



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายฟอสเฟตจากราก

พืชของข้าวหอมมะลิแดง

**Isolation of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the
Rhizosphere of
Red Brown Rice**

โดย

ภัทชนาวรรณ จันทรัตน์โยธิน

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2557

รหัสโครงการวิจัย มจ.1-56-079



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายฟอสเฟตจากรากพืชของ
ข้าวหอมมะลิแดง

**Isolation of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of
Red Brown Rice**

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2556
จำนวน 117,786 บาท

หัวหน้าโครงการ นางภัทชนาวรรณ จันทร์รัตนโยธิน

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

26 กันยายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายฟอสเฟตจากรากพืชของข้าวหอมมะลิแดง (Isolation of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of Red Brown Rice) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2556

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์และสถานที่ทำวิจัย จนกระทั่งงานสำเร็จลุล่วงได้ดี

ขอขอบคุณอาจารย์สุจิต โนคำ และนายพิรุณ คุ่มไม้ เจ้าของแปลงนาข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์ ที่อนุญาตให้ข้าพเจ้าและคณะเก็บตัวอย่างข้าวเพื่อนำมาคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ในโครงการนี้

ขอขอบคุณนายพัฒน์ โกจิณอก นักวิทยาศาสตร์ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์นางสาวสุภาวีย์ ศรีคำ นางสาวภาณุภา มาเต และนางสาวเบญจมาศ ฝัจิต นักศึกษาภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร ในการเก็บตัวอย่างดิน

นางภัทชนาวรรณ จันทรัตน์โยธิน

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ก
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	16
ผลการวิจัย	24
วิจารณ์ผลการวิจัย	31
สรุปผลการวิจัย	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	39

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ และชนิดของเชื้อที่สามารถ ละลายฟอสเฟต	12
ตารางที่ 2 ชนิดของกรดอินทรีย์ที่พบในส่วนใสหลังการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว	14
ตารางที่ 3 คุณสมบัติพื้นฐานของดินตัวอย่างที่นำมาคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์	24
ตารางที่ 4 แหล่งที่มา ชนิดของตัวอย่าง และจำนวนจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง	26
ตารางที่ 5 ค่า Halo:Colony ratio ของแบคทีเรียย่อยสลายฟอสเฟต	27
ตารางที่ 6 ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายอยู่ในส่วนใสของอาหารเหลว PVK ภายหลังการ เลี้ยงเชือนาน 3 วัน และ 7 วัน	29

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 วัฏจักรของฟอสฟอรัสในระบบเกษตรกรรมและดิน	8
ภาพที่ 2 การเก็บตัวอย่างดินในแปลงนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสันทราย และอำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่	25
ภาพที่ 3 ตัวอย่างดินในแปลงนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสันทราย และอำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่	26
ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีและบริเวณใสของการละลายฟอสเฟตของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจากดิน	28

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายฟอสเฟตจากรากพืชของ

ข้าวหอมมะลิแดง

Isolation of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of

Red Brown Rice

ภัทธนาวรรณ ฉันทรัตนโยธิน

Phatthanawan Chanrattanayothin

สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งที่เดิมแหล่งฟอสเฟตละลายยากสูตร Pikovskaya's medium (PVK) พบแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ จากจำนวนเชื้อทั้งหมด 106 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูตร PVK หลังการเลี้ยงเชือนาน 3 และ 7 วัน และวิเคราะห์ฟอสเฟตที่ละลายได้ พบว่าแบคทีเรีย PSB03 สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวได้ปริมาณสูงสุดระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน เท่ากับ 102.11 และ 191.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ค่า pH และการละลายฟอสเฟตของเชื้อที่คัดแยกได้ ในอาหารเหลวสูตร PVK พบว่าการละลายฟอสเฟตเกิดขึ้นสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อและประสิทธิภาพของเชื้อในการสร้างกรดระหว่างการเจริญทำให้การละลายฟอสเฟตเพิ่มมากขึ้น

คำสำคัญ: การคัดแยก, ฟอสเฟต, จุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต, ไโรซิสเฟียร์, ข้าวหอมมะลิแดง

Abstract

The ability of phosphate solubilization of bacteria was screened on Pikovskaya's medium 12 of 106 isolates of bacteria from rhizosphere soil of rice were able to solubilize phosphate on agar plates. Comparison of the efficiency of phosphate solubilization by the 12 strains were studied in PVK broth by analyzing soluble phosphate after 3 and 7 days incubation. The highest yield of soluble phosphate were obtained from isolate PSB03 with 102.11 and 191.02 mg P L⁻¹.

The relationship among bacteria growth, pH and phosphate solubilization of isolated microbe were also study in PVK broth. Phosphate solubilization was shown to be relative with bacterial growth and even getting higher when it reached the stationary phase within 7 days. The results indicated that the solubility of phosphate is increased as the acid is increased.

Key word: Isolation, Phosphate, Phosphate solubilizing bacteria (PSB), Rhizosphere soil, Red Brown Rice

บทที่ 1

คำนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช (Richadrdson, 1994) โดยฟอสฟอรัสจะทำให้พืชมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแป้ง กระบวนการถ่ายทอดพันธุกรรม การตรึงไนโตรเจน การออกดอก การออกผลและเมล็ด และการสุกของผล (Brady and Weil, 2008; Mehrvarz *et al.*, 2008) พืชที่ขาดธาตุฟอสฟอรัสจะทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ลำต้นแคระแกร็น ผอม สูง ใบมีขนาดเล็กลง จำนวนใบลดลง และเป็นสีเขียวเข้มออกน้ำเงิน (Brady and Weil, 2008) ดินในประเทศไทยโดยภาพรวมพบว่ามีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ (Chinabut, 2003) การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสจึงเป็นสิ่งจำเป็น การขาดธาตุฟอสฟอรัสในดินเป็นปัจจัยทางด้านเคมีที่สำคัญในการกำหนดผลผลิต การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายได้ (soluble phosphate fertilizer) เช่น ซุปเปอร์ฟอสเฟต เป็นการทดแทนปริมาณฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในดินน้อยในดิน แต่อย่างไรก็ตามปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายได้ที่ใส่ลงไปในดินจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับไอออนในดิน และมีการเปลี่ยนแปลงจากฟอสฟอรัสในรูปที่ละลายได้ไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Stevenson, 1986; McLaughlin *et al.*, 1988) พื้นที่ทำการเกษตรส่วนใหญ่มีฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงในดินเป็นจำนวนมากซึ่งมาจากการสะสมอย่างต่อเนื่องของการใช้ปุ๋ยเคมี โดยส่วนมากฟอสเฟตที่ละลายได้ที่ใส่ลงไปในดิน จะถูกตรึงให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ และไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช ซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากการใส่ปุ๋ยเคมี (Dey, 1988; Yadav and Dadarwal, 1997) ดังนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่จึงเพิ่มปริมาณการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในแปลงที่ใช้เพาะปลูกเป็นเท่าตัวเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีขึ้นทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของฟอสเฟตอยู่ในดินเป็นจำนวนมาก

จุลินทรีย์ดินมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารต่างๆ ในดิน รวมถึงสามารถเปลี่ยนแปลงฟอสเฟตในรูปที่ไม่สามารถละลายได้ในดินให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้และพืชดึงไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต อีกทั้งจุลินทรีย์ดินเองก็เป็นแหล่งของฟอสเฟตอินทรีย์ ซึ่งมีศักยภาพที่จะปลดปล่อยให้แก่พืชเมื่อตายและถูกย่อยสลาย จุลินทรีย์มีกลไกในการปลดปล่อยฟอสฟอรัสให้เป็นประโยชน์กับพืชแตกต่างกันออกไป (Salehrastin, 1999) นอกจากนี้จุลินทรีย์ดินยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของรากพืชในการดูดซับฟอสเฟต โดยเราเรียกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตนี้ว่า Phosphate solubilizing bacteria (PSB) โดยแบคทีเรียชนิดนี้ถือเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้ในการย่อยสลายฟอสเฟตในดินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืช (deFreitas *et al.*, 1997; Rodríguez and Fraga, 1999)

ในดินส่วนใหญ่ที่ขาดฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช จะส่งผลต่อต้นทุนการผลิตที่สูงมาก เนื่องจากการใช้ปุ๋ยฟอสเฟตซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นทั่วโลก นอกจากนั้นปัจจัยที่สำคัญของการทำเกษตรกรรมแบบยั่งยืนคือการลดการใช้สารเคมีในแปลงเพาะปลูก และเน้นการใช้ปุ๋ยชีวภาพเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างดินและเพิ่มอินทรีย์วัตถุในดิน การนำจุลินทรีย์ดินมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์นั้นจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษา ถึงแม้ว่าที่ผ่านมา มีการคัดแยกและศึกษาจุลินทรีย์ดินที่มีความสามารถในการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์มากมาย แต่การนำไปใช้ยังอยู่ในวงจำกัดเนื่องจากไม่เข้าใจถึงปัจจัยของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ นอกจากนั้นยังไม่มีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายฟอสเฟตจากรากของข้าวหอมมะลิแดง ดังนั้นในการศึกษครั้งนี้จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์เพื่อนำไปใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยา

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟตสายพันธุ์ที่มีความโดดเด่นและสามารถนำไปใช้ต่อยอดในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม
3. เพื่อเป็นแนวทางในการนำเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายฟอสเฟตในดินหรือแปลงนาข้าวเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟอสเฟต
2. เป็นการสร้างแนวทางการใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติอย่างรู้คุณค่าเพื่อการเกษตร
3. ลดปริมาณการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในดิน และนำไปใช้ในการปลูกพืชแบบอินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช
4. สามารถนำจุลินทรีย์ที่ได้ไปผลิตในเชิงพาณิชย์

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

จุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในดินมีหลายประเภท เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส เชื้อรา โปรโตซัว สาหร่าย และไวรัส จุลินทรีย์เหล่านี้มีความสำคัญในวัฏจักรธาตุต่างๆ เช่น วัฏจักรคาร์บอน วัฏจักรไนโตรเจน และช่วยในการยึดเกาะกันของอนุภาคดิน นอกจากนี้บริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) เป็นอีกบริเวณหนึ่งที่พบจุลินทรีย์หลากหลายชนิดเข้ามาอาศัยอยู่เป็นจำนวนมากเนื่องจากกิจกรรมของพืชที่บริเวณรากมีการปลดปล่อยสารออกมา เรียกว่า root exudates ที่เป็นตัวกำหนดขนาดของอาณาบริเวณรอบรากพืช สารดังกล่าวจะเคลื่อนกระจายออกไปได้กว้างไกลเพียงใดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของดิน ความชื้นในดิน ปฏิริยาของดิน อุณหภูมิ อายุของพืช และสภาพการเจริญเติบโตของพืช สารเหล่านี้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Barea *et al.*, 2005) โดยสารที่รากพืชปลดปล่อยออกมาสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ น้ำตาล ฟีนอลิก สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ และกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ เมือกซึ่งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ และ โปรตีน (Uren, 2000; Bertin *et al.*, 2003)

ความสำคัญของฟอสฟอรัส

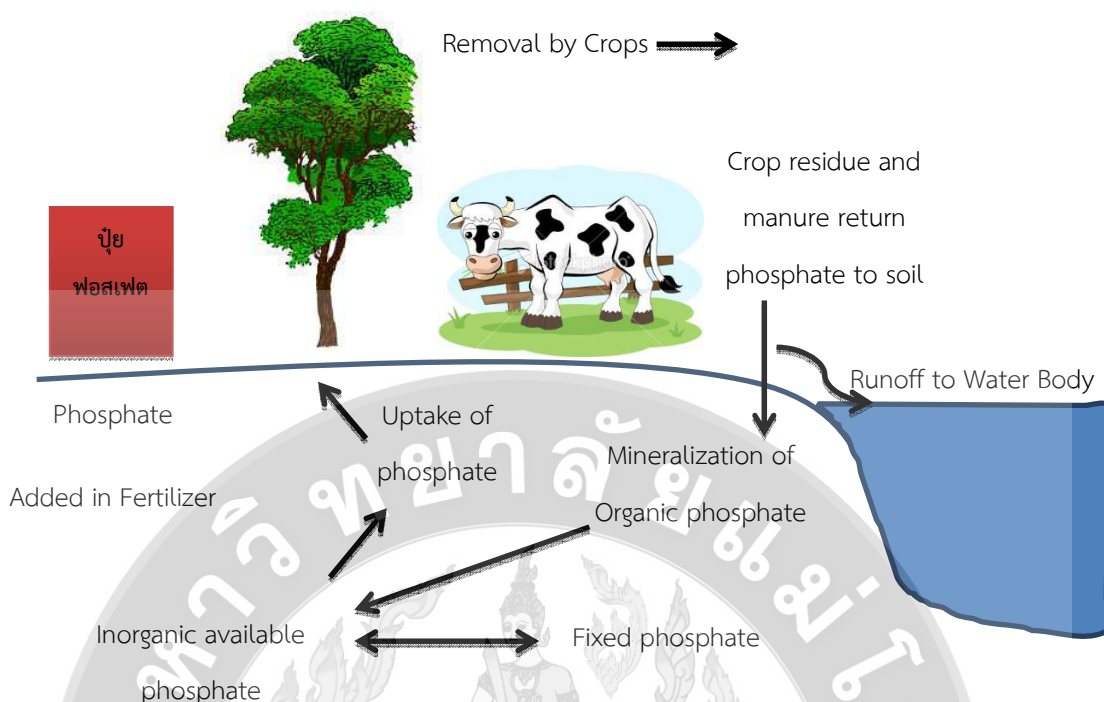
ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืชที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของพืช ทั้งส่วนที่อยู่เหนือดินและราก (คณาจารย์ภาควิชาปฐพี, 2548) เนื่องจากฟอสฟอรัสมีบทบาทสำคัญในการสะสมและถ่ายทอดพลังงานของเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกชนิด และเป็นองค์ประกอบของเซลล์ พืชที่ขาดแคลนธาตุฟอสฟอรัสไม่ว่าระยะใดของวงจรชีวิตจะแสดงความผิดปกติ เจริญเติบโตช้า ลำต้นแคระแกร็น การติดดอกติดผลต่ำ คุณภาพของเมล็ดลดลงต่ำลง (Brady and Weil, 2002; Tisdale *et al.*, 1985) ฟอสฟอรัสเกือบทั้งหมดที่พบในพืชมาจากดิน แต่พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสในดินที่อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์สำหรับพืชมีอยู่น้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณทั้งหมดในดิน เนื่องจากฟอสฟอรัสในดินมีความสามารถในการเคลื่อนที่ต่ำ ถูกตรึงและตกตะกอนปฏิกิริยาเคมีได้ง่าย ปลดปล่อยออกมาได้ยาก

ฟอสฟอรัสในดิน

ฟอสฟอรัสมีเลขอะตอม 15 เป็นธาตุที่ 2 ของหมู่ VA ในตารางธาตุ จัดเป็นธาตุโลหะสามัญ เป็นของแข็ง ๓ อุณหภูมิห้อง ไม่พบในรูปอิสระในธรรมชาติ แต่อยู่ในรูปของสารละลายฟอสเฟต (ชัยวัฒน์, 2525) โดยทั่วไปแล้วจะไม่มีฟอสฟอรัสในรูปอิสระแต่จะอยู่ในรูปของสารประกอบ ซึ่งมักจะเป็นสารประกอบฟอสเฟต ได้แก่ อนินทรีย์ฟอสเฟตหรืออินทรีย์ฟอสเฟตในดิน (ถวิล, 2519) และฟอสฟอรัสจะถูกตรึงโดยอนุภาคดินเหนียวร่วมกับธาตุอื่น เช่น เหล็ก อะลูมิเนียม แคลเซียม และแมกนีเซียม เป็นสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟต ซึ่งละลายน้ำได้น้อยมาก ส่วนที่ละลายน้ำได้จะเป็นประโยชน์ต่อพืชและจุลินทรีย์ในดิน ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการมากตัวหนึ่ง โดยฟอสฟอรัสที่พบในพืชเกือบทั้งหมดได้มาจากดิน ฟอสฟอรัสในพืชและในดินเป็นพวกออร์โธฟอสเฟต เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของฟอสฟอรัสกับธาตุอาหารหลักอื่นๆ ในดิน จะพบว่าปริมาณกว่าในโตรเจนและโพแทสเซียม โดยจะพบฟอสฟอรัสเฉลี่ยในดินเท่ากับ 0.06 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ดินชั้นบนของดินนาในประเทศไทยจะมีฟอสฟอรัสเฉลี่ย 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของฟอสฟอรัสในดินจะมีความแตกต่างกันไปตามวัตถุดินกำเนิดของดิน เช่น ดินเนื้อละเอียดจะมีปริมาณของฟอสฟอรัสมากกว่าดินเนื้อหยาบ ดินที่ถูกใช้มานานหรือถูกชะล้างมากกว่าจะมีปริมาณของฟอสฟอรัสเหลือน้อยกว่าดินที่เปิดป่าใหม่ และปริมาณของฟอสฟอรัสชั้นบนมักจะน้อยกว่าชั้นล่างเนื่องจากการชะล้างมากกว่า (สมศักดิ์, 2528) ฟอสฟอรัสจะมีการแปรสภาพในดินโดยอิทธิพลของจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งและอีกส่วนหนึ่งอาจทำปฏิกิริยาเคมีโดยตรง การเปลี่ยนแปลงของฟอสฟอรัสในดินโดยการทำงานของจุลินทรีย์มีหลายประการด้วยกันคือ การละลาย การแปรสภาพจากอินทรีย์ฟอสฟอรัสเป็นอนินทรีย์ฟอสฟอรัส การเปลี่ยนอนินทรีย์ฟอสฟอรัสเป็นฟอสฟอรัสในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และการเพิ่มและลดออกซิเจนแก่อินทรีย์ฟอสฟอรัสในวงจรหรือวัฏจักรของฟอสฟอรัส

วงจรฟอสฟอรัส

วัฏจักรของฟอสฟอรัสในระบบเกษตรกรรมและดินแสดงดังภาพที่ 1 พืชดูดซับฟอสเฟตจากดิน ฟอสฟอรัสถูกนำออกจากแปลงเกษตรเมื่อพืชถูกเก็บเกี่ยวไปจากพื้นที่การเกษตรหรือจากการกินของสัตว์ ฟอสเฟตกลับมาสู่ดินผ่านมูลสัตว์และเศษพืชที่เหลือจากการเก็บเกี่ยว จุลินทรีย์ในดินก็จะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์และฟอสเฟตก็ถูกปลดปล่อยอย่างช้าให้รากพืชดูดซับอีกครั้งหนึ่ง แต่ฟอสเฟตส่วนใหญ่ก็ถูกเปลี่ยนรูปไปในลักษณะที่ไม่สามารถถูกดูดซับด้วยพืชได้ และค่อยๆ แปลงกลับไปสู่รูปแบบที่พืชดูดซับได้เพียงปีละเล็กน้อย (Busman *et al.*, 2002)



ภาพที่ 1 วัฏจักรของฟอสฟอรัสในระบบเกษตรกรรมและดิน (Busman *et al.*, 2002)

วัฏจักรการหมุนเวียนฟอสฟอรัสตามธรรมชาติไม่เพียงพอสำหรับการเพาะปลูกในปริมาณมากๆ แบบปัจจุบัน ดังนั้นปุ๋ยเคมีจึงเป็นแหล่งฟอสฟอรัสที่สำคัญในปัจจุบัน (Johnston and Steen, 2000) แต่เนื่องจากในปุ๋ยเคมีที่ใส่เข้าไปในดินมีเพียงส่วนเดียวเท่านั้นซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ได้ ในขณะที่ฟอสเฟตส่วนใหญ่ก็ถูกเปลี่ยนรูปไปในลักษณะที่ไม่สามารถถูกดูดซับด้วยพืชได้ และค่อยๆ แปลงกลับไปสู่รูปแบบที่พืชดูดซับได้เพียงปีละเล็กน้อย (Price, 2006) ดังนั้นเกษตรกรจึงใส่ปุ๋ยในปริมาณมากกว่าหนึ่งเท่าของพืชที่ต้องการเพื่อเร่งให้พืชดูดซับฟอสเฟตไปใช้มากๆ ส่งผลให้มีฟอสฟอรัสส่วนใหญ่วัสดุเหลือจากแปลงเกษตรไปสู่น้ำผิวดิน ก่อให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน (Eutrophication)

เชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Microorganisms; PSMs)

เชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Microorganisms; PSMs) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราที่มีความสามารถในการละลายแร่ธาตุฟอสฟอรัสในรูปสารประกอบอนินทรีย์ที่ถูกตรึงในดินให้ละลายอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (อาภารัตน์, 2549) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช และเพิ่มธาตุฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน

เชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (มุกดา, 2547) ดังนี้

1. กลุ่มจุลินทรีย์ที่ช่วยดูดซับธาตุฟอสฟอรัสให้กับพืช ได้แก่ เชื้อราไมคอร์ไรซา เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ส่วนของเส้นใยเชื้อราจะซ่อนไขเข้าไปในดิน ช่วยดูดธาตุอาหาร โดยเฉพาะธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณที่เพียงพอ นอกจากนี้ไมคอร์ไรซายังช่วยป้องกันไม่ให้ฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาถูกตรึงโดยปฏิกิริยาทางเคมีของดิน แต่เชื้อราไมคอร์ไรซามีข้อจำกัดที่ต้องอยู่กับพืชอาศัยที่มีความจำเพาะเจาะจง จึงยังไม่สามารถเลี้ยงและเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ การผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อจำเป็นต้องเพาะเชื้อในพืชอาศัยและวัสดุปลูกที่เหมาะสมเท่านั้น

2. จุลินทรีย์ย่อยสลายหินฟอสเฟต เป็นแบคทีเรียที่สามารถทำให้หินฟอสเฟตละลายเป็นประโยชน์ต่อพืช มีอยู่หลายชนิด กิจกรรมของจุลินทรีย์พวกนี้จะช่วยย่อยละลายหินฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น *Bacillus*, *Thiobacillus* และ *Pseudomonas* โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างกรดออกมาละลายฟอสฟอรัส ปริมาณที่ละลายออกมากจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงกว่าแบคทีเรียในกลุ่มอื่นในการนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งแวดล้อมเนื่องจากการสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งจะทำให้มีความทนต่อสภาพแวดล้อมสูงกว่าเซลล์ปกติ

จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในธรรมชาติพบว่ามีรายงานการแยกเชื้อจากดินและบริเวณรอบรากพืช ดังแสดงในตารางที่ และแสดงให้เห็นว่ามีทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซิส แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้มีหลายชนิด ส่วนเชื้อราที่พบส่วนใหญ่เป็นพวก *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยเชื้อที่แยกได้จากบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตสูงกว่าเชื้อที่แยกจาก non-rhizosphere โดยแบคทีเรีย *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการละลายฟอสเฟต (Tilak et al., 2005)

การแยกและคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟต

การแยกและคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตและการหาปริมาณการละลายของฟอสเฟตของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตนิยมใช้ฟอสเฟตรูปละลายยาก (insoluble inorganic phosphate) เป็นแหล่งฟอสเฟต เช่น ไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) หินฟอสเฟต หรือ อะพาไทต์ เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Pikovskaya's medium โดยวิธี plate screening method สังเกตการณ์สร้างบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ และศึกษาการละลายและหาปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ในอาหารเหลว (liquid culture)

จากรายงานการแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง พบว่า แบคทีเรียที่แยกจากดินบริเวณรากพืช (Rhizosphere) ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียที่แยกจากดินประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จะสูญเสียความสามารถในการละลายฟอสเฟตในรูปอะพาไทต์เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟอสเฟตในครั้งต่อไป และหลังจากถ่ายเชื้อผ่านไปจำนวน 6 ครั้ง คงเหลือแบคทีเรียที่แสดงการละลายฟอสเฟตได้อีกเพียงเล็กน้อย (Sperber, 1958a) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kucey (1983) ที่พบว่า แบคทีเรียย่อยสลายฟอสเฟตที่แยกได้จากดินมีแนวโน้มในการสูญเสียคุณสมบัติการย่อยสลายฟอสเฟตเช่นกัน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟอสเฟตในเชื้อรา

วิธีการแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่กล่าวมาก่อนข้างใช้เวลาในการบ่มเลี้ยงเชื้อนาน ต่อมาจึงได้มีผู้ที่พยายามปรับปรุงสูตรอาหารเพื่อให้สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดย Gupta *et al.* (1994) ได้ปรับปรุงสูตรอาหาร Pikovskaya agar medium โดยเติม bromophenol blue เพื่อเป็นดัชนีบ่งชี้การเกิดกรด ในช่วง pH 3.0-4.6 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสังเกตการณ์สร้างบริเวณใสสีเหลืองรอบโคโลนีของเชื้อ เนื่องจากการละลายฟอสเฟตและการเปลี่ยนสีของ indicator เกิดจากการลดลงของค่า pH เมื่อเชื้อสร้างกรด และสรุปว่าวิธีนี้ให้ผลดีกว่าการสังเกตบริเวณใสในอาหาร Pikovskaya medium แบบเดิม

Nautiyal (1999) ได้ปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (NBRIP) เพื่อการแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟตในดิน จากการศึกษาพบว่าอาหารเหลวสูตรปรับปรุงนี้มีประสิทธิภาพในการแยกจุลินทรีย์สูงกว่าการแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟตด้วยอาหารเหลว Pikovskaya's medium ถึง 3 เท่า แต่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ใน

อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตรด้วยวิธี plate assay พบว่าให้ผลการคัดแยกเชื้อไม่แตกต่างกัน ต่อมา Mehta and Nautiyal (2001) ได้ปรับปรุงสูตรอาหาร NBRIP โดยเติม bromophenol blue เพื่อความรวดเร็วในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้

Rodriguez and Fraga (1999) กล่าวถึงข้อเสียของการหาปริมาณฟอสเฟตใน culture filtrate ที่ใช้ฟอสเฟตในรูปละลายยากเป็นแหล่งฟอสเฟตว่า วิธีการนี้ไม่ได้คำนึงถึงปริมาณฟอสเฟตที่เซลล์นำไปใช้ประโยชน์ระหว่างการเจริญเติบโต และความแตกต่างระหว่างอัตราการปลดปล่อยกับการนำเข้าสู่เซลล์ อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการละลายของฟอสเฟตและปริมาณฟอสเฟตที่ตรวจวิเคราะห์ได้ เนื่องจากช่วงที่เซลล์มีอัตราการนำฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ ปริมาณฟอสเฟตในอาหารจะลดลงและเมื่ออัตราการนำฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ลดลง เช่น ระยะที่เซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase ระดับของฟอสเฟตในอาหารจะเพิ่มขึ้น



ตารางที่ 1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ และชนิดของเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟต

แหล่งคัดแยก	จุลินทรีย์	อ้างอิง
บริเวณรอบรากพืช และดิน	<i>Arthrobacter</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Sarcina</i> และ <i>Serratia</i>	Sperber (1958)
หินฟอสเฟต และดิน	<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus carbonum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. wentii</i>	Gaur et al. (1973)
ดิน	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>B. firmus</i> (B7650 และ B7651), <i>Micrococcus</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. candidus</i> , <i>A. fumigatus</i> และ <i>Penicillium</i> sp.	Banik and Dey (1982)
ดิน	<i>Pseudomonas</i> sp. และ <i>Penicillium</i> sp.	Illmer and Schinner (1992)
บริเวณรอบราก	<i>B. brevis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. thuringiensis</i> และ <i>Xanthomonas maltophila</i>	De Freitas et al. (1997)
บริเวณรอบราก	<i>Rahnella aquatilis</i>	Kim et al. (1997)
ดิน	<i>Bacillus</i> sp.	Pal (1998)
บริเวณรอบราก	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. atrophaeus</i> ,	Vazquez et al. (2000)
บริเวณรอบราก	<i>Enterobacter intermedium</i>	Hwangbo et al. (2003)
ดิน	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>A. ureafaciens</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Chryseobacterium</i> sp., <i>Delftia</i> sp., <i>Gordonia</i> sp., <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i>	Chen et al. (2006)

กลไกการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ดิน

กลไกการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเกิดจากการสร้างกรดและปลดปล่อยออกมาละลายฟอสเฟตในดิน ดังนี้

1. การสร้างกรดอินทรีย์ (Organic acids) กรดอินทรีย์ที่พบเสมอๆ ว่าจุลินทรีย์สามารถสร้างและปลดปล่อยออกมาได้แก่ กรดฟอร์มิก อะซิติก โพรปิโอนิก แลคติก ไกลโคลิก ฟุมาริกและซักซินิก เป็นต้น ส่วนมากจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) จะปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาจำนวนหนึ่งเสมอในระหว่างการย่อยสารอินทรีย์แต่มีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ (ธงชัย, 2546) Illmer and Schinner (1992) พบว่าระหว่างการละลายฟอสเฟตของเชื้อจุลินทรีย์ *Penicillium* sp. และ *Pseudomonas* sp. มีการปลดปล่อย กรดไกลโคลิก (glycolic acid) และ กรดกลูโคนิก (gluconic acid) ซึ่งเชื่อว่ากรดเหล่านี้มีส่วนในการละลายฟอสฟอรัสในดิน

2. การสร้างกรดอนินทรีย์ (Inorganic acids) จุลินทรีย์บางชนิดสร้างและปลดปล่อยกรดอนินทรีย์ออกมาได้แก่ กรดไนตริก และซัลฟูริก จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ *Nitrobacter* sp. และ *Thiobacillus* sp. ตามลำดับ กรดต่างๆ ที่เกิดขึ้นเหล่านี้ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างลดลง และเกิดการละลายของฟอสฟอรัสมากขึ้น กรดอินทรีย์บางชนิดอาจเกิดคีเลตกับแคลเซียมและเหล็ก ทำให้การละลายและการใช้ฟอสเฟตมากขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณการละลายฟอสเฟตจะแตกต่างกันตามความสามารถในการละลายของจุลินทรีย์แต่ละชนิด รวมทั้งลักษณะ และรูปของฟอสเฟต โดยทั่วไปเชื่อว่าจะมีความสามารถสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 2 ชนิดของกรดอินทรีย์ที่พบในส่วนในสหลังจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว

จุลินทรีย์	แหล่งฟอสเฟต	ชนิดกรดอินทรีย์	อ้างอิง
<i>Arthrobacter</i> sp.	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	citric, lactic, malonic และ oxalic	Banik and Dey (1982), Chen <i>et al.</i> (2006)
<i>A. ureafaciens</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	citric และ lactic	Chen <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus</i> sp.	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	citric, oxalic และ succinic	Banik and Dey (1982), Gupta <i>et al.</i> (1994)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	acetic, isobutyric, isovaleric, lactic และ succinic	Vazquez <i>et al.</i> (2000)
<i>B. atrophaeus</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	acetic, isobutyric, isovaleric, isocaproic, propionic, succinic และ valeric	Vazquez <i>et al.</i> (2000)
<i>B. firmus</i> B-7650	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2-ketogluconic และ succinic	Banik and Dey (1982)
<i>B. firmus</i> B-7651	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	oxalic และ succinic	Banik and Dey (1982),
<i>B. licheniformis</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	fumaric, isobutyric, lactic, oxalic, succinic และ valeric	Gupta <i>et al.</i> (1994), Vazquez <i>et al.</i> (2000)
<i>B. megaterium</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	citric, lactic และ propionic	Chen <i>et al.</i> (2006)
<i>B. polymyxa</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	oxalic	Gupta <i>et al.</i> (1994)
<i>Chryseobacterium</i> sp.	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	citric	Chen <i>et al.</i> (2006)
<i>Delftia</i> sp.	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	succinic	Chen <i>et al.</i> (2006)
<i>Escherichia freundii</i>	hydroxyapatite	lactic	Sperber (1958b)
<i>Gordonia</i> sp.	goethite	citric, formic, lactic, malic และ succinic	Hoberg <i>et al.</i> (2005)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	แหล่งฟอสเฟต	ชนิดกรดอินทรีย์	อ้างอิง
<i>Micrococcus</i> sp.	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	oxalic	Banik and Dey (1982)
<i>P. macerans</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	isobutyric, isovaleric, lactic และ succinic	Vazquez <i>et al.</i> (2000)
<i>P. myrsinacerum</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	gluconic	Chen <i>et al.</i> (2006)
<i>P. fluorescens</i>	goethite	citric, gluconic, lactic, malic และ succinic	Hoberg <i>et al.</i> (2005)
<i>R. aquatilis</i>	hydroxyapatite	gluconic	Kim <i>et al.</i> (1997)
<i>R. erythropolis</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	citric และ gluconic	Chen <i>et al.</i> (2006)
<i>S. macerans</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	citric, gluconic, lactic และ succinic	Chen <i>et al.</i> (2006)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์

- 1.1 กระจกตวง ขนาด 25, 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.2 ขวดคูเรน ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 1.3 ขวดปริมาตร ขนาด 100, 250, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
- 1.4 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 1.5 ขวดหยดลิษา
- 1.6 เข็มเขี่ยเชื้อ
- 1.7 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 1.8 ซ้อนตักสาร
- 1.9 บิวเรตต์ (Burette) เกรด A ขนาด 25 มิลลิลิตร
- 1.10 ปีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.11 ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 1.12 ปิเปตอัตโนมัติขนาด 200 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.13 แท่งแก้วกวาดเชื้อรูปตัว L
- 1.14 แท่งแก้วคนสาร
- 1.15 ไม้จิ้มฟัน

- 1.16 สไลด์และกระจกปิดสไลด์
- 1.17 หลอดกลั่น (distillation vessel) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.18 หลอดปั่นเหวี่ยงตัวอย่าง ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.19 หลอดทดลอง ขนาด 16x150 มิลลิเมตร
- 1.20 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus model BX51TF, USA)
- 1.21 เครื่องเขย้าสาร (GFL model 3020, Germany)
- 1.22 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precisa model XB 4200C, Switzerland)
- 1.23 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa model XT 220A, Switzerland)
- 1.24 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich model Rotenta 460R, UK)
- 1.25 เครื่องผสมสาร (VELP model ZX3, Italy)
- 1.26 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน/ไนโตรเจน (Foss model Kjeltac 8420, Denmark)
- 1.27 เครื่องวิเคราะห์โลหะหนักและแร่ธาตุ (Agilent Technologies model 7500, USA)
- 1.28 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo Scientific Evolution model 300 LC, USA)
- 1.29 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Consort model C831T, Belgium)
- 1.30 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Mettler model BE 600, Germany)
- 1.31 ตู้ปลอดเชื้อ (Forma Scientific Class II A/B3 Model 1186, USA)
- 1.32 ตู้อบ (Mettler model BE 600, Germany)
- 1.33 เตาให้ความร้อน (IKA model HS7; Germany)
- 1.34 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Hirayama model HV-85; Japan)

2. สารเคมี

2.1 Ammonium ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

2.2 Ammonium metavanadate (NH_4VO_3)

2.3 Ammonium molybdate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

2.4 Ammonium oxalate ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$)

2.5 Ascorbic acid

2.6 Boric acid (H_3BO_3)

2.7 Bromocresol green

2.8 Copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

2.9 Crystal violet

2.10 Ethanol 95%

2.11 Hydrochloric acid (HCl)

2.12 Iodine

2.13 Methyl red

2.14 Methylene blue

2.15 Nitric acid (HNO_3) 69%

2.16 O-phenanthroline

2.17 Perchloric acid (HClO_4) 70%

2.18 Potassium antimony tartate ($\text{KSbO} \cdot \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$)

2.19 Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)

2.20 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

2.21 Potassium sulfate (K_2SO_4)

2.22 Potassium iodine (KI)

2.23 Safranin O

2.24 Selenium (Se)

2.25 Sodium carbonate (Na_2CO_3),

2.26 Sodium hydroxide (NaOH)

2.27 Sulfuric acid (H_2SO_4) 98%

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Nutrient agar (MERCK, Germany)

3.2 Nutrient broth (MERCK, Germany)

3.3 Pikovskaya's broth (Himedia, India)

3.4 Pikovskaya's medium (Himedia, India)

3.5 Rose-Bengal Chloramphenical Agar (MERCK, Germany)

3.6 Potato Dextrose Agar (MERCK, Germany)

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณรากพืชของข้าวหอมมะลิแดง โดยเลือกเก็บดินในส่วนที่อยู่ติดกับบริเวณรากพืชมากที่สุด จากนั้นนำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

4.2 การวิเคราะห์สมบัติพื้นฐานของดิน

ศึกษาคุณสมบัติบางประการของดินบริเวณที่เก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างดินทั้ง 2 แหล่ง คือ ดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสนทราย และ ดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอแมริม มาตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นบดโดยใช้โกร่งบดดินและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร วิเคราะห์สมบัติพื้นฐานของดินดังต่อไปนี้

4.2.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่า 1 ชั่วโมง วางทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอนประมาณ 5 นาที แล้ววัดค่า pH ของสารละลายดินด้วยเครื่อง pH meter

4.2.2 ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (Organic Matter)

วิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์วัตถุและอินทรีย์คาร์บอน ตามวิธีของ Walkley and Black method (1934) โดยชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 1.0 N $K_2Cr_2O_7$ 10 มิลลิลิตร และกรด H_2SO_4 เข้มข้น 10 มิลลิลิตร เขย่า ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นเติมน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ O-phenanthroline ferrous sulfate ลงไป 10 หยด จากนั้นทำการไทเทรต $K_2Cr_2O_7$ ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาด้วยสารละลายแอมโมเนียมเฟอร์รัสซัลเฟต จนกระทั่งสีของสารแขวนลอยค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนแดง แล้วคำนวณหาปริมาณอินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์วัตถุในดิน

4.2.3 ปริมาณไนโตรเจน (Total Nitrogen)

ชั่งดิน 0.5-1 กรัม ใส่ในหลอดย่อยขนาด 100 มิลลิลิตร เติมอะซิติคแอซิดผสม ($100\text{ g } K_2SO_4 + 10\text{ g } CuSO_4 + 1\text{ g } Se$) จำนวน 2.00 กรัม เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อนบนเตาย่อยจน จากนั้นทำการย่อยจนได้สารละลายใสและดินเป็นสีขาว วางไว้ให้อุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วนำหลอดต่อเข้ากับเครื่องกลั่น เติม 40% NaOH จำนวน 70 มิลลิลิตร ทำการกลั่น

ประมาณ 5 นาที โดยจุ่มก้านคอนเด้นเซอร์ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4% จำนวน 25 มิลลิลิตร เพื่อจับแอมโมเนียที่ได้จากการกลั่น สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว เติมสารละลายอินดิเคเตอร์ผสม 3-5 หยด นำไปไทเทรตด้วย 0.025 N HCl จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู ทำแบบลงค์ตามขั้นตอนเดียวกันโดยไม่มีตัวอย่างดิน แล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนในดิน

4.2.4 ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus)

ทำการย่อยตัวอย่างดินโดยใช้วิธีการ Wet digestion method โดยนำตัวอย่างดิน 2 กรัม เติมกรดผสมระหว่างกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริก (HNO_3 : HClO_4) ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 25 มิลลิลิตร ทำการย่อยบนเตาให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 80-150 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวอย่างเกิดควันขาวขึ้น หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้ตัวอย่างเย็น จึงนำมารองและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร เติมสารละลาย vanadomolybdate 10 มิลลิลิตร เขย่าวางทิ้งไว้ 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลายตัวอย่าง (Olsen and Sommers, 1982)

4.2.5 ปริมาณฟอสฟอรัสที่สกัดได้ (Extractable Phosphorus)

วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสที่สกัดได้โดยวิธี Bray II (Bray and Kurtz, 1945) โดยชั่งตัวอย่างดิน 2.5 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ เติมสารสกัด Bray II ($0.1 \text{ N HCl} + 0.03 \text{ N NH}_4\text{F}$) จำนวน 25 มิลลิลิตร เขย่านาน 1 นาที นำเข้าเครื่องเซนตริฟิวส์ให้ดินตกตะกอน กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 นำสารสกัดที่กรองได้ไปวัดหาความเข้มข้นของฟอสฟอรัสด้วยวิธี molybdenum blue โดยปิเปต color reagent (ammonium molybdate) 5 มิลลิลิตร และ 0.5% ascorbic acid ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดที่กรองได้ (ปริมาตรที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของฟอสฟอรัส) ปรับปริมาตรด้วยน้ำ เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 40 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 820 นาโนเมตร

4.2.6 ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Extractable Potassium)

วิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้โดยชั่งดิน 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $1 \text{ N NH}_4\text{OAc}$, pH 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ลงในขวดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างดินในกรวยด้วยสารละลาย NH_4OAc

จนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร วัดหาความเข้มข้นของโพแทสเซียมด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)

4.3 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดิน

คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดิน โดยนำตัวอย่างดินที่เจือจางแบบลดลงทีละสิบเท่า (10 fold serial dilution) ที่ระดับ 10^{-4} - 10^{-6} นำมาทาดเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เข็มเย็บเชื้อเย็บเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมา ทำ cross streak บนอาหาร NA จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อที่แยกได้บนอาหารแข็งเอียง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการละลายฟอสเฟต

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 4.3 นำมาเชื้อเชื้อลงบนอาหารเลี้ยง NB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟอสเฟต ด้วยวิธี spot inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar ที่มี tricalcium phosphate เป็นองค์ประกอบ เชื้อละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 และ 7 วัน จะสังเกตเห็นโซนใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการวัดรัศมีของบริเวณใสและรัศมีของโคโลนี เพื่อนำมาคำนวณหาค่า Halo: Colony ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{Halo:Colony ratio} = \frac{\text{รัศมีบริเวณใสรอบโคโลนี}}{\text{รัศมีโคโลนี}}$$

คำนวณค่า Halo: Colony ratio ทุกซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ยสุดท้ายของแต่ละเชื้อมาเปรียบเทียบกับกัน เชื้อใดให้ค่าเฉลี่ยของ Halo: Colony ratio สูงสุด แสดงว่ามีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด

4.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากข้อ 4.4 มาทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว PVK ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

4.5.1.1 ใช้เข็มเย็บเชื้อเย็บเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยวิธี cross streak สำหรับเชื้อแบคทีเรียให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

4.5.1.2 ใช้เข็มเข็มเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียและเชื้อราแต่ละชนิด ถ่ายเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบประมาณ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นานประมาณ 12 ชั่วโมง (มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml)

4.5.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทดสอบและการละลายฟอสเฟต

ถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารข้อ 4.5.1.2 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว PVK จำนวน 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 และ 7 วัน ทำซ้ำ 3 ซ้ำ โดยชุดควบคุม (Control) จะไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างที่เจริญในอาหารเหลว PVK โดยเทตัวอย่างใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง จำนวน 30 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใสที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 นำของเหลวใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตด้วยวิธี Bray II (Bray and Kurtz, 1945)

4.6 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟต

นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อย่อยสลายฟอสเฟตมาสเมียร์บนสไลด์ จากนั้นนำมาฉาบบนแผ่นไฟฟ้า 2-3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ แล้วหยด crystal violet ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า หยดไอโอดีน ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% โดยให้ไหลผ่านซ้ำๆ บนสไลด์ จนกระทั่งไม่มีสีของ crystal violet ปนไปกับแอลกอฮอล์ จากนั้นย้อมทับด้วย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำเปล่า แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อการติดสีและรูปร่างของแบคทีเรีย

4.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์สมบัติพื้นฐานของดิน

จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของตัวอย่างดินทั้ง 2 แหล่ง คือ ดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสนทราย และ ดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอแมริม พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ที่ 5.29- 7.87 ค่าการนำไฟฟ้าของดินตัวอย่างทั้ง 2 แหล่ง อยู่ที่ 0.12-0.20% ส่วนปริมาณอินทรีย์วัตถุที่พบในดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสนทราย มีปริมาณอินทรีย์วัตถุเท่ากับ 4.53% สูงกว่าปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอแมริม ซึ่งมีปริมาณอินทรีย์วัตถุอยู่ที่ 2.74% ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม ที่พบในดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสนทราย มีปริมาณเท่ากับ 0.65%, 348 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 218 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียมในดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอแมริม ที่มีปริมาณเท่ากับ เท่ากับ 0.22%, 292 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 3 คุณสมบัติพื้นฐานของดินตัวอย่างที่นำมาคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

แหล่งตัวอย่าง	คุณสมบัติพื้นฐานของดิน					
	pH	EC (dS/m)	Organic matter (%)	Nitrogen (%)	Total P (mg/kg)	Extractable K (mg/kg)
อ.สนทราย	5.29	0.12	4.53	0.65	348	218
อ.แมริม	7.87	0.20	2.74	0.22	292	120



ภาพที่ 2 การเก็บตัวอย่างดินในแปลงนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสันทราย และอำเภอแมริม จังหวัด
เชียงใหม่

2. ผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดิน

คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินบริเวณรากพืชของข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์ จำนวน 6 ตัวอย่าง จากข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์ที่ปลูกในพื้นที่ อำเภอสันทราย และ อำเภอแม่ริม สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียในพื้นที่อำเภอสันทรายและพื้นที่อำเภอแม่ริม จำนวน 65 ไอโซเลต และ 41 ไอโซเลต ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แหล่งที่มา ชนิดของตัวอย่าง และจำนวนจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต
อ.สันทราย	3	ดินบริเวณรากพืชข้าวหอมมะลิแดง	65
อ.แม่ริม	3	ดินบริเวณรากพืชข้าวหอมมะลิแดง	41
รวม	6		106



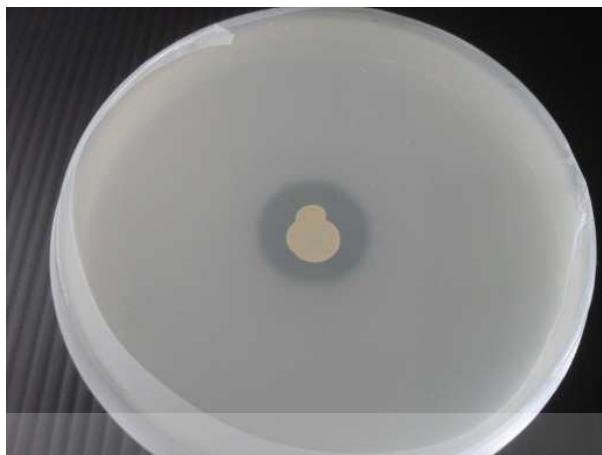
ภาพที่ 3 ตัวอย่างดินในแปลงนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสันทราย และอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการละลายฟอสเฟต

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินรากพืชของข้าวหอมมะลิแดง จำนวน 106 ไอโซเลต ในการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์รูปตะกอนแคลเซียมไตรฟอสเฟต $[(Ca_3(PO_4)_2)]$ บนอาหารแข็ง PVK หลังจากเลี้ยงเชื้อมานาน 3 และ 5 วัน พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 12 ไอโซเลต ที่ให้ผลบวกการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง PVK โดยจะสังเกตเห็นโซนใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต PSB03 ให้ค่าเฉลี่ยของ Halo: Colony ratio สูงสุด เท่ากับ 2.15 และ 3.06 ที่ระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า Halo:Colony ratio ของแบคทีเรียย่อยสลายฟอสเฟต

รหัสเชื้อจุลินทรีย์	ค่า Halo:Colony ration ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต	
	ระยะเวลา 3 วัน	ระยะเวลา 7 วัน
PSB01	1.90	2.98
PSB02	1.70	2.59
PSB03	2.15	3.06
PSB04	1.32	1.98
PSB05	1.22	1.34
PSB06	1.15	2.11
PSB07	1.27	1.80
PSB08	1.35	1.43
PSB09	1.13	1.78
PSB10	1.97	2.61
PSB11	1.42	2.20
PSB12	1.52	2.17



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโคโคนีและบริเวณใสของการละลายฟอสเฟตของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจากดิน

4. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

จากการคัดเลือกแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร PVK มาศึกษาประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 3 วัน และ 7 วัน พบว่าการละลายฟอสเฟตจากตะกอน $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ในอาหารเหลว PVK โดยแบคทีเรียไอโซเลต PSB03 สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวได้ปริมาณสูงสุดที่ระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน เท่ากับ 102.11 และ 191.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลแสดงดังตารางที่ 6

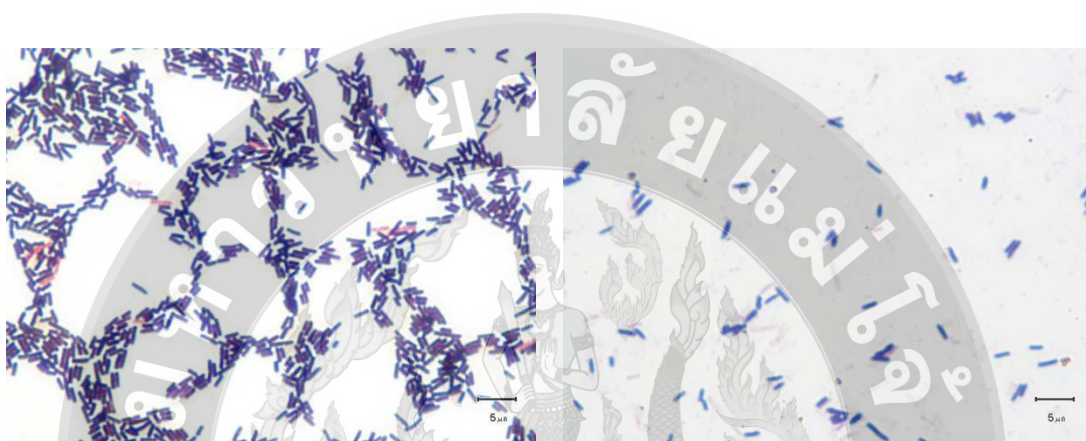
ตารางที่ 6 ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายอยู่ในส่วนใสของอาหารเหลว PVK ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อมานาน 3 วัน และ 7 วัน

รหัสเชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ (mg P L ⁻¹)		pH สุดท้ายของการทดลอง
	ระยะเวลา 3 วัน	ระยะเวลา 7 วัน	
PSB01	90.57±19.97 ^{de}	177.58±28.48 ^d	2.88±0.27 ^{de}
PSB02	90.33±31.51 ^{de}	177.15±19.02 ^d	2.90±0.05 ^c
PSB03	102.11±17.95 ^d	191.02±23.35 ^d	2.76±0.10 ^{de}
PSB04	47.42±18.72 ^{abc}	73.88±15.35 ^{abc}	3.67±0.15 ^{abc}
PSB05	39.64±18.04 ^{abc}	74.25±24.51 ^{abc}	3.59±0.03 ^a
PSB06	27.72±9.02 ^{ab}	57.93±14.32 ^a	4.04±0.18 ^{abc}
PSB07	33.39±6.16 ^{ab}	66.18±17.76 ^{ab}	4.02±0.16 ^{abc}
PSB08	47.44±15.37 ^{abc}	97.00±6.98 ^{bc}	3.30±0.44 ^a
PSB09	15.15±11.57 ^a	57.03±2.93 ^a	4.22±0.67 ^{ab}
PSB10	92.28±26.79 ^{de}	188.51±21.09 ^d	2.86±0.18 ^{de}
PSB11	63.12±21.71 ^{bc}	101.19±11.68 ^c	2.98±0.12 ^{cde}
PSB12	75.56±13.21 ^{cde}	162.85±15.99 ^d	2.97±0.21 ^{bcd}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

5. ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งสูตร PVK จำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เชลล์รูปร่างท่อน มีขนาด และการจัดเรียงตัวแบบเชลล์เดี่ยวหรือสองเชลล์ มีการเรียงตัวแบบต่อกันเป็นสายสั้นหรือสายยาว



ภาพที่ 5 การย้อมติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายฟอสเฟต

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินบริเวณรากพืชของข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์ จำนวน 6 ตัวอย่าง จากข้าวหอมมะลิแดงอินทรีย์ที่ปลูกในพื้นที่ อำเภอสนทราย และ อำเภอแมริม สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย ในพื้นที่อำเภอสนทรายและพื้นที่อำเภอแมริม จำนวน 65 ไอโซเลต และ 41 ไอโซเลต ตามลำดับ เมื่อ พิจารณาสสมบัติของดินที่พบจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในนาข้าวหอมแดง อำเภอสนทราย พบว่าแหล่ง ตัวอย่างดินนาข้าวในอำเภอสนทรายสามารถพบจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมากกว่าดินนาข้าวหอมแดง อำเภอแมริม เนื่องจากดินมีปริมาณอินทรีย์วัตถุและมีความอุดมสมบูรณ์สูง ดังนั้นกล่าวได้ว่าปัจจัยความ อุดมสมบูรณ์ของดินมีผลต่อการกระจายตัวของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ซึ่งสอดคล้องกับการคัดแยกเชื้อ แบคทีเรียในดินเขตวนอุทยานและเขตอุทยาน ที่มีความสัมพันธ์กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน โดย คุณสมบัติของดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงจะพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ มากกว่าดิน จึงจัดว่าสมบัติของดินเป็นปัจจัยควบคุมความหนาแน่นและการกระจายตัวของจุลินทรีย์ ละลายฟอสเฟต (วุฒิชัย และคณะ, 2550)

เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินรากพืชของข้าวหอมมะลิแดง จำนวน 106 ไอโซเลต ไปทดสอบ ประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 12 ไอโซเลต ที่ให้ผลบวกการละลาย ฟอสเฟตบนอาหารแข็ง PVK โดยจะสังเกตเห็นโซนใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยจุลินทรีย์ไอ โซเลต PSB03 ให้ค่าเฉลี่ยของ Halo: Colony ratio สูงสุด เท่ากับ 2.15 และ 3.06 ที่ระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ ซึ่งการสร้างโซนใสเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถสร้างกรดและปลดปล่อยออกมาละลายฟอสเฟตในระหว่างการเจริญของเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เร็วจะสามารถสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาละลาย ฟอสเฟตได้ดี และเร็วกว่าจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตช้า (Piccini and Azcon 1987; Illmer and Schinner 1992)

เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูตร PVK หลังการ เลี้ยงเชื้อนาน 3 และ 7 วัน และวิเคราะห์ฟอสเฟตที่ละลายได้ พบว่าแบคทีเรีย PSB03 สามารถละลาย

ฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ปริมาณสูงสุดระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน เท่ากับ 102.11 และ 191.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ค่า pH และการละลายฟอสเฟตของเชื้อที่คัดแยกได้ ในอาหารเหลวสูตร PVK พบว่าการละลายฟอสเฟตเกิดขึ้นสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ และประสิทธิภาพของเชื้อในการสร้างกรดระหว่างการเจริญทำให้การละลายฟอสเฟตเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้จะมีการสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์และอนินทรีย์ออกมา ซึ่งกรดต่างๆ เหล่านี้ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่ำลงและเกิดการละลายของฟอสฟอรัสมากขึ้น (Gaur and Sachar 1980; Illmer and Schinner 1992)



บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของตัวอย่างดินทั้ง 2 แหล่ง คือ ดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสันทราย และ ดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอแม่ริม พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ที่ 5.29- 7.87 ค่าการนำไฟฟ้าของดินตัวอย่างทั้ง 2 แหล่ง อยู่ที่ 0.12-0.20% ส่วนปริมาณอินทรีย์วัตถุที่พบในดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสันทราย มีปริมาณอินทรีย์วัตถุเท่ากับ 4.53% สูงกว่าปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอแม่ริม ซึ่งมีปริมาณอินทรีย์วัตถุอยู่ที่ 2.74% ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม ที่พบในดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอสันทราย มีปริมาณเท่ากับ 0.65%, 348 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 218 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียมในดินนาข้าวหอมมะลิแดง อำเภอแม่ริม ที่มีปริมาณเท่ากับ เท่ากับ 0.22%, 292 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินรากพืชของข้าวหอมมะลิแดง จำนวน 106 ไอโซเลต ไปทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 12 ไอโซเลต ที่ให้ผลบวกการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง PVK โดยจะสังเกตเห็นโซนใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต PSB03 ให้ค่าเฉลี่ยของ Halo: Colony ratio สูงสุด เท่ากับ 2.15 และ 3.06 ที่ระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งสูตร PVK จำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เชลล์รูปร่างท่อน มีขนาดและการจัดเรียงตัวแบบเชลล์เดี่ยวหรือสองเชลล์ มีการเรียงตัวแบบต่อกันเป็นสายสั้นหรือสายยาว

จากการคัดเลือกแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร PVK มาศึกษาประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 3 วัน และ 7 วัน พบว่าการละลายฟอสเฟตจากตะกอน $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ในอาหารเหลว PVK โดยแบคทีเรียไอโซเลต PSB03 สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวได้ปริมาณสูงสุดที่ระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน เท่ากับ 102.11 และ 191.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 10. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชัยวัฒน์ เจนวนิชย์. 2525. **สารานุกรมธาตุ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: อักษรเจริญทัศน์.
- ถวิล ครุฑกุล. 2519. **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น**. กรุงเทพฯ: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธงชัย มาลา. 2546. **ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- มุกดา สุขสวัสดิ์. 2547. **ชุดคู่มือการเกษตร: ปุ๋ยอินทรีย์**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.
- วุฒิชัย จันทรมบัติ นวลจันทร์ ภาสดา และ มนต์ระวี พิราวัชร. 2550. **การคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตร**, น. 1-51. ใน รายงานผลการวิจัยส่วนสำรวจและจำแนกดิน, สำนักสำรวจดินและวางแผนการใช้ที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สมศักดิ์ วังโน. 2528. **จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน**. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช.
- อาภารัตน์ มหาขันธ์. 2549. **ปุ๋ยชีวภาพจากจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตกับอนาคตการเกษตรของประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: บริษัทซีเอ็ดดูเคชั่น จำกัด (มหาชน)
- Banik S. and B. Dey. 1982. Available phosphare content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing microorganism. **Plant Soil** 69(3): 353-364.
- Barea J.M., M.J. Pozo, R. Azcón and C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. **J. Exp. Bot.** 56: 1761-1778.

Bertin C., H.W. Yang and L.A. Weston. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256: 67-83.

Brady N.C. and R.R. Weil. 2002. **The Nature and Properties of Soils**. 13rd ed., New Jersey: Pearson Education, Inc.

Brady N.C. and R.R. Weil. 2008. **The nature and properties of soils**, 14th ed, New Jersey: Pearson Education, Inc.

Bray R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.

Busman L., J. Lamb, G. Randall, G. Rehm and M. Schmitt. 2009. **The nature of phosphorus in soils**. USA: University of Minnesota.

Chen Y.P., P.D. Rekha, A.B. Arunshen, W.A. Lai and C.C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol.* 34: 33-41.

Chinabut N. 2003. **A soil testing service for farmers in Thailand, using mobile laboratories**. [Online] Available: <http://www.fftc.agnet.org/library/article/eb533.html> [2014, May 25].

de Freitas, J.R., M.R. Banerjee and J.J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of conola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils* 24: 358-364.

Dey B.K. 1988. **Phosphate solubilizing microorganisms in improving fertility status of soil**. In: Sen. S.P Palit.P. (Eds). Biofertilizers potentialities and problems. Plants physiology Forum. Naya Prokash. Calcutta. pp. 237-248.

- Gaur A.C., M. Madan and K.P. Ostwal. 1973. Solubilization of phosphatic compounds by native microflora of rock phosphates. **Indian J. Exp. Biol.** 11: 427-429.
- Gaur A.C. and S. Sachar. 1980. Effect of rock phosphate and glucose concentration on phosphate solubilization by *Aspergillus awamori*. **Current Sci.** 49: 553-554.
- Gupta R., R. Singal, A. Shankar, R.C. Kuhad and R.K. Saxena. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 40: 255-260.
- Hoberg E., P. Marschner and R. Lieberei. 2005. Organic acid exudation and pH changes by *Gordonia* sp. and *Pseudomonas fluorescens* grown with P adsorbed to goethite. **Microbiol. Res.** 160: 177-187.
- Hwangbo H., R.D. Park, Y.W. Kim, Y.S. Rim, K.H. Park, T.H. Kim, J.S. Suh and K.Y. Kim. 2003. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. **Curr. Microbiol.** 47: 87-92.
- Illmer P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biol. Biochem.** 24: 389-395.
- Kim K.Y., D. Jordan and H.B. Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. **FEMS Microbiol. Lett.** 153: 273-277.
- Kucey R.M.N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Can. J. Soil Sci.** 63: 671-678.
- McLaughlin M.J., A.M. Alston and J.K. Martin. 1988. Phosphorus cycling in wheat-pasture rotations. I. The source of phosphorus taken up by wheat. **Aust. J. Soil Res.** 26: 323-331.

- Mehrvarz S., M. R. Chachi and H. A. Alikhani. 2008. Effect of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of barely (*Hordeum vulgare* L.). **J. Agri. Environ. Sci.** 3: 822-828.
- Mehta S. and C.S. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. **Curr. Microbiol.** 43: 51-56.
- Nautiyal C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.** 170: 265-270.
- Olsen R.S., and Sommer, L.E. 1982. **Phosphorus** In: methods of soil Analysis part 2 (ed. Page, A.L, Miller, R.H and Keeney, D.R). American Soc. Of Agronomy Madison, Wisconsin pp 15-72.
- Pal S.S. 1998. Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. **Plant and Soil** 198: 169-177.
- Piccini D. and R. Azcon. 1987. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the utilization of Bayovar rock phosphate by alfalfa plants using a sand-vermiculite medium. **Plant and Soil** 101(1): 45-50.
- Price G. 2006. Australian soil fertility manual. Australia: CSIRO Publishing, Melbourne.
- Richardson A.E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. *Soil Biota*. 50-62.
- Rodríguez H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol. Adv.** 17: 319-339.
- Salehrastin N., 1999. Biological Fertilizers. Soil and Water Research Institute of Iran. **Sci. J. Soil and Water**. 12: 3.

Sperber I.J. 1958a. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil.

Aust. J. Res. 9: 778-781.

Sperber I.J. 1958b. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. **Aust.**

J. Res. 9: 782-787.

Stevenson, F.J. 1986. Cycles of Soil, Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients., New York: John Wiley & Sons. 380 p.

Tilak K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, S. Mittal, A.K. Tripathi and B.N. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. **Curr. Sci.** 89:136-150.

Tisdale S.L., W.L. Nelson and J.D. Beaton. 1985. **Soil Fertility and Fertilizers**. 4th ed., New York: Macmillan Company.

Uren N.C. 2000. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants, pp 19-40. *In* R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri, eds. **The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil Interface**. New York: Marcel, Dekker.

Vazquez P., G. Holguin., M.E. Puente., A. Lopez-Cortes and Y. Bashan. 2000. Phosphatesolubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biol. Fertil. Soils** 30: 460-468.

Yadav K.S. and K.R. Dadarwal. 1997. **Phosphate solubilisation and mobilization through soil microorganisms**. In K.R. Dadarwal (Ed.), *Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production*, p. 351.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารทดสอบ

1. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

ละลายในน้ำกลั่น ต้มให้สารละลายจนหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำออกจากเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแล้วรอให้อาหารเย็น ประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงบนจานอาหารปริมาณ 20 มิลลิลิตร

2. Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

ละลายในน้ำกลั่น ต้มให้สารละลายจนหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Pikovskaya's medium

Glucose	10.0	กรัม
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5.0	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
MnSO_4	trace	
FeSO_4	trace	
Yeast extract	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำไปต้มให้สารละลายจนหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมีและการย้อมสี

1. สีที่ใช้ย้อมแกรมและวิธีย้อมแกรม

1.1 สีย้อมแกรม

1.1.1 สารละลาย A

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร
ละลายสีจนละลายหมด		

1.1.2 สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับ B เข้าด้วยกันแล้วกรอง

1.1.2 Gram's iodine solution

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลาย iodine และ potassium iodide ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยก่อน แล้วจึงเติมน้ำให้ครบ เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

1.1.3 เอทานอล 95%

1.1.4 Safranin O counterstain (stock solution)

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย safranin ในเอทานอล 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 วิธีการย้อมสีแบบแกรม

ป้ายเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง บนสไลด์ที่สะอาดทิ้งให้แห้ง ทำให้เชื้อติดแน่นโดยนำสไลด์ที่มีเชื้อผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง จากนั้นย้อมด้วย Crystal violet โดยหยดสีให้ทั่วมนาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างน้ำเล็กน้อย หยดแกรมไอโอดีนลงให้ทั่วบริเวณที่ป้ายเชื้อ นาน 1 นาที จากนั้นเทไอโอดีนทิ้งแล้วล้างด้วยเอธานอล 95% นาน 15 วินาที แล้วล้างน้ำเปล่าแล้วย้อมต่อด้วยสี Safranin-O นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ชับด้วยกระดาษซับให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม และการจัดเรียงเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

Potassium dichromate	49.0247	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น 49.0247 กรัม ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3. สารละลายแอมโมเนียมเฟอร์รัสซัลเฟต ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

Ammonium ferrous sulfate	139.0085	กรัม
Sulphuric acid	20.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งแอมโมเนียมเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) จำนวน 139.0085 กรัม ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายจนหมดแล้วจึงเติมกรดซัลฟิวริก จำนวน 20 มิลลิลิตร ปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายอินดิเคเตอร์ (O-phenanthroline ferrous sulfate)

O-phenanthroline	0.74	กรัม
Ferrous sulfate	0.35	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

ละลายฟิแนนโทรลีน 0.74 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต 0.35 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตร
สุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร

5. สารละลาย NaOH เข้มข้น 40 เปอร์เซนต์

Sodium hydroxide	400	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 400 กรัม ละลายในน้ำกลั่นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นปรับปริมาตรจนครบ
1 ลิตร สารละลายที่เตรียมมีอายุ 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง นับจากวันที่เตรียม

6. สารละลายบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์

Boric acid	40	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งกรดบอริก (H_3BO_3) 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นร้อน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและปรับปริมาตรจน
ครบ 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร สารละลายที่เตรียมมีอายุ 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง นับจากวันที่เตรียม

7. สารละลายอินดิเคเตอร์ผสมเมทิลเรด (Methyl red) และโบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol green)

Methyl red	0.1	กรัม
Bromocresol green	0.1	กรัม
Ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

ชั่งเมทิลเรด 0.1 กรัม และโบรโมครีซอลกรีน 0.1 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ ปรับ
ปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายอินดิเคเตอร์มีอายุ 1 ปีที่อุณหภูมิห้องนับจากวันที่เตรียม

8. สารกระตุ้นผสม

Potassium sulphate	100	กรัม
Copper sulfate	10	กรัม
Selenium	1.0	กรัม

ซังโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 100 กรัม, คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 10 กรัม และ ซีลีเนียม (Se) 1 กรัม ผสมและบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในขวดที่มีฝาปิดสนิท

9. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

อบ Na_2CO_3 ที่อุณหภูมิ 290 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. แล้วทิ้งไว้ให้เย็นใน โถดูดความชื้น (Desiccator) จนกว่าจะนำมาใช้

10. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) 0.0.25 นอร์มอล

Hydrochloric acid	2.08	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl, A.R grade) 2.08 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตรเขย่าผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายในขวดแก้วที่อุณหภูมิห้อง สารละลายที่เตรียมมีอายุ 6 เดือนนับจากวันที่เตรียม

11. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) 0.0.25 นอร์มอล

Hydrochloric acid	2.08	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl, A.R grade) 2.08 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

12. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

Hydrochloric acid	41.7	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปีเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl, A.R grade) 41.7 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1 ลิตร ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

13. สารละลายแอมโมเนียมฟลูออไรด์ ความเข้มข้น 0.03 นอร์มอล

Ammonium fluoride	37.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (NH_4F) จำนวน 37 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดโพลีเอทิลีน

14. น้ำยาสกัด Bray II

ผสมสารละลายแอมโมเนียมฟลูออไรด์ ความเข้มข้น 0.03 นอร์มอล จำนวน 30 มิลลิลิตร และ กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล จำนวน 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน

15. กรดแอสคอร์บิก 0.5%

ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา เตรียมใหม่ทุกครั้งที่มีการทดสอบ

16. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (Color reagent)

a. สารละลาย A

Ammonium molybdate	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

นำแอมโมเนียมโมลิบเดต $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ จำนวน 12 กรัม ละลายในน้ำเดือดที่ปราศจากไอออน จำนวน 300 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้เย็น

b. สารละลาย B

Potassium antimony tartate	0.291	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

นำโพแทสเซียมแอนติโมนีทาร์เทรต $(\text{KSbO}_3\cdot \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4)$ จำนวน 0.291 กรัม ละลายในน้ำเดือดที่ปราศจากไอออน จำนวน 300 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้เย็น

c. สารละลาย C

Sulphuric acid	148.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปิเปตกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) 148 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1 ลิตร ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ผสมสารละลาย A, B และ C เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนจนมีปริมาตรสุดท้าย 2,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

17. สารละลายวานาโดโมลิบเดต (Vanadomolybdate reagent)

a. สารละลาย A

Ammonium molybdate	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

นำแอมโมเนียมโมลิบเดต 40 กรัม ละลายในน้ำเดือดที่ปราศจากไอออน จำนวน 300 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้เย็น

b. สารละลาย B

Ammonium metavanadate	2.0	กรัม
Perchloric acid	125.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

นำแอมโมเนียมเมตาวานาเดต 2 กรัม ละลายในน้ำเดือดปริมาตร 300 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดไนตริกเข้มข้น 160 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับ B เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนจนมีปริมาตรสุดท้าย 2,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

18. สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (Standard Phosphorus) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

Potassium dihydrogen phosphate	4.3936	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จำนวน 4.3936 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

19. สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (Standard Phosphorus) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวด
ปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

20. เวิร์คกิง สแตนดาร์ด ฟอสฟอรัส (Working standard phosphorus)

เตรียม Working standard ความเข้มข้น 0,1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1, 2, 3, 4
และ 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใ้ร้อดำเนินการเช่นเดียวกับสารละลาย
ตัวอย่าง

