ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

Validation Method of microbial quantitative and efficiency analysis in PGPR Biofertilizer

อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ *กัลยกร โปร่งจันทึก*
Amnat Eamvijarn *Kunlayakorn Prongjunthuek*

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

Acetylene Reduction Assay (ARA), the Most Probable Number (MPN), and Viable Plate Count are the methods for selecting the microbial quantity and efficiency for PGPR biofertilizer. *Azospirillum brasilense* (DASF04003) and *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) were used for method validation. The results revealed that *A. brasilense* (DASF04003) had the repeatability of analytical method was 2.79% of coefficient of variation (CV). The accuracy test at 10^{-1} and 10^{-4} concentrations were 98.39 and 103.65%. The LOD and LOQ of method were 4.68 and 1.58 Log_{10}CFU. In addition, the uncertainty of measurement based on MPN method was 0.599. Furthermore, *A. vinelandii* (DASF04141) showed the repeatability of analytical method was 5.61% of CV. The accuracy test at 10^{-1} concentration was 118.55%. The LOD and LOQ of method was 6.36 and 4.90 Log_{10}CFU. The uncertainty of measurement based on Viable Plate Count method was 0.421. Importantly, the within laboratory reproducibility test by between-analyst variation of both methods was non significance at 95% confidence level.

Keywords : Validation, nitrogen fixing efficiency, Plant growth promoting bacteria, biofertilizer

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) และการวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) และ Viable plate count เป็นวิธีที่ใช้คัดเลือกจุลินทรีย์อ้างอิงเพื่อใช้ควบคุมคุณภาพปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ *Azospirillum brasilense* (DASF04003) และ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) เพื่อนำมาใช้เป็นเชื้ออ้างอิงในการทดลอง ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความใช้ได้ของวิธีทดสอบของเชื้อ *A. brasilense* (DASF04003) พบว่าความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) เท่ากับ 2.79 เปอร์เซ็นต์ ความแม่นของวิธีได้ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-4} มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.39 และ 103.65 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดเชิงปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 4.68 และ 1.58 Log_{10}CFU ตามลำดับ และค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบเท่ากับ 0.599 ขณะที่เชื้อ *A. vinelandii* (DASF04141) การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำมี CV เท่ากับ 5.61 เปอร์เซ็นต์ ค่า %Recovery ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 118.55 เปอร์เซ็นต์ มีค่า LOD และค่า LOQ เท่ากับ 6.36 และ 4.90 Log_{10}CFU ตามลำดับ และค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบเท่ากับ 0.421 ขณะที่การทดสอบความเที่ยงแบบ

between-analyst variation โดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

คำสำคัญ : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ปุ๋ยชีวภาพ

คำนำ

ปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (Plant growth promoting rhizobacteria: PGPR) เป็นปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีชีวิต ที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ทั้งบริเวณดินรอบ ๆ ราก ผิวราก ภายในราก บางครั้งพบบริเวณต้นและใบ ส่วนใหญ่มักพบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมากถึง 10-100 เท่า บริเวณรอบรากเนื่องจากพืชจะปล่อย exudate หลายชนิด เช่น กรดอะมิโน (amino acid) และน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นต้น โดยเป็นแหล่งอาหารและพลังงานของแบคทีเรีย (Gray and Smith, 2005) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ 2 ทาง คือ การตรึงไนโตรเจน และผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid ช่วยให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้นทำให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้น (Boddey *et al.*, 1995; Meunchang *et al.*, 2004 and Jacoud *et al.* 1999) หรือการสร้างปฏิชีวนสาร (antagonistic substance) เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช (Glick, 1995) นอกจากนี้ยังช่วยให้อนุภาคดินจับกันเป็นเม็ดดินที่สมบูรณ์ จึงช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดิน และลดการพังทลายของดิน

ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เป็นปุ๋ยชีวภาพชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีความสามารถหลายด้านอยู่ในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพเดียวกัน จุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสามารถตรึงไนโตรเจน ผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ละลายฟอสเฟต รวมทั้งสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคบางชนิดได้ อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจนับปริมาณ มักใช้อาหารจำเพาะในการนับ ตามสกุลจุลินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบ วิธีการที่นิยมใช้นับจำนวนจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มี 2 วิธี คือ 1) วิธีนับแบบ Viable Plate Count ใช้นับแบคทีเรียในกลุ่ม aerobic และ 2) วิธีการนับแบบ Most Probable Number (MPN) ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่ม micro aerophilic (กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา, 2551) เกณฑ์ที่กำหนดในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 นั้น ปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยชีวภาพต้องมีไม่ต่ำกว่า 1×10^6 โคโลนีต่อเซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

จุลินทรีย์กลุ่ม aerobic คือ จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต เพื่อการหายใจ (respiration) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ในภาวะที่มีอากาศ หรือมีออกซิเจนเท่านั้น (obligate aerobe) มักพบเจริญบริเวณผิวหน้าของอาหาร เช่น *Azotobacter, Beijerinnckia* และ *Burkholderia* เป็นต้น *Azotobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปท่อนขนาดใหญ่ บางชนิดรูปร่างเซลล์คล้ายผลแพร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-4 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (flagella) พบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออาจอยู่รวมเป็นกลุ่มหรือต่อกันเป็นสาย สร้างเมือก (mucus) และแคปซูล (capsule) บางชนิดสร้างเม็ดสี (pigment) เช่น สีเขียวอมเหลือง สีม่วง หรือสีน้ำตาลเข้ม (Jensen, 1954; Holt *et al.* 1994) สามารถพบได้ทั่วไปในดิน ดินเค็ม น้ำและพืช มีรายงานการนำเชื้อ *Azotobacter* ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น วัตถุเจือปนในอาหาร (food additive) โพลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) และที่สำคัญการนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) (Then *et al*. 2012 and Wani *et al*. 2016) ส่วนจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophilic คือ จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำประมาณ 2-10 เปอร์เซ็นต์ (<21 เปอร์เซ็นต์) จึงต้องการออกซิเจนเพื่อการอยู่รอดเท่านั้น เช่น *Azospirillum, Gluconacetobacter* เป็นต้น *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบได้ทั่วไปในดินบริเวณรอบรากพืช สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ดีเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ผลิต proteolytic enzyme ผลิตฮอร์โมนพืช (auxins, cytokinins และ gibberellines) และสร้าง cyst ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Hartmann and Zimmer, 1994) มีรายงาน *Azospirillum* ที่มีประสิทธิภาพที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Azospirillum lipoferum, A. rasilens, A. amazonense,*

A. halopraeferens และ *A. irakense* (Tarrand *et al*. 1978; Magalhães *et al*. 1983; Reinhold *et al*. 1987 and Khammas *et al*. 1989)

ปัจจุบันเอกชนมีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อจำหน่ายกันอย่างแพร่หลาย ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อการค้านั้น มีการควบคุมคุณภาพโดยต้องขอขึ้นทะเบียนปุ๋ย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ซึ่งได้กำหนดมาตรฐานปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จะต้องมีจุลินทรีย์อย่างน้อย 1 x 10^6 หรือ 1 ล้านโคโลนี/เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ทั้งนี้การตรวจนับปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพด้วยวิธีข้างต้นยังไม่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการที่เป็นมาตรฐานสากล ทำให้ขาดข้อมูลที่ใช้ยืนยันความถูกต้อง แม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุงและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) เพื่อเป็นการยืนยันถึงวิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สอบกลับได้ และจัดทำเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (Standard Operation Procedure) ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ และเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล และคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อรองรับการขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ.2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 และเตรียมข้อมูลเพื่อขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophillic bacteria ได้แก่ DASF04003, DASF04005, DASF04008, PGPR16/63, AP1, DASF04175, DASF04176, DASF04177, DASF04178 และ PGPR189/62 และกลุ่ม aerophillic bacteria ได้แก่ DASF04141, DASF04126, DASF04127, AT1, AT2, AT4, AT9, AT10, AT32 และ AT38
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrogen free semisolid malate (NFb), LGI, Nutrient broth (NB) และ Nutrient agar (NA)
3. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้บ่มเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ เครื่องวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน เป็นต้น
4. เครื่องแก้วและวัสดุอื่น ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

วิธีการ

1. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

วัดประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 20 สายพันธุ์ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NFb และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนจุกหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแบบพลาสติกให้เป็นจุกยางสำหรับเก็บแก๊ส ทำการอัดแก๊สอะเซทิลีนลงไปในส่วนปริมาตรเหนืออาหาร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หลังจากนั้นทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดแก๊สจากหลอดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ ทำการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีการของ Hardy *et al*. (1973) แล้วนำตัวอย่างแก๊สที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) คำนวณหาปริมาณแก๊สเอทิลีน โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทิลีนมาตรฐานจากสูตรดังนี้

อัตราการตรึงไนโตรเจน = $(10^3 \times B \times V)/(250 \times Std. \times A \times 22.4)$

B = พื้นที่ใต้กราฟของพืชตัวอย่าง
V = ปริมาตรของขวดกรวยแก้วที่ใช้เก็บตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
Std. = พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของแก๊สอะเซทิลีนมาตรฐาน
A = เวลาที่ใช้ในการรีดิวซ์แก๊สอะเซทิลีน (ชั่วโมง)

10^3 = เปลี่ยนหน่วยจากมิลลิโมลเป็นไมโครโมล (μmol)
250 = ปริมาตรของภาชนะบรรจุแก๊สมาตรฐาน
22.4 = ปริมาณของแก๊ส 1 โมล ที่ STP

อัตราการตรึงไนโตรเจน มีหน่วยเป็นไมโครโมลของเอทิลีน (C_2H_4) ต่อหลอดต่อชั่วโมง เมื่อใช้เอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาตรที่แน่นอน (250 มิลลิลิตร) นำข้อมูลอัตราการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแต่ละไอโซเลทมาเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนดีที่สุดและสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ

2.1 นำหลอดเก็บตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เก็บรักษาไว้ มาทำการ streak บนอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

2.3 ใช้ลูป (loop) แตะโคโลนีเชื้อประมาณ 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 150-180 รอบ/นาที เป็นเวลา 3-5 วัน

2.4 ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มไว้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเชื้อที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 150-180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-5 วัน จะได้หัวเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณอย่างน้อย 1.0×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

2.5 ชั่งวัสดุพา (พีทมอส) ถุงละ 100 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±3 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทำการนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยวิธีการเดิม

2.6 นำวัสดุพาที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์อัตราส่วน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยการใช้กระบอกฉีดยาฉีดหัวเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปในถุงวัสดุพา จากนั้นใช้ผสมวัสดุพาและหัวเชื้อเข้ากันดี จะได้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

3. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพ

3.1 จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

3.1.1 วิธี Most Probable Number (MPN)

3.1.1.1 เตรียมอาหาร LGI แบบกึ่งเหลว แบ่งใส่หลอดทดลอง ขนาด 20 มิลลิลิตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.1.2 ทำการเจือจางตัวอย่างปุ๋ยโดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วเจือจางตามลำดับ ตั้งแต่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-7}

3.1.1.3 ดูดตัวอย่างปุ๋ยที่ทำการเจือจางแล้วระดับความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร หยดใส่ในหลอดอาหาร LGI กึ่งเหลว ความเจือจางละ 5 หลอด

3.1.1.4 บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

3.1.1.5 คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ตามสูตร

CFU/1 กรัม = ค่าจากตาราง MPN x 10 x dilution factor

3.1.2 วิธี drop plate

3.1.2.1 เตรียมอาหาร LGI แบบวุ้นแข็ง ใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้อาหารแข็งตัวอย่างน้อย 4 ชั่วโมง

3.1.2.2 ทำการเจือจางตัวอย่างปุ๋ยโดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วเจือจางตามลำดับ ตั้งแต่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-7}

3.1.2.3 หยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง จำนวน 3 จุดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 6 ซ้ำ โดยแต่ละจุดใช้ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหาร ประมาณ 15-30 นาที นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ตามสูตร

CFU/1 กรัม = จำนวนโคโลนีเฉลี่ย x 5 x dilution factor

3.2 จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

3.2.1 วิธี Viable plate count

3.2.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อไว้อย่างน้อย 4 ชั่วโมง

3.2.1.2 ทำการเจือจางตัวอย่างปุ๋ยโดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วเจือจางตามลำดับ ตั้งแต่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-8}

3.2.1.3 ดูดตัวอย่างปุ๋ยที่เจือจางแล้วแต่ละระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร หยดบนผิวหน้าอาหารที่เตรียมไว้ จากนั้นเกลี่ยให้กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม (glass spreader) ความเจือจางละ 3 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ซ้ำ)

3.2.1.4 บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่สารละลายตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทั้งหมดในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

4.1 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1.1 ความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability)

ทดสอบหาจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกันโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนเดียว นำข้อมูลจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพที่ได้ในหน่วยเซลล์หรือโคโลนีต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพจากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้งสองคนมาเปลี่ยนค่าให้อยู่ในรูป Log_{10}CFU คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) โดย %CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์

4.1.2 การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

ทดสอบหาจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ จำนวน 21 ซ้ำ โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน คำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ค่าเฉลี่ย และ %CV โดย %CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์ และเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ที่วัดได้จากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน โดยทดสอบทางสถิติด้วย Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.2 การทดสอบความแม่น (Accuracy)

นำตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่เตรียมจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์อ้างอิง จำนวน 10 กรัม มาทำการเจือจางลำดับส่วน 10 เท่า (10 fold serial dilution) ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} แล้วทำการหาจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพจากการทดสอบ 3 วิธี ดังนี้

4.2.1 จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

วิธี Most Probable Number (MPN) โดยทำการดูดสารละลายที่ความเข้มข้นระดับ 10^{-1} (สูง) 10^{4} (กลาง) 10^{-6} (ต่ำ) ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร หยดใส่ในหลอดอาหาร LGI กึ่งเหลว ความเจือจางละ 5 หลอด จำนวน 6 ซ้ำ บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

วิธี drop plate โดยทำการดูดสารละลายที่ความเข้มข้นระดับ 10^{-1} (สูง) 10^{-4} (กลาง) 10^{-6} (ต่ำ) ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 จุดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 6 ซ้ำ บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

4.2.2 จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

วิธี Viable plate count โดยทำการดูดสารละลายที่ความเข้มข้นระดับ 10^{-1} (สูง) 10^{-2} (กลาง) 10^{-3} (ต่ำ) ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 6 ซ้ำไปเกลี่ย (spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นแข็ง บ่มในตู้บ่มเชื้อ และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) โดยมีค่า 80-120 เปอร์เซ็นต์ และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) มีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์

4.3 การหาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ (Uncertainty) ทางจุลชีววิทยา

4.3.1 การนับปริมาณจุลินทรีย์

4.3.1.1 ชั่งตัวอย่าง 10±0.1 กรัม อย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

4.3.1.2 ตัวอย่างชุดที่1 (Yj1) ให้ผู้ทดสอบคนที่ 1 เป็นผู้ทดสอบ และตัวอย่าง (Yj2) ให้ผู้ทดสอบคนที่ 2 เป็นผู้ทดสอบ

4.31.3 ทำการทดสอบตัวอย่างเพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์

4.3.1.4 แปลงข้อมูลที่ได้จากผู้ทดสอบแต่ละคนให้อยู่ในรูป $Log_{10}CFU$

4.3.1.5 นำมาคำนวณตามสูตร

การหาค่า Standard deviation of reproducibility

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{2n}\sum_{i=1}^{n}(Yj1 - Yj2)^2}$$

โดยที่

S_R	=	Standard deviation of reproducibility
$(Y_j1 - Y_j2)$	=	ผลต่างของผลการทดสอบจากผู้ทดสอบแต่ละคนในรูป $Log_{10}CFU$
n	=	จำนวนตัวอย่าง
i	=	ลำดับที่ของตัวอย่าง

4.3.2 การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Expanded Uncertainty)

$$U_{95\%} = 2\sqrt{S_R^2 + \frac{0.18861}{\sum C}}$$

โดยที่

$U_{95\%}$	=	ค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Expanded Uncertainty)
S_R	=	Standard deviation of reproducibility ที่ได้จากคำนวณ
$\sum C$	=	ผลรวมของจำนวนจุลินทรีย์ทุกซ้ำของการทดสอบ
$\frac{0.18861}{\sum C}$	=	Variance component due to Poisson distribution

ระยะเวลา ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophillic สกุล *Azospirillum* จำนวน 10 สายพันธุ์ มีค่าการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 23.89 - 90.30 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อหลอด สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงสุด 3 อันดับแรก คือ AP1, DASF04175 และ DASF04178 โดยมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 90.30 68.89 และ 65.23 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อหลอด (Table 1) ส่วนเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม aerophillic สกุล *Azotobacter* จำนวน 10 สายพันธุ์ มีค่าการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 3.65 - 30 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อหลอด สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงสุด 3 อันดับแรก คือ DASF04141, AT4 และ DASF04127 โดยมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 30 9.14 และ 8.73 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อหลอด (Table 1) ทั้งนี้บางสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูง แต่มีการเจริญเติบโตช้า จึงคัดเลือกสายพันธุ์ DASF04003 และ DASF04141 เพื่อใช้เป็นเชื้ออ้างอิงที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในการวิธีวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ มีรายงานการศึกษาปริมาณการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter* จำนวน 16 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่า มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน 0.48 – 0.99 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง (อรุณี, 2556) ในทางเดียวกัน อาภากร (2553) รายงานการใช้เชื้อ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ผลิตเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้ในนาข้าว พบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในช่วง 0.05 – 9.74 นาโนโมลเอทิลีนต่อวันต่อ 10^8 CFU นอกจากนี้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชยังผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid ช่วยให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้นมีผลช่วยให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (Boddey *et al.*, 1995; Meunchang *et al.*, 2004 and Jacoud *et al*. 1999) หรือการสร้างปฏิชีวนสาร (antagonistic substance) เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช (Glick, 1995) และยังช่วยให้อนุภาคดินจับกันเป็นเม็ดดินที่สมบูรณ์ จึงช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดิน และลดการศักยภาพการพังทลายของดิน

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

2.1 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

2.1.1 ความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability)

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในด้านความสามารถในการทำซ้ำ พบว่า จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria มีค่าความสามารถในการทำซ้ำของการทดสอบ โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ในหน่วย CFU ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพเฉลี่ยเท่ากับ 8.68 Log_{10}CFU มีค่า %CV เท่ากับ 2.79 ส่วนจุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ในหน่วย CFU ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพเฉลี่ยเท่ากับ 4.58 Log_{10}CFU มีค่า %CV เท่ากับ 5.61 (Table 2)

2.1.2 การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation) จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

ทดสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพ จำนวน 21 ซ้ำ โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน พบว่า เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.37 Log_{10}CFU และมี %CV เท่ากับ 7.10 สำหรับเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.66 Log_{10}CFU และมี %CV เท่ากับ 7.06 (Table 3) และเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ที่นับได้จากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95% ได้ค่าเท่ากับ 0.39

จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

สภาวะเดียวกัน พบว่า เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.52 Log_{10}CFU และมี %CV เท่ากับ 6.71 สำหรับเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.53 Log_{10}CFU และมี %CV เท่ากับ 7.75 (Table 4) และเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ที่นับได้จากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95% ได้ค่าเท่ากับ 0.87

2.2 การทดสอบความแม่น (Accuracy)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

Relative Accuracy (AC) คือ ระดับของความตรงกันระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพที่ได้จากวิธีทดสอบ Most probable number (MPN) เมื่อเทียบกับวิธี Drop Plate ผลการทดสอบพบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของวิธีทดสอบปริมาณเชื้อ *Azospirillum brasilense* (DASF04003) ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} (ระดับสูง) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 7.40 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 98.39% (Table 5) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} (ระดับกลาง) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 4.68 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 103.65% (Table 6) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10^{-7} (ระดับต่ำ) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 1.58 Log_{10}CFU (Table 7) โดยมีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 193.09%

จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

Relative Accuracy (AC) คือ ระดับของความตรงกันระหว่างปริมาณเชื้อพีจีพีอาร์กลุ่ม aerophillic bacteria เชื้อ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพที่ได้จากปุ๋ยชีวภาพแบบผงและเหลว โดยนับปริมาณด้วยวิธี Viable Plate Count ผลการทดสอบพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} (ระดับสูง) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 6.36 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 118.55% (Table 8) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} (ระดับกลาง) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 5.35 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 131.25% (table 9) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} (ระดับต่ำ) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 4.90 Log_{10}CFU (Table 10) มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 168.52% ทั้งนี้ปริมาณเชื้อในระยะแรกที่เพิ่มมากขึ้นหลังจากที่นำหัวเชื้อแบบเหลวผสมกับวัสดุพา (carrier) อาจเนื่องจากพื้นที่ในการเจริญเติบโต ปริมาณออกซิเจน และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดไปกับหัวเชื้อแบบเหลว สอดคล้องกับการศึกษาของ Abd El-Fattah (2013) ที่รายงานว่าการใช้ดินเหนียว พีทมอส แกลบ รำข้าวสาลี และพีทมอสผสมเวอร์มิคูไลท์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์จากเชื้อ *Azotobacter chroococcum* ทำให้ปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นในระยะแรก และจะลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 1-2 เดือน นอกจากนี้ กัลยกรและคณะ (2556) รายงานว่าการใช้วัสดุพาที่นึ่งฆ่าในการผลิตปุ๋ยชีวภาพทำให้ปริมาณจุลินทรีย์มีค่าสูงกว่าการใช้วัสดุพาที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ

2.3 การประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection: LOD) และการประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถรายงานผลได้ (Limit of Quantization: LOQ)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Azospirillum brasilense* ต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) ด้วยวิธีทดสอบปริมาณในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.68 Log_{10}MPN มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 103.65 ส่วนจำนวน *A. brasilense* ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่สามารถตรวจได้ในระดับต่ำที่สุด แต่ยังไม่ถือว่ามีความถูกต้อง (Critical Level: LC) อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-7} หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.58 Log_{10}MPN มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 193.09 เนื่องจากมีค่า %Recovery เฉลี่ยเกิน 120 ดังนั้นจำนวน *A. brasilense* ต่ำที่สุดที่สามารถรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 4.68 Log_{10}MPN

จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) ด้วยวิธีทดสอบปริมาณในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.36 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 118.55 ส่วนจำนวน *A. vinelandii* ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่สามารถตรวจได้ในระดับต่ำที่สุด แต่ยังไม่

ถือว่ามีความถูกต้อง (Critical Level: LC) อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.90 Log_{10}CFU เนื่องจากมีค่า %Recovery เฉลี่ยเกิน 120 ดังนั้นจำนวน *A. vinelandii* ต่ำที่สุดที่สามารถรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 6.36 Log_{10}CFU

2.4 การหาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ (Uncertainty) ทางจุลชีววิทยา

การทดสอบตัวอย่างเชื้อ *Azospirillum brasilense* ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 21 ตัวอย่าง (n = 21) ตัวอย่างละ 2 ชุด ให้เจ้าหน้าวิเคราะห์ 2 ค่าผลต่างของผลการทดสอบจากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์แต่ละคนในรูป Log_{10}CFU ยกกำลังสอง $\sum_{i=1}^{n}(Yj1 - Yj2)^2$ เท่ากับ 3.73 ทำให้ได้ค่า Standard deviation of reproducibility (S_R) เท่ากับ 0.298 เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Expanded Uncertainty) จะได้ค่าเท่ากับ 0.599 ขณะที่การทดสอบเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ค่าผลต่างของผลการทดสอบจากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์แต่ละคนในรูป Log_{10}CFU ยกกำลังสอง $\sum_{i=1}^{n}(Yj1 - Yj2)^2$ เท่ากับ 1.82 ทำให้ได้ค่า S_R เท่ากับ 0.208 เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบได้ค่าเท่ากับ 0.421

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophilic สกุล *Azospirillum* สูงสุด 3 อันดับแรก คือ AP1, DASF04175 และ DASF04178 ส่วนจุลินทรีย์กลุ่ม aerophillic สกุล *Azotobacter* สูงสุด 3 อันดับแรก คือ DASF04141, AT4 และ DASF04127

2. วิธีการนี้สามารถนำไปวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ได้อย่างเหมาะสม โดยค่าความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมีค่า CV ของเชื้อ *Azospirillum brasilense* เท่ากับ 2.79% ความแม่นของวิธีได้ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-4} มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 98.39% และ 103.65% ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOD) และค่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดเชิงปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 4.68 และ 1.58 Log_{10}MPN ตามลำดับ และการทดสอบความเที่ยงแบบ between-analyst variation โดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า *P* เท่ากับ 0.39 โดยค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบเท่ากับ 0.599 และเชื้อ *Azotobacter vinelandii* การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำมี CV เท่ากับ 5.61 เปอร์เซ็นต์ ค่า %Recovery ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 118.55% มีค่า LOD และค่า LOQ เท่ากับ 6.36 และ 4.90 Log_{10}MPN ตามลำดับ และการทดสอบความเที่ยงแบบ between-analyst variation มีค่า *P* เท่ากับ 0.87 โดยค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบเท่ากับ 0.421

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ *Azospirillum brasilense* (DASF04003) และ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) ที่สามารถใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในการรับรองการขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ตาม พรบ. ปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 นอกจากนี้ยังเป็นการเตรียมข้อมูลเพื่อขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพ. 45 หน้า.

กัลยกร โปร่งจันทึก ภัชญภณ หมื่นแจ้ง ประไพ ทองระอา จินดารัตน์ ชื่นรุ่ง และพีรพงษ์ เชาวนพงษ์. 2556. การคัดเลือกวัสดุพาที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ. หน้า 192-199. *ใน: รายงานผลการปฏิบัติงานสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ประจำปี* 2556.

อรุณี คงสอน. 2556. รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาการสรางฮอรโมนออกซิน และการตรึงไนโตรเจนโดยเชื้ออะโซโตแบคเตอร. 33 หน้า.

อาภากร หล่องทองหลาง. 2553. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ในการปลูกข้าวระบบประณีต. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 79 หน้า.

Abd El-Fattah, D.A. W.E Eweda, M.S Zayed and M.K. Hassanein. 2013. Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. Annals of Agricultural Sciences 58(2): 111–118.

Boddey, R.M. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contribution and prospects for improvement. Plant Soil. 174: 195-209.

Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can J Microbiol 41:109-117.

Gray E.J. and D.L. Smith 2005. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. Soil Biol Biochem 37:395-412.

Hardy, R.W.F.; R.C. Burns and R.D. Holsten. 1973. Application of the Acetylene–ethylene Assay for Measurement of Nitrogen Fixation. Soil Biol. Biochem. 5: 47-81.

Hartmann, A. and Zimmer, W. 1994. Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum*/Plant Associations (Okon, Y., Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. USA. 15–39 pp.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. 787 p.

Jacoud, C. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CTR1 during maize seed germination. Canadian Journal of Microbiology. 45: 339-342.

Jensen, H. L. 1954. The Azotobacteriaceae. Bacteriol. Rev. 18(4): 195–214.

Khammas, K.M., E. Ageron, P.A.D. Grimont, and P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140, 679–693.

Magalhães, F.M., J.I. Baldani, S.M. Souto, J.R. Kuykendall, J. Döbereiner. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Bras. Cienc. 55: 417–429.

Meunchang, S., S. Panichsakpatana, S. Ando, T. Yokayama. 2004. Phylogenetic and Physiological characterization of indigenous *Azospirillum* isolates in Thailand. Journal of the Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition 50(3): 413-421.

Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans and J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar Grass (Leptochloa fusca (L.) Kunth). Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 43–51.

Tarrand, J.J., N.R.Krieg and J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967–980.

Then, C., Z. Othman, W.A.W. Mustapha, M.R. Sarmidi , R. Aziz, H. A. El Enshasy. 2012. Production of Alginate by *Azotobacter vinelandii* in semi-industrial scale using batch and fed-batch cultivation systems. J. Adv. Sci. Res., 3(4): 45-50.

Wani, S.A., S. Chand, M.A. Wani, M. Ramzan and K.R. Hakeem. 2016. *Azotobacter chroococcum* – A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview. Soil Science: Agricultural and Environmental Prospectives, DOI 10.1007/978-3-319-34451-5_15.

Table 1 Nitrogen fixation efficiency of micro aerobic and aerobic bacteria

No.	Strain*	Nitrogen fixing rate** (nanomole ethylene/hour/tube)
1	DASF04003	65.0
2	DASF04005	60.90
3	DASF04008	23.89
4	PGPR16/63	41.22
5	AP1	90.30
6	DASF04175	68.89
7	DASF04176	55.67
8	DASF04177	43.11
9	DASF04178	65.23
10	PGPR189/62	36.10
11	DASF04141	30.0
12	DASF04126	3.65
13	DASF04127	8.73
14	AT1	7.95
15	AT2	5.78
16	AT4	9.14
17	AT9	5.86
18	AT10	6.02
19	AT32	7.53
20	AT38	7.78

* DASF04003, DASF04005, DASF04008 and DASF04141 are used as PGPR biofertilizer inoculants

** Mean of three replications of each strain

Table 2 Precision of bacterial quantitative in PGPR biofertilizer

No.	Micro aerobic bacteria (Log_{10}CFU/g)	Aerobic bacteria (Log_{10}CFU/g)
1	8.54	4.78
2	8.54	4.67
3	8.96	4.29
$\bar{x}$	8.68	4.58
%CV	2.79	5.61

* Mean of three replications of each strain

Table 3 Precision of micro aerobic bacterial number in PGPR biofertilizer by between-analyst variation method

	Number micro aerobic bacteria CFU (Log_{10}CFU/g)	
	Analyst 1	Analyst 2
Mean	8.37	7.66
%CV	7.10	7.06
t-test* (Sig. 2-tailed)	0.39	

* According to Student's t-test of mean at 95% confidence level (P = 0.05)

Table 4 Precision of aerobic bacterial number in PGPR biofertilizer by between-analyst variation method

	Number aerobic bacteria (Log_{10}CFU/g)	
	Analyst 1	Analyst 2
Mean	4.52	4.53
%CV	6.72	7.75
t-test* (Sig. 2-tailed)	0.87	

* According to Student's t-test of mean at 95% confidence level (P = 0.05)

Table 5 The accuracy test of micro aerophillic bacteria in PGPR biofertilizer at high concentration (10^{-1} dilution)

No.	MPN method (Log_{10}CFU/g)	Drop plate method (Log_{10}CFU/g)	%Recovery
1	7.73		102.79
2	7.34		97.61
3	7.45	7.52	99.10
4	7.11		94.55
5	7.38		98.14
6	7.38		98.14
Mean	**7.40**		**98.39**

Table 6 The accuracy test of micro aerophillic bacteria in PGPR biofertilizer at medium concentration (10^{-4} dilution)

No.	MPN method (Log_{10}CFU/g)	Drop plate method (Log_{10}CFU/g)	%Recovery
1	4.86	4.52	107.52
2	4.52		100
3	4.90		108.41
4	4.90		108.41
5	4.52		100
6	4.41		97.57
Mean	**4.68**		**103.65**

Table 7 The accuracy test of micro aerophillic bacteria in PGPR biofertilizer at low concentration (10^{-7} dilution)

No.	MPN (Log_{10}MPN)	Drop plate (Log_{10}CFU)	%Recovery
1	1.65	0.82	201.22
2	1.65		202.22
3	1.60		195.12
4	1.65		201.22
5	1.30		158.54
6	1.65		201.22
Mean	**1.58**		**193.09**

Table 8 The accuracy test of aerophillic bacteria in PGPR biofertilizer at high concentration (10^{-1} dilution) by using plate count method

No.	Powder biofertilizer (Log_{10}CFU)	Liquid biofertilizer (Log_{10}CFU)	%Recovery
1	6.31	5.37	117.58
2	6.42		119.54
3	6.44		120.02
4	6.42		119.54
5	6.40		119.28
6	6.19		115.34
Mean	**6.36**		**118.55**

Table 9 The accuracy test of aerophillic bacteria in PGPR biofertilizer at medium concentration (10^{-2} dilution) by using plate count method

No.	Powder biofertilizer ($Log_{10}CFU$)	Liquid biofertilizer ($Log_{10}CFU$)	%Recovery
1	5.30		130.14
2	5.26		129.14
3	5.40		132.58
4	5.12	4.07	127.37
5	5.50		135.08
6	5.42		133.19
Mean	**5.35**		**131.25**

Table 10 The accuracy test of aerophillic bacteria in PGPR biofertilizer at low concentration (10^{-3} dilution) by using plate count method

No.	Powder biofertilizer ($Log_{10}CFU$)	Liquid biofertilizer ($Log_{10}CFU$)	%Recovery
1	4.90		168.79
2	4.89		168.38
3	4.85		166.93
4	4.94	2.91	170.06
5	4.89		168.34
6	4.90		168.62
Mean	**4.90**		**168.52**