รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพดิน ปุ๋ย และน้ำทางการเกษตรอย่างสมดุลและยั่งยืน

2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยและพัฒนาการเพิ่มประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพและจุลินทรีย์ดินเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร

กิจกรรม : การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพและหัวเชื้อจุลินทรีย์รูปแบบใหม่

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : วิจัยและพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบ spray dry

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of Phosphate Solubilizing Biofertilizer Powder by Spray Dryer

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นายสนธยา ขำติ๊บ	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	: นางสุปรานี มั่นหมาย	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	: นายอธิปัตย์ คลังบุญครอง	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบผงโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยเริ่มต้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินรอบราก และรากพืช ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าว อ้อย และส้มโอ ในจังหวัดชัยนาท จำนวน 13 ตัวอย่าง พื้นที่ปลูกอ้อย มันสำปะหลัง และทานตะวัน ในจังหวัดนครราชสีมา จำนวน 17 ตัวอย่าง และพื้นที่ปลูกมังคุด ทุเรียน ลองกอง สับปะรด และปาล์มน้ำมัน ในจังหวัดตราด จำนวน 19 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้ จำนวน 6 ไอโซเลท โดยได้จากตัวอย่างดินรอบราก จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 2 ไอโซเลท คือ *Burkholderia latens* SM-P013B และ *Burkholderia multivorans* SM-P020B ได้จากตัวอย่างดินรอบราก จังหวัดตราด จำนวน 4 ไอโซเลท คือ *Pseudomonas fluorescens* SM-P025B, *Curtobacterium* sp. SM-P027B, *Bacillus velezensis* SM-P029B และ *Pantoea dispersa* SM-P033B ซึ่งทั้ง 6 ไอโซเลท มีศักยภาพในการละลาย $AlPO_4$, $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ แบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เจริญได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6.5, 6.5, 7.0, 6.5, 8.0 และ 7.0 ตามลำดับ ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 15, 20, 20, 20, 20 และ 15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกได้ไปทดสอบทำผงโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิ 110 และ 120 องศาเซลเซียส แล้วนำผงแบคทีเรียที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งการงอกของเมล็ด และการส่งเสริมการ

กรมวิชาการเกษตร

เจริญเติบโตในระยะต้นกล้ามะเขือเทศ ผลการทดลองพบว่า *P. fluorescens* SM-P025B เป็นแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบผงโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยมากที่สุด เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยเกิน 80 เปอร์เซ็นต์ทั้ง 2 สภาวะ และผงแบคทีเรียที่ได้ไม่ส่งผลยับยั้งต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ คือให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด เท่ากับ 92.31 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดมะเขือเทศที่ไม่ได้คลุกผงแบคทีเรีย และต้นกล้ามะเขือเทศ ที่วันที่ 21 หลังการเพาะ มีความ

สูงเฉลี่ย เท่ากับ 12.30 เซนติเมตร สูงกว่าต้นกล้ามะเขือเทศที่ไม่ได้คลุกผงแบคทีเรีย ซึ่งมีความสูง 10.65 เซนติเมตร นอกจากนี้เมื่อนำผงแบคทีเรีย *P. fluorescens* SM-P025B ไปทดสอบการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง มีปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิต เท่ากับ 2.18×10^{8} และ 1.16×10^{8} โคโลนีต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่เกินเกณฑ์ของปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 (กรณีของแบคทีเรียมากกว่า 10^{8} โคโลนีต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ) แต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิต เท่ากับ 8.40×10^{7} โคโลนีต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต การทดสอบการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าในสภาพกระถาง พบว่า การคลุกมะเขือเทศด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในอัตราส่วน 1:0.6 (กรัมต่อกรัม) ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำของกรมวิชาการเกษตร มีความสูงหลังย้ายปลูก 15, 45 และ 75 วัน สูงสุด เท่ากับ 33.56, 58.00 และ 97.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่การคลุกเคลือบเมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ในอัตราส่วน 1:0.8 (กรัมต่อกรัม) ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำของกรมวิชาการเกษตร มีความสูงหลังย้ายปลูก 15, 45 และ 75 วัน สูงสุด เท่ากับ 16.78, 35.28 และ 49.67 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับปุ๋ยเคมีในการผลิตมะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดสอบ พบว่าต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B มีผลต่อความสูงของต้นมะเขือเทศ แต่ไม่มีผลต่อขนาดทรงพุ่ม หลังย้ายต้นกล้าลงปลูก 90 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B สามารถช่วยลดปุ๋ยเคมีเหลือ 24-12.8-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ โดยที่ให้ผลผลิตมะเขือเทศไม่แตกต่างทางสถิติจากการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ ในส่วนของพริก พบว่า ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ไม่มีผลต่อความสูง และขนาดทรงพุ่มของต้นพริก เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B สามารถช่วยลดปุ๋ยเคมีเหลือ 24-14.4-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ โดยที่ให้ผลผลิตของพริกไม่แตกต่างทางสถิติจากการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ เพียงอย่างเดียว

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Abstract

This research aims to select potential phosphate solubilizing bacteria and develop phosphate solubilizing bio-fertilizer by spray drying. In fiscal year 2017, fifty phosphate solubilizing bacteria (PSB) were isolated from rhizosphere soil and plant roots. In screening, out of 50 bacterial isolates 6 bacterial isolates (SM-P013B, SM-P020B, SM-P025B, SM-P027B, SM-P029B and SM-P033B.) showed highest phosphate solubilization were selected for further study. In fiscal year 2018, all 6 bacterial isolates were identified based on nucleotide sequence at 16S rRNA gene as *Burkholderia latens* SM-P013B, *Burkholderia multivorans* SM-P020B, *Pseudomonas fluorescens* SM-P025B, *Curtobacterium* sp. SM-P027B, *Bacillus velezensis* SM-P029B and *Pantoea dispersa* SM-P033B. Initial pH suitable for growth of 6 bacterial isolates was 6.5, 6.5, 7.0, 6.5, 8.0 and 7.0 respectively. Glucose concentrations suitable for growth of 6 bacterial isolates were 15, 20, 20, 20 and 15 g/L respectively. In spray drying, all 6 bacterial isolates were spray dried at 110 and 120 °C. The results showed that *P. fluorescens* SM-P025B had high survival rates at both 110 and 120 ° C. Furthermore, *P. fluorescens* SM-P025B powder did not inhibit the germination of tomato seeds and had the ability to promoted tomato growth. In fiscal year 2019, *P. fluorescens* SM-P025B were produced the prototype of phosphate solubilization biofertilizer. The prototype of phosphate solubilization biofertilizer was test under pot experiment with tomato and chili. Results showed that biofertilizer improved tomato seeding and chili growth at seed and biofertilizer ratio 1:0.6 and 1:0.8, respectively. In fiscal year 2020, the prototype of phosphate solubilization biofertilizer was test under filed experiment with tomato and chili. In tomato test, results showed that biofertilizer improved tomato height and canopy width. In addition, biofertilizer can reduce chemical fertilizer $N+0.8P_2O_5+K_2O$ of fertilizer recommendation (24-12.84-16 kg $N-P_2O_5-K_2O$ / rai). In chili test, results showed that biofertilizer improved tomato canopy width. In addition, biofertilizer can reduce chemical fertilizer $N+0.9P_2O_5+K_2O$ of fertilizer recommendation (24-14.4-16 kg $N-P_2O_5-K_2O$ / rai).

6. คำนำ

ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เช่น รา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสีท ที่สามารถช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสเฟตในดิน ทำให้พืชสามารถใช้ฟอสเฟตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการจะให้ได้มาซึ่งผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่มีคุณภาพตามที่กำหนดในพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 (กรณีของแบคทีเรียมากกว่า 10^8 โคโลนีต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ) จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัย เพื่อให้ได้มาซึ่งจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพดี และได้กระบวนการผลิตปุ๋ยชีวภาพที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกได้ แม้ในธรรมชาติจะพบจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตได้มากมาย แต่ที่มีประสิทธิภาพดีนั้นต้องได้รับการคัดแยกและทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร

โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพดีมักอยู่ในสกุล *Pseudomonas, Azotobacter, Burkholderia, Bacillus* และ *Rhizobium* (Jones and Oburger, 2011) ราละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพดีมักอยู่ในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* (Sharma *et al*., 2013) และแอคติโนมัยสีทละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพดีมักอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ *Nocardia* (Khan *et al*., 2007) ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวจะสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ และ/หรือ กรดอนินทรีย์ออกมาออก โดยกรดเหล่านี้ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง และเกิดการละลายของฟอสเฟต นอกจากนี้กรดอินทรีย์บางชนิดทำหน้าที่เป็นคีเลตกับแคลเซียมและเหล็กทำให้เกิดการแย่งจับแคลเซียมและเหล็ก จากสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟต เช่น $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ ส่งผลให้ฟอสเฟตปลดปล่อยออกมา

ในประเทศไทยมีนักวิจัยจำนวนมากสนใจคัดแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินรอบรากพืชชนิดต่าง ๆ เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพดีมาใช้ร่วมกับการปลูกพืชเพื่อช่วยให้พืชสามารถใช้ฟอสเฟตได้อย่างมีประสิทธิภาพ และลดต้นทุนจากการใช้ปุ๋ยเคมีฟอสเฟต เช่น สุปรานี และคณะ (2558) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ 003F, 0081B, 1102B, F6, F56, F128, G19, 3%C1, 3%C2 และ 3%75 เพื่อทดสอบร่วมกับการผลิตอ้อย ผลการศึกษาพบว่า ไอโซเลท F128 ทำให้น้ำหนักอ้อยต่อกอมากที่สุด เท่ากับ 17.07 กิโลกรัม มากกว่ากรรมวิธีควบคุม 1.79 เท่า (9.52 กิโลกรัม) ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต นอกจากจะช่วยลดต้นทุนแล้ว ยังช่วยเพิ่มผลผลิตด้วย สุภาพรและคณะ (2553) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินประเภทดินนาที่เป็นดินกรดกำมะถัน หรือที่เรียกว่าดินเปรี้ยวจัด (paddy acid sulfate soils) ชุดดินตัวแทน คือ ชุดดินรังสิต สามารถคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ในสกุล *Burkholderia* ได้ จำนวน 6 ไอโซเลท คือ Rs01, Rs02, Rs03, Rs04, Rs05 และ Rs06 โดย Rs01 เป็นแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพดี ถูกนำไปทดสอบร่วมกับการผลิตข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 ในชุดดินตาคลี พบว่า การเติม *Burkholderia* sp. Rs01 ร่วมกับการใส่ยูเรียและโพแทสเซียมคลอไรด์ทำให้ความสูง เส้นรอบวง น้ำหนักแห้งของลำต้นและใบของข้าวโพดหวานที่ระยะออกไหม (54 วัน) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ในปัจจุบันกรมวิชาการเกษตรได้ผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบผง ใช้ปุ๋ยหมักมูลวัวไม่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นวัสดุรองรับ ซึ่งวิธีการผลิตในปัจจุบันยังต้องใช้ระยะเวลานาน นอกจากนี้คุณภาพวัสดุรองรับไม่สม่ำเสมอและไม่สามารถควบคุมคุณภาพที่แน่นอนได้ จากปัญหาดังกล่าวทำให้คณะวิจัยให้ความสนใจการพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบผงโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เป็นวิธีการที่ทำให้ของเหลว เช่น สารแขวนลอยจุลินทรีย์เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปแบบของผงแห้งโดยอาศัยการพ่นฝอยสารละลายในอากาศร้อนที่อุณหภูมิ 110 - 200 องศาเซลเซียส เกิดการถ่ายเทความร้อยให้แก่ผลิตภัณฑ์ที่เคลื่อนที่ในทิศสวนทางกัน ทำให้เกิดการระเหยอย่างรวดเร็ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจเกิดการเสียสภาพขึ้นเพียงเล็กน้อยจากอุณหภูมิ แต่สามารถเก็บรักษาได้ง่ายและนาน เป็นข้อดีที่ควรนำมาใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหาคุณภาพวัสดุรองรับไม่สม่ำเสมอ และง่ายต่อการควบคุมคุณภาพ

ดังนั้นงานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบผงโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยเริ่มต้นจากการคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพดี การจัดจำแนกชนิดของ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

แบคทีเรีย หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน หาสภาวะในการผลิตผงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ทดสอบผลของต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดแบคทีเรียผงร่วมกับการผลิตพืชทดสอบ ได้แก่ มะเขือเทศ และพริกชี้ฟ้าในสภาพกระถาง และแปลงทดลอง

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ Pikovskaya broth, Pikovskaya agar, Nutrient broth, Nutrient agar และ Minimal medium

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต

3. สารเคมีสำหรับงานอณูชีวิทยา ได้แก่ สีย้อมดีเอ็นเอ DNA primer, Agarose, TAE buffer, TIANamp bacteria DNA kit, One PCR ultra mastermix และ PureLink quick PCR purification kit

4. สารเคมีสำหรับทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

5. ชุดทดสอบการติดสีแกรม (K001-1KT, Hi Media, Mumbai, India)

6. วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ได้แก่ จานเพาะเลี้ยง หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ หลอดทดลอง บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ แผ่นสไลด์ ลูปเขี่ยเชื้อ หลอดพีซีอาร์ กรวยกรอง กระดาษกรอง และไมโครปิเปตต์ทิป

7. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้อบ เครื่องชั่งสาร หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง เครื่องบ่มเขย่า ตู้ปลอดเชื้อ สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เครื่องปั่นเหวี่ยง กล้องจุลทรรศน์ เครื่องเทอโมไซเคิล เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และไมโครปิเปตต์

8. ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดแบคทีเรียผง

9. เมล็ดพืชทดสอบ ได้แก่ มะเขือเทศ และพริกชี้ฟ้า

10. กระถางขนาด 14 นิ้ว

11. ปุ๋ยเคมี ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต (21-0-0) ทริปเปิลซูเปอร์ฟอสเฟต (0-46-0) โพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60)

12. สารเคมีสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ดิน เช่น กรดเปอร์คลอริก กรดไนทริก กรดบอริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟิวริก เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดโครเมต ฟีแนนโทรลีนอินดิเคเตอร์ ซีลีเนียมมิกซ์เจอร์ แอมโมเนียมอะซีเทต ฯลฯ

13. เครื่องแก้วสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ดิน เช่น หลอดทดลอง บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ฯลฯ

- วิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินและรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากจังหวัดชัยนาท นครราชสีมา และตราด (Table 1) ที่ระดับความลึก 0 - 15 เซนติเมตร บริเวณรอบ ๆ ราก จำนวน 25 ตัวอย่าง และตัวอย่างรากกระถินณรงค์จากจังหวัดตราด จำนวน 2 ตัวอย่าง ใส่ในถุงพลาสติกขนส่งมายังห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา เพื่อคัดแยก

กรมวิชาการเกษตร

แบคทีเรียละลายฟอสเฟต โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (enrichment technique) โดยชั่งตัวอย่างดินหรือรากสับปะรด 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร Pikovskaya broth (Pikovskaya, 1948) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางมาคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยเทคนิค Spread plate บนอาหาร Pikovskaya agar (Pikovskaya, 1948) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สร้างวงใสรอบ ๆ และมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Cross streak บนอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต

นำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดแยกได้ (50 ไอโซเลท) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางความเข้มข้นของเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.95 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าการกระเจิงแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ดูดตัวอย่างแบคทีเรียด้วยปิเปตต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร Pikovskaya broth ซึ่งมี $Ca_3(PO_4)_2$ เป็นแหล่งฟอสเฟต ปรับความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น เท่ากับ 8.5 (เป็นสภาวะที่เกิดปฏิกิริยาระหว่าง Ca^{2+} และ PO_4^{3-} ได้สารประกอบ $Ca_3(PO_4)_2$ ซึ่งพืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ และสะสมในดิน) ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Kubota 7000, Kubota Corp., Osaka, Japan) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่ถูกละลายโดยจุลินทรีย์ โดยวิธี Molybdenum blue method (Murphy and Riley, 1962) คัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่สามารถละลายและปลดปล่อยฟอสเฟตใน Pikovskaya broth สูงสุด 25 ไอโซเลท เพื่อทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya agar ซึ่งมี $AlPO_4$, $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ เป็นแหล่งฟอสเฟต โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางความเข้มข้นของเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.95 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าการกระเจิงแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ดูดตัวอย่างแบคทีเรียด้วยไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวอาหาร Pikovskaya agar ที่มีแหล่งฟอสเฟตต่าง ๆ ได้แก่ $AlPO_4$, $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างวงใสรอบโคโลนีในอาหาร Pikovskaya agar ซึ่งมี $AlPO_4$, $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

3. การคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีความเป็นไปได้ในการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

แบคทีเรียที่สามารถละลาย $AlPO_4$, $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ ที่คัดเลือกได้ ถูกนำมาทดสอบการอยู่รอดของภายใต้สภาวะอุณภูมิสูง เพื่อการคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีความเป็นไปได้ในการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยนำแบคทีเรียบ่มที่อุณภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยวิธี Standard plate count ก่อนและหลังบ่ม นำข้อมูลที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตแต่ละไอโซเลท ซึ่งแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ จะถูกจัดจำแนกชนิดและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

4. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกได้

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกได้ โดยการศึกษาทางอณูชีววิทยา สัณฐานวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต การศึกษาทางอณูชีววิทยาด้วยการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA เริ่มต้นโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในอาหาร Nutrient broth ที่อุณหูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Kubota 6000, Kubota Corp., Osaka, Japan) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเพาะเลี้ยง เทสารละลายส่วนใสทิ้ง นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอด้วย TIANamp Bacteria DNA Kit (Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd., Beijing, China) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย โดยใช้สารเคมีผสม One PCR ultra (GeneDireX Inc., Taiwan) และ universal primer ได้แก่ 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') เป็น forward primer และ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') เป็น reward primer ดำเนินการในเครื่องเทอโมไซเคิล (Multigene Thermal Cycler, Labnet International Inc., New Jersey, USA) โดยมีสภาวะในการทำงาน ดังนี้ (1) pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (2) denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที (3) annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดำเนินการซ้ำในขั้นตอนที่ (2) – (4) จำนวน 30 รอบ (5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพีซีอาร์มาทำให้บริสทธิ์ โดยใช้ PureLink Quick PCR Purification kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Baltics, UAB) ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenkBank บนเว็บไซต์ของ NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) การศึกษาทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรมแบคทีเรียละลายฟอสเฟต เริ่มต้นโดยนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรีย จากนั้นเสมียร์ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมสีแกรมด้วยสีย้อมแกรม (K001-1KT, Hi Media, Mumbai, India) ตามวิธีการ Hucker method (Doetsch, 1981) นำไปส่องภายใต้กล่องจุลทรรศน์ (Olympus BX43, Olympus, Tokyo, Japan) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อตรวจสอบการติดสีแกรมและลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย ส่วนการศึกษาทางชีวเคมีของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต โดยศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ glucose, fructose, galactose, mannose, arabinose, ribose, xylose, cellobiose, maltose, sucrose, lactose, trehalose, raffinose และ carboxymethyl cellulose

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกได้

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต เป็นการหาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ซึ่งศึกษาทีละปัจจัย (one factor at a time; OFAC) โดยทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้ปริมาตร

ศรีนครินทรวิโรฒ

เพาะเลี้ยง (working volume) 100 มิลลิลิตร (อาหารเพาะเลี้ยง 90 มิลลิลิตร และแบคทีเรียเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร) เริ่มต้นศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในอาหาร Nutrient broth ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 6.0 – 9.0 เมื่อทราบค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว จึงศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในอาหาร Nutrient broth ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 - 30 กรัมต่อลิตร นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตด้วยวิธี standard plate count

6. การผลิตแบคทีเรียละลายฟอสเฟตผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย และทดสอบผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตผงต่อการงอกและการเจริญของมะเขือเทศในระยะกล้า

การผลิตแบคทีเรียละลายฟอสเฟตผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ดำเนินการโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายฟอสเฟต SM-P013B, SM-P020B, SM-P025B, SM-P027B, SM-P029B และ SM-P033B ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตแต่ละไอโซเลท บ่มที่อุณภูมิห้อง ให้เจริญแบคทีเรียเจริญเข้าสู่ระยะ late log phase เก็บตัวอย่างหาจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นด้วยวิธี Standard plate count นำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตแต่ละไอโซเลท ปริมาตร 2 ลิตร ไปทำผงแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) โดยดำเนินการที่อุณหภูมิขาเข้า 110 และ 120 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างผงแบคทีเรียที่ได้หาจำนวนแบคทีเรียหลังการทำผงด้วยวิธี Standard plate count นำแบคทีเรียผงที่ได้ทดสอบการยับยั้งการงอกและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในระยะกล้า โดยฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของเมล็ดเมล็ดมะเขือเทศโดยดัดแปลงวิธีการของ Lwin *et al*., (2012) คือ ชั่งเมล็ด 0.5 กรัม ใส่ในจานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติม 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite ให้ท่วมเมล็ด แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที เท 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite ทิ้ง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพื่อล้าง 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite ประมาณ 2 – 3 ครั้ง นำเมล็ดมะเขือเทศผึ่งในตู้ปลอดเชื้อ (Dwyer Mark II 25 manometer, Dwyer Instruments Inc., Michigan City, USA) เติมผงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตแต่ละไอโซเลท 0.5 กรัม เพื่อคลุกเมล็ดมะเขือเทศ สำหรับกรรมวิธีควบคุมจะไม่คลุกผงแบคทีเรียกับเมล็ด นำเมล็ดมะเขือเทศเพาะในถาดเพาะชำขนาด 104 หลุม ที่บรรจุพีทมอสเป็นวัสดุเพาะ รดน้ำเช้า-เย็น ทุกวัน ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดมะเขือเทศที่ระยะเวลา 7 วันหลังการเพาะ และวัดความสูงของต้นกล้าก่อนย้ายปลูกที่ระยะเวลา 21 วัน หลังการเพาะ คัดเลือกแบคทีเรียเพื่อใช้ผลิตเป็นต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต โดยพิจารณาจากข้อมูลผลการผลิตแบคทีเรียละลายฟอสเฟตผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย และผลทดสอบผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตผงต่อการงอกและการเจริญของมะเขือเทศในระยะกล้า

7. การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Pseudomonas fluorescens* SM-P025B ในต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ที่สภาวะการเก็บรักษาต่าง ๆ

ในการศึกษาใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ซึ่งได้ถูกคัดเลือกเพื่อใช้ผลิตเป็นต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *P. fluorescens*

ศูนย์วิทยทรัพยากร

SM-P025B ในต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ที่สภาวะการเก็บรักษาต่าง ๆ ทำการทดลองโดยนำต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต แบ่งบรรจุใส่ถุงอลูมิเนียมฟอยล์ทึบแสง ขนาด 9 × 13 เซนติเมตร ปริมาณถุงละ 20 กรัม จำนวน 30 ถุง ปิดปากถุงให้สนิท สุ่มแบ่ง 3 ส่วน ส่วนละ 10 ถุง นำไปเก็บรักษาในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง (25 - 33 องศาเซลเซียส) และตู้บ่ม 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ที่มีชีวิตด้วยวิธี Standard plate count ทุก ๆ 30 วัน เป็นเวลา 6 เดือน

8. ศึกษาการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับการผลิตมะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าในสภาพกระถาง

การศึกษาการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับการผลิตมะเขือเทศ และพริกชี้ฟ้าในสภาพกระถาง วางแผนการทดลองแบบ 5×3 factorials ที่จัดในรูปแบบ RCB โดยมีปัจจัยที่ 1 คือ อัตราส่วนเมล็ดพืชกับต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต มี 5 ระดับ ได้แก่ 1:0 1:0.2 1:0.4 1:0.6 และ 1:0.8 (กรัม : กรัม) ปัจจัยที่ 2 คือ ปริมาณปุ๋ยเคมี 3 ระดับ ได้แก่ 1.12-0.75-0.56, 1.12-0.64-0.56, 1.12-0.53-0.56 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อดิน 15 กิโลกรัม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้หน่วยการทดลองละ 3 กระถาง

(1) มะเขือเทศ ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของเมล็ดมะเขือเทศ โดยดัดแปลงวิธีการของ Lwin *et al*., (2012) คือ ชั่งเมล็ด 0.5 กรัม ใส่ในจานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติม 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite ให้ท่วมเมล็ด แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที เท 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite ทิ้ง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพื่อล้าง 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite ประมาณ 2 – 3 ครั้ง นำเมล็ดพืชมะเขือเทศผึ่งในตู้ปลอดเชื้อ (Dwyer Mark II 25 manometer, Dwyer Instruments Inc., Michigan City, USA) คลุกเคลือบเมล็ดมะเขือเทศกับต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0 1:0.2 1:0.4 1:0.6 และ 1:0.8 (กรัม : กรัม) นำเมล็ดมะเขือเทศเพาะในถาดเพาะชำขนาด 104 หลุม ที่บรรจุพีทมอสเป็นวัสดุเพาะ รดน้ำเช้า-เย็น ทุกวัน เมื่อต้นกล้าอายุได้ 21 วัน ทำการย้ายลงปลูกในกระถางขนาด 14 นิ้ว ซึ่งบรรจุดิน 15 กิโลกรัมต่อกระถาง ใส่ปุ๋ยเคมีตามแผนการทดลองที่วางไว้ โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง คือครั้งแรกหลังปลูก 10 วัน ครั้งที่ 2 หลังจากปลูก 30 วัน ให้น้ำสม่ำเสมอตามความต้องของมะเขือเทศ การป้องกันกำจัดโรคและแมลง หลังย้ายปลูกสำรวจการระบาดของโรคและแมลงทุกสัปดาห์ หากพบพ่นด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร โดยพ่นซ้ำติดต่อกัน 2 ครั้ง และสลับชนิดสารเคมี เพื่อป้องกันการดื้อสารเคมี บันทึกผลการทดลองสมบัติกายภาพ เคมี และชีวภาพของดินก่อน วัดความสูงของมะเขือเทศ และเก็บขอมูลผลผลิตของมะเขือเทศต่อต้น

(2) พริกชี้ฟ้า ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของเมล็ดพริกชี้ฟ้า โดยดัดแปลงวิธีการของ Lwin *et al*., (2012) คือ ชั่งเมล็ด 0.5 กรัม ใส่ในจานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติม 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite ให้ท่วมเมล็ด แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที เท 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite ทิ้ง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพื่อล้าง 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite ประมาณ 2 – 3 ครั้ง นำเมล็ดพริกผึ่งในตู้ปลอดเชื้อ (Dwyer Mark II 25 manometer, Dwyer Instruments Inc., Michigan City, USA) เตรียมเมล็ดก่อนเพาะกล้าโดยแช่เมล็ดในน้ำอุ่น 50 - 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นคลุกเคลือบเมล็ดพริกกับต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0 1:0.2 1:0.4 1:0.6 และ 1:0.8 (กรัม : กรัม) นำเมล็ดพริกเพาะใน

กรมวิชาการเกษตร

ถาดเพาะชำขนาด 104 หลุม ที่บรรจุพีทมอสเป็นวัสดุเพาะ รดน้ำเช้า-เย็น ทุกวัน เมื่อต้นกล้าพริกอายุได้ 25 - 30 วัน ทำการย้ายลงปลูกในกระถางขนาด 14 นิ้ว ซึ่งบรรจุดิน 15 กิโลกรัมต่อกระถาง ใส่ปุ๋ยเคมีตามแผนการทดลองที่วางไว้ โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง คือครั้งแรกหลังปลูก 7 - 10 วัน ครั้งที่ 2 หลังจากปลูก 30 - 40 วัน ให้น้ำสม่ำเสมอตามความต้องของพริก การป้องกันกำจัดโรคและแมลง หลังย้ายปลูกสำรวจการระบาดของโรคและแมลงทุกสัปดาห์ หากพบพ่นด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร โดยพ่นซ้ำติดต่อกัน 2 ครั้ง และสลับชนิดสารเคมี เพื่อป้องกันการดื้อสารเคมี บันทึกผลการทดลองสมบัติกายภาพ เคมี และชีวภาพของดินก่อน วัดความสูงของพริกชี้ฟ้า และเก็บขอมูลผลผลิตของพริกชี้ฟ้าต่อต้น

9. ศึกษาการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับการผลิตมะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดสอบ

การศึกษาการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับการผลิตมะเขือเทศ และพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ RCB ทำการทดลอง 3 ซ้ำ 8 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1	ต้นกล้าจากการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเก่า + ปุ๋ยเคมี 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 2	ต้นกล้าที่ไม่ได้ใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต + ปุ๋ยเคมี 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 3	ต้นกล้าจากการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต + ปุ๋ยเคมี 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 4	ต้นกล้าจากการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต + ปุ๋ยเคมี 24-14.4-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 5	ต้นกล้าจากการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต + ปุ๋ยเคมี 24-12.8-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 6	ต้นกล้าจากการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต + ปุ๋ยเคมี 24-11.2-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 7	ต้นกล้าที่ไม่ได้ใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต + ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี
กรรมวิธีที่ 8	ต้นกล้าจากการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต + ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี

เริ่มต้นการศึกษาโดยสำรวจแปลงทดสอบ เก็บตัวอย่างดินวิเคราะห์สมบัติกายภาพ เคมี และชีวภาพของดินก่อนปลูก เตรียมเมล็ดพันธุ์พืชทดสอบตามขั้นตอนของการทดสอบในสภาพกระถาง คลุกเคลือบเมล็ดพืชทดสอบกับต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0.8 (กรัม : กรัม) ซึ่งเป็นอัตราที่เหมาะสมจากการทดลองในสภาพกระถาง นำเมล็ดพืชทดสอบเพาะในถาดเพาะชำขนาด 104 หลุม ที่บรรจุพีทมอสเป็นวัสดุเพาะ รดน้ำเช้า-เย็น ทุกวัน จากนั้นย้ายต้นกล้าพืชทดสอบลงปลูกในแปลงทดลองขนาด 4 x 5 เมตร โดยปลูกพืชทดสอบลักษณะแถวคู่ ระยะระหว่างต้น 50 เซนติเมตร ระยะระหว่างแถว 80 เซนติเมตร ปลูกพืชทดสอบ 1 ต้นต่อหลุม ให้ปุ๋ยเคมีตามกรรมวิธีที่กำหนด ระยะเวลาการให้ปุ๋ยและดูแลรักษาให้ปฏิบัติตามตารางการปฏิบัติงานและวงจรชีวิตของมะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าตามเกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับพริก (GAP) วัดความสูงของพืชทดสอบทุก ๆ 30 วัน เก็บข้อมูลผลผลิต เช่น น้ำหนักผลผลิตต่อไร่ และขนาดของผลผลิต และเก็บตัวอย่างดินวิเคราะห์สมบัติกายภาพ เคมี และชีวภาพของดินหลังปลูก

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาของผลงาน ตุลาคม 2559 – กันยายน 2563

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สถานที่ 1) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กปผ.

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยเคมีดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กปผ.

3) แปลงเกษตรกร อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. คัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

จากการนำตัวอย่างดิน และรากพืชที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดชัยนาท นครราชสีมา และตราด จำนวน 27 ตัวอย่าง (Table 1) มาคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ก่อนนำไป spread บนอาหาร Pikovskaya agar และเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท ซึ่งมาจากตัวอย่างดินนาข้าว ต.เขาท่าพระ อ.เมืองชัยนาท จ. ชัยนาท จำนวน 3 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินไร่อ้อย ต.หนองระเวียง อ.พิมาย จ. นครราชสีมา จำนวน 4 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินไร่มันสำปะหลัง ต.หนองระเวียง อ.พิมาย จ. นครราชสีมา จำนวน 4 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินไร่อ้อย ต.หนองพลวง อ.จักราช จ.นครราชสีมา จำนวน 2 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินไร่มันสำปะหลัง ต.ลาดบัวขาว อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา จำนวน 2 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินไร่ทานตะวัน ต.ลาดบัวขาว อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา จำนวน 4 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินไร่อ้อย ต.ลาดบัวขาว อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา จำนวน 5 ไอโซเลท จากตัวอย่างรากกระถินณรงค์ ต.เขาสมิง อ.เขาสมิง จ.ตราดจำนวน 2 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินสวนสับปะรด ต.เขาสมิง อ.เขาสมิง จ.ตราด จำนวน 6 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินสวนปาล์มน้ำมัน ต.เขาสมิง อ.เขาสมิง จ.ตราด จำนวน 3 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินสวนมังคุด ต.เขาสมิง อ.เขาสมิง จ.ตราด จำนวน 5 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินสวนลองกอง ต.เขาสมิง อ.เขาสมิง จ.ตราด จำนวน 4 ไอโซเลท และจากตัวอย่างรากลองกอง ต.เขาสมิง อ.เขาสมิง จ.ตราด จำนวน 6 ไอโซเลท

Table 1 Description of phosphate solubilizing bacteria isolated from different rhizosphere soil and plant root

Sources of rhizosphere **soil and plant root**	**No. samples**	**Isolates of Phosphate solubilizing bacteria**
Paddy soil, Khao Tha Phra Sub District, Muang District, Chai Nat Province	2	SM-P001B, SM-P002B, SM-P003B
Soil of sugarcane field, Nong Rawiang Sub District, Phimai District, Nakhon Ratchasima Province	4	SM-P004B, SM-P005B, SM-P006B, SM-P007B
Soil of cassava field, Nong Rawiang Sub District, Phimai District, Nakhon Ratchasima Province	2	SM-P008B, SM-P009B, SM-P010B, SM-P011B

กรมวิชาการเกษตร

Table 1 cont.

Sources of rhizosphere **soil and plant root**	**No. samples**	**Isolates of Phosphate solubilizing bacteria**
Soil of sugarcane field, Nong Phluang Sub District, Chakkarat District, Nakhon Ratchasima Province	4	SM-P012B, SM-P013B
Soil of cassava field, Lat Bua Khao Sub District, Sikhio District, Nakhon Ratchasima Province	2	SM-P014B, SM-P015B
Soil of sunflower field, Lat Bua Khao Sub District, Sikhio District, Nakhon Ratchasima Province	1	SM-P016B, SM-P017B, SM-P018B, SM-P019B
Soil of sugarcane field, Lat Bua Khao Sub District, Sikhio District, Nakhon Ratchasima Province	1	SM-P020B, SM-P021B, SM-P022B, SM-P023B SM-P024B
Root of *Acacia auriculiformis* Cunn., Khao Saming Sub District, Khao Saming District, Trat Province	2	SM-P025B, SM-P026B
Soil of Pineapple Field, Khao Saming Sub District, Khao Saming District, Trat Province	2	SM-P027B, SM-P028B, SM-P029B, SM-P030B SM-P031B, SM-P032B
Soil of oil palm field, Khao Saming Sub District, Khao Saming District, Trat Province	2	SM-P033B, SM-P034B, SM-P035B
Soil of Mangosteen Field, Khao Saming Sub District, Khao Saming District, Trat Province	2	SM-P036B, SM-P037B, SM-P038B, SM-P039B SM-P040B
Soil of longkong field, Khao Saming Sub District, Khao Saming District, Trat Province	2	SM-P041B, SM-P042B, SM-P043B, SM-P044B
Longkong root, Khao Saming Sub District, Khao Saming District, Trat Province	1	SM-P045B, SM-P046B, SM-P047B, SM-P048B SM-P049B, SM-P050B

2. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต

การทดสอบความสามารถในการละลาย $Ca_3(PO_4)_2$ ในอาหาร Pikovskaya broth ที่มี $Ca_3(PO_4)_2$ เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น 8.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เกิดปฏิกิริยาระหว่าง Ca^{2+} และ PO_4^{3-} ได้สารประกอบ $Ca_3(PO_4)_2$ พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และสะสมในดิน พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถละลายและปลดปล่อยฟอสเฟตอยู่ในช่วง 40 - 171 มิลลิกรัม P ต่อลิตร โดย SM-P033B สามารถละลายและปลดปล่อยฟอสเฟตได้สูงสุด เท่ากับ 171 มิลลิกรัม P ต่อลิตร ขณะที่ SM-P008B สามารถละลายและปลดปล่อยฟอสเฟตต่ำสุด เท่ากับ 40 มิลลิกรัม P ต่อลิตร (Table 2) ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียที่สามารถละลายและปลดปล่อยฟอสเฟตในอาหารเหลวสูงสุดจำนวน 25 ไอโซเลทไปทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya agar ที่มีแหล่งฟอสเฟตต่าง ๆ ได้แก่ $AlPO_4$, $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างวงใสรอบโคโลนีในอาหาร Pikovskaya agar ซึ่งมี $AlPO_4$, $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ 15 ไอโซเลท ได้แก่ SM-P013B, SM-P014B, SM-P020B,

กรมวิชาการเกษตร

SM-P021B, SM-P022B, SM-P023B, SM-P025B, SM-P027B, SM-P029B, SM-P031B, SM-P032B, SM-P033B, SM-P034B, SM-P035B และ SM-P045B โดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ได้ถูกนำไปศึกษาความเป็นไปได้ในการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

Table 2 Initial pH and final pH of Pikrovskaya broth with 1.0% w/v tricalcium phosphate supplement and activity of phosphate solubilizing bacteria

Isolates	Initial pH	Final pH	Available phosphate (mg P/L)
SM-P001B	8.50	4.91	82
SM-P002B	8.50	5.13	91
SM-P003B	8.50	5.26	73
SM-P004B	8.50	4.50	96
SM-P005B	8.50	4.71	95
SM-P006B	8.50	4.98	65
SM-P007B	8.50	5.79	43
SM-P008B	8.50	6.12	40
SM-P009B	8.50	4.72	63
SM-P010B	8.50	5.00	100
SM-P011B	8.50	5.20	101
SM-P012B	8.50	4.54	100
SM-P013B	8.50	4.35	161
SM-P014B	8.50	4.44	113
SM-P015B	8.50	4.36	108
SM-P016B	8.50	4.57	78
SM-P017B	8.50	4.58	94
SM-P018B	8.50	5.20	65
SM-P019B	8.50	4.36	96
SM-P020B	8.50	4.31	147
SM-P021B	8.50	4.30	114
SM-P022B	8.50	4.18	112
SM-P023B	8.50	4.87	111
SM-P024B	8.50	4.26	100

กรมวิชาการเกษตร

Table 2 cont.

Isolates	Initial pH	Final pH	Available phosphate (mg P/L)
SM-P025B	8.50	4.70	142
SM-P026B	8.50	5.32	60
SM-P027B	8.50	4.67	122
SM-P028B	8.50	5.13	83
SM-P029B	8.50	4.62	121
SM-P030B	8.50	4.63	95
SM-P031B	8.50	4.44	120
SM-P032B	8.50	4.71	117
SM-P033B	8.50	4.50	171
SM-P034B	8.50	4.63	111
SM-P035B	8.50	4.68	118
SM-P036B	8.50	5.11	102
SM-P037B	8.50	5.24	59
SM-P038B	8.50	4.18	64
SM-P039B	8.50	5.61	53
SM-P040B	8.50	4.42	66
SM-P041B	8.50	5.52	56
SM-P042B	8.50	5.56	62
SM-P043B	8.50	4.28	89
SM-P044B	8.50	4.27	102
SM-P045B	8.50	4.40	112
SM-P046B	8.50	4.83	70
SM-P047B	8.50	4.74	84
SM-P048B	8.50	4.48	82
SM-P049B	8.50	4.47	54
SM-P050B	8.50	4.75	71

กรมวิชาการเกษตร

3. คัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีความเป็นไปได้ในการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

การคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีความเป็นไปได้ในการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตภายใต้สภาวะอุณภูมิสูง โดยนำสารละลายเซลล์แบคทีเรียบ่มที่อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที พบว่า ที่อุณภูมิ 100 องศาเซลเซียส แบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 62.18 - 92.51 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) โดย SM-P029B มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 92.51 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ SM-P031B มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดต่ำสุด เท่ากับ 62.18 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณภูมิ 120 องศาเซลเซียส แบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดอยู่ในช่วง 58.51 - 90.24 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) โดย SM-P013B มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เท่ากับ 90.24 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ SM-P014B มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดต่ำสุด เท่ากับ 58.51 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการทดลองสามารถคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีความเป็นไปได้ในการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเกิน 90 เปอร์เซ็นต์) ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ SM-P013B, SM-P020B, SM-P025B, SM-P027B, SM-P029B และ SM-P033B

Table 3 Survival rate of PSB isolates at high temperature incubation

Isolates	100 °C			120 °C		
	Viable cell (cfu/mL)		Survival rate (%)	Viable cell (cfu/mL)		Survival rate (%)
	Initial	Final		Initial	Final	
SM-P013B	1.22×10^{8}	1.12×10^{8}	91.80	1.22×10^{8}	1.10×10^{8}	90.24
SM-P014B	1.01×10^{8}	6.83×10^{7}	67.62	1.01×10^{8}	5.91×10^{7}	58.51
SM-P020B	9.86×10^{7}	8.92×10^{7}	90.47	9.86×10^{7}	8.88×10^{7}	90.06
SM-P021B	9.29×10^{7}	7.96×10^{7}	85.68	9.29×10^{7}	7.85×10^{7}	84.50
SM-P022B	9.91×10^{7}	8.73×10^{7}	88.09	9.91×10^{7}	8.61×10^{7}	86.88
SM-P023B	1.05×10^{8}	7.79×10^{7}	74.19	1.05×10^{8}	7.02×10^{7}	66.86
SM-P025B	8.98×10^{7}	8.29×10^{7}	92.32	8.98×10^{7}	8.08×10^{7}	89.98
SM-P027B	9.07×10^{7}	8.32×10^{7}	91.73	9.07×10^{7}	8.17×10^{7}	90. 08
SM-P029B	9.74×10^{7}	9.01×10^{7}	92.51	9.74×10^{7}	8.78×10^{7}	90.14
SM-P031B	1.01×10^{8}	6.28×10^{7}	62.18	1.01×10^{8}	6.02×10^{7}	59.60
SM-P032B	9.78×10^{7}	8.71×10^{7}	89.06	9.78×10^{7}	8.58×10^{7}	87.73
SM-P033B	1.07×10^{8}	9.88×10^{7}	92.34	1.07×10^{8}	9.64×10^{7}	90.16
SM-P034B	1.21×10^{8}	9.83×10^{7}	81.24	1.21×10^{8}	9.76×10^{7}	80.66
SM-P035B	9.41×10^{7}	8.07×10^{7}	85.76	9.41×10^{7}	7.98×10^{7}	84.80
SM-P045B	9.92×10^{7}	8.82×10^{7}	88.91	9.92×10^{7}	8.62×10^{7}	86.90

กรมวิชาการเกษตร

4. จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกได้

การจัดจำแนกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลาร์ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย ซึ่งมีขนาด 1,369 - 1,425 นิวคลีโอไทด์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTn search ผลการทดลองดังแสดงใน Table 4 คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SM-P013B (1,425 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Burkholderia latens* (NR_042632.1) เท่ากับ 99.58 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SM-P020B (1,419 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Burkholderia multivorans* (NR_029358.1) เท่ากับ 99.86 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SM-P025B (1,396 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Pseudomonas fluorescens* (NR_114476.1) เท่ากับ 99.51 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SM-P027B (1,369 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Curtobacterium oceanosedimentum* (NR_104839.1) เท่ากับ 98.83 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SM-P029B (1,406 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Bacillus velezensis* (NR_075005.2) เท่ากับ 99.65 เปอร์เซ็นต์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SM-P033B (1,408 นิวคลีโอไทด์) มีความเหมือน *Pantoea dispersa* (NR_116797.1) เท่ากับ 99.00 เปอร์เซ็นต์

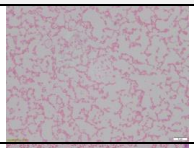
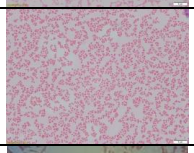
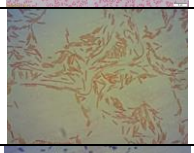
Table 4 Identification of PSB isolates by 16s rRNA gene

Isolates	No. nucleotide (bp)	Most closely bacteria species	Identities (%)	Accession number
SM-P013B	1,425	*Burkholderia latens*	99.58	NR_042632.1
SM-P020B	1,419	*Burkholderia multivorans*	99.86	NR_029358.1
SM-P025B	1,396	*Pseudomonas fluorescens*	99.51	NR_114476.1
SM-P027B	1,369	*Curtobacterium oceanosedimentum*	98.83	NR_104839.1
SM-P029B	1,406	*Bacillus velezensis*	99.65	NR_075005.2
SM-P033B	1,408	*Pantoea dispersa*	99.00	NR_116797.1

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยการศึกษาลักษณะของโคโลนี และการย้อมสีแบคทีเรียด้วยคริสตอลไวโอเลต (Crystal violet) และซาฟรานิน (Safranin) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามการติดสีแกรมและลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ไอโซเลท SM-P013B, SM-P020B, SM-P025B และSM-P033B เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากติดสีแดงของซาฟรานิน ขณะที่ไอโซเลท SM-P027B และ SM-P029B เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Table 5) เนื่องจากติดสีน้ำเงินของคริสตอลไวโอเลต นอกจากนี้ยัง พบว่า แบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท มีรูปร่างเป็นท่อน (Bacilli) (Table 5)

กรมวิชาการเกษตร

Table 5 Gram stains of PSB isolates were cultured on nutrient agar at 37 °C for 24 hr.

Isolates	Gram stains	
Burkholderia latens SM-P013B		Gram stain: negative Cell shape: Bacilli
Burkholderia multivorans SM-P020B		Gram stain: negative Cell shape: Bacilli
Pseudomonas fluorescens SM-P025B		Gram stain: negative Cell shape: Bacilli
Curtobacterium sp. SM-P027B		Gram stain: positive Cell shape: Bacilli
Bacillus velezensis SM-P029B		Gram stain: positive Cell shape: Bacilli
Pantoea dispersa SM-P033B		Gram stain: negative Cell shape: Bacilli

การศึกษาทางชีวเคมี โดยศึกษาความสามารถการใช้แหล่งคาร์บอน (น้ำตาล) ชนิดต่าง ๆ เพื่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (Table 6) ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตทั้งหมด 6 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีมากในอาหารที่มี glucose, fructose และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน ขณะที่เจริญได้ไม่ค่อยดี ในอาหารที่มีน้ำตาลเพนโตส ได้แก่ arabinose, ribose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอน และเจริญได้ไม่ดีในอาหารที่มี carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอน

Table 6 Utilization of carbon sources by PSB isolates

Carbon sources	SM-P013B	SM-P020B	SM-P025B	SM-P027B	SM-P029B	SM-P033B
Glucose	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Fructose	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Galactose	+++++	+++++	++++	++++	++++	+++++
Mannose	++++	++++	++++	++++	+++++	++++
Arabinose	++	++	++	+++	++	++
Ribose	++	++	++	++	++	++

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 6 cont.

Carbon sources	SM-P013B	SM-P020B	SM-P025B	SM-P027B	SM-P029B	SM-P033B
Xylose	+++	+++	++	+++	++	++
Cellobiose	++++	+++++	++++	+++++	++++	++++
Maltose	++++	++++	++++	+++++	++++	++++
Sucrose	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Lactose	+++	+++	++++	++++	+++	+++
Trehalose	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Raffinose	++++	++++	++++	+++++	++++	++++
CMC	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : - คือ แบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโต

+, ++, +++, ++++ และ +++++ คือ ระดับความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโต (วัดจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเพาะเลี้ยง)

5. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกได้

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต เป็นการหาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ซึ่งศึกษาทีละปัจจัย (one factor at a time; OFAC) เริ่มต้นศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกได้ โดยใช้อาหาร Nutrient broth ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร เท่ากับ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ผลการศึกษาพบว่า ไอโซเลท SM-P013B, SM-P020B และ SM-P027B เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง เท่ากับ 6.5 (Figure 1) ขณะที่ไอโซเลท SM-P025B และ SM-P033B เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง เท่ากับ 7.0 (Figure 1) ส่วนไอโซเลท SM-P029B เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง เท่ากับ 8.0 (Figure 1)

ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกได้ โดยใช้อาหาร Nutrient broth ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงให้เท่ากับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตแต่ละไอโซเลท แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ผลการศึกษาพบว่า ไอโซเลท SM-P013B และ SM-P033B เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร (Figure 2) ขณะที่ไอโซเลท SM-P020B, P025B, SM-P027B และ SM-P029B เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (Figure 2)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

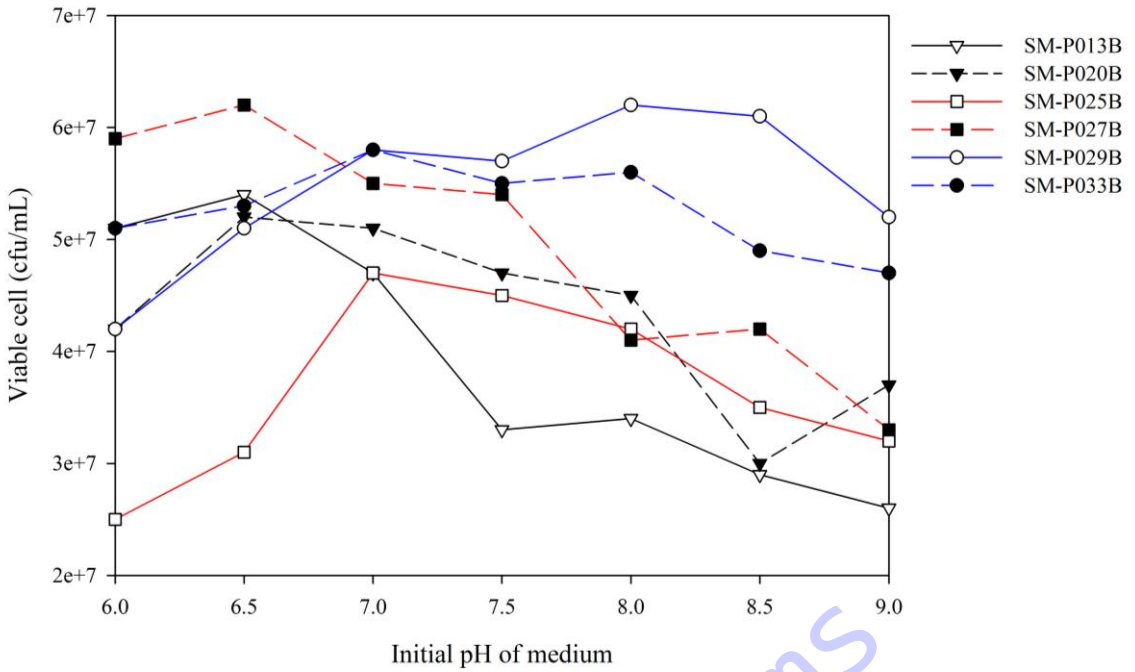


Figure 1 Effect of initial pH on growth of phosphate solubilizing bacteria

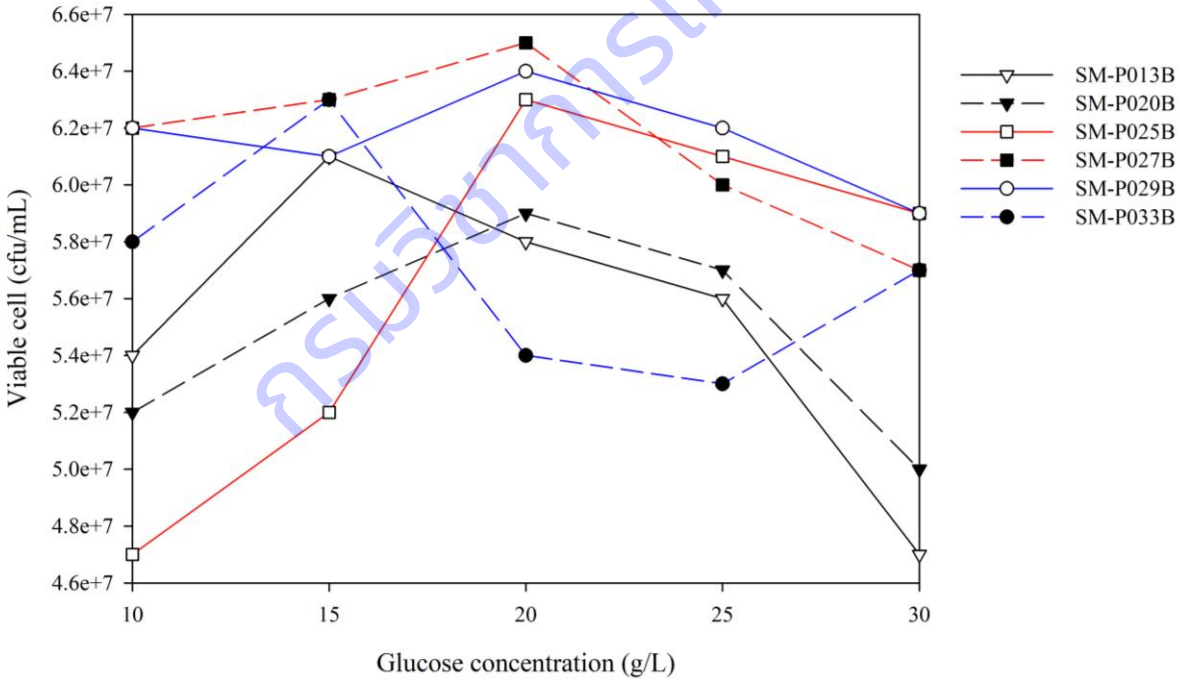


Figure 2 Effect of glucose concertation on growth of phosphate solubilizing bacteria

กรมวิชาการเกษตร

6. ผลการผลิตแบคทีเรียละลายฟอสเฟตผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย และผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตผงต่อการงอกและการเจริญของมะเขือเทศในระยะกล้า

จากการศึกษาหาสภาวะในการผลิตผงแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่า ที่อุณหภูมิขาเข้า 110 องศาเซลเซียส อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตหลังการทำผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย อยู่ระหว่าง 76.92 - 92.79 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3) โดย SM-P013B มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด เท่ากับ 92.79 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ SM-P025B, SM-P020B, SM-P033B, SM-P029B และ SM-P027B มีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 88.10 87.63 87.62 85.31 และ 76.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ที่อุณหภูมิขาเข้า 120 องศาเซลเซียส อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตหลังการทำผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย อยู่ระหว่าง 69.54 - 82.79 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4) โดย SM-P013B มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด เท่ากับ 82.79 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ SM-P025B, SM-P029B, SM-P033B, SM-P020B และ SM-P027B มีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 81.11, 80.16, 80.16, 77.12 และ 69.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

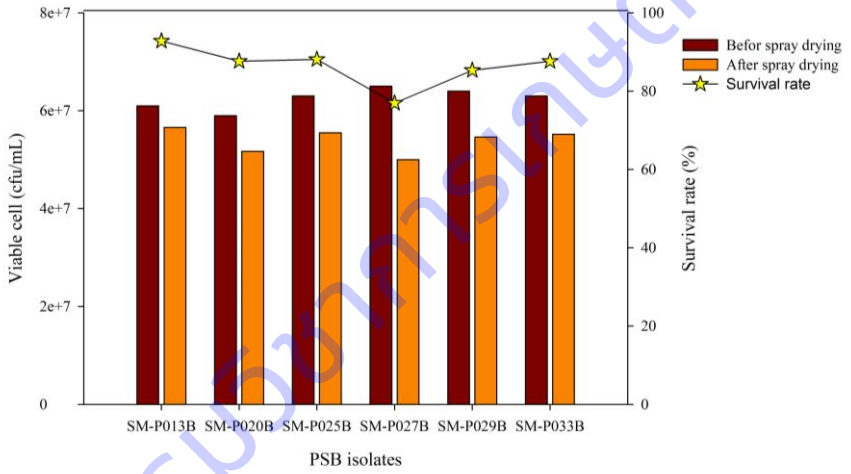


Figure 3 Survival of phosphate solubilizing bacteria after spray drying at 110 °C

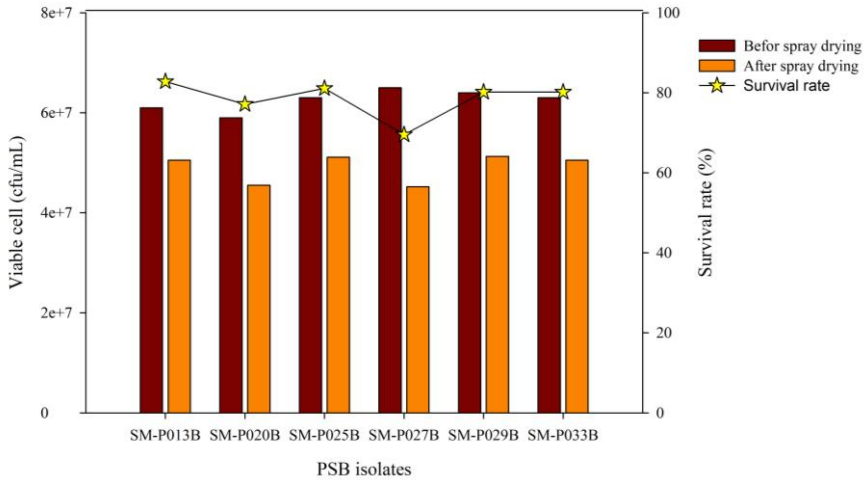


Figure 4 Survival of phosphate solubilizing bacteria after spray drying at 120 °C

ศรีนครินทร์

จากการทดสอบผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตผงแต่ละไอโซเลทต่อการงอกและการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในระยะกล้า พบว่า เมื่อคลุกเมล็ดมะเขือเทศด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตผงก่อนนำไปเพาะมีเปอร์เซ็นต์การงอกอยู่ระหว่าง 80.77 - 92.31 เปอร์เซ็นต์ โดยการคลุกเมล็ดมะเขือเทศด้วยผง SM-P025B มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดเท่ากับ 92.31 เปอร์เซ็นต์ (เปรียบเทียบกับเมล็ดมะเขือเทศที่ไม่ได้คลุกผงแบคทีเรียละลายฟอสเฟต) รองลงมาคือการคลุกเมล็ดมะเขือเทศด้วยผง SM-P020B, SM-P013B, SM-P033B, SM-P029B และ SM-P027B ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 88.46, 84.62, 84.62, 80.77 และ 72.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อวัดความสูงต้นกล้ามะเขือเทศที่เจริญเติบโต 21 วันหลังการเพาะ พบว่า ความสูงของต้นกล้ามะเขือเทศที่คลุกเมล็ดมะเขือเทศด้วยแบคทีเรียผงทุกไอโซเลทมีความสูงเฉลี่ย (10.95 - 12.35 เซนติเมตร) สูงกว่าต้นกล้าเมล็ดมะเขือเทศที่ไม่ได้คลุกด้วยแบคทีเรียผง (10.65 เซนติเมตร) โดยต้นกล้ามะเขือเทศที่คลุกเมล็ดด้วยผง SM-P029B มีความสูงที่ 21 วันหลังการเพาะสูงสุด เท่ากับ 12.35 เซนติเมตร รองลงมาคือต้นกล้ามะเขือเทศที่คลุกเมล็ดด้วยผง SM-P025B, SM-P027B, SM-P013B, SM-P020B และ SM-P033B ซึ่งมีความความสูง เท่ากับ 12.30, 12.26, 12.00, 11.96 และ 10.95 เซนติเมตร ตามลำดับ จากการผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า SM-P025B มีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพรูปแบบผงโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากไม่ยับยั้งการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในระยะต้นกล้า

Table 7 Effect of phosphate solubilizing bacteria isolates on tomato seeds germinating and growth

Isolates	Seeds germinating after 7 days (%)	Tomato plants height after 21 days (cm)
Control	100.00	10.65
SM-P013B	84.62	12.00
SM-P020B	88.46	11.96
SM-P025B	92.31	12.30
SM-P027B	72.31	12.26
SM-P029B	80.77	12.35
SM-P033B	84.62	10.95

7. อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Pseudomonas fluorescens* SM-P025B ในต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ที่สภาวะการเก็บรักษาต่าง ๆ

การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดแบคทีเรียซึ่งผลิตจากแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B โดยบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ทึบแสง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง และ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทุก 30 วัน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า *P. fluorescens* SM-P025B ที่มีชีวิตมีจำนวนลดลงตามระยะเวลาเก็บรักษา โดย

กรมวิชาการเกษตร

อุณหภูมิเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีจำนวน *P. fluorescens* SM-P025B ที่รอดชีวิตในระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือนสูงสุด เท่ากับ 2.18 $\times 10^8$ โคโลนีต่อกรัม รองลงมาคือที่อุณหภูมิห้อง และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีจำนวน *P. fluorescens* SM-P025B ที่รอดชีวิต เท่ากับ 1.16 $\times 10^8$ โคโลนีต่อกรัม และ 8.40 $\times 10^7$ โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดแบคทีเรีย สามารถเก็บรักษาได้นาน 6 เดือน โดยสามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง

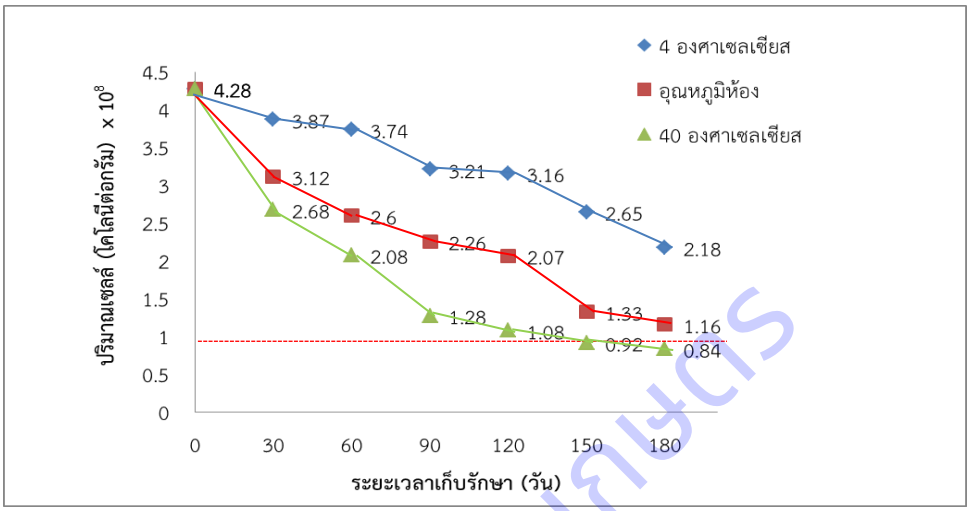


Figure 5 Survival of *P. fluorescens* SM-P025B in aluminum foil zip lock bag stored at 4 °C, room temperature (25 – 33 °C) and 40 °C for 6 months

8. ผลการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ และพริกชี้ฟ้าในสภาพกระถาง

8.1 ผลการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ

(1) การเจริญเติบโตระยะกล้า

การศึกษาผลของต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ต่อการเจริญของมะเขือเทศในระยะกล้า โดยคลุกเคลือบเมล็ดมะเขือเทศที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวเมล็ดด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วนเมล็ดพืชต่อต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต เท่ากับ 1:0 1:0.2 1:0.4 1:0.6 และ 1:0.8 ซึ่งผลการทดลองพบว่า การคลุกเคลือบเมล็ดมะเขือเทศด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วนเมล็ดต่อปุ๋ยชีวภาพ เท่ากับ 1 : 0.8 ได้ต้นกล้ามะเขือเทศที่มีความสูงที่สุด เท่ากับ 13.53 เซนติเมตร (21 วันหลังการเพาะ)

กรมวิชาการเกษตร

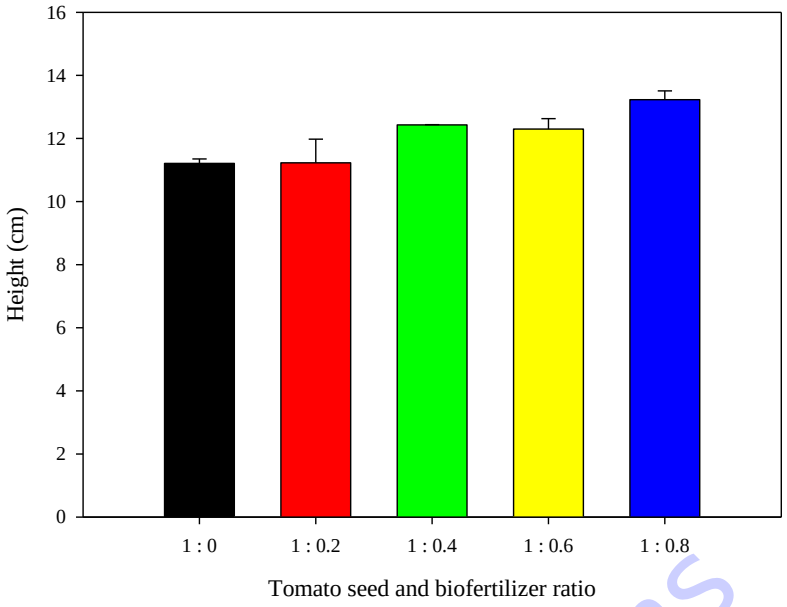


Figure 6 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on tomato seedling growth

(2) การเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาพกระถาง

การศึกษาผลของต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ต่อการเจริญของมะเขือเทศ ทำการย้ายต้นกล้ามะเขือเทศ ที่มีอายุ 21 วันหลังการเพาะ (วันที่ 2 กรกฎาคม 2562) ลงปลูกในกระถาง ขนาด 14 นิ้ว ซึ่งบรรจุดิน 15 กิโลกรัมต่อกระถาง โดยดินที่ใช้ในการศึกษาทดลองมีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.72 ค่าแคตไอออนที่แลกเปลี่ยนได้ เท่ากับ 23.90 เซนติโมลต่อกิโลกรัม อินทรียวัตถุ เท่ากับร้อยละ 1.08 ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ เท่ากับ 7.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 136.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสามารถกำหนดอัตราการใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร ดังนี้ ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 1.12-0.75-0.56 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อดิน 15 กิโลกรัม (24-16-12 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่) โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใส่ 1/2N+P+K เมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้ดีแล้ว และครั้งที่ 2 ใส่ 1/2N หลังจากย้ายปลูกแล้ว 30 วัน จากการทดลองพบว่า ต้นกล้าจากการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วน 1:0.6 (กรัมต่อกรัม) ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมี 1.12-0.75-0.56 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อดิน 15 กิโลกรัม (T10) มีความสูงหลังจากย้ายปลูก 15, 45 และ 75 วัน สูงสุด เท่ากับ 33.56, 58.00 และ 97.89 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 8)

กรมวิชาการเกษตร

Table 8 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on tomato plant growth under pot experiments

Treatments			Tomato height (cm)		
	Seed and biofertilizer ratio	Chemical fertilizer (g N-P_2O_5-K_2O/15 kg soil)	15 Days after planting	45 Days after planting	75 Days after planting
T 1	1:0	1.12-0.75-0.56	26.56d	62.89a	97.00ab
T 2	1:0	1.12-0.64-0.56	25.62d	60.62a	97.08ab
T 3	1:0	1.12-0.53-0.56	25.76d	60.45a	97.42a
T 4	1:0.2	1.12-0.75-0.56	30.67abc	61.89a	98.33a
T 5	1:0.2	1.12-0.64-0.56	30.26c	60.31a	93.64ab
T 6	1:0.2	1.12-0.53-0.56	29.85c	58.97a	90.61ab
T 7	1:0.4	1.12-0.75-0.56	32.56abc	61.33a	97.56a
T 8	1:0.4	1.12-0.64-0.56	31.35abc	61.63a	99.99a
T 9	1:0.4	1.12-0.53-0.56	30.21c	59.47a	92.61ab
T 10	1:0.6	1.12-0.75-0.56	33.56a	58.00a	97.89a
T 11	1:0.6	1.12-0.64-0.56	30.44bc	59.50a	93.52ab
T 12	1:0.6	1.12-0.53-0.56	32.21abc	57.53a	85.49b
T 13	1:0.8	1.12-0.75-0.56	33.33ab	60.00a	100.22a
T 14	1:0.8	1.12-0.64-0.56	33.33ab	59.56a	95.76ab
T 15	1:0.8	1.12-0.53-0.56	30.97abc	48.12b	88.55ab
		F-test[1/]	**	**	*
		% CV	9.40	7.36	6.81

Remark [1/] *, ** = significantly different at 0.05 and 0.01 probability level, respectively, means with different letters within column indicate significant difference according to LSD

กรมวิชาการเกษตร

8.2 ผลการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ต่อการเจริญเติบโตของพริกชี้ฟ้า

(1) การเจริญเติบโตระยะกล้า

การศึกษาผลของต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ต่อการเจริญของมะเขือเทศในระยะกล้า โดยคลุกเคลือบเมล็ดมะเขือเทศที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวเมล็ดด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วนเมล็ดพืชต่อต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต เท่ากับ 1:0 1:0.2 1:0.4 1:0.6 และ 1:0.8 ซึ่งผลการทดลองพบว่า การคลุกเคลือบเมล็ดมะเขือเทศด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วนเมล็ดต่อปุ๋ยชีวภาพ เท่ากับ 1 : 0.8 ได้ต้นกล้าพริกชี้ฟ้าที่มีความสูง อยู่ระหว่าง 11.18 – 12.03

เซนติเมตร (28 วันหลังการเพาะ) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างกับต้นกล้าพริกชี้ฟ้าที่ไม่ได้คลุกเคลือบเมล็ดด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต (1 : 0)

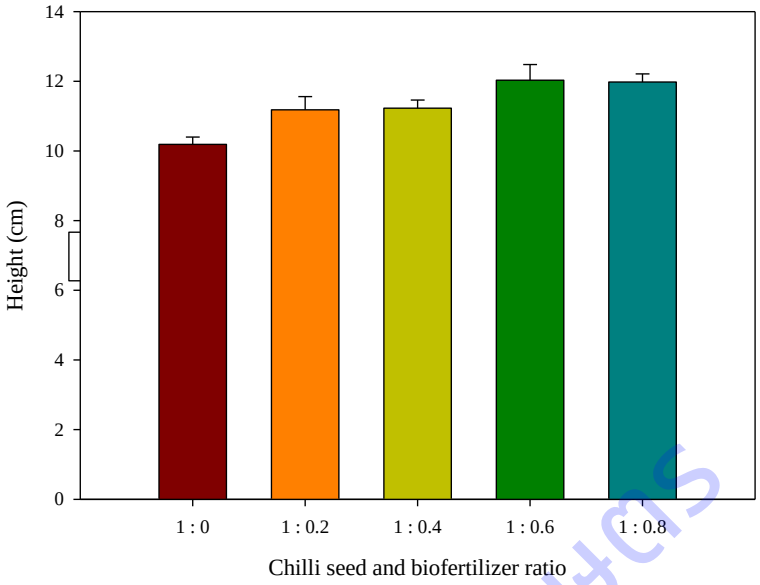


Figure 7 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on chili seedling growth

(2) การเจริญเติบโตของพริกชี้ฟ้าในสภาพกระถาง

การศึกษาผลของต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ต่อการเจริญของพริกชี้ฟ้า ทำการย้ายต้นกล้ามะเขือเทศ ที่มีอายุ 28 วันหลังการเพาะ (วันที่ 25 มีนาคม 2562) ลงปลูกในกระถางขนาด 14 นิ้ว ซึ่งบรรจุดิน 15 กิโลกรัมต่อกระถาง โดยดินที่ใช้ในการศึกษาทดลองมีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.72 ค่าแคตไอออนที่แลกเปลี่ยนได้ เท่ากับ 23.90 เซนติโมลต่อกิโลกรัม อินทรียวัตถุ เท่ากับร้อยละ 1.08 ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ เท่ากับ 7.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 136.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสามารถกำหนดอัตราการใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร ดังนี้ ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 1.12-0.75-0.56 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อดิน 15 กิโลกรัม (24-16-12 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่) โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใส่ 1/2N+P+K เมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้ดีแล้ว และครั้งที่ 2 ใส่ 1/2N หลังจากย้ายปลูกแล้ว 30 วัน จากการทดลองพบว่า ต้นกล้าพริกชี้ฟ้าที่ได้จากการคลุกเคลือบเมล็ดด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในอัตราส่วน 1:0.8 (กรัมต่อกรัม) ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมี 1.12-0.75-0.56 กรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อดิน 15 กิโลกรัม (T13) มีความสูงหลังจากย้ายปลูก 15, 45 และ 75 วัน สูงสุด เท่ากับ 16.78, 35.28 และ 49.67 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 9)

ศรีปทุมการเกษตร

Table 9 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on chili plant growth under pot experiments

Treatments			Chili height (cm)		
	Seed and biofertilizer ratio	Chemical fertilizer (g N-P_2O_5-K_2O/15 kg soil)	15 Days after planting	45 Days after planting	75 Days after planting
T 1	1:0	1.12-0.75-0.56	12.57de	28.39de	42.63cde
T 2	1:0	1.12-0.64-0.56	12.13f	24.23f	42.95cde
T 3	1:0	1.12-0.53-0.56	11.65f	24.27f	38.01f
T 4	1:0.2	1.12-0.75-0.56	12.94cde	29.33cde	42.56cde
T 5	1:0.2	1.12-0.64-0.56	11.94ef	27.42ef	41.11def
T 6	1:0.2	1.12-0.53-0.56	11.84ef	27.17ef	39.89df
T 7	1:0.4	1.12-0.75-0.56	14.89ab	34.89ab	44.56bcd
T 8	1:0.4	1.12-0.64-0.56	13.61bcde	30.89bcde	42.74cde
T 9	1:0.4	1.12-0.53-0.56	13.72abcd	31.47abcd	40.23df
T 10	1:0.6	1.12-0.75-0.56	14.10ab	34.22ab	48.78a
T 11	1:0.6	1.12-0.64-0.56	13.77ab	33.75ab	47.51ab
T 12	1:0.6	1.12-0.53-0.56	13.68ab	33.64ab	43.33cde
T 13	1:0.8	1.12-0.75-0.56	16.78a	35.28a	49.67a
T 14	1:0.8	1.12-0.64-0.56	15.21a	35.21a	46.19abc
T 15	1:0.8	1.12-0.53-0.56	14.27abc	33.12abc	46.27abc
		F-test[1/]	**	**	**
		% CV	12.20	13.55	8.40

Remark [1/] ** = significantly different at 0.01 probability level, means with different letters within column indicate significant difference according to LSD

กรมวิชาการเกษตร

9. ผลการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับการผลิตมะเขือเทศ และพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดสอบ

9.1 ผลการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับการผลิตมะเขือเทศ

การทดลองใช้แปลงเกษตรกรในพื้นที่ อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 1 ไร่ ที่มีการปลูกพริกหลังนาสลับกับถั่วเขียวหลังนามาอย่างต่อเนื่อง ผลวิเคราะห์ตัวอย่างดินแปลงทดลองการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับการผลิตมะเขือเทศ พบว่า ที่ระดับความลึกของดิน 0-15 เซนติเมตร มีเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.63 ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับต่ำ เท่ากับ 1.16 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับต่ำ (20.17 และ 58.23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) (Table 10) จากค่าวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน สามารถ

กำหนดอัตราการใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร ดังนี้ ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใส่ 1/2N+P+K หลังจากย้ายปลูกแล้วประมาณ 7 วัน หรือเมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้ดีแล้ว ครั้งที่ 2 ใส่ 1/2N หลังจากย้ายปลูกแล้วประมาณ 30 วัน

Table 10 Soil properties of tomato experimental plots before planting

Soil depth (cm)	Texture	pH H_2O (1:1)	OM (%)	Avail. P (mg/kg)	Exch. K (mg/kg)
0-15	Sandy loam	7.63	1.16	20.17	58.23
15-30	-	6.87	0.93	14.79	52.54

(1) การเจริญเติบโตของมะเขือเทศ

จากการทดลองการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับปุ๋ยเคมีในการผลิตมะเขือเทศ ผลการทดลองพบว่า หลังย้ายต้นกล้าลงปลูก 30 วัน ความสูงของต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T2) และกรรมวิธีที่ใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับปุ๋ยเคมีทุกกรรมวิธี (T3 T4 T5 และ T6) มีความสูงของต้นมะเขือเทศไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่ 90 วัน หลังย้ายต้นกล้าลงปลูก พบว่า การใช้ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T2) และการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเก่าร่วมกับปุ๋ยเคมี 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T1) มีความสูงของต้นมะเขือเทศสูงกว่าการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับปุ๋ยเคมี 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 11) ส่วนผลต่อทรงพุ่มของต้นมะเขือ พบว่า หลังย้ายต้นกล้าลงปลูก 30 วัน กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T2) และกรรมวิธีที่ใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเก่าร่วมกับปุ๋ยเคมี 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T1) ให้ขนาดทรงพุ่มของต้นมะเขือเทศสูงสุด แต่หลังจาก 60 วัน หลังย้ายต้นกล้าลงปลูก พบว่าขนาดทรงพุ่มของต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T2) และกรรมวิธีที่ใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับปุ๋ยเคมีทุกกรรมวิธี (T1 T3 T4 T5 และ T6) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 12)

ศรีนครินทร์

Table 11 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on tomato height

	Treatments		Tomato height (cm)		
	Biofertilizer	Chemical fertilizer (kg N-P_2O_5-K_2O / rai)	30 Days after planting	60 Days after planting	90 Days after planting
T1	*Talaromyces sp.*	24-16-16	39.10a	73.59a	83.96a
T2	-	24-16-16	39.17a	73.67a	83.01a
T3	*P. fluorescens*	24-16-16	39.14**a**	71.05a	79.98b
T4	*P. fluorescens*	24-14.4-16	38.77a	66.99b	78.50bc
T5	*P. fluorescens*	24-12.8-16	38.73a	65.26b	78.19bc
T6	*P. fluorescens*	24-11.2-16	37.92ab	65.58b	77.20cd
T7	-	-	36.35b	64.19b	75.33de
T8	*P. fluorescens*	-	36.23b	64.87b	75.29e
	F-test[1/]		**	**	**
	CV (%)		3.23	5.85	4.09

Remark [1/] ** = significantly different at 0.01 probability level, means with different letters within column indicate significant difference according to LSD

Table 12 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on tomato canopy width

	Treatments		Tomato canopy width (cm)		
	Biofertilizer	Chemical fertilizer (kg N-P_2O_5-K_2O / rai)	30 Days after planting	60 Days after planting	90 Days after planting
T1	*Talaromyces sp.*	24-16-16	21.09ab	48.04a	50.40a
T2	-	24-16-16	21.73a	47.15a	49.91a
T3	*P. fluorescens*	24-16-16	19.56bc	48.16a	50.42a
T4	*P. fluorescens*	24-14.4-16	19.20c	47.06a	48.33a
T5	*P. fluorescens*	24-12.8-16	18.67c	47.02a	48.85a
T6	*P. fluorescens*	24-11.2-16	19.01c	46.66a	49.24a
T7	-	-	18.18c	33.37b	40.86b
T8	*P. fluorescens*	-	18.59c	34.05b	41.82b
	F-test[1/]		**	**	**
	CV (%)		6.45	14.42	8.14

Remark [1/] ** = significantly different at 0.01 probability level, means with different letters within column indicate significant difference according to LSD

กรมวิชาการเกษตร

(2) ผลผลิตของมะเขือเทศ

จากการทดลองการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับปุ๋ยเคมีในการผลิตมะเขือเทศ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเก่าและต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T1 และ T3) และการใช้ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ เพียงอย่างเดียว (T2) ให้ผลผลิตของมะเขือเทศไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 13) แต่เมื่อเปรียบเทียบการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับการลดปุ๋ยเคมี 24-14.4-16, 24-12.8-16 และ 24-11.2-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T4 T5 และ T6) และการใช้ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ เพียงอย่างเดียว (T2) พบว่า การลดปุ๋ยเคมีเหลือ 24-12.8-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T5) ให้ผลผลิตของมะเขือเทศไม่แตกต่างทางสถิติจากการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ เพียงอย่างเดียว (T2) แต่เมื่อลดปุ๋ยเคมี 24-11.2-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T6) ให้ผลผลิตที่ต่ำการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ เพียงอย่างเดียว (T2) (Table 12) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 13 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on tomato yield

Treatments			Tomato yield
	Biofertilizer	Chemical fertilizer (kg N-P_2O_5-K_2O / rai)	(kg/rai)
T1	*Talaromyces sp.*	24-16-16	871a
T2	-	24-16-16	878a
T3	*P. fluorescens*	24-16-16	862a
T4	*P. fluorescens*	24-14.4-16	815a
T5	*P. fluorescens*	24-12.8-16	688ab
T6	*P. fluorescens*	24-11.2-16	625b
T7	-	-	227c
T8	*P. fluorescens*	-	222c
	F-test[1/]		*
	% CV		28.47

Remark [1/] * = significantly different at 0.05 probability level, means with different letters within column indicate significant difference according to LSD

กรมวิชาการเกษตร

9.2 ผลการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับการผลิตพริกชี้ฟ้า

การทดลองใช้แปลงเกษตรกรในพื้นที่ อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 1 ไร่ ที่มีการปลูกพริกหลังนาสลับกับถั่วเขียวหลังนามาอย่างต่อเนื่อง ผลวิเคราะห์ตัวอย่างดินแปลงทดลองการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับการผลิตมะเขือเทศ พบว่า ที่ระดับความลึกของดิน 0-15 เซนติเมตร มีเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.24 ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับต่ำ (0.98 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับต่ำ (13.68 และ 57.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) (Table 14) จากค่าวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน สามารถกำหนดอัตราการใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร ดังนี้ ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใส่ 1/2N+P+K หลังจากย้ายปลูกแล้วประมาณ 7 วัน หรือเมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้ดีแล้ว ครั้งที่ 2 ใส่ 1/2N หลังจากย้ายปลูกแล้วประมาณ 30 วัน

Table 14 Soil properties of chili experimental plots before planting

Soil depth (cm)	Texture	pH H_2O (1:1)	OM (%)	Avail. P (mg/kg)	Exch. K (mg/kg)
0-15	Sandy loam	7.24	0.98	13.68	57.12
15-30	-	6.98	0.86	9.06	41.13

(1) การเจริญเติบโตของพริกชี้ฟ้า

จากการทดลองการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับปุ๋ยเคมีในการผลิตพริก พบว่า การใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเก่าและต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T1 และ T3) และการใช้ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ เพียงอย่างเดียว (T2) ไม่ทำให้ความสูงของต้นพริกแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับการลดปุ๋ยเคมี 24-14.4-16, 24-12.8-16 และ 24-11.2-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T4 T5 และ T6) มีความแต่สูงของต้นพริกแตกต่างจากการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ (T1 T2 และ T3) (Table 15) ส่วนผลต่อทรงพุ่มของต้นพริก พบว่า การใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเก่าและต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ร่วมกับปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ (T1 และ T3) และการใช้ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ เพียงอย่างเดียว (T2) ไม่ทำให้ขนาดทรงพุ่มของต้นพริกแตกต่างกันทางสถิติ (Table 16)

กรมวิชาการเกษตร

Table 15 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on chili height

Treatments			Chili height (cm)		
	Biofertilizer	Chemical fertilizer (kg N-P_2O_5-K_2O / rai)	30 Days after planting	60 Days after planting	90 Days after planting
T1	*Talaromyces sp.*	24-16-16	18.37a	34.83a	62.73a
T2	-	24-16-16	18.23a	35.80a	62.38a
T3	*P. fluorescens*	24-16-16	18.30a	35.93a	62.01a
T4	*P. fluorescens*	24-14.4-16	17.23b	33.40b	58.25b
T5	*P. fluorescens*	24-12.8-16	16.98b	33.40b	59.32b
T6	*P. fluorescens*	24-11.2-16	17.14b	33.15b	57.37b
T7	-	-	15.83c	27.07c	48.07c
T8	*P. fluorescens*	-	15.90c	27.38c	49.72c
	F-test[1/]		**	**	**
	CV (%)		5.89	10.73	9.86

Remark [1/] ** = significantly different at 0.01 probability level, means with different letters within column indicate significant difference according to LSD

Table 16 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on chili canopy width

Treatments			Chili canopy width (cm)		
	Biofertilizer	Chemical fertilizer (kg N-P_2O_5-K_2O / rai)	30 Days after planting	60 Days after planting	90 Days after planting
T1	*Talaromyces sp.*	24-16-16	8.75a	23.70a	50.21a
T2	-	24-16-16	8.52ab	23.25a	49.68ab
T3	*P. fluorescens*	24-16-16	8.25abc	22.87ab	50.15a
T4	*P. fluorescens*	24-14.4-16	7.98bc	20.98c	49.18abc
T5	*P. fluorescens*	24-12.8-16	8.07bc	21.55bc	47.90bc
T6	*P. fluorescens*	24-11.2-16	7.92c	21.28c	48.20c
T7	-	-	7.39d	20.83c	41.21d
T8	*P. fluorescens*	-	7.33d	21.05c	41.22d
	F-test[1/]		**	**	**
	CV (%)		6.17	5.22	8.04

Remark [1/] ** = significantly different at 0.01 probability level, means with different letters within column indicate significant difference according to LSD

กรมวิชาการเกษตร

(2) ผลผลิตของพริกชี้ฟ้า

จากการทดลองการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับปุ๋ยเคมีในการผลิตพริก พบว่า การใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ เพียงอย่างเดียว (T2) และการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับปุ๋ยเคมีทุกกรรมวิธี (T1 T3 T4 T5 และ T6) ไม่ทำให้ความยาว และความกว้างของผลพริกแตกต่างกันทางสถิติ (Table 17) ผลผลิตของพริก พบว่า การใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเก่าและต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ (T1 และ T3) และการใช้ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ เพียงอย่างเดียว (T1) ให้ผลผลิตของพริกไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 16) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับการลดปุ๋ยเคมี 24-14.4-16, 24-12.8-16 และ 24-11.2-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ (T4 T5 และ T6) แนวโน้มของผลผลิตลดลง อย่างไรก็ตามการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตร่วมกับการลดปุ๋ยเคมี 24-14.4-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ ยังให้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างทางสถิติจากการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ ต่อไร่ พียงอย่างเดียว (T2)

Table 17 Effect of phosphate solubilization biofertilizer prototype on chili fruit size and chili yield

Treatments			Chili fruit (cm)		Chili yield
	Biofertilizer	Chemical fertilizer (kg $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ / rai)	Length of fruit	Diameter of fruit	(kg/rai)
T1	*Talaromyces sp.*	24-16-16	6.56a	0.64	776a
T2	-	24-16-16	6.54a	0.63	758a
T3	*P. fluorescens*	24-16-16	6.55a	0.63	769a
T4	*P. fluorescens*	24-14.4-16	6.47a	0.62	645ab
T5	*P. fluorescens*	24-12.8-16	6.38a	0.61	568b
T6	*P. fluorescens*	24-11.2-16	6.26ab	0.62	496b
T7	-	-	6.01b	0.61	236c
T8	*P. fluorescens*	-	5.98b	0.60	307c
	F-test[1/]		*	ns	*
	% CV		4.86	3.67	23.44

Remark [1/] ns = non–significant, * = significantly different at 0.05 probability level, means with different letters within column indicate significant difference according to LSD

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีศักยภาพในการละลาย $AlPO_4$, $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ จากตัวอย่างดินรอบราก และรากพืช ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกพืชในจังหวัดชัยนาท นครราชสีมา และตราด

กรมวิชาการเกษตร

สามารถคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ได้ 6 ไอโซเลท คือ *Burkholderia latens* SM-P013B, *Burkholderia multivorans* SM-P020B, *Pseudomonas fluorescens* SM-P025B, *Curtobacterium* sp. SM-P027B, *Bacillus velezensis* SM-P029B และ *Pantoea dispersa* SM-P033B

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Burkholderia latens* SM-P013B คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 6.5 และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 15 กรัมต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Burkholderia multivorans* SM-P020B คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 6.5 และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Pseudomonas fluorescens* SM-P025B คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 7.0 และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Curtobacterium* sp. SM-P027B คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 6.5 และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus velezensis* SM-P029B คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 8.0 และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Pantoea dispersa* SM-P033B คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง 7.0 และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 15 กรัมต่อลิตร

3. *Pseudomonas fluorescens* SM-P025B เป็นแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบผงโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยมากที่สุด เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการทำแห้งเกิน 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิขาเข้า เท่ากับ 110 และ 120 องศาเซลเซียส และไม่ส่งผลยับยั้งต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ และมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศด้วย นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาได้นาน 6 เดือน ทั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง

4. การทดสอบการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าในสภาพกระถาง พบว่า การคลุกมะเขือเทศด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วน 1:0.6 (กรัมต่อกรัม) ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำของกรมวิชาการเกษตร มีความสูงหลังย้ายปลูก 15, 45 และ 75 วัน สูงสุด เท่ากับ 33.56, 58.00 และ 97.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการคลุกเคลือบเมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ในอัตราส่วน 1:0.8 (กรัมต่อกรัม) ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำของกรมวิชาการเกษตร มีความสูงหลังย้ายปลูก 15, 45 และ 75 วัน สูงสุด เท่ากับ 16.78, 35.28 และ 49.67 เซนติเมตร ตามลำดับ

5. ผลการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต *P. fluorescens* SM-P025B ร่วมกับปุ๋ยเคมีในการผลิตมะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดสอบ พบว่า ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต มีผลต่อความสูงของต้นมะเขือเทศ แต่ไม่มีผลต่อขนาดทรงพุ่ม หลังย้ายต้นกล้าลงปลูก 90 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต สามารถช่วยลดปุ๋ยเคมีเหลือ 24-12.8-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ โดยที่ให้ผลผลิตมะเขือเทศไม่แตกต่างทางสถิติจากการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ ในส่วนของพริก พบว่า ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ไม่มีผลต่อความสูง และขนาดทรงพุ่มของต้นพริก เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ต้นแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

สามารถช่วยลดปุ๋ยเคมีเหลือ 24-14.4-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ โดยที่ให้ผลผลิตของพริกไม่แตกต่างทางสถิติจากการใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราแนะนำ 24-16-16 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบใหม่ ที่ช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสเฟต โดยสามารถละลายฟอสเฟตรูปต่าง ๆ ($AlPO_4$, $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$) ที่สะสมในดิน เพื่อลดต้นทุนการผลิต เป็นการทำการเกษตรที่ยั่งยืน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ทีมงานห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่ให้ความช่วยเหลือเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ต่าง ๆ และช่วยอำนวยความสะดวกในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง และเตรียมวัสดุอุปกรณ์ ที่จำเป็นในการทดลอง ขอขอบคุณ ดร. อำนาจ เอี่ยมวิจารย์ ดร. อมรรัตน์ ใจยะเสน และ ดร. กัลยกร โปร่งจันทึก ที่อนุเคราะห์สารเคมีและเอื้อเฟื้อสถานที่ ในการทำงานทางอณูชีววิทยา และขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือต่าง ๆ ให้งานวิจัยนี้เสร็จสิ้นไปได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

สุปรานี มั่นหมาย, ภาวนา ลิกขนานนท์ และอธิปัตย์ คลังบุญครอง. 2558. การจัดการธาตุอาหารพืชโดยใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ดินเพื่อการผลิตอ้อย. ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2558 หน้า 160 - 171. กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

สุภาพร จันรุ่งเรือง, เบญจมาส รสโสภา และ กรรณิการ์ สัจจาพันธ์. 2553. ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ Rs01 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2. วิทยาสารกำแพงแสน. 8: 1 – 14.

Doetsch, R.N. 1981. Determinative methods of light microscopy, pp. 29 – 30. In: P. Gerhardt (ed). Manual of methods for general bacteriology. Amercan Society for Microbiology. Washington, DC.

Jones, D.L. and E. Oburger. 2011. Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. pp. 169 - 198. In: Bünemann, E., A. Oberson, and E. Frossard. (eds.). Phosphorus in action: biological processes in soil phosphorus cycling. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg.

Khan, M.S., A. Zaidi and P.A. Wani. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. Agronomy for Sustainable Development. 27: 29-43.

Lwin, K.M., M.M. Myint, T. Tar and W.Z.M. Aung. 2012. Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid - IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. Engineering Journal. 16: 137 – 144.

กรมวิชาการเกษตร

Murphy, J. and J.P. Lirey. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. Analytic Chimica Acta. 27: 31 – 36.

Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya. 17: 362 – 370.

Sharma, S.B., R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi and T.A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus. 2: 587.

กรมวิชาการเกษตร