จากหิ้งสู่ห้าง...ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

The Product of Phosphate Solubilizing Biofertilizer

ภาวนา ลิกขนานนท์ วิทยา ธนานุสนธิ์ ประพิศ แสงทอง สุปรานี มั่นหมาย
กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การศึกษาหาจุลินทรีย์ที่มีในประเทศเพื่อนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ดำเนินการศึกษาตามขั้นตอนต่างๆ ตั้งแต่รวบรวมจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินและรากพืช แล้วคัดเลือกจุลินทรีย์นั้นให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการละลายหินฟอสเฟตชนิดต่างๆ ในสภาพห้องปฏิบัติการ ศึกษาการใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ร่วมกับหินฟอสเฟตในสภาพ micro-plot และสภาพแปลงทดลอง ศึกษาการละลายของฟอสฟอรัสรูปต่างๆ ทั้งอนินทรีย์และอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ถูกยึดตรึงอยู่ในดิน โดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ เมื่อได้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมจึงศึกษาวิธีการผลิตจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตให้เป็นรูปแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่พร้อมนำไปใช้ประโยชน์

ผลการศึกษาได้จุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน $CaHPO_4$ ที่ระยะเวลา 3 วัน ได้วงใสรอบโคโลนีของจุลินทรีย์มากกว่า 9 มิลลิเมตร จำนวน 60 ไอโซเลท และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟตชนิดต่างๆ จากจุลินทรีย์ 60 ไอโซเลท ได้เชื้อราในสกุล *Penicillium* 3 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท เมื่อศึกษาการใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ร่วมกับหินฟอสเฟตในสภาพ micro-plot และสภาพแปลงทดลอง พบว่า การเพาะเชื้อรา *Penicillium spp.* ทั้ง 3 ไอโซเลทร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตทำให้การเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของพืชทดสอบสูงกว่าการใส่หินฟอสเฟตแต่ไม่เพาะเชื้อรา นอกจากนี้พบว่า การเพาะเชื้อรา *Penicillium spp.* ลงดินชุดต่างๆ ทำให้ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดที่เป็นประโยชน์ในดิน อนินทรีย์ฟอสฟอรัสและอินทรีย์ฟอสฟอรัสสูงขึ้นกว่าการไม่เพาะเชื้อรา โดยเฉพาะอินทรีย์ฟอสฟอรัสมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างเด่นชัด เมื่อทดลองผลิตเชื้อรา *Penicillium sp.* ให้อยู่ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่พร้อมนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบว่าการเลี้ยงเชื้อราในลักษณะ solid substrate fermentation ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีข้าวฟ่างเป็นส่วนประกอบหลัก ทำให้ได้สปอร์จำนวนมากและมี shelf life ที่นานเพียงพอ และสามารถใช้ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียดเป็นวัสดุพาหะ สำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

คำนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช ฟอสฟอรัสปรากฏในธรรมชาติในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในดินอยู่ในช่วง 0.02-0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (Barber, 1984) และส่วนใหญ่อยู่ในรูปออร์โทฟอสเฟต ฟอสฟอรัสในดินโดยทั่วไปจำแนกได้เป็น (ก) ฟอสฟอรัสในสารละลายดิน (ข) อนินทรีย์ฟอสฟอรัสและ (ค) อินทรีย์ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสในสารละลายดินที่จัดว่าเป็นประโยชน์ต่อพืชมีปริมาณน้อยมาก เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบต่างๆในดินได้ดี ดังนั้นดินที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยจึงมีฟอสฟอรัสในสารละลายดินประมาณ 0.05 มก./ลิตร หรือพบน้อยมากที่จะเกิน 0.3 มก./ลิตร (Ozanne, 1980) ส่วนอนินทรีย์ฟอสฟอรัสในสารละลายดินอยู่ในรูปของออร์โทฟอสเฟต ($H_2PO_4^{-1}$และHPO_4^{-2}) ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สำหรับอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดินทั่วไปนั้น พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 30-50 เปอร์เซ็นต์ ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน (Paul and Clark, 1989) โดยอาจจะมีถึง 50 เปอร์เซ็นต์ในดินที่มีอินทรียวัตถุสูง (Barber, 1984) และประพิศ (2534) รายงานว่าดินไร่ของประเทศไทยมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสอยู่ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน ซึ่งฟอสฟอรัสรูปนี้จะเป็นประโยชน์ต่อพืชเมื่อถูกปลดปล่อยออกมาโดย จุลินทรีย์ในดิน ดินส่วนใหญ่มีอนินทรีย์ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่ไม่ละลายจึงเป็นฟอสฟอรัสที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช ในขณะที่ดินส่วนใหญ่มีแหล่งสำรองของธาตุฟอสฟอรัส แต่ฟอสฟอรัสในแหล่งสำรองนี้คงอยู่ในสภาพที่เป็นประโยชน์น้อยเพราะถูกดินดูดตรึงเอาไว้ และด้วยเหตุที่ฟอสฟอรัสมีปฏิกิริยาทางเคมีมาเกี่ยวข้องหลายประการ จึงมีฟอสฟอรัสน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ที่เข้าสู่วัฏจักร พืช สัตว์ ดังนั้นการขาดฟอสฟอรัสจึงเป็นปัญหาที่พบอย่างกว้างขวาง การใส่ปุ๋ยฟอสเฟตจึงจำเป็นเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง

เพื่อการพัฒนาการเกษตรอย่างยั่งยืน การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิดกำลังเป็นที่สนใจ เพราะประชากรจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบหลักของระบบดิน-พืช การที่ประชากรจุลินทรีย์มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์นี้จะมีผลต่อการพัฒนาของพืช มีจุลินทรีย์ดินหลายชนิดสามารถละลายไอออนฟอสเฟตจากสารประกอบอนินทรีย์ฟอสฟอรัส แต่ไอออนฟอสเฟตรูปที่ละลายออกมานี้จะถูกดินตรึงไว้อีกครั้งก่อนที่จะถึงผิวรากพืช การใช้หินฟอสเฟตซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสต้นทุนต่ำจึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่ง ปัญหาของการใช้หินฟอสเฟตคือประสิทธิภาพในการใช้ต่ำ ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดินที่มีค่า pH มากกว่า 5.5-6 แม้ว่าเมื่อสภาพแวดล้อมอื่นๆเหมาะสม ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าพืชได้รับจากปุ๋ยเคมีฟอสเฟตที่ละลายได้อื่นๆ (Khasawneh and Doll, 1978) การใช้หินฟอสเฟตเป็นปุ๋ยโดยตรงจึงไม่แพร่หลาย อย่างไรก็ตามมีวิธีการหลายวิธีที่ทำให้ฟอสฟอรัสในหินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นเช่นวิธีการทางเคมี (วิศิษฐ์ และมนูเวทย์, 2520) วิธีทางกายภาพโดยนำอาหินฟอสเฟตไปเผาไฟหรือบดให้ละเอียด (ลัดดาวัลย์ และคณะ, 2532) รวมทั้งพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถละลายหินฟอสเฟตออกมาเป็นประโยชน์ได้ (Sperber, 1958; Louw and Weber, 1959; Gerretsen, 1984) ซึ่งการทำให้ความเป็นประโยชน์ของหินฟอสเฟตเพิ่มขึ้นจากกระบวนการของจุลินทรีย์ จึงเป็นแนวทางที่น่าจะนำไปถึงจุดมุ่งหมายในการทำการเกษตรอย่างยั่งยืนได้ โดยมีรายงานว่า

จุลินทรีย์สามารถปลดปล่อยกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ออกมา ทำให้หินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดอินทรีย์โมเลกุลต่ำสามารถเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลายโดยกลไก ที่เกี่ยวข้องกับ chelation และปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน (Fox and Comerford, 1990; Gerkel, 1992) มีการนำเชื้อราเส้นใยมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดอินทรีย์อย่างแพร่หลาย (Mattey, 1992; Vassilev and Vassileva, 1992) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Penicillium sp.*บางสายพันธุ์ โดยมีการศึกษาในระบบหมักร่วมกันกับหินฟอสเฟต หรือโดยการเพาะเชื้อโดยตรงเพื่อให้ไปละลายหินฟอสเฟต (Kucey, 1987; Asea et al,1988; Cerezine et al,1988; Cunningham and Kulack, 1992)

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จึงทำการศึกษาจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเพื่อคัดเลือกหาจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ โดยพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการ

1. การรวบรวมจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพืช (rhizosphere) และรากพืชจากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง แล้วเลี้ยงแยกจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar, potato dextrose agar และ actinomycete agar สำหรับจุลินทรีย์ประเภทเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อแอคติโนมัยซิส ตามลำดับ จากนั้นทำการแยกหาจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเบื้องต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract agar ที่เทหนา 2 ชั้น (double-layered) โดยมีตะกอน $CaHPO_4$ เป็นส่วนประกอบอยู่ชั้นบนของอาหาร ตามวิธีของ Katznelson and Boss (1959) เพาะจุลินทรีย์แบบจุด (spot-inoculation) แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิตู้บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส วัดและบันทึกความกว้างของวงใสที่ปรากฏอยู่รอบโคโลนีจุลินทรีย์เมื่อบ่มได้ 3 และ7 วัน โดยให้คะแนนตามความกว้าง ของวงใสดังนี้ระดับที่ 1. 0 มิลลิเมตร 2. 0-3 มิลลิเมตร 3. 3-6 มิลลิเมตร 4. 6-9 มิลลิเมตร และ 5. มากกว่า 9 มิลลิเมตร เก็บรวบรวมเชื้อเดี่ยวที่แสดงความกว้างของวงใสระดับ 6-9 มิลลิเมตร และมากกว่า 9 มิลลิเมตร เพื่อการทดลองขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต

นำจุลินทรีย์จากขั้นตอนที่ 1 ที่แสดงความกว้างของวงใสระดับ 6-9 มิลลิเมตรและมากกว่า 9 มิลลิเมตร มาคัดเลือกให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต 2 ชนิด คือ หินฟอสเฟตกาญจนบุรี และหินฟอสเฟตลำพูนในสภาพห้องปฏิบัติการดังนี้ วางแผนการทดลองแบบ factorial in randomized complete block ทำ 10 ซ้ำ โดยมีปัจจัยที่ 1 เป็นการเพาะและไม่เพาะจุลินทรีย์ ปัจจัยที่ 2 เป็นหินฟอสเฟต 5 อัตราคือ 0.0000 0.2500 0.5000 0.7500 และ 1.0000 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร เพาะจุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน $CaHPO_4$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Pikovskaya ที่มีหินฟอสเฟตอัตรา 0.0000 0.2500 0.5000 0.7500 และ 1.0000 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร pH 6.5 เพาะจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา

โดยเจาะขอบของโคโลนีของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ corn meal agar ด้วย cork borer แล้วเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพาะจุลินทรีย์ประเภทเชื้อแบคทีเรีย โดยกำหนดให้ปริมาณเซลล์มีชีวิต เท่ากับ 1 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาโดยวิธีของ Watanabe and Olsen (1965) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำได้โดยการทำให้เกิดสีด้วยกรดแอสคอบิก ที่ระยะเวลาบ่ม 7 14 และ 28 วันสำหรับจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา และที่ระยะเวลาบ่ม 3 7 และ 14 วันสำหรับจุลินทรีย์ประเภทเชื้อแบคทีเรีย เปรียบเทียบผลระหว่างการเพาะและไม่เพาะจุลินทรีย์ จากนั้นเก็บเชื้อที่คัดเลือกแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงเพื่อการทดลองต่อไป

3. ศึกษาการใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ร่วมกับหินฟอสเฟตใน micro-plot และสภาพแปลงทดลอง

ทำการทดลองใน micro-plot จำนวน 15 แปลงและแปลงปลูก 10 แปลง ที่จังหวัดขอนแก่นและกำแพงเพชร ในฤดูฝนและฤดูแล้ง โดยปลูกถั่วเหลืองและข้าวโพดเป็นพืชทดสอบ เพราะพืชทั้งสองชนิดมีการตอบสนองต่อฟอสฟอรัส ถ้าปริมาณฟอสฟอรัสไม่เพียงพอ จะแสดงการขาดฟอสฟอรัสออกมาให้เห็นค่อนข้างชัด ชุดดินที่ใช้ในการทดลอง จึงต้องคัดเลือกในขั้นต้นให้มีปริมาณฟอสฟอรัสที่มีประโยชน์ในดินต่ำกว่าค่าวิกฤตของพืช ซึ่งมีค่าประมาณ 10 มก./กก. การทดลองนี้ได้ดำเนินการระหว่างปี 2542-2547 ทดลองทั้งใน micro-plot และในแปลงแบบ randomized complete block ทำ 4-8 ซ้ำ การทดลองใน พ.ศ. 2543-2544 เป็นการทดลองใน micro-plot มีกรรมวิธีการทดลอง 14 กรรมวิธี โดยมีกรรมวิธี 1)ไม่ใส่หินฟอสเฟต ไม่เพาะเชื้อ 2) ใส่ปุ๋ยฟอสเฟต 3) ใส่หินฟอสเฟตอัตรา 5 มก./กก. 4) ใส่หินฟอสเฟต 10 มก./กก. และ 5-14. ใส่หินฟอสเฟต 2 อัตรา คือ 5 และ 10 มก./กก.ร่วมกับการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตแต่ละไอโซเลท ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ RPS 013 B และ RPS 042 B และเชื้อรา 3 ไอโซเลท คือ RPS 003 F, RPS 032 F และ RPS 145 F ส่วนการทดลองในปี พ.ศ. 2544 ที่จังหวัดกำแพงเพชรและการทดลองในทั้งสองจังหวัดในปี พ.ศ. 2545 เป็นการทดลองใน micro-plot และแปลงทดลอง แต่ลดกรรมวิธีการทดลองเหลือ 6 กรรมวิธี โดยลดการใส่หินฟอสเฟตลงเหลือเพียงอัตราเดียวและไม่ใช้ จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตประเภทเชื้อแบคทีเรีย ในปี พ.ศ. 2546 ปรับกรรมวิธีการทดลองเป็น 10 กรรมวิธีโดยเพิ่มกรรมวิธีการทดลองเพาะเชื้อราละลายฟอสเฟตร่วมกับหินฟอสเฟตอัตรา 200 กก./ไร่ และเพาะเชื้อราร่วมกับปุ๋ยเคมีฟอสเฟตครึ่งอัตรา

ขั้นตอนการทดลอง

3.1 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

โดยเลี้ยงขยายจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โดยเชื้อแบคทีเรีย เลี้ยงขยายปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar แล้วเก็บเชื้อใส่ลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นประมาณ 1 x 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อรา เลี้ยงขยายปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt yeast extract agar เพื่อเตรียมเชื้อตั้งต้น จากนั้นขยายจำนวนสปอร์ราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเป็นข้าวฟ่างและรำข้าวแล้วบ่มเชื้อไว้

3.2 ปลูกพืชทดลองและเพาะจุลินทรีย์ใน micro-plot

ทำ micro-plot โดยใช้แผ่นสังกะสีขดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร สูง 25 เซนติเมตรและฝังดินลึก 20 เซนติเมตร ในการปลูกถั่วเหลืองปลูก 6 ต้นต่อ micro-plot ในทุกกรรมวิธีการทดลอง ใส่ปุ๋ยรองพื้น 12 กิโลกรัม N ต่อไร่ และ 6 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ การใส่หินฟอสเฟตให้ใส่ในกรรมวิธี ตามอัตราที่กำหนด การใส่ปุ๋ยฟอสเฟตให้ใส่ 9 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ แล้วเพาะหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ สำหรับข้าวโพด ปลูก 2 ต้นในแต่ละ micro-plot ใส่ปุ๋ยรองพื้น 20 กิโลกรัม N ต่อไร่ และ 10 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ การใส่หินฟอสเฟตให้ใส่ในกรรมวิธี ตามอัตราที่กำหนด การใส่ปุ๋ยฟอสเฟตให้ใส่ 20 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ แล้วเพาะหัวเชื้อจุลินทรีย์

3.3 ปลูกพืชทดลองและเพาะจุลินทรีย์ในสภาพแปลง

ปลูกถั่วเหลืองในแปลงขนาด 3 x 6 เมตร ระยะปลูก 50 x 20 เซนติเมตร ปลูกข้าวโพดในแปลงขนาด 3 x 6 เมตร ระยะปลูก 75 x 25 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยให้ถั่วเหลืองและข้าวโพดในอัตราที่เหมือนกับการทดลองใน micro-plot

4. ศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงอยู่ในชุดดินต่างๆโดยเชื้อรา

ศึกษากับชุดดิน 5 ชุด ได้แก่ ชุดดินปากช่อง โคราช ยโสธร คลองชาก และทับกวาง วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block มี 4 ซ้ำ 4 กรรมวิธีการทดลอง คือ 1. การไม่เพาะเชื้อรา 2.- 4. การเพาะเชื้อราที่คัดเลือกไว้ 3 ไอโซเลท (รูปที่ 1) คือ RPS 003 F, RPS 032 F และ RPS 145 F ตามลำดับ โดยเก็บดินชั้นไถพรวน (0-15 เซนติเมตร) ผึ่งแห้ง บดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร บรรจุ 200 กรัม ในภาชนะมีฝาปิดขนาด 1000 มิลลิลิตร (รูปที่ 2) ปรับความชื้นดินให้เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการอุ้มน้ำของชุดดินนั้นๆ และรักษาระดับความชื้นนี้ตลอดการทดลอง เพาะเชื้อรา 3 ไอโซเลท คลุกผสมให้ทั่ว บ่มดินที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาบ่มที่ 1, 2, 4, 8 และ 12 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ทั้งรูป อนินทรีย์และอินทรีย์ โดยวิธี Bray 2 (Bray and Kurtz, 1945) และวิธี Olsen (Olsen, 1965) พร้อมกับทำการนับปริมาณเชื้อราที่มีชีวิตตามระยะเวลาบ่มที่กำหนดไว้

รูปที่ 1 เชื้อรา 3 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 2 ดินในภาชนะที่ใช้ทดลอง

5. ศึกษาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในห้องปฏิบัติการ

เพื่อให้อยู่ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่พร้อมใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการ เชื้อราที่ใช้ทดลองผลิตคือ *Penicillium sp.* RPS 003 F (รูปที่ 3) มีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

5.1 เลือกวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อและขยายปริมาณ conidiospore ซึ่งเป็นส่วนขยายพันธุ์ที่เหมาะสมกับการจะนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพของเชื้อรา *Penicillium sp.* RPS 003 F จากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium sp.* RPS 003 F มาก่อน จึงใช้ข้าวฟ่างผสมรำข้าวหยาบอัตราส่วน 2:1 เป็นวัตถุดิบเลี้ยงขยายเชื้อ ส่วนวิธีการเลี้ยงขยายสปอร์เป็นแบบ solid substrate โดยบรรจุวัตถุดิบในถุงพลาสติค ชนิดทนร้อนขนาด 5x8 นิ้วถุงละ 100 กรัม สวมคอขวด พลาสติคทนร้อน อุดจุกด้วยสำลี นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที แล้วเพาะเชื้อรา *Penicillium sp.* RPS 003 F ลงในถุงที่เตรียมไว้ เก็บบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5.2 ศึกษาหาวัสดุพาหะที่เหมาะสม โดยเพาะเชื้อราลงในวัสดุอินทรีย์ชนิดต่างๆที่ทดลองใช้เป็นวัสดุพาหะได้แก่ ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียด กากตะกอนหม้อกรองโรงงานน้ำตาล และดินพีท เก็บบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับปริมาณเซลล์เชื้อราทุกระยะเวลา 0 5 15 30 60 90 120 180 240 และ 360 วัน เมื่อได้วัสดุพาหะที่เหมาะสม ผสมหินฟอสเฟตลงไป แล้วอัดเม็ดด้วยเครื่องบดเนื้อโดยผสมหินฟอสเฟตลงไปพร้อมกัน ใช้กากน้ำตาล 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นสารเชื่อมการอัดเม็ด (รูปที่ 4-6)

5.3 ศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อรา *Penicillium sp.* RPS 003 F ในปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตได้เมื่อใส่ลงดินจากจังหวัดต่างๆ วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block ทำ 4 ซ้ำ กรรมวิธีการทดลองมี 1) ดินขอนแก่น นึ่งฆ่าเชื้อ 2) ดินขอนแก่น ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ 3) ดินเพชรบุรี นึ่งฆ่าเชื้อ 4) ดินเพชรบุรี ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ 5) ดินลพบุรี นึ่งฆ่าเชื้อ 6) ดินลพบุรี ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ 7) ดินสุพรรณบุรี นึ่งฆ่าเชื้อ 8. ดินสุพรรณบุรี ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ ใส่ดินทดลองในจานเพาะเชื้อขนาด 20 x 150 มม. การทำให้ดินปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อดินในหม้อนึ่งความดันไอ ใส่ปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตได้ลงดิน โดยให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน ตรวจนับปริมาณเชื้อรา RPS 003 F ทุกระยะเวลา 0 5 15 30 60 90 120 180 240 และ 360 วัน

รูปที่ 3 เชื้อรา *Penicillium sp* RPS 003 F จากกล้องจุลทรรศน์ 40x

รูปที่ 4
ปุ๋ยหมักมูลวัวและเชื้อราในข้าวฟ่าง

รูปที่ 5
คลุกผสมกัน

รูปที่ 6
อัดเม็ด

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การรวบรวมจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

เลี้ยงแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและรากพืชที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางจำนวนรวมกัน 172 ตัวอย่าง เป็นดินรอบรากพืชจำนวน 80 ตัวอย่าง และรากพืชจำนวน 92 ตัวอย่าง ผลการทดลองเป็นดังนี้ จากตัวอย่างทั้งหมดได้จุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน $CaHPO_4$ ใน 3 วัน ได้วงใสรอบโคโลนีของจุลินทรีย์ (รูปที่ 7-8) กว้างระดับ 5 (วงใสกว้างมากกว่า 9 มิลลิเมตร) จำนวน 60 ไอโซเลท จุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน $CaHPO_4$ ได้วงใสกว้างมากกว่า 9 มิลลิเมตร ส่วนมากเป็นเชื้อราและส่วนหนึ่งเป็นเชื้อรา *Penicillium sp.* ความสามารถในการละลายตะกอน $CaHPO_4$ น้อยลงมา คือ จุลินทรีย์ประเภทเชื้อแบคทีเรียและเชื้อแอคติโนมัยซีสตามลำดับ

รูปที่ 7 วงใสรอบโคโลนีเชื้อรา

รูปที่ 8 วงใสรอบโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟตในห้องปฏิบัติการ

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถละลายหินฟอสเฟต (รูปที่ 9-10) คือ หินฟอสเฟตกาญจนบุรี (ตารางที่ 1) และหินฟอสเฟตลำพูน ได้จุลินทรีย์ 5 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพ เป็นจุลินทรีย์ประเภทราเส้นใยจำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งทั้งหมดเป็นราในจีนัส *Penicillium sp.* และจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท

รูปที่ 9 หินฟอสเฟตชนิดต่างๆ

รูปที่ 10 การละลายหินฟอสเฟต (ซ้าย) เพาะเชื้อ (ขวา) ไม่เพาะเชื้อ

ตารางที่ 1 การละลายหินฟอสเฟต กาญจนบุรี โดยเชื้อรา RPS 003 F ที่อัตราหินฟอสเฟต 5 ระดับ และที่ระยะ เวลา 7, 14 และ 28 วัน

อัตราหินฟอสเฟต (กรัม/อาหาร 100 มิลลิลิตร)	ไมโครกรัม-ฟอสฟอรัส/สารละลาย 20 มล./ระยะเวลา (วัน)					
	7 วัน		14 วัน		28 วัน	
	เพาะเชื้อ	ไม่เพาะ	เพาะเชื้อ	ไม่เพาะ	เพาะเชื้อ	ไม่เพาะ
0.0000	0.00 d	0.000 d	0.02 e	0.01 e	0.03 d	0.04 d
0.2500	11.07 c	0.32 d	14.84 d	0.34 e	16.80 c	0.37 d
0.5000	11.97 b	0.30 d	17.51 c	0.29 e	20.52 b	0.31 d
0.7500	12.75 b	0.25 d	19.68 b	0.28 e	23.57 a	0.23 d
1.0000	15.15 a	0.22 d	21.24 a	0.27 e	20.39 b	0.21 d
F-test	**		**		**	
C.V. (%)	12.1		10.3		9.5	

หมายเหตุ : ** = ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ ความเป็นไปได้ 0.01

ปริมาณฟอสฟอรัสที่ตามท้ายด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี DMRT

3. ศึกษาการใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ร่วมกับหินฟอสเฟตใน micro-plot และแปลงทดลอง

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้มาทดลองใช้ร่วมกับหินฟอสเฟตใน micro-plot (รูปที่ 11-12) พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท คือ *Penicillium spp.* RPS 003 F, RPS 032 F และ RPS 145 F มีประสิทธิภาพสูงกว่าเชื้อแบคทีเรีย เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยผลผลิตของถั่วเหลืองและข้าวโพดจากผลการทดลองใน micro-plot 15 แปลงและแปลงทดลอง 10 แปลง พบว่าถั่วเหลืองใน micro-plot การเพาะเชื้อราร่วมกับหินฟอสเฟตให้น้ำหนักเมล็ดมากกว่าการใส่เฉพาะหินฟอสเฟต 92.9 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับข้าวโพด การเพาะเชื้อราร่วมกับหินฟอสเฟตให้น้ำหนักเมล็ดมากกว่าการใส่หินฟอสเฟตเพียงอย่างเดียว 93.3 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพแปลงทดลอง (รูปที่ 13-14) พบว่าการเพาะเชื้อรา *Penicillium spp.* ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตอัตราต่ำ ทำให้การเจริญเติบโตของพืชทดสอบสูงกว่าการใส่หินฟอสเฟตแต่ไม่เพาะเชื้อรา โดยรวมแล้วการเพาะเชื้อราร่วมกับหินฟอสเฟตทำให้ผลผลิตถั่วเหลืองและข้าวโพดเพิ่มขึ้นจากการไม่เพาะเชื้อรา 28.3 และ 27.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เพาะเชื้อ ไม่เพาะ

รูปที่ 11 ถั่วเหลืองใน micro-plot

เพาะเชื้อ ไม่เพาะ

รูปที่ 12 ข้าวโพดใน micro-plot

รูปที่ 13 แปลงทดลองถั่วเหลือง

รูปที่ 14 แปลงทดลองข้าวโพด

4. ศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงอยู่ในชุดดินต่างๆ โดยเชื้อรา

พบว่า การเพาะเชื้อรา *Penicillium spp.* ที่คัดเลือกไว้ลงในชุดดินต่างๆ ทำให้ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดที่เป็นประโยชน์ในดินสูงขึ้นกว่าการไม่เพาะเชื้อรา และเมื่อวิเคราะห์รูปของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (อนินทรีย์และอินทรีย์ฟอสฟอรัส) พบเช่นกันว่ามีการเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพาะเชื้อรา โดยเฉพาะอินทรีย์ฟอสฟอรัสมีการเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด (ตารางที่ 2)

5. ศึกษาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในห้องปฏิบัติการ

พบว่า การเลี้ยงขยายปริมาณ conidiospore ของเชื้อรา *Penicillium sp.* โดยวิธี solid-substrate fermentation ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีข้าวฟ่างเป็นส่วนประกอบหลักทำให้ได้สปอร์ปริมาณประมาณ 1.0 x 10^8 สปอร์ต่อกรัมและมี shelf life ที่นานพอเพียงกับการนำไปใช้ประโยชน์ ประมาณ 60 วัน วัสดุพาหะที่เหมาะสมกับเชื้อรา *Penicillium sp.* RPS 003 F คือ ปุ๋ยหมักมูลวัว โดยมีแนวโน้มที่เมื่อบ่มเป็นเวลานานปุ๋ยหมักมูลวัวมีปริมาณเชื้อรารอดชีวิตมากกว่าวัสดุทดลองอื่นๆ รวมทั้งเมื่อพิจารณาในเรื่องราคาความสะดวกในการจัดหาและคุณภาพของวัตถุดิบที่จะใช้เป็นวัสดุพาหะในการผลิตเชื้อปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียด จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นวัสดุพาหะสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในเบื้องต้น (ตารางที่ 3) และเมื่อทดลองใส่ปุ๋ยชีวภาพรูปแบบที่ผลิตได้ลงดินชุดต่างๆ เพื่อศึกษาความสามารถในการมีชีวิตรอด พบว่าเชื้อรา *Penicillium sp.* RPS 003 F ในปุ๋ยชีวภาพ มีชีวิตรอดในชุดดินต่างๆได้จนถึง 12 เดือน

ตารางที่ 2 ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อนินทรีย์ฟอสฟอรัส และอินทรีย์ฟอสฟอรัส ที่วิเคราะห์ได้จากชุดดินปากช่องในแต่ละระยะเวลา

รูปฟอสฟอรัส	ระยะเวลาบ่ม (สัปดาห์)		
	1	2	4
อนินทรีย์ฟอสฟอรัส (มก./กก.)			
- ไม่เพาะรา	4.31 d	4.25 b	2.67
- เพาะรา RPS 003 F	4.88 c	4.75 a	2.49
- เพาะรา RPS 032 F	5.56 a	5.01 a	2.83
- เพาะรา RPS 145 F	5.33 b	4.87 a	2.47
F-test	**	*	ns
C.V. (%)	1.9	3.5	17.6
อินทรีย์ฟอสฟอรัส (มก./กก.)			
- ไม่เพาะรา	8.50 b	8.73	7.71 b
- เพาะรา RPS 003 F	9.64 a	9.53	8.60 a
- เพาะรา RPS 032 F	8.51 b	9.79	8.58 a
- เพาะรา RPS 145 F	9.56 a	10.15	8.82 a
F-test	*	ns	*
C.V. (%)	4.5	7.9	4.1

ns : ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* : แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

** : แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ปริมาณฟอสฟอรัสที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3 การมีชีวิตรอดของเชื้อรา *Penicillium sp.* RPS 003 F ในวัสดุพาหะชนิดต่างๆ

ชุดดิน	ปริมาณเชื้อรา (เซลล์/กรัม)ในแต่ละระยะเวลาบ่ม (วัน)								
	0	5	15	30	60	90	180	240	360
1. ปุ๋ยหมักมูลวัว	1.5×10^8	1.7×10^8	1.0×10^8	1.0×10^7	2.3×10^6	1.4×10^5	1.0×10^5	1.3×10^4	1.3×10^2
2. กากตะกอนหม้อกรองโรงงานน้ำตาล	1.5×10^8	1.0×10^7	2.0×10^6	1.0×10^6	2.0×10^5	3.0×10^5	1.3×10^4	1.4×10^3	10^1
3. ดินพีท	1.5×10^8	2.3×10^7	5.6×10^6	1.2×10^6	1.0×10^5	4.4×10^5	3.3×10^4	4.2×10^3	10^1

สรุปผลการทดลอง

สามารถรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ที่ละลายตะกอน $CaHPO_4$ ได้ความกว้างของวงใสรอบโคโลนีจุลินทรีย์มากกว่า 9 มิลลิเมตร จำนวน 60 ไอโซเลท จำแนกเป็นแบคทีเรีย 27 ไอโซเลท ราเส้นใย 33 ไอโซเลท

เมื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่รวบรวมไว้โดยให้ละลายหินฟอสเฟต 2 ชนิด ผลการคัดเลือกได้ จุลินทรีย์ 5 ไอโซเลทโดยแยกเป็นราเส้นใยจำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งทั้งหมดเป็นราในจีนัส *Penicillium sp.* และแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้มาทดลองใช้ร่วมกับหินฟอสเฟตใน micro-plot และในสภาพแปลงทดลอง พบว่า จุลินทรีย์ประเภทเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท คือ *Penicillium spp.* RPS 003 F, RPS 032 F และ RPS 145 F มีประสิทธิภาพสูงกว่าเชื้อแบคทีเรีย

ศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงอยู่ในชุดดินต่างๆ โดยเชื้อรา *Penicillium spp.* 3 ไอโซเลท พบว่า การเพาะเชื้อราทำให้ค่าฟอสฟอรัสทั้งหมดที่เป็นประโยชน์ในดิน อนินทรีย์ฟอสฟอรัส และอินทรีย์ฟอสฟอรัส เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพาะเชื้อรา โดยเฉพาะอินทรีย์ฟอสฟอรัสมีการเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดสูงขึ้นกว่าการไม่เพาะเชื้อรา

การศึกษาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในห้องปฏิบัติการ พบว่าวิธี solid-substrate fermentation ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีข้าวฟ่างเป็นส่วนประกอบหลักเหมาะสำหรับการเลี้ยงขยายปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium sp.* เพราะทำให้ได้สปอร์ปริมาณมากและมี shelf life ที่นานพอเพียง ส่วนวัสดุพาหะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตคือปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียด นอกจากนี้เมื่อนำปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตไปใส่ชุดดินต่างๆ พบว่าเชื้อราในปุ๋ยชีวภาพมีชีวิตรอดได้จนถึง 12 เดือนโดยยังคงมีปริมาณเชื้อมีชีวิต $10^4 – 10^5$ เซลล์ต่อกรัมของดิน

การนำไปใช้ประโยชน์

ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตสามารถนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยหินฟอสเฟต ซึ่งจัดเป็นปุ๋ยฟอสเฟตราคาต่ำ และเป็นปุ๋ยที่ปลดปล่อยธาตุอาหารฟอสฟอรัสออกมาทีละน้อย (slow release) อีกทั้งสามารถนำมาใช้ละลายฟอสฟอรัสที่มีอยู่แล้วในดินให้ออกมาเป็นประโยชน์อีกครั้ง ซึ่งฟอสฟอรัสในดินดังกล่าวมาจากปุ๋ยเคมีฟอสเฟตที่ใส่ลงดินให้กับพืชขณะเพาะปลูก แต่พืชสามารถดูดใช้ได้บางส่วน โดยส่วนใหญ่แล้วเหลือตกค้างในดินโดยดินยึดตรึงเอาไว้ ดังนั้นถ้าใช้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตตามแนวทางนี้กับดินทำการเกษตรทั่วไป จะทำให้ลดการใช้ปุ๋ยฟอสเฟตลงได้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทำให้ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ถือเป็นแหล่งสำรอง (reserve pool) ของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้อย่างต่อเนื่อง นอกจากจะใช้ประโยชน์จากปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตกับการเกษตรโดยทั่วไปแล้ว ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

น่าจะเป็นปัจจัยการผลิตที่สำคัญของการทำเกษตรอินทรีย์ เพราะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ร่วมกับหินฟอสเฟตซึ่งตามมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ หินฟอสเฟตถูกกำหนดเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสในการผลิตพืช

เอกสารอ้างอิง

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

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

วิศิษฐ์ โชลิตกุล และมนูเวทย์ ศรีเสน. 2520. ปุ๋ยฟอสเฟตและโพแทสเซียม. รายงานการสัมมนาทางวิชาการเรื่อง อุตสาหกรรมปุ๋ยกับการเกษตร หน้า 85-130.

Asea, P.E.A., R.M.N. Kucey and J.W.B. Stewart. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two Penicillium species in solution culture and soil. Soil Biol. Biochem 20: 459-464.

Barber, S.A. 1984. Soil Nutrient Bioavailability, John Wiley and Sons. New York

Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic and available form of phosphorus in soil. Soil Sci. 59: 39-45.

Cerezine, P.C., E.,Nahas and D.A. Ban Zatto. 1988. Soluble phosphate accumulation by Aspergillus niger from fluoapatite. Appl Microbiol Biotechnol 29: 501-505.

Cunningham J.E. and C. Kuiak. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by Penicillium bilaji App Environ Microbiol 52: 1451-1458.

Fox,T. and N. Comerford. 1990. Low-molecular weight acids in selected forest soils of the southeastern USA.. Soil Sci Soc Am J 54: 1139-1144.

Gerkel. 1992. Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. Pflanzenernahr Bodenk. 155: 339-343.

Gerretsen, F.C. 1984. The influence of microorganisms on the phosphate uptake by plant. Plant Soil, 1: 51-81.

Katznelson, H. and B. Boss. 1959. Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots: rhizosphere and non-rhizosphere soil. Can. J. Microbiol. 5: 79-85.

Khasawneh, F.E. and E.C. Doll. 1979. The use of phosphate rock for direct application to soils. Adv. Agron 30:159-206.

Kucey, R.M.N. 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing Penicillium bilajii and with mycorrhizal fungi. Appl Environ Microbiol 55: 2699-2703.

Louw, H.A. and Webley. 1959. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. J. Appl. Bacteriol. 22: 171-196.

Matte, M. 1992. The production of organic acids. Rev Biotechnol. 12: 87-132

Olsen, S.R. and L.E. Sommers. 1982. Phosphorus. In A.L. Page et al (ed.). Method of Soil Analysis, Part 2. Agronomy 9: 403-427. Am. Soc. of Agron. Madison, Wisc.

Ozanne, P.G. 1980. The Role of Phosphorus in Agriculture. Am. Soc. of Agron. Madison, Wisc.

Paul, E.A. and F.E. Clark. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, New York.

Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soli. Aust.. J. Agriic. Res. 9: 778-781.

Vassilev, N. and M. Vassileva. 1992. Production of organic acids by immobilized filamentous fungi. Mycol Res 96: 563-570.

Watanabe, F.S. and S.R. Olsen. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and $NaHCO_3$ extracts from soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 29:677-678