic potential of a novel strain of

Paenibacillus sp. isolated from the armored catfish Parotocinclus maculicauda gut. Braz J Microbiol. 42(4):1608-1615.

BalasundaranM. 2009. development of microbial inoculants for aerobic composting. Kerala Forest Research Institute Report No. 324. 43p.

Bowen GD, 1980. Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. In Contemporary Microbial Ecology. Ellwood DC, Hedger JN. Lathan MJ. Lynch JM and Slater JH (Eds.) Academic Press, London.

Cappuccino Jame G. and Sherman N. 2001. Microbiology a Laboratory Manual, State University of New York.

D.A. Barber and J.M. Lynch, Microbial growth in the rhizosphere, Soil Biology and Biochemistry 9:305 (1977).

E.A. Curl and B. Truelove, The Rhizosphere, Springer Verlag, New York, 1986.

Feng H. W., Y. E. Zhi, W. W. Shi, L. Mao and P. Zhou. 2013. Isolation, identification and characterization of a straw degrading *Streptomyces griseorubens* JSD-1. African Journal of Microbiology Research. 7(22) :2730-2735.

FengJ.Ch. , L. Chi-Wen,I. Yet-Po, W. Chih-Hungand Ch. Ding-Hsuan. 2012. Hydrolysis of bamboo cellulose and cellulase characteristics by *Streptomyces griseoaurantiacus* ZQBC691. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 43 :220-225.

John P.E. Anderson, 1984. Soil Respiration, Mchod of Soil Analysis part 2, 2nd ed. 41:831-871.

Kuo-Shu Ch., L. Yann-Shyingand Shang-Shyng Yang. 2007. Application of thermotolerant microorganisms for biofertilizer preparation. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 40: 462-473.

Mandels, M and J. Weber. 1969. Cellulase and their application. Advances in Chemistry Series. 95: p.391

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Soomogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380

Page, A.L. Miller, R.H. and Keeney, D.R. 1984. Method of Soil analysis part 2, 2nd ed. American society of agronomy, Wisconsin USA.

Pual EA and Clark FE (1996). Soil microbiology and Biochemistry, 2nd ed. Academic Press, San Diego. P. 72

R. Merckx. J.H. Van Ginkel J. Sinnaeve, and A. Cremers, Plant induced changes in the rhizosphere of maize and wheat. Plant and Soil 9:85 (1986).

S.J. Grayston, D. Vanghan, D. Jones, Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual

plats:the Importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. Appl. Soil Ecol, 5:29 (1996).

Yan-Ling L., Zh. Zheng,W. Min, Yuan Wu and F. Jia-Xun. 2014. Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. Bio Med Research International. Article ID 512497, 13 pages.

ประยูร สวัสดี, สมพร ชุนห์ลือชานนท์ และ นันทกร บุญเกิด. 2530. รายงานผลการวิจัยการใช้แหนแดงเป็นปุ๋ยพืชสดในนาข้าว. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 28 น.

Lui Chung-Chu. 1987. Reevaluation of *Azolla* Utilization in Agricultural Production. *In* Azolla Utilization: Proceedings of the Workshop on *Azolla* Use. pp. 67-76. Int. Rice Research Inst., Los Baños, Philippines.

Watanabe I., and Ramirez C. 1984. Relationship between soil phosphorus availability and *Azolla* growth. Soil Sci. Plant Nutr. 30: 595-598.