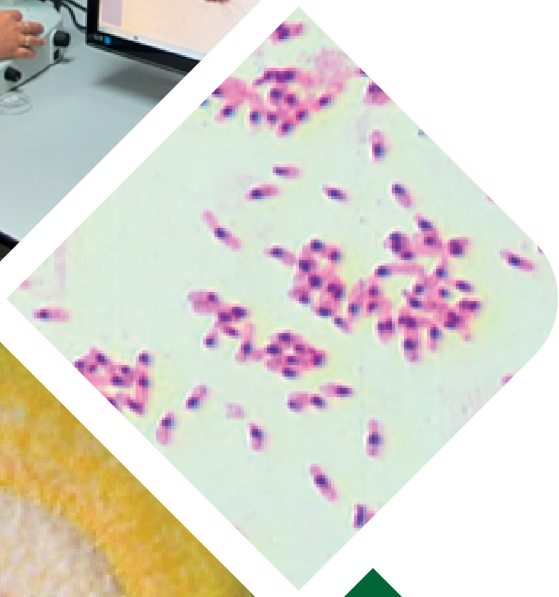
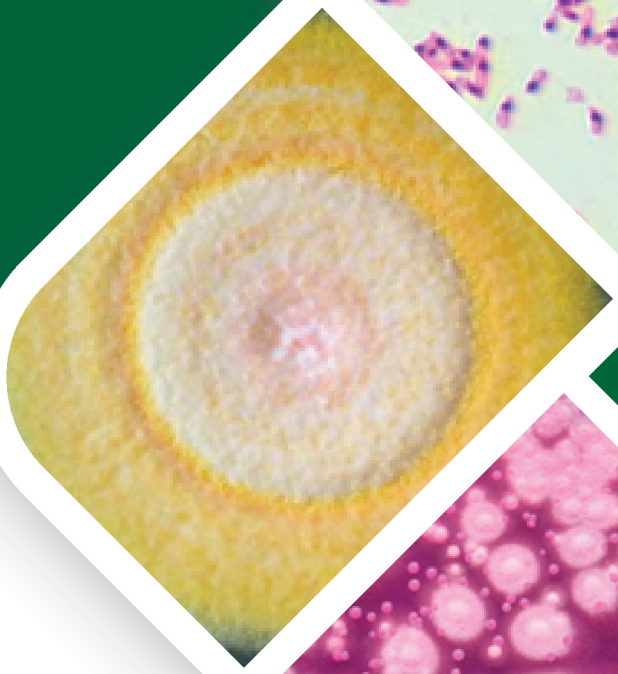
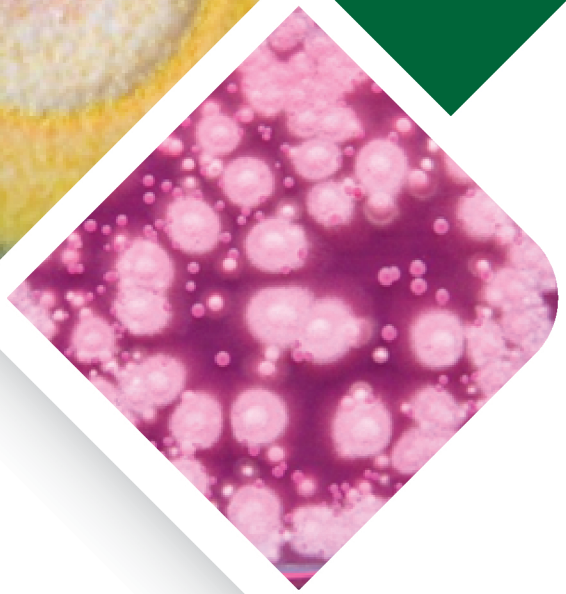
# คู่มือ

# ตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ







กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน
กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร 2566
ISBN : 978-974-436-988-8

# คู่มือตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ

ISBN : 978-974-436-988-8

## คณะที่ปรึกษา

| | | |
|---|---|---|
| นางจิราพรรณ | ทองหยอด | ผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร |
| นางสาวศุภกาญจน์ | ล้วนมณี | ผู้เชี่ยวชาญด้านดินและปุ๋ย |
| นางสาวจรีรัตน์ | กุศลวิริยะวงศ์ | รักษาการในตำแหน่งผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์และทดสอบ |
| นางสาววรรณรัตน์ | ชุติบุตร | ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี |
| นางสาววนิดา | โนบรรเทา | ผู้อำนวยการกลุ่มบริหารโครงการวิจัย |
| นางอุชฎา | สุขจันทร์ | ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรขอนแก่น |
| นางภาวนา | ลิกขนานนท์ | ผู้ทรงคุณวุฒิ |

.....

## คณะผู้จัดทำ

| | |
|---|---|
| นางสุปรานี มั่นหมาย | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ |
| นางสาวศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ |
| นางประไพ ทองระอา | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ |
| นางสาวนิศารัตน์ ทวีนุต | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ |
| นางสาวจิตรา เกาะแก้ว | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ |
| นางสาวกัลยกร โปร่งจันทึก | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ |
| นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ |
| นายมนต์ชัย มนัสสิลา | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ |
| นางสาวบุณฑริก ฉิมชาติ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ |
| นางสาวกนกอร บุญพา | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ |
| นายสนธยา ขำติ๊บ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ |
| นางสาวณัฐนันท์ ไกรเลิศรัตนชัย | นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ |

.....

จำนวนพิมพ์ : 100 เล่ม
พิมพ์เมื่อ : กันยายน 2566
สถานที่ติดต่อ : กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900
โทรศัพท์ 0 2579 7522 , 0 2579 0065
โทรสาร 0 2561 4763

# คำนำ

จากสถานการณ์ราคาปุ๋ยเคมีแพงและประเทศไทยต้องพึ่งพิงการนำเข้าปุ๋ยเคมี ทำให้เกษตรกรได้รับผลกระทบจากราคาปุ๋ยเคมีที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากโดยเฉลี่ยต้นทุนปุ๋ยเคมีคิดเป็นร้อยละ 20 ของต้นทุนการเพาะปลูกพืชทั้งหมด กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้มีนโยบายส่งเสริมให้เกษตรกรใส่ปุ๋ยคอก ปุ๋ยอินทรีย์ และใช้ปุ๋ยชีวภาพเพื่อลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมี และใช้ปุ๋ยอย่างมีประสิทธิภาพด้วยการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะเป็นการช่วยทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร มีบทบาทสำคัญในการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและการใช้ปุ๋ยชีวภาพในการผลิตพืช สำหรับเป็นแนวทางในการลดหรือทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี รวมถึงสนับสนุนให้มีการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพให้แก่ภาคเอกชน นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการควบคุมคุณภาพของปุ๋ยชีวภาพให้ได้คุณภาพตามมาตรฐาน ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 เพื่อให้เกษตรกรได้ใช้ปุ๋ยชีวภาพที่มีคุณภาพตรงตามมาตรฐาน

การจัดทำ **“คู่มือตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ”** ฉบับนี้ เป็นการรวบรวมและเรียบเรียงหลักการ วิธีการ และเทคนิคต่าง ๆ ในการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ และได้มีการปรับปรุงแก้ไขเพิ่มเติมให้เป็นไปตามหลักสากล เพื่อให้นักวิชาการและผู้เกี่ยวข้องได้เข้าใจถึงวิธีการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพชนิดต่าง ๆ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ และควบคุมกำกับปุ๋ยชีวภาพในท้องตลาดให้มีคุณภาพตามมาตรฐาน ตาม พ.ร.บ. ปุ๋ย ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

(นางจิราพรรณ ทองหยอด)
ผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม | 1 |
| วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ | 10 |
| วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน | 22 |
| วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา | 28 |
| วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต | 33 |
| วิธีการจำแนกสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยวิธีสัณฐานวิทยา | 41 |
| วิธีการจำแนกแบคทีเรียและราด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี | 46 |
| วิธีการจำแนกแบคทีเรียและราด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล | 53 |
| **ภาคผนวก** | |
| คำสั่งกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ที่ 5/2566 เรื่อง แต่งตั้งคณะทำงานจัดการความรู้ (Knowledge Management Team – KM Team) ประจำปีงบประมาณ 2566 | 60 |

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม
# (Method for analyzing rhizobium biofertilizer)

**1. ขอบข่าย (Scope)**

การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมที่มีชีวิตทั้งหมดในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมด้วยวิธี Plant infection

**2. เอกสารอ้างอิง (Reference)**


Broughton, W. J. and M. J. Dilworth. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. Biochemical Journal 125: 1075–1080.

Fisher, R. A. and F. Yates. 1963. Statistical tables for biological, Agricultural and Medical Research. 6th Ed. Oliver & Boyd, Edinburgh and London. 146 p.

Hardy, R.W.F., R.C. Burns and R.D. Holsten. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biology and Biochemistry 5(1): 47–81.

Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in legume-*Rhizobium* technology. University of Hawaii, NifTAL project, Paia, Hawaii. 450 p.


**3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)**

MPN = Most probable number

Plant infection method หมายถึง การวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียมโดยอาศัยการสร้างปมที่รากของพืชทดสอบที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไรโซเบียมในถุงปลูกพืช นับจำนวนถุงปลูกพืชที่สร้างปมที่ราก แล้วนำไปอ่านค่าในตาราง MPN โดยค่าในตาราง MPN นี้เป็นค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งจะเป็นการประมาณค่าทางสถิติถึงปริมาณไรโซเบียม

**4. หลักการ (Principle)**

แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่อาศัยแบบพึ่งพาซึ่งกันและกัน (Symbiosis) กับพืชตระกูลถั่ว สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศ โดยการเข้าอาศัยสร้างปมที่เฉพาะเจาะจงกับพืชตระกูลถั่ว และนับปริมาณไรโซเบียมด้วยวิธี Plant infection วัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene reduction assay (ARA) ตามวิธีของ Hardy *et al*. (1973)

**5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)**

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ: ภาคผนวก 1

5.1.1 อาหาร Yeast mannitol broth (YMB)

5.1.2 สารละลายธาตุอาหารพืชที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (N-free plant nutrient)

5.2 สารเคมี

5.2.1 95% Ethyl alcohol

5.2.2 สารละลายสำหรับเจือจาง ได้แก่ น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง

5.2.3 1N Sodium hydroxide

5.2.4 0.1N Hydrochloric acid

5.2.5 5% Hydrogen peroxide

5.2.6 98% Sulfuric acid

**6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and materials)**

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องชั่ง (Balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง

6.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

6.1.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

6.1.4 เครื่องผสมสารแบบปั่น (Vortex mixer)

6.1.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

6.1.6 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

6.1.7 เครื่องเขย่า (Shaker)

6.1.8 เครื่องวัดแสง (Lux meter)

6.1.9 ชั้นแสงพร้อมหลอดไฟให้แสงสว่าง

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 ขวดแก้วฝาเกลียว (Screw cap bottle)

6.2.2 หลอดทดลอง (Test tube)

6.2.3 ปิเปต (Pipette)

6.2.4 ชุดดูดจ่ายสารละลาย (Dispenser)

6.2.5 เมล็ดถั่วที่ระบุตามชนิดปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

6.2.6 ถุงพลาสติกอย่างหนาและทนร้อน (PP) ขนาด 5 x 8 นิ้ว สำหรับปลูกพืช

6.2.7 กระดาษฟาง

6.2.8 ชั้นวางถุงปลูก

6.2.9 เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

**7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)**

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเป็นของแข็ง (ผงหรือเม็ด) คลุกเคล้าปุ๋ยชีวภาพในภาชนะบรรจุให้เข้ากัน ตักใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อประมาณ 50–100 กรัม

7.1.2 กรณีตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเป็นของเหลวเขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 50–100 กรัม

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า ด้วยสารละลายเจือจางตัวอย่าง ดังนี้

7.2.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพแบบผงหรือเม็ดหรือเหลวจำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดที่มีสารละลายเจือจางที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 20–30 นาที ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที จะได้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-1}$

7.2.2 ปิเปตตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-1}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายสำหรับเจือจางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารแบบปั่น

จะได้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-2}$ จากนั้นทำการเจือจางตามลำดับจนถึงระดับความเจือจาง $10^{-3}$, $10^{-4}$,..., $10^{-8}$

7.3 การนับปริมาณ (Enumeration): ภาคผนวก 2

7.3.1 การเตรียมถุงปลูกพืชและจานเพาะเมล็ด

นึ่งฆ่าเชื้อถุงปลูกพืชที่ภายในบรรจุกระดาษฟางในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวางในชั้นวางถุงปลูก นำจานเพาะเมล็ดที่มีสำลีบรรจุอยู่เต็ม ใส่ในถุงพลาสติกใส ปิดปากถุง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เทน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อลงบนสำลีให้ชุ่มแล้วปิดฝา

7.3.2 การเพาะเมล็ดถั่ว

ทำการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนบนผิวเมล็ดถั่ว กรณีเป็นเมล็ดถั่วเปลือกแข็งต้องทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนนุ่มลงโดยการแช่เมล็ดถั่วใน 98% Sulfuric acid 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 4–6 ครั้ง จากนั้นแช่เมล็ดถั่วในน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–4 ชั่วโมง กรณีเมล็ดถั่วเปลือกอ่อนให้แช่เมล็ดถั่วใน 5% Hydrogen peroxide ให้ท่วมเมล็ดถั่ว เป็นเวลา 15–20 นาที ล้างด้วยน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่า 4–6 ครั้ง จากนั้นแช่เมล็ดถั่วในน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–4 ชั่วโมง แล้วเพาะเมล็ดลงบนจานเพาะ เกลี่ยเมล็ดให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ทิ้งไว้จนเมล็ดงอกรากมีความยาวประมาณ 1.0–1.5 เซนติเมตร (ใช้เวลา 2–3 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของถั่ว) จากนั้นจึงนำเมล็ดถั่วไปปลูกในถุงปลูกต่อไป

7.3.3 การปลูกถั่ว

นำถุงปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อจากข้อ 7.3.1 วางในชั้นวางถุงปลูก เติมสารละลายธาตุอาหารพืชที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (N-free plant nutrient) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ถุงละประมาณ 100 มิลลิลิตร จุ่มปากคีบลงใน 95% Ethyl alcohol เพื่อฆ่าเชื้อปนเปื้อน จากนั้นใช้ปากคีบเจาะรูบนขอบกระดาษฟางที่พับไว้ 1 รู (1 เมล็ด/ถุง) สอดรากเมล็ดถั่วที่รากงอกแล้วลงในรูที่เจาะไว้ โดยเมล็ดถั่วจะอยู่บนขอบกระดาษฟางที่พับไว้ และใช้ผ้าคลุมสีดำเพื่อป้องกันแสง วางทิ้งไว้ 1–2 วัน

7.3.4 ปิเปตตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจางที่ได้จากข้อ 7.2.2 ระดับความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร หยดตรงบริเวณรากถั่ว โดยทำระดับความเจือจางละ 4 ซ้ำ

7.3.5 นำตัวอย่างไปวางบนชั้นแสงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25–30 องศาเซลเซียส ให้ได้รับแสงนาน 12 ชั่วโมงต่อวัน (ประมาณ 5,000–8,000 ลักซ์) เติมสารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากไนโตรเจน เพื่อรักษาระดับสารละลายไม่ให้ต่ำกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายธาตุอาหารพืชที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้น จนครบกำหนด 3 สัปดาห์

**8. การคำนวณ (Calculation of results)**

ตรวจนับจำนวนถุงที่รากต้นถั่วติดปมและนำไปเทียบค่าในตาราง MPN (Most Probable Number) ในภาคผนวก 3 (ดัดแปลงจาก Fisher and Yates, 1963) เพื่อประเมินปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมที่รากต้นถั่ว จากนั้นคำนวณปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมต่อกรัมของปุ๋ยชีวภาพ ดังนี้

$$X = \frac{m \times d}{V}$$

X = ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียม (เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม)

m = ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมที่ประเมินโดยวิธี Plant infection

d = ค่า dilution factor ของสารละลายปุ๋ยชีวภาพที่ใส่ให้กับต้นถั่ว (เท่ากับ 10)

V = ปริมาตรสารแขวนลอยปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเจือจางที่ใส่ให้กับต้นถั่ว (1 มิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ

นับจำนวนถุงที่พบการสร้างปมที่รากต้นถั่ว ได้ 20 ถุง จากทั้งหมด 32 ถุง เมื่อนำไปเปิดตาราง MPN จะได้ค่า m = $1.7 \times 10^4$ คำนวณจำนวนไรโซเบียม จากสูตร

$$X = \frac{m \times d}{V}$$

$$X = \frac{1.7 \times 10^4 \times 10}{1}$$

ปริมาณไรโซเบียมที่ตรวจพบ $1.7 \times 10^5$ เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

**9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)**

รายงานปริมาณไรโซเบียม หน่วยเป็น เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

9.1 การรายงานผลการทดสอบในกรณีที่มีค่าตั้งแต่ 100 เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม ให้รายงานผลการทดสอบในรูปของเลขยกกำลัง โดยมีจุดทศนิยม 1 หลัก (ภาคผนวก 3)

**เช่น** $1.6 \times 10^3$ เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

9.2 การรายงานผลการทดสอบในกรณีที่มีค่าต่ำกว่า 100 เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม ให้รายงานเป็นเลขจำนวนเต็ม (ตามภาคผนวก 3)

**เช่น** 58 เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

9.3 การรายงานผลการทดสอบในกรณีที่ไม่พบจำนวนถุงปลูกของพืชวงศ์ถั่วที่เกิดปมราก (ไม่มีถุงใดเกิดปมราก) ให้รายงานผลการทดสอบเป็น **Non Detection** (ภาคผนวก 3)

**เช่น** Non detection หมายถึง ไม่พบ

9.4 การรายงานผลการทดสอบในกรณีที่ตรวจพบจำนวนถุงปลูกของพืชวงศ์ถั่วที่เกิดปมรากที่มากกว่า 30 ถุง ขึ้นไป ให้รายงานผลการทดสอบในลักษณะประมาณค่า (ภาคผนวก 3)

**เช่น** มากกว่า $7.0 \times 10^7$ เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

**10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)**

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: การนับปริมาณ (Enumeration) ไรโซเบียมโดยวิธี Plant infection

10.3 ภาคผนวก 3: ตาราง MPN แสดงจำนวนไรโซเบียมที่ประเมินโดยวิธี Plant infection (ค่า m) และปริมาณไรโซเบียมจากการคำนวณในหน่วยเซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

# ภาคผนวก 1

## อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
## (Culture media and reagents)

1. Yeast mannitol broth (YMB)

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 Di-potassium hydrogen phosphate | 0.5 | กรัม |
| 1.2 Sodium chloride | 0.1 | กรัม |
| 1.3 Magnesium sulfate heptahydrate | 0.2 | กรัม |
| 1.4 D-mannitol | 10 | กรัม |
| 1.5 สารละลาย 0.25% Congo red | 10 | มิลลิลิตร |
| 1.6 Yeast extract | 0.5 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 1.1–1.4 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองประมาณ 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Congo red และ Yeast extract คนสารละลายอย่างต่อเนื่องจนเข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ในกรณีต้องการใช้อาหารแข็งเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

2. สารละลายธาตุอาหารพืชที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (N-free plant nutrient) เป็นสารละลายตั้งต้นชนิดเข้มข้น (Stock solution)

| | | |
|---|---|---|
| <u>Stock 1 ปริมาตร 1 ลิตร</u> | | |
| - Calcium chloride dihydrate | 294.1 | กรัม |
| <u>Stock 2 ปริมาตร 1 ลิตร</u> | | |
| - Potassium dihydrogen phosphate | 136.1 | กรัม |
| <u>Stock 3 ปริมาตร 1 ลิตร</u> | | |
| - Ethylenediaminetetraacetic acid ferric monosodium salt | 6.7 | กรัม |
| - Magnesium sulfate heptahydrate | 123.3 | กรัม |
| - Potassium sulfate | 87 | กรัม |
| - Manganese sulfate monohydrate | 0.338 | กรัม |
| <u>Stock 4 ปริมาตร 1 ลิตร</u> | | |
| - Boric acid | 0.247 | กรัม |
| - Zinc sulfate heptahydrate | 0.288 | กรัม |
| - Copper sulfate pentahydrate | 0.1 | กรัม |
| - Cobalt sulfate heptahydrate | 0.056 | กรัม |
| - Sodium molybdate dihydrate | 0.048 | กรัม |

ชั่งสารปริมาณตามแต่ละ Stock ข้างต้น (Stock 1–4) ละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปิเปต Stock 2–4 อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

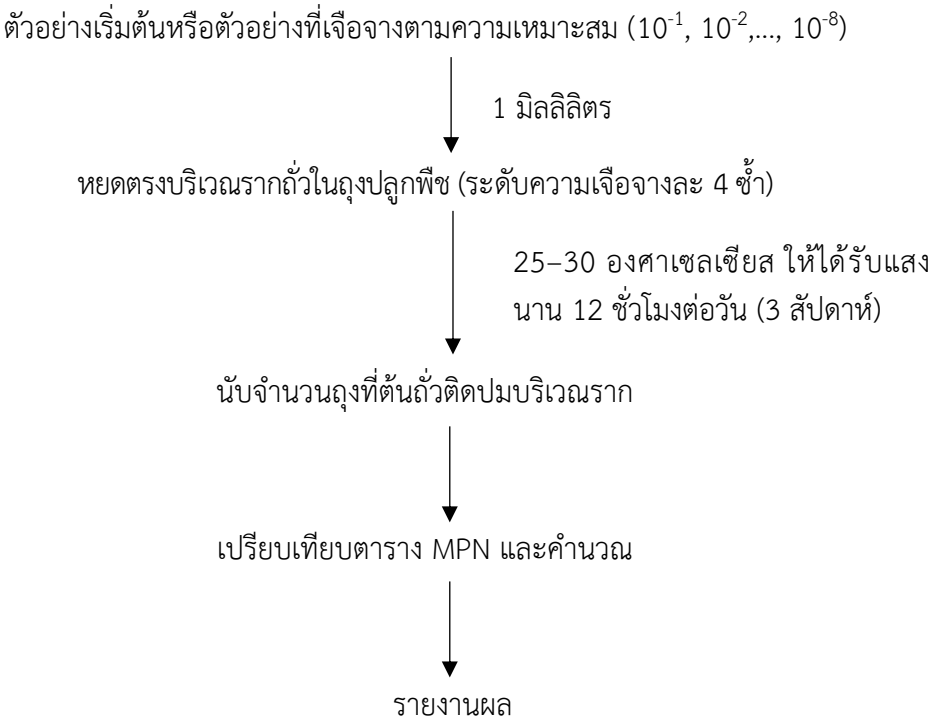
เติม Stock 1 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง ปรับ pH สารละลายให้เป็น 6.5 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และเก็บสารละลายตั้งต้นชนิดเข้มข้น (Stock solution) ไว้ที่อุณหภูมิ 5–8 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลาย 0.25% Congo red

| | | |
|---|---|---|
| 3.1 Congo red | 0.25 | กรัม |
| 3.2 น้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ | 100 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 3.1 ในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

## ภาคผนวก 2




**ขั้นตอน** การนับปริมาณ (Enumeration) ไรโซเบียมโดยวิธี Plant infection

# ภาคผนวก 3

**ตาราง MPN แสดงจำนวนไรโซเบียมที่ประเมินโดยวิธี Plant infection (ค่า m) และปริมาณไรโซเบียมจากการคำนวณในหน่วยเซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม**

| จำนวนถุงปลูกของพืชที่เกิดปมราก | ค่า m ที่เปิดได้จากตาราง MPN | ปริมาณไรโซเบียม (เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม) |
|---|---|---|
| 32 | $> 7.0 \times 10^6$ | $> 7.0 \times 10^7$ |
| 31 | $> 7.0 \times 10^6$ | $> 7.0 \times 10^7$ |
| 30 | $6.9 \times 10^6$ | $6.9 \times 10^7$ |
| 29 | $3.4 \times 10^6$ | $3.4 \times 10^7$ |
| 28 | $1.8 \times 10^6$ | $1.8 \times 10^7$ |
| 27 | $1.0 \times 10^6$ | $1.0 \times 10^7$ |
| 26 | $5.9 \times 10^5$ | $5.9 \times 10^6$ |
| 25 | $3.1 \times 10^5$ | $3.1 \times 10^6$ |
| 24 | $1.7 \times 10^5$ | $1.7 \times 10^6$ |
| 23 | $1.0 \times 10^5$ | $1.0 \times 10^6$ |
| 22 | $5.8 \times 10^4$ | $5.8 \times 10^5$ |
| 21 | $3.1 \times 10^4$ | $3.1 \times 10^5$ |
| 20 | $1.7 \times 10^4$ | $1.7 \times 10^5$ |
| 19 | $1.0 \times 10^4$ | $1.0 \times 10^5$ |
| 18 | $5.8 \times 10^3$ | $5.8 \times 10^4$ |
| 17 | $3.1 \times 10^3$ | $3.1 \times 10^4$ |
| 16 | $1.7 \times 10^3$ | $1.7 \times 10^4$ |
| 15 | $1.0 \times 10^3$ | $1.0 \times 10^4$ |
| 14 | $5.8 \times 10^2$ | $5.8 \times 10^3$ |
| 13 | $3.1 \times 10^2$ | $3.1 \times 10^3$ |
| 12 | $1.7 \times 10^2$ | $1.7 \times 10^3$ |
| 11 | $1.0 \times 10^2$ | $1.0 \times 10^3$ |
| 10 | $5.8 \times 10^1$ | $5.8 \times 10^2$ |
| 9 | $3.1 \times 10^1$ | $3.1 \times 10^2$ |
| 8 | $1.7 \times 10^1$ | $1.7 \times 10^2$ |
| 7 | $1.0 \times 10^1$ | $1.0 \times 10^2$ |
| 6 | 5.8 | 58 |
| 5 | 3.1 | 31 |
| 4 | 1.7 | 17 |
| 3 | 1.0 | 10 |
| 2 | 0.6 | 6 |
| 1 | < 0.6 | < 6 |
| 0 | --- | Non-Detection |

**ที่มา** : ดัดแปลงจาก Fisher and Yates (1963)

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์
# (Method for analyzing PGPR biofertilizer)

**1. ขอบข่าย (Scope)**

การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Micro aerophilic bacteria) และสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญ

**2. เอกสารอ้างอิง (Reference)**


Cavalcante, V.A. and J. Dobereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil 108: 23–31.

Cochran, W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number." Biometrics 6: 105–116.

Dobereiner, J. 1980. Forage grasses and grain crops, pp. 535–555. *In* Methods for evaluating biological nitrogen fixation, Ed. F. J. Bergersen. John Wiley & Sons Ltd. New York.

Dobereiner, J. and J.M. Day. 1976. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. pp. 518–538. *In* W.E. Newton and C.J.N. Nyman (eds.) Proc 1st "Int Symp Nitrogen Fixation." Washington: Pullman, Washington State University Press.

Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of Salkowski reagent for indolic compounds phytopathogenic bacteria. Applied Environmental Microbiology 61(2): 793–796.

Hardy, R.W.F., R.C. Burns and R.D. Holsten. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biology and Biochemistry 5(1): 47–81.

Knowles, R. and W.L. Barraquio. 1994. Free living dinitrogen-fixing bacteria, pp. 179–197. *In* R.W. Weaver *et al*. (eds.) Method of soil analysis, Part 2. Microbiological and biochemical properties, Soil Science Society of America, Madison, WI.


**3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)**

CFU หมายถึง Colony forming unit

Cross streak plate หมายถึง วิธีการการแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ลูปเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีแล้วลากหรือขีดบนอาหารแข็ง ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4–5 เส้น

MPN (Most probable number) หมายถึง การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม Micro aerophile โดยอาศัยการสร้างฝ้าสีขาว (Pellicle) ในหลอดทดลองในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Semi solid media) จากจำนวนของหลอดทดลองที่ให้ผลบวก (Positive) ของแต่ละระดับการเจือจาง 5 ระดับ แล้วนำไปอ่านหาค่าในตาราง MPN โดยค่าในตาราง MPN นี้เป็นค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งจะเป็นการประมาณค่าทางสถิติของปริมาณแบคทีเรีย

Viable plate count หมายถึง การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม Aerobic ที่ยังมีชีวิตอยู่ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเป็นรูปแบบโคโลนีได้บนอาหารแข็ง (Agar media)

**4. หลักการ (Principle)**

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่มแอโรบิค (Aerobic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนและสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญ ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเพิ่มปริมาณและเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารแข็งที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนได้ และนับปริมาณด้วยวิธี Viable plate count

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่มไมโครแอโรฟิลิค (Micro aerophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยและสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโต ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนได้ และนับปริมาณด้วยวิธี MPN

การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene reduction assay (ARA) ตามวิธีของ Hardy *et al*. (1973) และวัดการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) ด้วยวิธี Salkowski's colorimetric assay ตามวิธีของ Glickmann and Dessaux (1995)

**5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)**

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ: ภาคผนวก 1

5.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุล *Azotobacter*

5.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุล *Beijerinckia*

5.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุล *Azospirillum*

5.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุล *Gluconacetobacter*

5.2 สารเคมี

5.2.1 สารละลาย Bromothymol blue

5.2.2 95% Ethyl alcohol

5.2.3 สารละลายสำหรับเจือจาง ได้แก่ น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง หรือ 0.85% Sodium chloride

5.2.4 1N Sodium hydroxide

5.2.5 0.1N Hydrochloric acid

**6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and materials)**

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องชั่ง (Balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง

6.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

6.1.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

6.1.4 เครื่องผสมสารแบบปั่น (Vortex mixer)

6.1.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

6.1.6 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

6.1.7 เครื่องเขย่า (Shaker)

6.1.8 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography)

6.1.9 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 ขวดแก้วฝาเกลียว (Screw cap bottle)

6.2.2 หลอดทดลอง (Test tube)

6.2.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

6.2.4 แท่งแก้วงอ (Glass spreader)

6.2.5 ปิเปต (Pipette)

6.2.6 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

6.2.7 ชุดดูดจ่ายสารละลาย (Dispenser)

6.2.8 เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

**7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)**

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเป็นของแข็ง (ผงหรือเม็ด) คลุกเคล้าปุ๋ยชีวภาพในภาชนะบรรจุให้เข้ากัน ตักใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อประมาณ 50–100 กรัม

7.1.2 กรณีตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเป็นของเหลวเขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 50–100 กรัม

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า ด้วยสารละลายเจือจางตัวอย่างดังนี้

7.2.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพแบบผงหรือเม็ดหรือเหลวจำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดที่มีสารละลายเจือจางที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 20–30 นาที ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที จะได้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-1}$

7.2.2 ปิเปตตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-1}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายสำหรับเจือจางที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารแบบปั่น จะได้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-2}$ จากนั้นทำการเจือจางตามลำดับจนถึงระดับความเจือจาง $10^{-3}$, $10^{-4}$,..., $10^{-n}$

7.3 การนับปริมาณ (Enumeration): ภาคผนวก 2 และ 3

7.3.1 แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน: โดยวิธี Viable plate count

7.3.1.1 เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง

7.3.1.2 ปิเปตตัวอย่างสารแขวนลอยปุ๋ยชีวภาพที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ $10^{-1}$ จนถึงระดับความเจือจางที่ต้องการ จากข้อ 7.2.2 ระดับละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารที่เตรียมไว้ เกลี่ยให้กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอ โดยทำระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ ในตู้ปลอดเชื้อ

7.3.1.3 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3–5 วัน

7.3.1.4 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อจากข้อ 7.3.1.3 ที่มีเชื้อเจริญ 30–300 โคโลนี

7.3.2 แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย: โดยวิธี MPN

7.3.2.1 ปิเปตตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ $10^{-1}$ จนถึงระดับความเจือจางที่ต้องการ จากข้อ 7.2.2 ระดับละ 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำระดับความเจือจางละ 5 ซ้ำ ในตู้ปลอดเชื้อ

7.3.2.2 บ่มหลอดทดลองในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5–7 วัน

7.3.2.3 นับจำนวนหลอดทดลองที่ได้จากข้อ 7.3.2.2 ของแต่ละระดับความเจือจางที่มีเชื้อเจริญเป็นฝ้าสีขาว ภายใต้ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.4 การแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak plate บนอาหารแข็งสูตรจำเพาะของแต่ละสกุล จนได้โคโลนีเดี่ยว (Single colony)

7.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีของ Hardy *et al.* (1973)

7.5.1 นำแบคทีเรียจากข้อ 7.4 เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรจำเพาะของแต่ละสกุล และบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48–96 ชั่วโมง

7.5.2 ปิเปตอาหารเหลว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน NFb ในหลอดทดลองขนาด 21 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารบรรจุอยู่ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48–96 ชั่วโมง

7.5.3 เปลี่ยนจุกหลอดทดลองให้เป็นจุกยางสำหรับเก็บก๊าซ ดูดอากาศภายในหลอดทดลองออก 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ของปริมาตรส่วนช่องว่างที่เหลือเหนืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Head space) เติมก๊าซ Acetylene ($C_2H_2$) ในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.5.4 ใช้ไซริงค์ดึงก๊าซจากหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตรวจวัดปริมาณ Ethylene ($C_2H_4$) ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) ที่มีตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)

7.6 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสาร Indole-3-Acetic Acid (IAA) โดยวิธี Salkowski's colorimetric assay ตามวิธีของ Glickmann and Dessaux (1995)

7.6.1 นำแบคทีเรียจากข้อ 7.4 เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรจำเพาะของแต่ละสกุล และทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48–96 ชั่วโมง

7.6.2 ปิเปตเชื้อเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร NFb ที่เติม L–tryptophan 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีอาหารบรรจุอยู่ 10 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องเขย่าและทำการบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48–96 ชั่วโมง

7.6.3 ปิเปตเชื้อเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

7.6.4 ปิเปตสารละลายส่วนใส (Supernatant) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม Salkowski's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มไว้ในที่มืดนาน 30 นาที

7.6.5 วัดปริมาณ IAA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

**8. การคำนวณ (Calculation of results)**

8.1 แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน: โดยวิธี Viable plate count

คำนวณจำนวนแบคทีเรียเป็นค่าเฉลี่ยของการนับโคโลนีจาก 3 จานเพาะเชื้อ และคูณด้วยส่วนกลับของระดับความเจือจางต่ำสุด

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

ก. ระดับความเจือจางของปุ๋ยชีวภาพที่ $10^{-4}$ จำนวนโคโลนีที่นับได้จากจานเพาะเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ คือ 35 40 และ 45 โคโลนี ตามลำดับ

ข. รวมจำนวนเชื้อที่นับได้เท่ากับ 35+40+45 = 120 โคโลนี

ค. หาค่าเฉลี่ยโดยนำจำนวนโคโลนีที่รวมกันแล้วหารด้วยจำนวนซ้ำเท่ากับ 120/3 = 40 โคโลนี

ง. คูณค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วยส่วนกลับของระดับความเจือจางต่ำสุด เท่ากับ $40 \times 10^4 = 4.0 \times 10^5$ โคโลนีต่อ 0.1 มิลลิลิตร

จ. ปรับหน่วยให้เป็นโคโลนีต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพเท่ากับ $4.0 \times 10^5 \times 10 = 4.0 \times 10^6$ โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม (CFU/g)

8.2 แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย: โดยวิธี MPN

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

ก. ระดับความเจือจางที่ใช้ คือ $10^{-1}$, $10^{-2}$,..., $10^{-5}$ ระดับความเจือจางละ 5 ซ้ำ ใส่ตัวอย่างระดับความจางละ 0.1 มิลลิลิตร

ข. มีจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก คือ $10^{-1}$ = 5, $10^{-2}$ = 5, $10^{-3}$ = 4, $10^{-4}$ = 3, $10^{-5}$ = 1 เลือกชุดลำดับความเจือจาง 3 ระดับ คือ ที่ระดับความเข้มข้น P1 = 4, P2 = 3, P3 = 1 จึงใช้ตัวเลข 4-3-1 ไปเปิดตาราง MPN ภาคผนวก 4 ได้ 0.21

P1 มีหลอดที่ให้ผลบวก 4 หลอดจาก 5 หลอด (ระดับการเจือจางแรกควรเข้าใกล้ 5)

P2 มีหลอดที่ให้ผลบวก 3 หลอดจาก 5 หลอด

P3 มีหลอดที่ให้ผลบวก 1 หลอดจาก 5 หลอด (ระดับการเจือจางสุดท้ายควรเข้าใกล้ 0 ไม่ควรเกิน 2)

ค. นำค่า 0.21 ที่เปิดได้จากตาราง คูณด้วยส่วนกลับของระดับความเจือจางที่ P2 เท่ากับ $0.21 \times 10^4 \times 10$ (ปรับหน่วยให้เป็นเซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ) เท่ากับ $2.1 \times 10^4$ หรือ 21,000 เซลล์ต่อกรัม

ง. ปรับหน่วยให้เป็นเซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพเท่ากับ $2.1 \times 10^4$ หรือ 21,000 เซลล์ต่อ/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

**9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)**

9.1 รายงานปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธี Viable plate count หน่วยเป็น โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

9.2 รายงานปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธี MPN หน่วยเป็น เซลล์/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

9.3 กรณีที่ไม่พบแบคทีเรีย

ใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร รายงานเป็น น้อยกว่า 1 x ระดับความเจือจางแรกที่ทดสอบ x 10

9.3 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ และเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4 แต่ถ้าตำแหน่งที่สามเป็น 5 ต้องดูตัวเลข

ตำแหน่งที่สอง หากตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคู่ ให้คงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม แต่ถ้าตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคี่ ให้เพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับ

| | | | |
|---|---|---|---|
| ตัวอย่าง: | 456 | ปรับให้เป็น | 460 |
| | 454 | ปรับให้เป็น | 450 |
| | 445 | ปรับให้เป็น | 440 |
| | 455 | ปรับให้เป็น | 460 |

9.4 รายงานผลการทดสอบให้รายงานเป็นตัวเลขยกกำลัง หากมีปริมาณแบคทีเรีย มากกว่า 100 โคโลนีหรือเซลล์/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม ตัวอย่างเช่น 460 ให้รายงานเป็น $4.6\times10^2$ โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

**10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)**

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: การนับปริมาณ (Enumeration) แบคทีเรียโดยวิธี Viable plate count

10.3 ภาคผนวก 3: การนับปริมาณ (Enumeration) แบคทีเรียโดยวิธี MPN

10.4 ภาคผนวก 4: ตาราง MPN สำหรับตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่า เมื่อใช้ระดับความเจือจางละ 5 หลอด

# ภาคผนวก 1

## อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
## (Culture media and reagents)

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* (Dobereiner, 1980)

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 Di-potassium hydrogen phosphate | 0.05 | กรัม |
| 1.2 Potassium dihydrogen phosphate | 0.15 | กรัม |
| 1.3 Magnesium sulfate heptahydrate | 0.2 | กรัม |
| 1.4 Calcium chloride dihydrate | 0.02 | กรัม |
| 1.5 Ferric chloride | 0.01 | กรัม |
| 1.6 Sodium molybdate | 0.002 | กรัม |
| 1.7 Glucose | 20 | กรัม |
| 1.8 Calcium carbonate | 1 | กรัม |
| 1.9 สารละลาย 0.5% Bromothymol blue | 2 | มิลลิลิตร |
| 1.10 ผงวุ้น | 15 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 1.1–1.8 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น (คนสารละลายอย่างต่อเนื่องจนเข้ากัน) เติมสารละลาย 0.5% Bromothymol blue จากนั้นปรับ pH เป็น 6.8 ด้วยสารละลาย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุล *Beijerinckia* (Dobereiner, 1980)

| | | |
|---|---|---|
| 2.1 Glucose | 20 | กรัม |
| 2.2 Potassium dihydrogen phosphate | 1 | กรัม |
| 2.3 Ferric chloride | 0.01 | กรัม |
| 2.4 Sodium molybdate | 0.02 | กรัม |
| 2.5 Magnesium sulfate heptahydrate | 0.5 | กรัม |
| 2.6 ผงวุ้น | 15 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 2.1–2.5 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น (คนสารละลายอย่างต่อเนื่องจนเข้ากัน) จากนั้นปรับ pH เป็น 5.0 ด้วยสารละลาย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* (Dobereiner and Day, 1976)

| | | |
|---|---|---|
| 3.1 Malic acid | 5 | กรัม |
| 3.2 Di-potassium hydrogen phosphate | 0.1 | กรัม |
| 3.3 Potassium dihydrogen phosphate | 0.4 | กรัม |

| | | |
|---|---|---|
| 3.4 Magnesium sulfate heptahydrate | 0.2 | กรัม |
| 3.5 Sodium chloride | 0.1 | กรัม |
| 3.6 Calcium chloride dihydrate | 0.02 | กรัม |
| 3.7 Ferric chloride | 0.01 | กรัม |
| 3.8 Sodium molybdate | 0.002 | กรัม |
| 3.9 Potassium hydroxide | 4 | กรัม |
| 3.10 สารละลาย 0.5% Bromothymol blue | 2 | มิลลิลิตร |
| 3.11 ผงวุ้น | 0.9 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ตามข้อ 3.1–3.9 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงวุ้น คนสารละลายอย่างต่อเนื่องจนเข้ากัน และเติมสารละลาย 0.5% Bromothymol blue จากนั้นปรับ pH เป็น 6.8 ด้วยสารละลาย 1 N KOH และ 1 N HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แบ่งสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดทดลอง จำนวน 5 มิลลิลิตร ปิดฝา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุล *Gluconacetobacter* (Cavalcante and Dobereiner, 1988)

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 Di-potassium hydrogen phosphate | 0.2 | กรัม |
| 4.2 Potassium dihydrogen phosphate | 0.6 | กรัม |
| 4.3 Magnesium sulfate heptahydrate | 0.2 | กรัม |
| 4.4 Calcium chloride dihydrate | 0.02 | กรัม |
| 4.5 Ferric chloride | 0.01 | กรัม |
| 4.6 Sodium molybdate | 0.002 | กรัม |
| 4.7 Sucrose | 100 | กรัม |
| 4.8 น้ำอ้อย | 10 | มิลลิลิตร |
| 4.9 สารละลาย 0.5% Bromothymol blue ใน 0.2 N KOH | 5 | มิลลิลิตร |
| 4.10 ผงวุ้น | 0.9 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ตามข้อ 4.1–4.8 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงวุ้น คนสารละลายอย่างต่อเนื่องจนเข้ากัน และเติมสารละลาย 0.5% Bromothymol blue ใน 0.2 N KOH จากนั้นปรับ pH เป็น 6.0 ด้วยสารละลาย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แบ่งสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดทดลอง จำนวน 5 มิลลิลิตร ปิดฝา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

5. การเตรียมสารละลาย 0.5% Bromothymol blue

| | | |
|---|---|---|
| 5.1 Bromothymol blue | 0.5 | กรัม |
| 5.2 95% Ethyl alcohol | 100 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 5.1 ใน 95% Ethyl alcohol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6. การเตรียมสารละลาย 0.5% Bromothymol blue ใน 0.2 N KOH

| | | |
|---|---|---|
| 6.1 Bromothymol blue | 0.5 | กรัม |
| 6.2 Potassium hydroxide | 0.891 | กรัม |
| 6.3 95% Ethyl alcohol | 100 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 6.1–6.2 ใน 95% Ethyl alcohol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

7. การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจาง 0.85% Sodium chloride

| | | |
|---|---|---|
| 7.1 Sodium chloride | 8.5 | กรัม |
| 7.2 น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง | 1 | ลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 7.1 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปริมาตร 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

8. การเตรียม Salkowski’s reagent

8.1 สารละลาย 35% Perchloric Acid

| | | |
|---|---|---|
| 8.1.1 70% Perchloric Acid | 250 | มิลลิลิตร |
| 8.1.2 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 250 | มิลลิลิตร |

ตวงสารข้อ 8.1.1 และเทช้า ๆ ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อผสมให้เข้ากัน

8.2 สารละลาย 0.5 M Ferric chloride

| | | |
|---|---|---|
| 8.2.1 Ferric chloride | 0.8 | กรัม |
| 8.2.2 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 10 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

8.3 ผสมสารละลายข้อ 8.1 และ 8.2 เข้าด้วยกัน จะได้ Salkowski’s reagent

9. การเตรียมสารละลาย 1 N NaOH

| | | |
|---|---|---|
| 9.1 Sodium hydroxide | 4 | กรัม |
| 9.2 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 100 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

10. การเตรียมสารละลาย 1 N KOH

| | | |
|---|---|---|
| 10.1 Potassium hydroxide | 5.61 | กรัม |
| 10.2 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 100 | มิลลิลิตร |

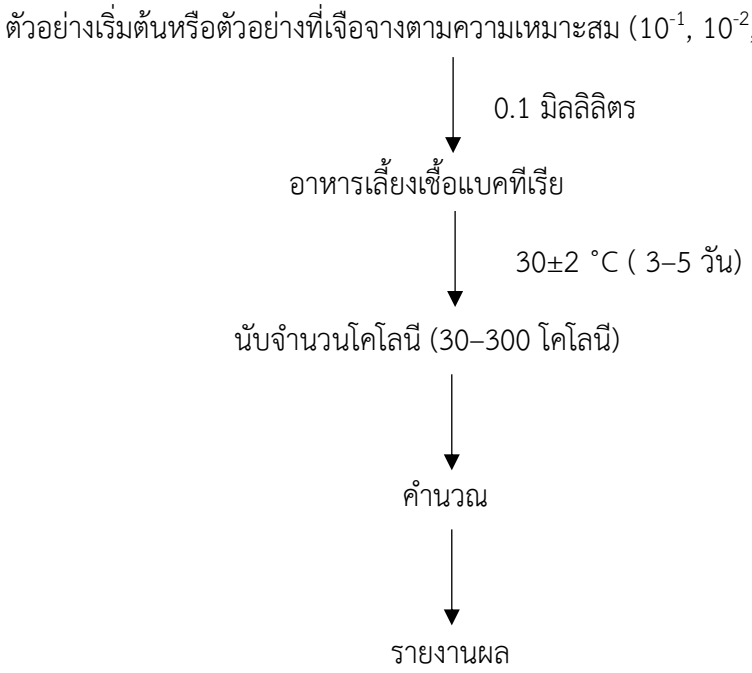
ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

11. การเตรียมสารละลาย 1 N HCl

| | | |
|---|---|---|
| 11.1 37% HCl | 8.3 | มิลลิลิตร |
| 11.2 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 91.7 | มิลลิลิตร |

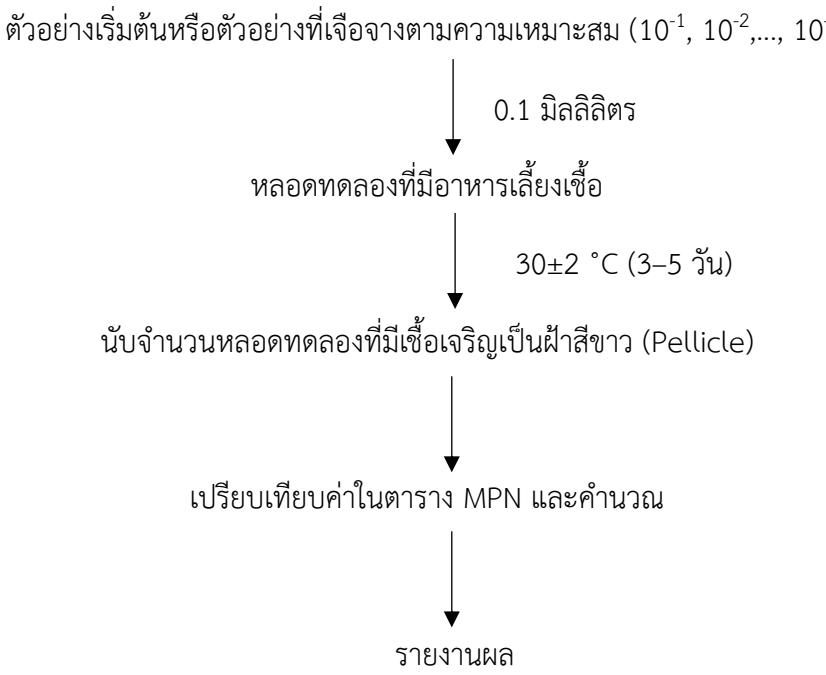
ตวงสารข้อ 11.1 เทช้า ๆ ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อผสมให้เข้ากัน

## ภาคผนวก 2




**ขั้นตอน** การนับปริมาณ (Enumeration) แบคทีเรียโดยวิธี Viable plate count

## ภาคผนวก 3




**ขั้นตอน** การนับปริมาณ (Enumeration) แบคทีเรียโดยวิธี MPN

# ภาคผนวก 4

## ตาราง MPN สำหรับตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่า เมื่อใช้ระดับความเจือจางละ 5 หลอด

| | | ค่า MPN ของระดับความเจือจางที่ 3 (P3) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | P2 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0 | 0 | - | 0.018 | 0.036 | 0.054 | 0.072 | 0.09 |
| 0 | 1 | 0.018 | 0.036 | 0.055 | 0.073 | 0.091 | 0.11 |
| 0 | 2 | 0.037 | 0.055 | 0.074 | 0.092 | 0.11 | 0.13 |
| 0 | 3 | 0.056 | 0.074 | 0.093 | 0.11 | 0.13 | 0.15 |
| 0 | 4 | 0.075 | 0.094 | 0.11 | 0.13 | 0.15 | 0.17 |
| 0 | 5 | 0.094 | 0.11 | 0.13 | 0.15 | 0.17 | 0.19 |
| 1 | 0 | 0.02 | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.10 | 0.12 |
| 1 | 1 | 0.04 | 0.061 | 0.081 | 0.10 | 0.12 | 0.14 |
| 1 | 2 | 0.061 | 0.082 | 0.10 | 0.12 | 0.15 | 0.17 |
| 1 | 3 | 0.083 | 0.10 | 0.13 | 0.15 | 0.17 | 0.19 |
| 1 | 4 | 0.11 | 0.13 | 0.15 | 0.17 | 0.19 | 0.22 |
| 1 | 5 | 0.13 | 0.15 | 0.17 | 0.19 | 0.22 | 0.24 |
| 2 | 0 | 0.045 | 0.068 | 0.091 | 0.12 | 0.14 | 0.16 |
| 2 | 1 | 0.68 | 0.092 | 0.12 | 0.14 | 0.17 | 0.19 |
| 2 | 2 | 0.093 | 0.12 | 0.14 | 0.17 | 0.19 | 0.22 |
| 2 | 3 | 0.12 | 0.14 | 0.17 | 0.20 | 0.22 | 0.25 |
| 2 | 4 | 0.15 | 0.17 | 0.20 | 0.23 | 0.25 | 0.28 |
| 2 | 5 | 0.17 | 0.20 | 0.23 | 0.26 | 0.29 | 0.32 |
| 3 | 0 | 0.078 | 0.11 | 0.13 | 0.16 | 0.20 | 0.23 |
| 3 | 1 | 0.11 | 0.14 | 0.17 | 0.20 | 0.23 | 0.27 |
| 3 | 2 | 0.14 | 0.17 | 0.20 | 0.24 | 0.27 | 0.31 |
| 3 | 3 | 0.17 | 0.21 | 0.24 | 0.28 | 0.31 | 0.35 |
| 3 | 4 | 0.21 | 0.24 | 0.28 | 0.32 | 0.36 | 0.40 |
| 3 | 5 | 0.25 | 0.26 | 0.32 | 0.37 | 0.41 | 0.45 |
| 4 | 0 | 0.13 | 0.17 | 0.21 | 0.25 | 0.30 | 0.36 |
| 4 | 1 | 0.17 | 0.21 | 0.26 | 0.31 | 0.36 | 0.42 |
| 4 | 2 | 0.22 | 0.26 | 0.32 | 0.38 | 0.44 | 0.50 |
| 4 | 3 | 0.17 | 0.21 | 0.24 | 0.28 | 0.31 | 0.35 |
| 4 | 4 | 0.34 | 0.40 | 0.47 | 0.54 | 0.62 | 0.69 |
| 4 | 5 | 0.41 | 0.48 | 0.56 | 0.64 | 0.72 | 0.81 |
| 5 | 0 | 0.23 | 0.31 | 0.43 | 0.58 | 0.76 | 0.95 |
| 5 | 1 | 0.33 | 0.46 | 0.64 | 0.84 | 1.1 | 1.3 |
| 5 | 2 | 0.49 | 0.7 | 0.95 | 1.2 | 1.5 | 1.8 |
| 5 | 3 | 0.79 | 1.1 | 1.4 | 1.8 | 2.1 | 2.5 |
| 5 | 4 | 1.3 | 1.7 | 2.2 | 2.8 | 3.5 | 4.3 |
| 5 | 5 | 2.4 | 3.5 | 5.4 | 9.2 | 16 | - |

**ที่มา:** Cochran (1950)

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
# (Method for analyzing Blue-green algae biofertilizer)

**1. ขอบข่าย (Scope)**

การตรวจวิเคราะห์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตในปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

**2. เอกสารอ้างอิง (Reference)**


Allen, M.B. and D.I. Arnon. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* LEMM. Plant Physiology 30(4): 366–372.

Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herman and R.Y. Stanier. 1979. Generic assignment, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. Journal of General Microbiology 111: 1–61.

Waterbury, J.B. and R.Y. Stanier. 1981. Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments, pp. 221–223. *In* M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel (eds.). The Prokaryotes : A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. Springer Publishing Company, Berlin.


**3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)**

-

**4. หลักการ**

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำพวกตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย การนับปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถดำเนินการได้เช่นเดียวกันกับการนับปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด คือ วิธี Viable plate count โดยทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีการเจือจางเป็นลำดับ (Serial dilution) จากนั้นเกลี่ยเชื้อ (Spread plate) สารละลายเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแหล่งของไนโตรเจนให้ทั่วผิวหน้าแล้วนำไปบ่มเชื้อไว้ภายใต้สภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ 4,000–7,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 27–30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30–45 วัน จึงทำการนับปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

**5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)**

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ: ภาคผนวก 1

5.1.1 อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

5.2 สารเคมี

5.2.1 95% Ethyl alcohol

5.2.2 สารละลายสำหรับเจือจาง ได้แก่ น้ำกลั่นหรือน้ำกรองหรือ 0.85% Sodium chloride

5.2.3 1 N Sodium hydroxide

5.2.4 0.1 N Hydrochloric acid

**6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and materials)**

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องชั่ง (Balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง

6.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

6.1.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

6.1.4 เครื่องผสมสารแบบปั่น (Vortex mixer)

6.1.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

6.1.6 เครื่องเขย่า (Shaker)

6.1.7 เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)

6.1.8 ชั้นแสงพร้อมหลอดไฟให้แสงสว่าง

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 ขวดแก้วฝาเกลียว (Screw cap bottle)

6.2.2 หลอดทดลอง (Test tube)

6.2.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

6.2.4 แท่งแก้วงอ (Glass spreader)

6.2.5 ปิเปต (Pipette)

6.2.6 ชุดดูดจ่ายสารละลาย (Dispenser)

6.2.7 พาราฟิล์ม

6.2.8 เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

**7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)**

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเป็นของแข็ง (ผงหรือเม็ด) คลุกเคล้าปุ๋ยชีวภาพในภาชนะบรรจุให้เข้ากัน ตักใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อประมาณ 50–100 กรัม

7.1.2 กรณีตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 50–100 กรัม

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า ด้วยสารละลายเจือจางตัวอย่างดังนี้

7.2.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพแบบผงหรือเม็ดหรือเหลว จำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดที่มีสารละลายเจือจางที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากันประมาณ 20–30 นาที ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที จะได้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-1}$

7.2.2 ปิเปตตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-1}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายสำหรับเจือจางที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารแบบปั่นจะได้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-2}$ จากนั้นทำการเจือจางตามลำดับจนถึงระดับความเจือจาง $10^{-3}$, $10^{-4}$,..., $10^{-n}$

7.3 การตรวจนับปริมาณ (Enumeration)

7.3.1 เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง

7.3.2 ปิเปตตัวอย่างสารแขวนลอยปุ๋ยชีวภาพที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ $10^{-1}$ จนถึงระดับความเจือจางที่ต้องการ จากข้อ 7.2.2 ระดับละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารที่เตรียมไว้ เกลี่ยให้กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอ โดยทำระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ ในตู้ปลอดเชื้อ

7.3.3 ปิดขอบจานเพาะเชื้อด้วยพาราฟิล์ม วางไว้บนชั้นแสงที่อุณหภูมิ 27–30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30–45 วัน

7.3.4 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อจากข้อ 7.3.3 ที่มีเชื้อเจริญ 30–300 โคโลนี

**8. การคำนวณ (Calculation of results)**

คำนวณปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นค่าเฉลี่ยของการนับโคโลนีจาก 3 จานเพาะเชื้อ และคูณด้วยระดับความเจือจางต่ำสุด

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

ก. ระดับความเจือจางของปุ๋ยชีวภาพที่ $10^{-4}$ จำนวนโคโลนีที่นับได้จากจานเพาะเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ คือ 35 40 และ 45 โคโลนี ตามลำดับ

ข. รวมจำนวนเชื้อที่นับได้เท่ากับ 35+40+45 = 120 โคโลนี

ค. หาค่าเฉลี่ยโดยนำจำนวนโคโลนีที่รวมกันแล้วหารด้วยจำนวนซ้ำ เท่ากับ 120/3 = 40 โคโลนี

ง. คูณค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วยระดับความเจือจางต่ำสุด (ส่วนกลับของระดับความเจือจาง) เท่ากับ $40 \times 10^4 = 4.0 \times 10^5$ โคโลนีต่อ 0.1 มิลลิลิตร

จ. ปรับหน่วยให้เป็นโคโลนีต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ เท่ากับ $4.0 \times 10^5 \times 10 = 4.0 \times 10^6$ โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม (CFU/g)

**9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)**

9.1 ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินรายงานหน่วยเป็น โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

9.2 กรณีที่ไม่พบโคโลนีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร รายงานเป็น น้อยกว่า 1 x ระดับความเจือจางแรกที่ทดสอบ x 10

9.3 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ และเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4 แต่ถ้าตำแหน่งที่สามเป็น 5 ต้องดูตัวเลขตำแหน่งที่สอง หากตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคู่ให้คงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม แต่ถ้าตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคี่ ให้เพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับ

| | | | |
|---|---|---|---|
| ตัวอย่าง: | 456 | ปรับให้เป็น | 460 |
| | 454 | ปรับให้เป็น | 450 |
| | 445 | ปรับให้เป็น | 440 |
| | 455 | ปรับให้เป็น | 460 |

9.4 รายงานผลการทดสอบให้รายงานเป็นตัวเลขยกกำลัง หากมีปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มากกว่า 100 โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม ตัวอย่างเช่น 460 ให้รายงานเป็น $4.6 \times 10^2$ โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

**10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)**

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: การบ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบนชั้นแสง และลักษณะโคโลนีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุลต่าง ๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

# ภาคผนวก 1

## อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
## (Culture media and reagents)

1. อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 Magnesium sulfate anhydrous | 0.037 | กรัม |
| 1.2 Sodium carbonate anhydrous | 0.002 | กรัม |
| 1.3 Calcium chloride dihydrate | 0.035 | กรัม |
| 1.4 Citric acid anhydrous | 6 | มิลลิกรัม |
| 1.5 Ferric ammonium citrate | 6 | มิลลิกรัม |
| 1.6 Ethylenediamine tetraacetic acid | 1 | มิลลิกรัม |
| 1.7 Di-potassium hydrogen phosphate anhydrous | 0.038 | กรัม |
| 1.8 Stock Micronutrient | 1 | มิลลิลิตร |
| 1.9 ผงวุ้น | 15 | กรัม |

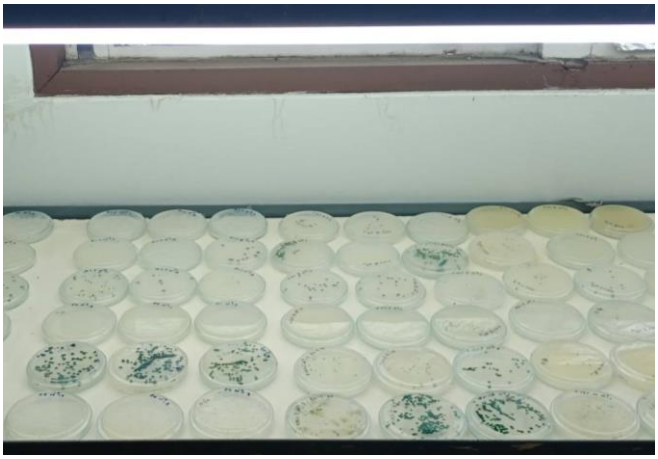
ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 1.1–1.7 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติม Stock Micronutrient และผงวุ้น ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.8 และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. Stock Micronutrient

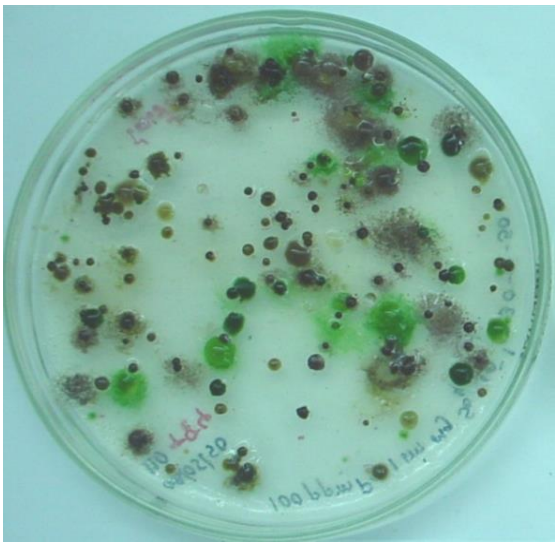
| | | |
|---|---|---|
| 2.1 Boric acid | 2.8 | กรัม |
| 2.2 Manganese sulphate monohydrate | 1.56 | กรัม |
| 2.3 Molybdenum trioxide | 0.15 | กรัม |
| 2.4 Zinc sulfate heptahydrate | 0.22 | กรัม |
| 2.5 Copper (II) sulfate pentahydrate | 0.08 | กรัม |
| 2.6 Potassium chromium sulfate | 0.1 | กรัม |
| 2.7 Nickel sulfate hexahydrate | 0.045 | กรัม |
| 2.8 Cobalt (II) nitrate hexahydrate | 0.05 | กรัม |
| 2.9 Sodium tungstate dihydrate | 0.018 | กรัม |
| 2.10 Titanium dioxide | 0.017 | กรัม |
| 2.11 Ammoniummonovanadate | 0.02 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 2.1–2.11 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

# ภาคผนวก 2



**ภาพที่ 1** การบ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินภายใต้สภาพที่มีความเข้มแสงประมาณ 4,000 ลักซ์



**ภาพที่ 2** ลักษณะโคโลนีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุลต่าง ๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อายุ 30 วัน

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา
# (Method for analyzing arbuscular mycorrhiza biofertilizer)

**1. ขอบข่าย (Scope)**

การตรวจวิเคราะห์สปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีชีวิตในปุ๋ยชีวภาพอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

**2. เอกสารอ้างอิง (Reference)**

Brundrett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajezuk. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR. Canberra, Australia. 374 p.

Daniels, B.A. and H.D. Skipper. 1982. Methods for the Recovery and Quantitative Estimation of Propagules from Soil. pp. 29–35. *In*: Methods and Principles of Mycorrhizal Research, N.C. Schench. (ed.). The American Phytopathological Society. Minnesota, U.S.A.

**3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)**

-

**4. หลักการ (Principle)**

อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเป็นราที่อยู่ร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัย มีการขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ และไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นการตรวจนับปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา จึงใช้วิธีการนับปริมาณสปอร์โดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

**5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents):** ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

-

5.2 สารเคมี

5.2.1 ซูโครสหรือน้ำตาลทรายขาว

5.2.2 น้ำกรอง

**6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and materials)**

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องชั่ง (Balance) 2 ตำแหน่ง

6.1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่มีความเร็วไม่ต่ำกว่า 2,000 รอบต่อนาที

6.1.3 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope)

6.1.4 เครื่องให้ความร้อนพร้อมปั่นกวนสารละลาย (Hot plate and stirrer)

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 ตะแกรงร่อน (Sieve) ขนาด 45 และ 425 ไมครอน

6.2.2 ที่นับจำนวนแบบมือกด (Hand tally counter)

6.2.3 ขวดฉีดน้ำ (Wash bottle)

6.2.4 เข็มเขี่ยปลายแหลม (Needle)

6.2.5 บีกเกอร์สแตนเลส (Stainless steel beaker) ขนาด 1 ลิตร

6.2.6 จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 และ 9 เซนติเมตร

6.2.7 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 2 ลิตร

6.2.8 แท่งแก้ว (Stirring Rod)

6.2.9 เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

**7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)**

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

กรณีตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเป็นของแข็ง (ผงหรือเม็ด) คลุกเคล้าปุ๋ยชีวภาพในภาชนะบรรจุให้เข้ากัน ตักใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อประมาณ 200–300 กรัม

7.2 การตรวจนับปริมาณ (Enumeration): ภาคผนวก 2

7.2.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ 100 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์สแตนเลส ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกรอง ประมาณ 400 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นคนตัวอย่างไปทางเดียวกันประมาณ 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 2–3 วินาที เทตัวอย่างผ่านตะแกรงขนาด 425 และ 45 ไมครอน ซึ่งเรียงซ้อนกัน เติมน้ำกรอง 400 มิลลิลิตร เพื่อผสมตัวอย่างตะกอนที่เหลือให้เข้ากัน แล้วเทผ่านตะแกรงอีกครั้ง

7.2.2 ใช้ขวดน้ำฉีดล้างตะกอนบนตะแกรงขนาด 425 ไมครอน เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร แล้วนำไปตรวจนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

7.2.3 ใช้ขวดน้ำฉีดล้างตะกอนบนตะแกรงขนาด 45 ไมครอน ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง เติมน้ำกรองหรือน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง

7.2.4 เติมสารละลายซูโครส ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร ลงในขวดปั่นเหวี่ยงข้อ 7.2.3 ใช้แท่งแก้วคนให้ตะกอนผสมกับสารละลาย ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

7.2.5 เทสารละลายตัวอย่างส่วนบนลงในตะแกรง ขนาด 45 ไมครอน ฉีดล้างสปอร์บนตะแกรงด้วยขวดฉีดน้ำ จนน้ำที่ผ่านตะแกรงใส จากนั้นใช้ขวดฉีดน้ำฉีดไล่สปอร์ลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร แล้วนำไปตรวจนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

**8. การคำนวณ (Calculation of results)**

$$\text{จำนวนสปอร์ต่อ 1 กรัมปุ๋ยชีวภาพ} = \frac{\text{จำนวนสปอร์ที่นับได้บนตะแกรง 425 ไมครอน และ 45 ไมครอน}}{\text{น้ำหนักปุ๋ยชีวภาพ}}$$

**9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)**

9.1 ปริมาณสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา รายงานหน่วยเป็น สปอร์/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

9.2 กรณีที่ไม่พบสปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

รายงานว่า “ไม่พบ”

**10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)**

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: การตรวจนับปริมาณ (Enumeration) สปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

# ภาคผนวก 1

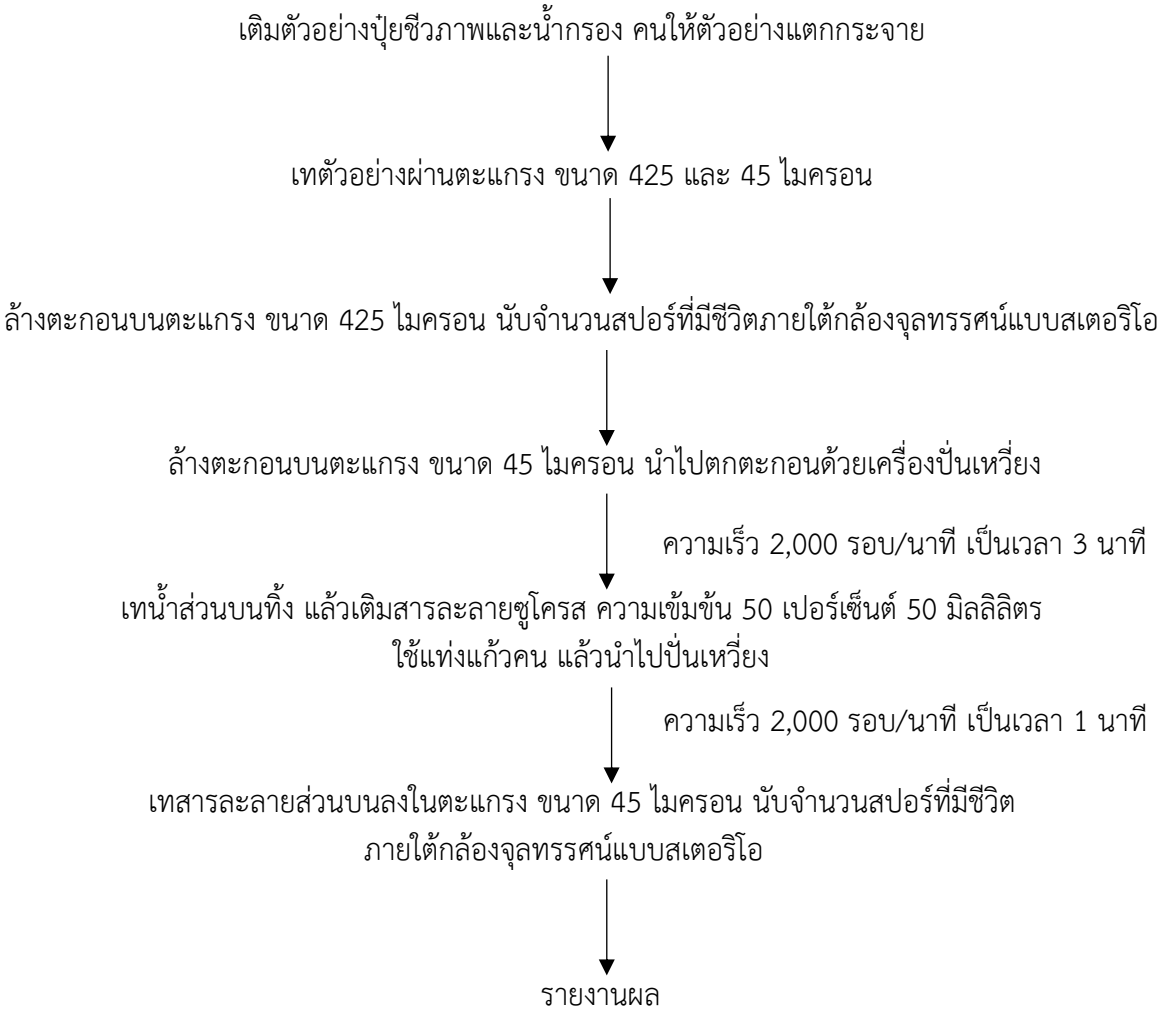
## อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
## (Culture media and reagents)

1. สารละลายซูโครส ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 น้ำตาลทรายขาวหรือซูโครส | 500 | กรัม |
| 1.2 น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง | 1 | ลิตร |

ชั่งน้ำตาลทรายขาวหรือซูโครส จำนวน 500 กรัม ละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปริมาตร 1 ลิตร นำไปตั้งบนเครื่องให้ความร้อนพร้อมปั่นกวนสารละลาย ที่อุณหภูมิ 80–90 องศาเซลเซียส จนละลายเป็นสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น

## ภาคผนวก 2




**ขั้นตอน** การตรวจนับปริมาณ (Enumeration) สปอร์ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

# วิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต
# (Method for analyzing phosphate-solubilizing biofertilizer)

**1. ขอบข่าย (Scope)**

การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียและราละลายฟอสเฟตที่มีชีวิตและประเมินระดับกิจกรรมการละลายตะกอน $CaHPO_4$ ของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต

**2. เอกสารอ้างอิง (Reference)**

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

Gochenaur, S. 1964. A modification of the immersion tube method for isolating soil fungi. Mycologia 56: 921–923.

**3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)**

-

**4. หลักการ (Principle)**

จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถละลายสารประกอบฟอสเฟตที่ละลายน้ำยากให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ โดยผ่านกลไกการสร้างกรดออกมาละลายฟอสเฟตทั้งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ เมื่อนำจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมแคลเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Calcium hydrogen phosphate) ซึ่งอยู่ในรูปที่ใช้ประโยชน์ได้ยาก จุลินทรีย์จะเจริญและสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารทำให้สามารถตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตได้

**5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)**

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ: ภาคผนวก 1

5.1.1 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย เช่น Nutrient agar (NA) หรือ Plate count agar (PCA) ที่เติมสารปฏิชีวนะ Cycloheximide และ Nystatin เพื่อยับยั้งการเจริญของรา

5.1.2 อาหารเลี้ยงรา เช่น Potato dextrose agar (PDA) หรือ Glucose ammonium nitrate agar (GAN) ที่เติมสารปฏิชีวนะ Streptomycin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

5.1.3 Pikovskaya's medium

5.1.4 GYA double-layered agar medium

5.2 สารเคมี

5.2.1 95% Ethyl alcohol

5.2.2 สารละลายสำหรับเจือจาง ได้แก่ น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง หรือ 0.85% Sodium chloride

5.2.3 1N Sodium hydroxide

5.2.4 0.1N Hydrochloric acid

5.2.5 0.5% Cycloheximide

5.2.6 0.1% Nystatin

5.2.7 1% Streptomycin

**6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and materials)**

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องชั่ง (Balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง

6.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

6.1.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

6.1.4 เครื่องผสมสารแบบปั่น (Vortex mixer)

6.1.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

6.1.6 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

6.1.7 เครื่องเขย่า (Shaker)

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 ขวดแก้วฝาเกลียว (Screw cap bottle)

6.2.2 หลอดทดลอง (Test tube)

6.2.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

6.2.4 แท่งแก้วงอ (Glass spreader)

6.2.5 ปิเปต (Pipette)

6.2.6 ชุดดูดจ่ายสารละลาย (Dispenser)

6.2.7 เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

**7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)**

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเป็นของแข็ง (ผงหรือเม็ด) คลุกเคล้าปุ๋ยชีวภาพในภาชนะบรรจุให้เข้ากัน ตักใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อประมาณ 50–100 กรัม

7.1.2 กรณีตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเป็นของเหลวเขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 50–100 กรัม

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า ด้วยสารละลายเจือจางตัวอย่างดังนี้

7.2.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพแบบผงหรือเม็ดหรือเหลวจำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดที่มีสารละลายเจือจางที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 20–30 นาที ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที จะได้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-1}$

7.2.2 ปิเปตตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-1}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายสำหรับเจือจางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารแบบปั่น จะได้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจาง $10^{-2}$ จากนั้นทำการเจือจางตามลำดับจนถึงระดับความเจือจาง $10^{-3}$, $10^{-4}$,..., $10^{-n}$

7.3 การตรวจนับปริมาณ (Enumeration)

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต้องอาศัยหลักการของ Aseptic technique เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นซึ่งจะทำให้ผลการนับปริมาณผิดพลาดได้

7.3.1 การนับปริมาณแบคทีเรีย

7.3.1.1 ปิเปตตัวอย่างสารแขวนลอยปุ๋ยชีวภาพที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ $10^{-1}$ จนถึงระดับความเจือจางที่ต้องการ จากข้อ 7.2.2 ระดับละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร NA หรือ PCA ที่เตรียมไว้ เกลี่ยให้กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอ โดยทำระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ ในตู้ปลอดเชื้อ

7.3.1.2 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2–3 วัน

7.3.1.3 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 30–300 โคโลนี

7.3.1.4 แยกแบคทีเรีย จากข้อ 7.3.1.3 ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak plate บนอาหาร NA จนได้โคโลนีเดี่ยว เพื่อนำไปวัดระดับกิจกรรมการละลายฟอสเฟต

7.3.2 การนับปริมาณรา

7.3.2.1 ปิเปตตัวอย่างสารแขวนลอยปุ๋ยชีวภาพที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ $10^{-1}$ จนถึงระดับความเจือจางที่ต้องการ จากข้อ 7.2.2 ระดับละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร PDA หรือ GAN ที่เตรียมไว้ เกลี่ยให้กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอ โดยทำระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ ในตู้ปลอดเชื้อ

7.3.2.2 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3–5 วัน

7.3.2.3 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 10–150 โคโลนี

7.3.2.4 แยกรา จากข้อ 7.3.2.3 ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้เข็มเขี่ยตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของราวางบนอาหาร PDA เพื่อนำไปวัดระดับกิจกรรมการละลายฟอสเฟต

7.4 การประเมินประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต: ภาคผนวก 2

7.4.1 เพาะจุลินทรีย์แบบจุด (Spot inoculation) จากข้อ 7.3.1.4 (แบคทีเรีย) หรือ 7.3.2.4 (รา) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYA double-layered agar medium ซึ่งมีตะกอน Calcium hydrogen phosphate ผสมอยู่ โดยเข็มเขี่ยในการเพาะเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

7.4.2 เมื่อบ่มเชื้อครบเวลา 3 และ 7 วัน วัดความกว้างของวงใสจากขอบโคโลนีถึงขอบนอกของวงใส

*วัดความกว้างของวงใส = เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส - เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี*

7.4.3 ประเมินระดับกิจกรรมการสร้างวงใสของจุลินทรีย์ เมื่อบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน สร้างวงใส 6 มิลลิเมตร ขึ้นไป (ภาคผนวก 2) จัดว่าจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต

โดยมีเกณฑ์การประเมินระดับประสิทธิภาพการละลายตะกอน Calcium hydrogen phosphate ของจุลินทรีย์ตามความกว้างของวงใส (ภาคผนวก 2) ดังนี้ ระดับ 1) 0 มิลลิเมตร ระดับ 2) 0–3 มิลลิเมตร ระดับ 3) 3–6 มิลลิเมตร ระดับ 4) 6–9 มิลลิเมตร และระดับ 5) มากกว่า 9 มิลลิเมตร

**8. การคำนวณ (Calculation of results)**

คำนวณจำนวนแบคทีเรีย/ราเป็นค่าเฉลี่ยของการนับโคโลนีจาก 3 จานเพาะเชื้อ และคูณด้วยระดับความเจือจางต่ำสุด

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

1. ระดับความเจือจางของปุ๋ยชีวภาพที่ $10^{-4}$ จำนวนโคโลนีที่นับได้จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ คือ 35 40 และ 45 โคโลนี ตามลำดับ
2. รวมจำนวนเชื้อที่นับได้เท่ากับ 35+40+45 = 120 โคโลนี

3. หาค่าเฉลี่ยโดยนำจำนวนโคโลนีที่รวมกันแล้วหารด้วยจำนวนซ้ำเท่ากับ 120/3 = 40 โคโลนี
4. คูณค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วยระดับความเจือจางต่ำสุด (ส่วนกลับของระดับความเจือจาง) เท่ากับ $40 \times 10^4$ = $4.0 \times 10^5$ โคโลนีต่อ 0.1 มิลลิลิตร
5. ปรับหน่วยให้เป็นโคโลนีต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพเท่ากับ $4.0 \times 10^5 \times 10 = 4.0 \times 10^6$ โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม (CFU/g)

**9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)**

9.1 วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย/รา รายงานหน่วยเป็น โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

9.2 กรณีที่ไม่พบโคโลนีแบคทีเรีย/รา

ใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร รายงานเป็น น้อยกว่า 1 x ระดับความเจือจางแรกที่ทดสอบ x 10

9.3 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ และเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4 แต่ถ้าตำแหน่งที่สามเป็น 5 ต้องดูตัวเลขตำแหน่งที่สอง หากตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคู่ให้คงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม แต่ถ้าตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคี่ ให้เพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับ

| | | | |
|---|---|---|---|
| ตัวอย่าง: | 456 | ปรับให้เป็น | 460 |
| | 454 | ปรับให้เป็น | 450 |
| | 445 | ปรับให้เป็น | 440 |
| | 455 | ปรับให้เป็น | 460 |

9.4 รายงานผลการทดสอบให้รายงานเป็นตัวเลขยกกำลัง หากมีปริมาณแบคทีเรีย/รา มากกว่า 100 โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม ตัวอย่างเช่น 460 ให้รายงานเป็น $4.6 \times 10^2$ โคโลนี/ปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

**10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)**

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: การประเมินประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต

# ภาคผนวก 1

## อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
## (Culture media and reagents)

**อาหารเลี้ยงเชื้อ** กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามปริมาณที่ผู้ผลิตระบุ

1. Nutrient agar (NA) + Cycloheximide และ Nystatin

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 Beef extract | 3 | กรัม |
| 1.2 Peptone | 5 | กรัม |
| 1.3 ผงวุ้น | 15 | กรัม |
| 1.4 0.5% Cycloheximide | 2 | มิลลิลิตร |
| 1.5 0.1% Nystatin | 2 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 1.1–1.2 และผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงวุ้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม 0.5% Cycloheximide และ 0.1% Nystatin ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ

2. Plate count agar (PCA) + Cycloheximide และ Nystatin

| | | |
|---|---|---|
| 2.1 Tryptone | 5 | กรัม |
| 2.2 Yeast extract | 2.5 | กรัม |
| 2.3 Dextrose | 1 | กรัม |
| 2.4 ผงวุ้น | 15 | กรัม |
| 2.5 0.5% Cycloheximide | 2 | มิลลิลิตร |
| 2.6 0.1% Nystatin | 2 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 2.1–2.3 และผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงวุ้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม 0.5% Cycloheximide และ 0.1% Nystatin ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ

3. Potato dextrose agar (PDA) + Streptomycin

| | | |
|---|---|---|
| 3.1 Potato infusion | 200 | กรัม |
| 3.2 Dextrose | 20 | กรัม |
| 3.3 ผงวุ้น | 15 | กรัม |
| 3.4 1% Streptomycin | 10 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 3.1–3.2 และผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงวุ้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม 1% Streptomycin ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ

4. Glucose ammonium nitrate agar (GAN) + Streptomycin

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 Ammonium nitrate | 1 | กรัม |
| 4.2 Di-potassium hydrogen phosphate | 1 | กรัม |
| 4.3 Magnesium sulfate heptahydrate | 0.5 | กรัม |
| 4.4 Rose bengal | 0.03 | กรัม |
| 4.5 Yeast extract | 1 | กรัม |
| 4.6 Glucose | 5 | กรัม |
| 4.7 ผงวุ้น | 15 | กรัม |
| 4.8 1% Streptomycin | 10 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 4.1–4.6 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงวุ้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม 1% Streptomycin ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ

5. Pikovskaya’s medium

| | | |
|---|---|---|
| 5.1 Glucose | 10 | กรัม |
| 5.2 Yeast extract | 0.5 | กรัม |
| 5.3 Calcium phosphate | 5 | กรัม |
| 5.4 Potassium chloride | 0.2 | กรัม |
| 5.5 Magnesium sulfate heptahydrate | 0.1 | กรัม |
| 5.6 Ammonium sulfate | 0.5 | กรัม |
| 5.7 Ferrous sulfate heptahydrate | 0.0001 | กรัม |
| 5.8 Manganese sulfate heptahydrate | 0.0001 | กรัม |
| 5.9 ผงวุ้น | 15 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 5.1–5.8 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

6. GYA double-layered agar medium ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชั้น ดังนี้

ชั้นที่ 1 (ชั้นล่าง) basal agar medium

| | | |
|---|---|---|
| 6.1 Glucose | 10 | กรัม |
| 6.2 Yeast extract | 5 | กรัม |
| 6.3 Calcium chloride dihydrate | 1 | กรัม |
| 6.4 Magnesium sulfate anhydrous | 2.5 | กรัม |
| 6.5 ผงวุ้น | 15 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 6.1–6.4 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมผงวุ้น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ แล้วทิ้งไว้จนอาหารแข็ง

ชั้นที่ 2 (ชั้นบน) ชั้นที่มีตะกอนฟอสเฟต

| | | |
|---|---|---|
| 6.6 Basal agar medium ที่หลอมละลาย | 100 | มิลลิลิตร |
| 6.7 10% Calcium chloride dihydrate | 3 | มิลลิลิตร |
| 6.8 10% Di-potassium monohydrogen phosphate | 2 | มิลลิลิตร |

ใส่สารตามข้อ 6.7 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ลงใน Basal agar medium ที่หลอมละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารตามข้อ 6.8 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ระหว่างเติมให้ผสมอาหารจนตะกอนสีขาว ($CaHPO_4$) กระจายสม่ำเสมอ แล้วเทส่วนผสมนี้ทับชั้นที่ 1

7. การเตรียม 0.5% Cycloheximide

| | | |
|---|---|---|
| 7.1 Cycloheximide | 1 | กรัม |
| 7.2 95% Ethyl alcohol | 20 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 7.1 ใน 95% Ethyl alcohol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

8. การเตรียม 0.1% Nystatin

| | | |
|---|---|---|
| 8.1 Nystatin | 0.05 | กรัม |
| 8.2 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 50 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 8.1 ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร

9. การเตรียม 1% Streptomycin

| | | |
|---|---|---|
| 9.1 Streptomycin | 0.2 | กรัม |
| 9.2 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 20 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 9.1 ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร

## ภาคผนวก 2

จุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์

↓

เพาะจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYA double-layered agar medium

↓ 30±2 ˚C (7 วัน)

วัดความกว้างของวงใส* เมื่อบ่มเชื้อครบเวลา 3 และ 7 วัน

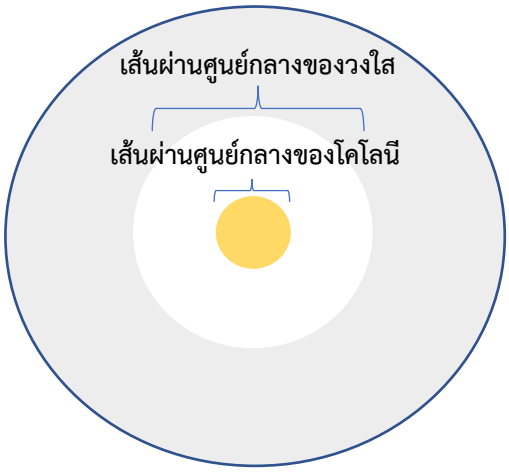
↓

ประเมินระดับกิจกรรมการสร้างวงใสของจุลินทรีย์

↓

รายงานผล

**ขั้นตอน** การประเมินประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต




**ภาพที่ 1** การวัดความกว้างของวงใส

# วิธีการจำแนกสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยวิธีสัณฐานวิทยา

# วิธีการจำแนกสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยวิธีสัณฐานวิทยา
# (Method for genera classification of Blue-green algae by morphological characterization)

**1. ขอบข่าย (Scope)**

การตรวจวิเคราะห์สกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตในปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

**2. เอกสารอ้างอิง (Reference)**

Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 686 p.

**3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)**

Akinete หมายถึง สปอร์ชนิดหนึ่งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ภายในมีสีเข้ม ผนังหนา และมีขนาดใหญ่กว่า Vegetative cell

Filament หมายถึง Trichome ที่มี Sheath ห่อหุ้ม

Heterocyst หมายถึง เซลล์พิเศษที่ทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในกลุ่มที่เป็นเส้นสาย

Hormogonia หมายถึง การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศชนิดหนึ่งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยการที่ Trichome สายสั้น ๆ ขาดออกไปจากสายเซลล์แม่และเจริญต่อไป

Sheath หมายถึง สารใสหรือมีสี (Colloidal matrix) ที่ผลิตอยู่บริเวณรอบ Filament อาจจะติดแน่นหรืออยู่ในลักษณะหลวม ๆ บางชนิดหนาเห็นได้ชัดเจนหรือบางชนิดบางจนมองเห็นไม่เด่นชัด

Thallus หมายถึง กลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันหนาแน่นมีรูปร่างที่ซับซ้อนคล้ายกันกับต้นไม้

Trichome หมายถึง สายของเซลล์ที่เกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์จากเซลล์แม่โดยไม่มี Sheath ห่อหุ้ม ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด คือ Vegetative cells, Heterocyst และ Akinete

Vegetative cell หมายถึง เซลล์ทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ เป็นแหล่งเก็บธาตุอาหาร สามารถสร้างอาหารได้เองโดยการสังเคราะห์ด้วยแสง

**4. หลักการ (Principle)**

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีลักษณะคล้ายพืชเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ แต่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย การจำแนกสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินใช้วิธีการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยตรวจดูจากลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น รูปร่าง และ ขนาดของ Vegetative cell และลักษณะของเซลล์ปลายสุด ตำแหน่งการสร้าง Heterocyst รูปร่าง ขนาด และตำแหน่งการสร้าง Akinete รูปร่าง ขนาด การแตกแขนง และอื่น ๆ

**5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)**

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

-

5.2 สารเคมี

-

**6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and materials)**

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound microscope)

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 แผ่นสไลด์ (Glass slide)

6.2.2 กระจกปิดสไลด์ (Cover slip)

6.2.3 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

6.2.4 น้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ

6.2.5 เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

**7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)**

7.1 เตรียมเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Streak plate

7.2 หยดน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อบนแผ่นสไลด์ จำนวน 1–2 หยด

7.3 เผาลูปเขี่ยเชื้อทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เตรียมไว้เกลี่ยให้กระจายบนสไลด์ และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

7.4 นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า จะเห็นลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

7.5 จำแนกสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ตามแนววินิจฉัยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในระดับสกุลมีรายละเอียดดังนี้

7.5.1 สกุล *Anabaena*

Trichome มีความกว้างใกล้เคียงกันตลอดสาย บางชนิดอยู่เดี่ยว ๆ บางชนิดอยู่แบบเป็นกลุ่มใหญ่ มีรูปร่างของกลุ่มไม่จำกัด และ Heterocyst ส่วนใหญ่จะอยู่ตรงกลางสายเซลล์ บางครั้งพบ Heterocyst อยู่บริเวณตอนปลายหัวท้ายของสายเซลล์ ส่วน Akinete สร้างเดี่ยว ๆ หรือเป็นสายยาวสร้างอยู่ระหว่างหรืออยู่ติดกับ Heterocyst

7.5.2 สกุล *Calothrix*

Filament ส่วนใหญ่จะอยู่เดี่ยว ๆ หรือบางครั้งพบเป็นกลุ่มเล็ก ๆ Filament ส่วนใหญ่มีลักษณะตรง ไม่มีกิ่งแขนง หรือมีกิ่งแขนงเทียมซึ่งไม่ค่อยพบ Sheath ส่วน Heterocyst ส่วนใหญ่อยู่บริเวณฐาน พบได้น้อยบริเวณตอนกลางสายเซลล์ การสร้างสปอร์จะสร้างเดี่ยว ๆ หรือต่อกันเป็นสายต่อจาก Heterocyst บริเวณฐาน

7.5.3 สกุล *Cylindrospermum*

Thallus มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว ส่วนใหญ่มีสีเขียวออกน้ำเงิน Trichome มีสายสั้น และความกว้างของ Vegetative cell เสมอกัน เซลล์มีรูปร่างทรงกระบอกและมีรอยแยกระหว่างเซลล์ Heterocyst จะพบบริเวณส่วนปลายด้านเดียวหรือทั้งสองด้าน บางครั้งพบอยู่บริเวณกลางของ Trichome ส่วน Akinete อยู่ติดกับ Heterocyst 1 ด้าน สร้างเดี่ยว ๆ ไม่ค่อยพบสร้างติดต่อกันเป็นสาย

7.5.4 สกุล *Fischerella*

Filament หลักส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างกลมขนาดใหญ่และมีหลายแถวไม่ค่อยพบ Filament ที่ประกอบด้วยเซลล์แถวเดียว แตกแขนงแท้ตั้งตรงบนด้านเดียวเท่านั้น กิ่งแขนงยาวและ

เซลล์มีลักษณะแคบ Sheath ของกิ่งแขนง และ Filament จะหนาเมื่อมีอายุมากขึ้นส่วน Heterocyst สร้างบริเวณตอนกลางและด้านข้างของสายเซลล์ สร้าง Hormogonia ที่ส่วนปลายของกิ่งแขนง

7.5.5 สกุล *Hapalosiphon*

Filament หลักประกอบด้วยเซลล์ 1 หรือ 2 แถว แตกกิ่งแขนงแท้ได้ทั้ง 2 ด้านของ Filament หลัก Heterocyst สร้างบริเวณตอนกลางสายเซลล์ พบได้น้อยที่สร้างบริเวณด้านข้าง Hormogonia สร้างจากกิ่งแขนงเป็นส่วนใหญ่

7.5.6 สกุล *Nostoc*

Filament คดงอบิดไปมา หรือพันกันยุ่งเหยิง Vegetative cell มีรูปร่างกลม (Spherical) กลมแบน (Compress spherical) ถังเบียร์ (Barrel) หรือทรงกระบอก (Cylindrical) Heterocyst จะสร้างบริเวณตอนกลางและตอนปลายของ Filament และสร้าง Akinete รูปร่างกลมหรือเป็นสายยาวประมาณ 1–3 เซลล์ระหว่าง Heterocyst

7.5.7 สกุล *Scytonema*

Filament มีความกว้างเท่ากันตลอดทั้งสาย ประกอบด้วยแขนงเทียมเดี่ยวหรือคู่อยู่ระหว่าง Heterocyst มี Vegetative cell รูปทรงกระบอก Trichome มี 1 แขนง ลักษณะตรง Heterocyst สร้างบริเวณตอนกลางของ Filament และสร้าง Hormogonia บริเวณตอนปลายของ Filament

7.5.8 สกุล *Tolypothrix*

Filament มี Sheath หุ้มทั้งหนาและบาง แตกแขนงเทียมเดี่ยวบริเวณติดกับ Heterocyst เพียง 1 Trichome บริเวณยอดของ Trichome สร้าง Hormogonia

**8. การคำนวณ (Calculation of results)**

-

**9.การรายงานผลการทดสอบ (Test report)**

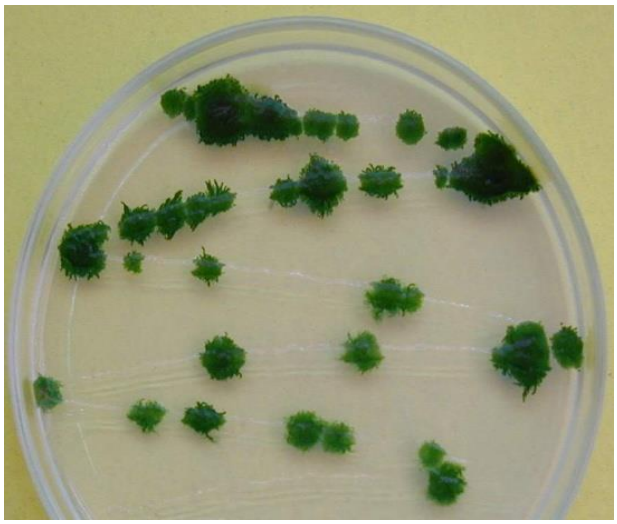
รายงานผลการจำแนกเป็นสกุล (Genus) ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

**10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)**

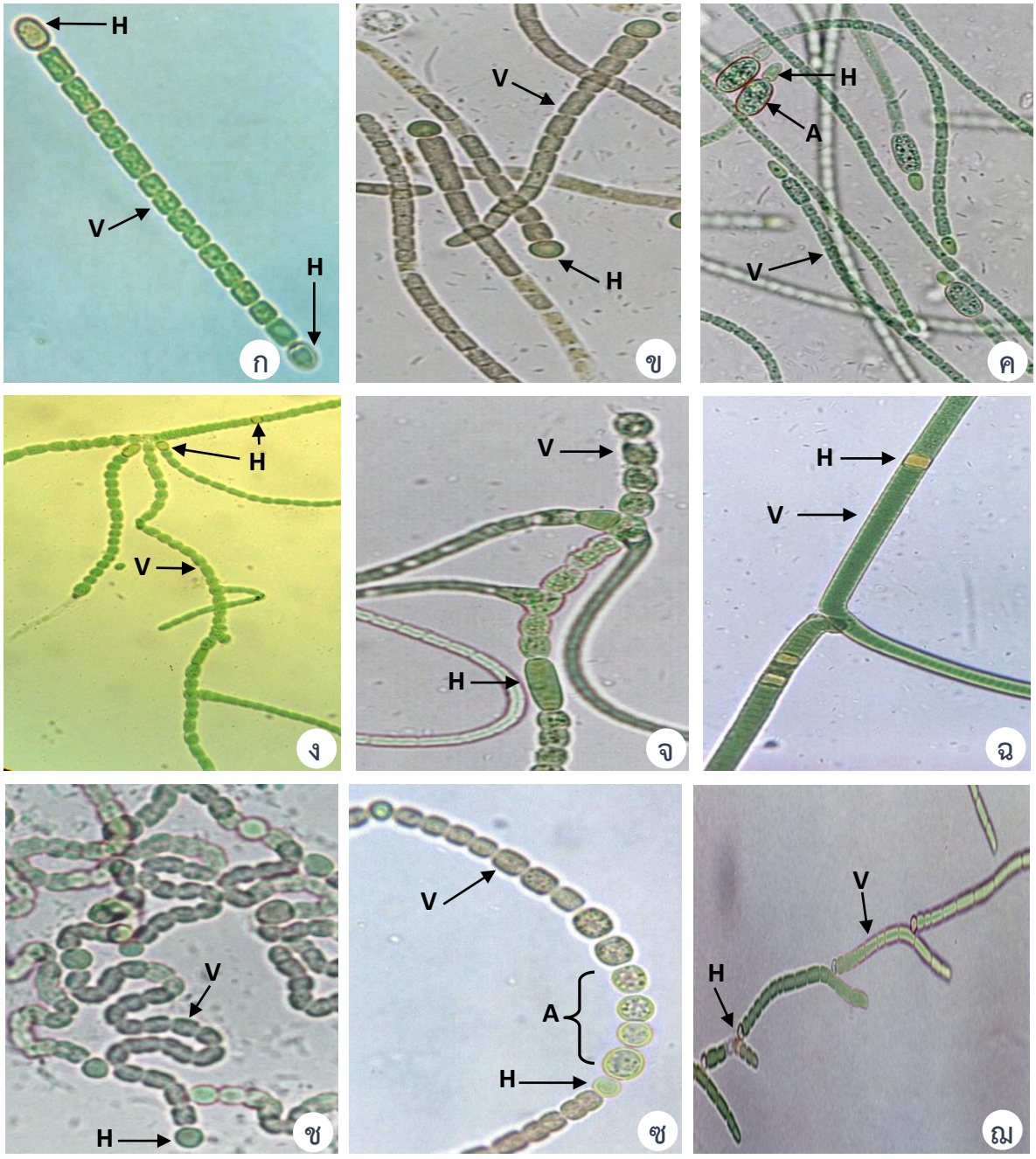
10.1 ภาคผนวก 1: ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Morphology of blue-green algae)

# ภาคผนวก 1
## ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

**ภาพที่ 1** ลักษณะ Thallus ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Cylindrospermum*



**ภาพที่ 2** ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Streak plate




**ภาพที่ 3** ลักษณะสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางสกุลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(ก) *Anabaena* sp. (ข) *Calothrix* sp. (ค) *Cylindrospermum* sp. (ง) *Fischerella* sp.

(จ) *Hapalosiphon* sp. (ฉ) *Scytonema* sp. (ช) *Nostoc* sp. 1 (ซ) *Nostoc* sp. 2

(ฌ) *Tolypothrix* sp. (H = Heterocyst, V = Vegetative cell, A = Akinete)

# วิธีการจำแนกแบคทีเรียและรา ด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี

## วิธีการจำแนกแบคทีเรียและราด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี

## (Mass spectrometry tools for the identification of bacteria and fungi)

**1. ขอบข่าย (Scope)**

การตรวจจำแนกสกุล-ชนิด ของแบคทีเรียและราที่มีชีวิตด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี (Mass Spectrometry)

**2. เอกสารอ้างอิง (Reference)**


Bastin, B., P. Bird, M.J. Benzinger, E. Crowley, J. Agin, D. Goins, D. Sohier, M. Timke, G. Shi and M. Kostrzewa. 2018. Confirmation and Identification of *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp., and other Gram-Negative Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.09. Journal of AOAC International 101(5): 1593–1609.

Bastin, B., P. Bird, M.J. Benzinger, E. Crowley, J. Agin, D. Goins, D. Sohier, M. Timke, G. Shi, M. Awad and M. Kostrzewa. 2018. Confirmation and Identification of *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp. and other Gram-Positive Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.10. Journal of AOAC International 101(5): 1610–1622.


**3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)**

-

**4. หลักการ (Principle)**

การจำแนกสกุล-ชนิด แบคทีเรียและราด้วยเครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ (MALDI-TOF MS) สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียและรากลุ่มต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี (Mass Spectrometry) ในการตรวจวัดหาค่ามวลโมเลกุล และโครงสร้างของโปรตีนที่เชื้อสร้างขึ้น และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (In house database) ทำให้ทราบถึงสกุล-ชนิด ของจุลินทรีย์

**5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)**

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ: ภาคผนวก 1

5.1.1 Yeast mannitol broth (YMB)

5.1.2 Nutrient agar (NA)

5.1.3 Nutrient broth (NB)

5.1.4 Potato dextrose agar (PDA)

5.1.5 Potato dextrose broth (PDB)

5.2 สารเคมี

5.2.1 10% Sodium hypochlorite

5.2.2 Crystal violet

5.2.3 Iodine solution

5.2.4 Congo red

5.2.5 95% Ethyl alcohol

5.2.6 Safranin O

5.2.7 α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)

5.2.8 70% Formic acid

5.2.9 Deionized water

5.2.10 Bacterial test standard (BTS)

5.2.11 Acetonitrile

5.2.12 Trifluoroacetic acid

**6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and materials)**

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องชั่ง (Balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง

6.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

6.1.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

6.1.4 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

6.1.5 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

6.1.6 เครื่องเขย่า (Shaker)

6.1.7 เครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ (MALDI-TOF MS)

6.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)

6.1.9 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (Compound microscope)

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

6.2.2 Target plate

6.2.3 ปิเปต (Pipette)

6.2.4 สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Glass slide and cover slip)

6.2.5 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

6.2.6 เข็มเขี่ย (Needle)

6.2.7 มีดผ่าตัด (Scalpel)

6.2.8 ไม้จิ้มฟัน

6.2.9 เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

**7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)**

7.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

7.1.1 แบคทีเรีย

7.1.1.1 การแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak plate บนอาหาร NA จนได้โคโลนีเดี่ยว

7.1.1.2 การแยกไรโซเบียมบริสุทธิ์จากปมรากถั่ว

- นำปมรากถั่วที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างจากวิธีทดสอบปริมาณไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมมาแยกเชื้อ โดยการล้างปมรากด้วยน้ำสะอาด
- แช่ปมรากด้วย 95% Ethyl alcohol นาน 1 นาที ตามด้วย 10% Sodium hypochlorite นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกรองปลอดเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง
- ผ่าปมรากด้วยมีดปลอดเชื้อหรือใช้วิธีบี้ปมรากให้ละเอียด แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อแตะบริเวณที่มีสีชมพู มาขีดลาก (Streak) บนอาหารวุ้นสูตร YMA ที่ใส่ Congo red ในตู้ปลอดเชื้อ
- บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 วัน เมื่อมีแบคทีเรียเจริญบนอาหาร เลือกโคโลนีลักษณะกลมนูน และดูดซับสี Congo red ได้น้อย

7.1.2 รา

ใช้เข็มเขี่ยตัดบริเวณขอบโคโลนีของราวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน

7.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์: ภาคผนวก 1

7.2.1 แบคทีเรียโดยวิธีย้อมแกรม (Gram staining)

7.2.2 รา

7.3 การเตรียมตัวอย่างทดสอบด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

7.3.1 แบคทีเรีย

7.3.1.1 ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียเกลี่ยลงบน Target plate รอให้ตัวอย่างแห้งประมาณ 10–15 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ

7.3.1.2 หยด 70% Formic acid 1 ไมโครลิตร รอให้ตัวอย่างแห้งประมาณ 15–30 นาที

7.3.1.3 หยด Bacterial test standard 1 ไมโครลิตร รอให้ตัวอย่างแห้งประมาณ 15–30 นาที เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมประสิทธิภาพของเครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์

7.3.1.4 หยด HCCA 1 ไมโครลิตร เป็นลำดับสุดท้าย รอให้ตัวอย่างแห้งโดยสังเกตตัวอย่างจะมีลักษณะเป็นคราบสีขาว

7.3.1.5 นำ Target plate เข้าเครื่อง MALDI-TOF MS

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต้องอาศัยหลักการของ Aseptic technique เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นซึ่งจะทำให้ผลการจำแนกผิดพลาดได้

7.3.2 รา

7.3.2.1 ใช้เข็มเขี่ยตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีลงในอาหาร PDB บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 วัน โดยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ ด้วยการปฏิบัติการทดสอบด้วยเทคนิคการปลอดเชื้อ

7.3.2.2 ตกตะกอนเส้นใยราด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง

7.3.2.3 เติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร และเขย่าตัวอย่างให้เข้ากัน เพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดกับเส้นใยรา

7.3.2.4 ตกตะกอนเส้นใยราด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และทำซ้ำข้อ 7.3.2.3–7.3.2.4 อีกครั้ง

7.3.2.5 เติม Deionized water 300 ไมโครลิตร และ 95% Ethyl alcohol 900 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร

7.3.2.6 ตกตะกอนเส้นใยราด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และทิ้งให้ตัวอย่างแห้งเพื่อกำจัด 95% Ethyl alcohol

7.3.2.7 เติม 70% Formic acid ที่ผสมกับ Acetonitrile ปริมาตร 10–100 ไมโครลิตร โดยใส่ให้ท่วมตัวอย่าง

7.3.2.8 ตกตะกอนตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

7.3.2.9 ดูดส่วนใส 1 ไมโครลิตร ลงบน Target plate รอให้ตัวอย่างแห้ง 10–15 นาที

7.3.2.10 หยด 70% Formic acid 1 ไมโครลิตร รอให้ตัวอย่างแห้งประมาณ 15–30 นาที

7.3.2.11 หยด Bacterial test standard 1 ไมโครลิตร รอให้ตัวอย่างแห้งประมาณ 15–30 นาที เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมประสิทธิภาพของเครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์

7.3.2.12 หยด HCCA จำนวน 1 ไมโครลิตร เป็นลำดับสุดท้าย รอให้ตัวอย่างแห้งโดยสังเกตตัวอย่างจะมีลักษณะเป็นคราบสีขาว

7.3.2.13 นำ Target plate เข้าเครื่อง MALDI-TOF MS

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต้องอาศัยหลักการของ Aseptic technique เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นซึ่งจะทำให้ผลการจำแนกผิดพลาดได้

7.3.3 การแปลผลจากเครื่อง MALDI-TOF MS ตามระดับคะแนน (Score)

- Score ระหว่าง 0.00–1.69 แสดงผลเป็นสีแดง แปลผลว่า ไม่สามารถจำแนกได้
- Score ระหว่าง 1.70–1.99 แสดงผลเป็นสีเหลือง แปลผลว่า สามารถรายงานได้ในระดับสกุล (Genus)
- Score ระหว่าง 2.00–3.00 แสดงผลเป็นสีเขียว แปลผลว่า สามารถรายงานได้ในระดับสกุล (Genus) และชนิด (Species)

**8. การคำนวณ (Calculation of results)**

-

**9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)**

รายงานผลการจำแนกเป็น สกุล-ชนิดของแบคทีเรีย/รา

**10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)**

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: ลักษณะโคโลนีของไรโซเบียมบนอาหาร YMA

# ภาคผนวก 1

## อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
## (Culture media and reagents)

**อาหารเลี้ยงเชื้อ** กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามปริมาณที่ผู้ผลิตระบุ

1. Yeast mannitol broth (YMB)

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 Di-potassium hydrogen phosphate | 0.5 | กรัม |
| 1.2 Sodium chloride | 0.1 | กรัม |
| 1.3 Magnesium sulfate heptahydrate | 0.2 | กรัม |
| 1.4 D-mannitol | 10 | กรัม |
| 1.5 สารละลาย 0.25% Congo red | 10 | มิลลิลิตร |
| 1.6 Yeast extract | 0.5 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 1.1–1.4 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ประมาณ 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 0.25% Congo red และ Yeast extract คนสารละลายอย่างต่อเนื่องจนเข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ในกรณีต้องการใช้อาหารแข็งเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม/ลิตร

2. Nutrient broth (NB)

| | | |
|---|---|---|
| 2.1 Beef extract | 3 | กรัม |
| 2.2 Peptone | 5 | กรัม |

ชั่งสารตามข้อ 2.1–2.2 และผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ในกรณีต้องการใช้อาหารแข็งเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม/ลิตร

3. Potato dextrose broth (PDB)

| | | |
|---|---|---|
| 3.1 Potato infusion | 200 | กรัม |
| 3.2 Dextrose | 20 | กรัม |

ชั่งสารตามข้อ 3.1–3.2 และผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ในกรณีต้องการใช้อาหารแข็งเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม/ลิตร

4. การเตรียมสารละลาย 0.25% Congo red

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 Congo red | 0.25 | กรัม |
| 4.2 น้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ | 100 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 4.1 ในน้ำกรองปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร

5. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5.1 แบคทีเรียโดยวิธีย้อมแกรม (Gram staining)

5.1.1 ใช้ลูปแตะโคโลนีเดี่ยวมาเกลี่ยเชื้อลงบนสไลด์ ทิ้งให้แห้ง ตรึงเซลล์แบคทีเรียโดยการผ่านสไลด์บนเปลวไฟ

5.1.2 หยด Crystal violet บนเชื้อที่เกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง

5.1.3 หยด Iodine solution บนสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

5.1.4 หยด 95% Ethyl alcohol ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ

5.1.5 หยด Safranin O ลงบนเชื้อ ทิ้งไว้ 30–45 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ

5.1.6 นำสไลด์ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า (Oil immersion objective lens) สังเกตลักษณะการติดสีของเซลล์ ดังนี้

- เซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำเงินม่วง เป็นแกรมบวก (Gram Positive)
- เซลล์ที่ย้อมติดสีแดง เป็นแกรมลบ (Gram Negative)

5.2 รา

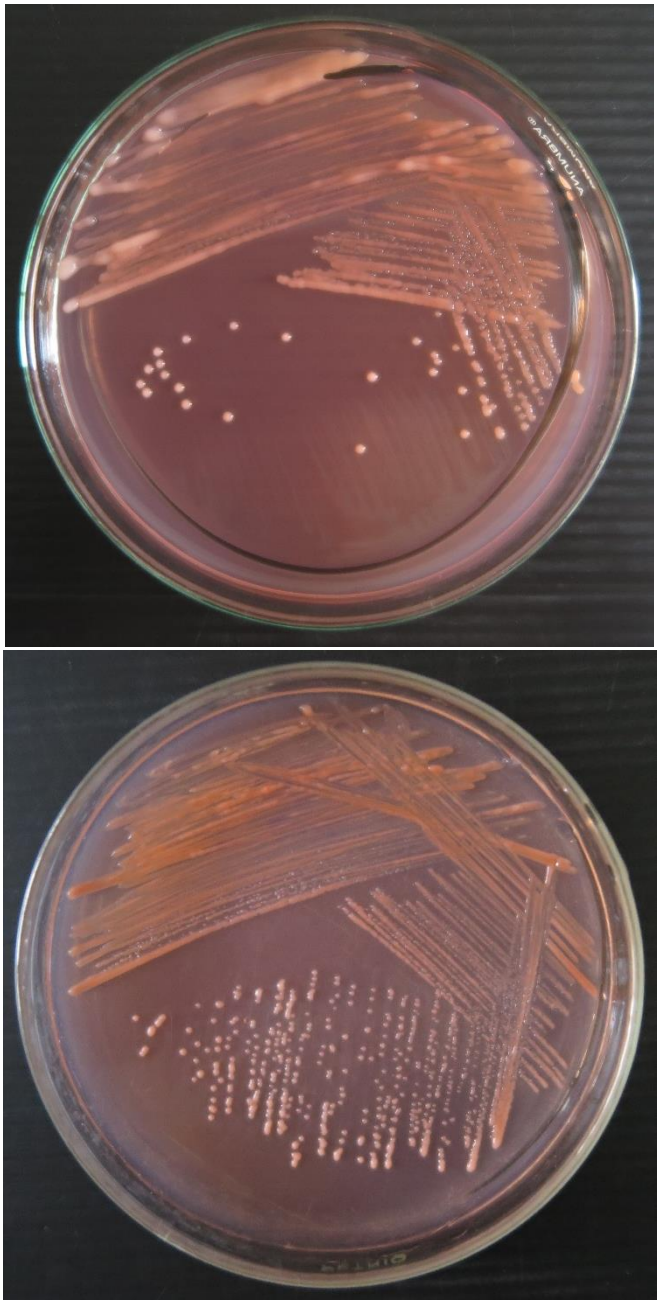
5.2.1 หยดน้ำกลั่น 1–2 หยด บนแผ่นสไลด์

5.2.2 ใช้เข็มเขี่ย ๆ เส้นใยราลงในหยดน้ำกลั่น

5.2.3 ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

5.2.4 นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 40–1,000 เท่า

# ภาคผนวก 2



**ลักษณะโคโลนีของไรโซเบียมบนอาหาร YMA**

# วิธีการจำแนกแบคทีเรียและรา ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล

# วิธีการจำแนกแบคทีเรียและราด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล
# (Molecular technique for identification of bacteria and fungi)

**1. ขอบข่าย (Scope)**

การตรวจจำแนกสกุล-ชนิด ของแบคทีเรียและราที่มีชีวิตด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (molecular method)

**2. เอกสารอ้างอิง (Reference)**

Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. Journal of Bacteriology 173(2): 697–703.

National Center for Biotechnology Information. แหล่งข้อมูล: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. สืบค้น: 26 สิงหาคม 2566.

**3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)**

-

**4. หลักการ (Principle)**

การจำแนกสกุล-ชนิด แบคทีเรียและราโดยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (Molecular method) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction: PCR) และการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ทำให้ทราบถึงสกุล-ชนิดของแบคทีเรียและรา

**5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)**

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ: ภาคผนวก 1

- 5.1.1 Yeast mannitol broth (YMB)
- 5.1.2 Nutrient agar (NA)
- 5.1.3 Nutrient broth (NB)
- 5.1.4 Potato dextrose agar (PDA)
- 5.1.5 Potato dextrose broth (PDB)

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid (TEN buffer)
- 5.2.2 ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extract kit)
- 5.2.3 ไพรเมอร์ (Primer)
- 5.2.4 Taq DNA polymerase
- 5.2.5 dNTP
- 5.2.6 Deionized water
- 5.2.7 1XTBE buffer
- 5.2.8 Agarose
- 5.2.9 Loading dye

5.2.10 DNA ladder

5.2.11 สีย้อมดีเอ็นเอ (Fluorescent dye)

5.2.12 Deionized water

5.2.13 Tween 80

5.2.14 Streptomycin sulfate

5.2.15 Chloramine T

5.2.16 Gentamycin sulfate

5.2.17 สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

**6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and materials)**

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องชั่ง (Balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง

6.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

6.1.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

6.1.4 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

6.1.5 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

6.1.6 เครื่องเขย่า (Shaker)

6.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)

6.1.8 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler)

6.1.9 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)

6.1.10 เครื่องแยกดีเอ็นเอ (Gel electrophoresis)

6.1.11 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound microscope)

6.1.12 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope)

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 ขวดแก้วฝาเกลียว (Screw cap bottle)

6.2.2 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

6.2.3 ปิเปต (Pipette)

6.2.4 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

6.2.5 เข็มเขี่ย (Needle)

6.2.6 สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Glass slide and cover slip)

6.2.7 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 2 มิลลิลิตร

6.2.8 หลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

6.2.9 เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

**7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)**

7.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

7.1.1 แบคทีเรีย

7.1.1.1 การแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak plate บนอาหาร NA จนได้โคโลนีเดี่ยว

7.1.1.2 การแยกไรโซเบียมบริสุทธิ์จากปมรากถั่ว

- นำปมรากถั่วที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างจากวิธีทดสอบปริมาณไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมมาแยกเชื้อ โดยการล้างปมรากด้วยน้ำสะอาด
- แช่ปมรากด้วย 95% Ethyl alcohol นาน 1 นาที ตามด้วย 10% Sodium hypochlorite นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกรองปลอดเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง
- ผ่าปมรากด้วยมีดปลอดเชื้อหรือใช้วิธีบี้ปมรากให้ละเอียด แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อแตะบริเวณที่มีสีชมพู มาขีดลาก (Streak) บนอาหารวุ้นสูตร YMA ที่ใส่ Congo red ในตู้ปลอดเชื้อ
- บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 วัน เมื่อมีแบคทีเรียเจริญบนอาหาร เลือกโคโลนีลักษณะกลมนูน และดูดซับสี Congo red ได้น้อย

7.1.2 รา

ใช้เข็มเขี่ยตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของราวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน

7.1.3 ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

นำสปอร์ที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงร่อนใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มี Tween 80 1 มิลลิลิตร นำไป Sonicate เป็นเวลา 3–5 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และปิเปตสารละลายด้านบนทิ้ง

7.1.3.1 การฆ่าเชื้อบริเวณผิวสปอร์

- เติมสารละลาย 2% Chloramine-T + Tween 80 1 มิลลิลิตรลง พลิกหลอดกลับไปมาประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และปิเปตสารละลายด้านบนทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 รอบ
- เติม Streptomycin sulfate + Gentamycin sulfate ลงไป 1 มิลลิลิตร พลิกหลอดกลับไปมาประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และปิเปตสารละลายด้านบนทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 2 รอบ
- เติม Deionized water ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างเอาสารละลายเดิมออก ปั่นเหวี่ยงให้สปอร์ตกตะกอน เทน้ำทิ้งหรือปิเปตสารละลายด้านบนทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 รอบ

7.2 การเลี้ยงเชื้อและการสกัดสารพันธุกรรม

7.2.1 แบคทีเรีย

7.2.1.1 ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีแบคทีเรียลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150–180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง

7.2.1.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดมาถ่ายใส่หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงปลอดเชื้อ ขนาด 50 มิลลิลิตร นำหลอดไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ และเทอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสด้านบนทิ้ง

7.2.1.3 เติม TEN buffer 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างตะกอนเซลล์ นำหลอดไปเขย่าด้วยเครื่องผสมสาร ประมาณ 20 วินาที นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง แล้วทำซ้ำอีก 2 รอบ

7.2.1.4 นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียมาทำการสกัดสารพันธุกรรมตามวิธีการของชุดสกัดสารพันธุกรรม

7.2.1.5 แยกสารพันธุกรรมด้วยเครื่องแยกดีเอ็นเอ และตรวจปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ต้องอาศัยหลักการของ Aseptic technique เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นซึ่งจะทำให้ผลการจำแนกผิดพลาดได้

7.2.2 รา

7.2.2.1 ใช้เข็มเขี่ยหรือลูปขูดเส้นใยราบนผิวหน้าอาหาร PDA ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงปลอดเชื้อ ขนาด 2 มิลลิลิตร

7.2.2.2 สกัดสารพันธุกรรมตามวิธีการของชุดสกัดสารพันธุกรรม

7.2.2.3 แยกสารพันธุกรรมด้วยเครื่องแยกดีเอ็นเอ และตรวจปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

7.2.3 ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ใช้ปิเปตดูดสปอร์จำนวน 1 สปอร์ ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่มี Deionized water ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 10 ไมโครลิตร ใช้ปลายทิปกดสปอร์ให้แตกโดยสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และปิเปตน้ำที่ได้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

7.3 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและการเตรียมตัวอย่างเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

7.3.1 ปิเปตสารพันธุกรรม 1 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

7.3.2 เติม ไพรเมอร์ Taq DNA polymerase, dNTP, Deionized water และสารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

7.3.3 นำหลอดใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และตรวจ PCR product ด้วยเครื่องแยกดีเอ็นเอและเครื่องถ่ายภาพเจล

7.3.4 ทำความสะอาด PCR product และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

7.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

7.4.1 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์เปรียบเทียบความคล้ายคลึง (Identity) กับฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

7.4.2 พิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จุลินทรีย์เทียบกับฐานข้อมูล (Sequences producing significant alignments) เพื่อบ่งบอกสกุล-ชนิด ของจุลินทรีย์

**8. การคำนวณ (Calculation of results)**

-

**9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)**

รายงานผลการจำแนกเป็น สกุล-ชนิดของแบคทีเรีย/รา

**10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)**

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก 1

## อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
## (Culture media and reagents)

**อาหารเลี้ยงเชื้อ** กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Yeast mannitol broth (YMB)

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 Di-potassium hydrogen phosphate | 0.5 | กรัม |
| 1.2 Sodium chloride | 0.1 | กรัม |
| 1.3 Magnesium sulfate heptahydrate | 0.2 | กรัม |
| 1.4 D-mannitol | 10 | กรัม |
| 1.5 สารละลาย 0.25% Congo red | 10 | มิลลิลิตร |
| 1.6 Yeast extract | 0.5 | กรัม |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 1.1–1.4 ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองประมาณ 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 0.25% Congo red และ Yeast extract คนสารละลายอย่างต่อเนื่องจนเข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ในกรณีต้องการใช้อาหารแข็งเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม/ลิตร

2. Nutrient broth (NB)

| | | |
|---|---|---|
| 2.1 Beef extract | 3 | กรัม |
| 2.2 Peptone | 5 | กรัม |

ชั่งสารตามข้อ 2.1–2.2 และผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ในกรณีต้องการใช้อาหารแข็งเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม/ลิตร

3. Potato dextrose broth (PDB)

| | | |
|---|---|---|
| 3.1 Potato infusion | 200 | กรัม |
| 3.2 Dextrose | 20 | กรัม |

ชั่งสารตามข้อ 3.1–3.2 และผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ในกรณีต้องการใช้อาหารแข็งเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม/ลิตร

4. การเตรียมสารละลาย 0.25% Congo red

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 Congo red | 0.25 | กรัม |
| 4.2 น้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ | 100 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 4.1 ในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร

5. น้ำกลั่น + Tween 80

| | | |
|---|---|---|
| 5.1 Tween 80 | 1 | หยด |
| 5.2 น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

หยด Tween 80 จำนวน 1 หยด ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±2 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

6. การเตรียมสารละลาย 2 % Chloramine T + Tween 80

| | | |
|---|---|---|
| 6.1 Chloramine T | 2 | กรัม |
| 6.2 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 100 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสม ข้อ 6.1 ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ100 มิลลิลิตร

7. การเตรียม Streptomycin sulfate + Gentamycin sulfate

| | | |
|---|---|---|
| 7.1 Streptomycin sulfate | 0.1 | กรัม |
| 7.2 Gentamycin sulfate | 0.05 | กรัม |
| 7.3 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 10 | มิลลิลิตร |

ชั่งสารตามปริมาณข้างต้นและละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร โดยการนำไป sonicate จนสารละลายหมด แล้วกรองสารลายด้วยหัวกรอง (Syringe filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บในที่ทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Stock solution)

การเตรียมสารก่อนใช้งาน โดยผสมสารละลาย Stock solution 2 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร

คำสั่งกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ที่ ๔๕ /๒๕๖๖
เรื่อง แต่งตั้งคณะทำงานการจัดการความรู้ (Knowledge Management Team – KM Team)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๖
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

---

ด้วยกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ได้จัดทำคำรับรองการปฏิบัติราชการ ปีงบประมาณ ๒๕๖๖ โดยมีตัวชี้วัดระดับความสำเร็จของการจัดการความรู้ นั้น เพื่อให้การติดตามการจัดการความรู้ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๖ ดำเนินงานเป็นไปด้วยความเรียบร้อย มีประสิทธิภาพสอดคล้องกับกรอบแนวทางที่วางไว้ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จึงแต่งตั้งคณะทำงานการจัดการความรู้ (Knowledge Management Team – KM Team) ๒ คณะ โดยมีองค์ประกอบและหน้าที่ดังต่อไปนี้

**๑. คณะทำงานพิจารณาคำแนะนำการใช้ปุ๋ยสำหรับไม้ผล**

| | | |
|---|---|---|
| ๑. ผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร | | ประธานคณะทำงาน |
| ๒. ผู้เชี่ยวชาญด้านดินและปุ๋ย | | คณะทำงาน |
| ๓. ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | | คณะทำงาน |
| ๔. ผู้อำนวยการกลุ่มบริหารโครงการวิจัย | | คณะทำงาน |
| ๕. ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรขอนแก่น | | คณะทำงาน |
| ๖. นางสุปรานี มั่นหมาย | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๗. นางประไพ ทองระอา | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๘. นายพีรพงษ์ เชาวนพงษ์ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๙. นางสาวชัชธนพร เกื้อหนุน | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๐. นางสาวทิวาพร ผดุง | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๑. นางสาวปิยะนันท์ วิวัฒน์วิทยา | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๒. นางสาวรมิดา ขันตรีกรม | นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๓. นางสาวสมฤทัย ตันเจริญ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงานและเลขานุการ |
| ๑๔. นางสาวณัฐธิดา ทองนาค | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ กลุ่มบริหารโครงการวิจัย | คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ |



๑๕. นางสาวนุชนาฏ...

| | | |
|---|---|---|
| ๑๕. นางสาวนุชนาฏ ตันวรรณ | นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงานและ<br>ผู้ช่วยเลขานุการ |

**๒. คณะทำงานพิจารณาคู่มือตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ**

| | | |
|---|---|---|
| ๑. ผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร | | ประธานคณะทำงาน |
| ๒. ผู้เชี่ยวชาญด้านดินและปุ๋ย | | คณะทำงาน |
| ๓. ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์และทดสอบ | | คณะทำงาน |
| ๔. ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | | คณะทำงาน |
| ๕. ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี | | คณะทำงาน |
| ๖. ผู้อำนวยการกลุ่มบริหารโครงการวิจัย | | คณะทำงาน |
| ๗. ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรขอนแก่น | | คณะทำงาน |
| ๘. นางสาวศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๙. นางประไพ ทองระอา | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๐. นางสาวนิศารัตน์ ทวีนุต | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๑. นางสาวจิตรา เกาะแก้ว | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๒. นางสาวกัลยกร โปร่งจันทึก | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๓. นายมนต์ชัย มนัสสิลา | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๔. นายสนธยา ขำติ๊บ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๕. นางสาวกนกอร บุญพา | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๖. นางสาวบุณฑริก ฉิมชาติ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๗. นางสาวณัฐนันท์ ไกรเลิศรัตนชัย | นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงาน |
| ๑๘. นางสุปรานี มั่นหมาย | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงานและ<br>เลขานุการ |
| ๑๙. นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ<br>กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา | คณะทำงานและ<br>ผู้ช่วยเลขานุการ |
| ๒๐. นางสาวณัฐธิดา ทองนาค | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ<br>กลุ่มบริหารโครงการวิจัย | คณะทำงานและ<br>ผู้ช่วยเลขานุการ |

โดยให้คณะทำงาน...

โดยให้คณะทำงานมีหน้าที่

๑. จัดทำแผน กำหนดรูปแบบและขอบเขตแนวทางการจัดการความรู้

๒. ประสานงานและติดตามความก้าวหน้าของการดำเนินการตามแผนการจัดการความรู้ และดำเนินการตามแผนที่กำหนด

๓. สรุปผลการติดตามและจัดทำรายงานผลการติดตามการจัดการความรู้ ส่งให้ผู้จัดเก็บข้อมูลตามแบบฟอร์มและระยะเวลาที่กำหนด

๔. ดำเนินการเผยแพร่ความรู้จากการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ผ่านช่องทางต่างๆ

๕. ปฏิบัติงานอื่นๆ ที่ได้รับมอบหมาย

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ ๑๙ มกราคม พ.ศ. ๒๕๖๖

(นางจิราพรรณ ทองหยอด)
ผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

DOA TOGETHER

Hearing for Changing, Acting for Moving forward

50 ปีกรมวิชาการเกษตร
DOA TOGETHER

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900
โทรศัพท์ 0 2579 5722 , 0 2579-0065
โทรสาร 0 2561 4763

https://qr.page/g/1tWs4t1F9vD