

การศึกษาความหลากหลายและประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. ในการละลาย ฟอสเฟตอินทรีย์

Diversity and Efficiency of *Bacillus* sp. on Inorganic Phosphate Solubilization

คำนำ

พื้นที่เกษตรกรรมของประเทศไทยในปัจจุบันกำลังอยู่ในสภาพเสื่อมโทรม และถูกทำลาย เนื่องจากการจัดการที่ไม่เหมาะสม เป็นเหตุให้ผลผลิตทางการเกษตรตกต่ำ การพัฒนาทางการเกษตรเพื่อเพิ่มผลผลิตจากการใช้พื้นที่เพาะปลูกอย่างเหมาะสม รวมถึงการป้องกันและฟื้นฟูสภาพเสื่อมโทรมของพื้นที่เกษตรกรรม ให้กลับมีประสิทธิภาพดังเดิมนั้นเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง หนึ่งในปัจจัยที่ต้องการการพัฒนา คือ การเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินที่เสื่อมโทรมจากการเพาะปลูกพืช และการขาดแคลนธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชในดิน เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นธาตุอาหารพืชหลักที่พบว่ามีการขาดแคลนค่อนข้างรุนแรงในดิน การใส่ปุ๋ยเคมีแต่เพียงอย่างเดียวอาจไม่คุ้มค่าและให้ประสิทธิผลที่ดีเพียงพอ เพราะมีต้นทุนสูง เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตแม่ปุ๋ยใช้เองได้ จึงต้องนำเข้าปุ๋ยจากต่างประเทศ อีกทั้งแนวโน้มการนำเข้ายังเพิ่มขึ้นทุกปี ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราไปหลายหมื่นล้านบาท การนำเทคโนโลยีเกี่ยวกับปุ๋ยชนิดอื่น เช่น ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยพืชสด และปุ๋ยชีวภาพ รวมทั้งการพัฒนาวิธีการจัดการธาตุอาหารพืชแบบผสมผสาน จากการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีภายในประเทศ เช่น หินฟอสเฟต กำลังเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินอย่างยั่งยืน (อาภารัตน์, 2549)

Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ปรับปรุงคุณภาพดินและพืช PGPB มีความหลากหลายทั้งจำนวนชนิดและปริมาณ พบทั่วไปในดินทั้งที่ดำรงชีพอย่างอิสระ และอาศัยอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของพืชที่อยู่เหนือดิน (epiphyte) และภายในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) กิจกรรมของ PGPB เป็นกลไกสำคัญที่ช่วยให้พืชเจริญเติบโตแข็งแรง มีคุณภาพและผลผลิตเพิ่มขึ้น กลไกนี้มีอยู่หลายลักษณะมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อม กลไกหนึ่งที่รู้จักเป็นอย่างดีและได้นำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางคือ การเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดินและพืช จากแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เช่น

Rhizobium, *Azotobacter* และ *Azospirillum* กลไกอื่นที่เป็นประโยชน์สำหรับพืช ได้แก่ การสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช การควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืช และการละลายแร่ธาตุอาหารพืชในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ เช่น ธาตุฟอสฟอรัส (Glick *et al.*, 1999)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืชหลักที่สำคัญ และพบว่าในดินขาดแคลนธาตุนี้ค่อนข้างรุนแรง รองจากธาตุไนโตรเจน การขาดแคลนธาตุนี้ในดินมีสาเหตุมาจากรูปของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สำหรับพืช (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-) มีปริมาณน้อย พืชไม่สามารถดูดดึงไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเพียงพอ ทั้งที่ในดินมีธาตุฟอสฟอรัสอยู่ปริมาณมาก แต่ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ สาเหตุเกิดจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาการตรึง การตกตะกอนทางเคมีสูง และละลายออกมาได้ยาก ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตรึงและตกตะกอนของธาตุฟอสฟอรัสในดินที่สำคัญคือ ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน นอกจากนี้ธาตุนี้ยังแพร่กระจายไปสู่รากพืชได้ช้า เพราะการเคลื่อนที่ในดินนั้นต่ำ พืชที่มีระบบรากที่ไม่แข็งแรงหรือไม่สามารถขอนไขไปยังแหล่งที่มีธาตุนี้ละลายอยู่ ก็จะแสดงอาการขาดธาตุฟอสฟอรัส

หินฟอสเฟต เป็นหินแร่ที่พบในธรรมชาติ และมีธาตุฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญ หินฟอสเฟตที่พบส่วนใหญ่อยู่ในรูปของแร่อะพาไทต์ แบ่งตามแหล่งกำเนิดออกเป็น 3 ลักษณะ คือ แบบหินอัคนี แบบกัวโน และแบบหินตะกอนภาคพื้นมหาสมุทร แหล่งหินฟอสเฟตที่พบในประเทศไทย มีขนาดเล็ก พบตามถ้ำ และเทือกเขาหินปูนในหลายจังหวัดของประเทศ หินฟอสเฟตที่พบส่วนใหญ่เป็นแบบกัวโน ที่เกิดจากการสะสมของมูลค้างคาว หินฟอสเฟตเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตปุ๋ยเคมีฟอสฟอรัส และสามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยเพิ่มธาตุฟอสฟอรัสในดินได้โดยตรง เพื่อทดแทนหรือใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีฟอสฟอรัส เพราะมีราคาถูก ปุ๋ยหินฟอสเฟตที่เหมาะสมกับการนำมาใช้เป็นปุ๋ยควรมีปริมาณฟอสฟอรัสรูปที่เป็นประโยชน์ (คิดในรูป P_2O_5) ไม่น้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดไม่น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (ธงชัย, 2546: 123-142) ปุ๋ยหินฟอสเฟตที่ใช้ในการเกษตรมีอัตราการละลายของฟอสฟอรัสรูปที่เป็นประโยชน์จากหินฟอสเฟตค่อนข้างช้า และมีปริมาณน้อย จึงอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช และพบว่าพืชสามารถนำฟอสฟอรัสจากปุ๋ยเคมีหรือหินฟอสเฟตไปใช้ได้เพียง 10-25 เปอร์เซ็นต์ของฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้เท่านั้น ส่วนที่เหลือจะถูกตรึงอยู่ในดินอย่างรวดเร็ว พืชนำไปใช้ได้ยาก (คณาจารย์ภาควิชาปฐพี, 2548: 294-306; Tisdale *et al.*, 1985: 189-248) ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถละลายฟอสเฟตจากรูปที่ไม่ละลายให้กลายเป็นฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์สำหรับพืชจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ได้มีผู้สนใจศึกษา

จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมีหลายชนิด แต่ที่มีความสำคัญได้แก่ เชื้อราไมคอร์ไรซา เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ส่วนของเส้นใยเชื้อราจะซอนไขเข้าไปในดินช่วยดูดธาตุอาหารโดยเฉพาะธาตุฟอสฟอรัส ทำให้พืชที่มีเชื้อนี้อยู่ได้รับธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณที่เพียงพอ นอกจากนี้ไมคอร์ไรซายังช่วยป้องกันไม่ให้ฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาถูกตรึงโดยปฏิกิริยาทางเคมีของดิน แต่เชื้อราไมคอร์ไรซามีข้อจำกัดที่ต้องอยู่กับพืชอาศัยที่มีความจำเพาะเจาะจง จึงยังไม่สามารถเลี้ยงและเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ การผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อจำเป็นต้องเพาะเชื้อในพืชอาศัยและวัสดุปลูกที่เหมาะสมเท่านั้น (มุกดา, 2547)

แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Bacteria; PSB) ที่ถูกตรึงอยู่ในดิน และหินแร่ในธรรมชาติให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช มีอยู่หลายชนิด เช่น *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* โดยแบคทีเรียจะสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาละลายฟอสฟอรัส (มุกดา, 2547) จากข้อมูลพบว่า *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการละลายฟอสเฟต พบได้ในดินทั่ว ๆ ไป และมีความเหมาะสมในแง่ของการนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งแวดล้อม เพราะคุณสมบัติการสร้าง endospore ซึ่งทำให้มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมสูงกว่าเซลล์ปกติ และปัจจุบันมีหลายประเทศให้ความสนใจ และนำเอาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการละลายฟอสเฟต มาผลิตเป็นผงเชื้อจุลินทรีย์ในรูปของปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) เช่น *Bacillus megaterium* var *phosphaticum* ทั้งนี้อาจใช้ในลักษณะเชื้อผสมเพื่อเพิ่มความหลากหลายของธาตุอาหารพืช เช่น *Azotobacter* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ขายเป็นการค้า

งานวิจัยนี้สนใจคัดเลือกและจัดจำแนกชนิดเชื้อ *Bacillus* sp. ที่แยกจากดิน และหินฟอสเฟต ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์สำหรับพืช และศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารต่างสูตร เพื่อประโยชน์ในการนำเชื้อไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ต่อไป เช่น ด้านการเกษตรในรูปของปุ๋ยจุลินทรีย์

วัตถุประสงค์

1. แยกและคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่มีศักยภาพในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ที่พืชนำไปใช้ไม่ได้ ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จากดินและหินฟอสเฟต ที่มีจำหน่ายทางการค้า
2. จำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถละลายฟอสเฟตโดยวิธีแบบดั้งเดิม
3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ของแบคทีเรียที่มีความสามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวต่างชนิด เพื่อหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพ

การตรวจเอกสาร

ความหลากหลายและประโยชน์ของจุลินทรีย์ในทางการเกษตร

จุลินทรีย์ดินที่พบทั่วไปมีหลายประเภทประกอบด้วย แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซิส โปรโตซัว สาหร่าย และไวรัส จุลินทรีย์เหล่านี้มีส่วนสำคัญในวัฏจักรธาตุต่างๆ เช่น วัฏจักรคาร์บอน วัฏจักรไนโตรเจน และช่วยในการยึดเกาะกันของอนุภาคดิน นอกจากนี้บริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) เป็นอีกบริเวณหนึ่งที่พบจุลินทรีย์หลากหลายชนิดเข้ามาอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก เนื่องจากกิจกรรมของพืชที่บริเวณรากปลดปล่อยสารที่เรียกว่า root exudate ที่มีความสำคัญต่อการกำหนดอาณาบริเวณรอบรากพืช และช่วยดึงดูดให้จุลินทรีย์เข้ามาอาศัยอยู่บริเวณราก เพราะสารนี้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Barea *et al.*, 2005) กิจกรรมของจุลินทรีย์ที่พบบริเวณรอบรากพืชยังช่วยส่งเสริมการเจริญพัฒนาของราก และเพิ่มธาตุอาหารบางชนิดที่จำเป็นสำหรับพืช เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส

จุลินทรีย์เหล่านี้ยังสามารถพบได้ตามบริเวณส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช โดยกลุ่มที่พบภายนอกต้นพืชส่วนที่อยู่เหนือดิน เช่น ใบ ดอก ผล และลำต้น เรียกว่า epiphyte (Lindow and Brandl, 2003) สำหรับชนิดที่พบอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช เรียกว่า endophyte เป็นเชื้อที่ไม่ก่ออันตรายให้กับพืช และแยกได้จากเนื้อเยื่อพืช (Hallmann *et al.*, 1997) ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบจากทั้งสองแหล่งมีความคล้ายคลึงกัน เช่น *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* และ *Xanthomonas* เป็นต้น

ดินและพืชเป็นแหล่งที่พบที่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ทั้งจำนวนชนิด ปริมาณ เพราะแหล่งทั้งสองเป็นถิ่นอาศัยที่เหมาะสม การเข้ามาอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์กับพืช หรือระหว่างจุลินทรีย์กับจุลินทรีย์ เกิดเป็นสังคมสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์อย่างหลากหลาย และสลับซับซ้อน เช่น ความสัมพันธ์แบบพึ่งพิงอาศัย แบบแก่งแย่งแข่งขัน และแบบปรสิต รูปแบบความสัมพันธ์เหล่านี้มีทั้งที่ก่อประโยชน์และโทษต่อกัน อีกทั้งมีความสำคัญต่อระบบนิเวศ และระบบการเกษตรอย่างยิ่ง เพราะช่วยส่งเสริมการเจริญพัฒนาของพืช ปรับปรุงคุณภาพพืชและดิน (Barea *et al.*, 2005)

การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ทางการเกษตรเป็นการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม ชนิด ปริมาณ โครงสร้าง หน้าที่ และติดตามบทบาทของจุลินทรีย์ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชในด้านต่าง ๆ Shen (1997) ได้แบ่งบทบาทของจุลินทรีย์ในทางเกษตรออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ประกอบด้วยหนึ่ง Biofertilization เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช Biocontrol agent เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืช และ Biodegradation เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถกำจัดหรือย่อยสลายสารพิษที่ตกค้างในดิน เช่น ยาฆ่าแมลง

วิธีการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์มีหลายวิธีสรุปได้ดังนี้

วิธีดั้งเดิม (classical technique)

การศึกษาจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมแบบดั้งเดิมอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยา ประเมินจำนวนชนิดและปริมาณ โดยวิธี Plate Counting Technique, Most Probable Number (MPN) หรือ direct count วิธีการเหล่านี้จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์สำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งอาจใช้เวลานาน และวิธีการนี้อาจให้ผลการวิเคราะห์ที่ผิดพลาด เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดที่สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จากธรรมชาติได้ทุกชนิด จึงไม่สามารถศึกษาจำนวนชนิดและปริมาณที่แท้จริงของจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาโดยวิธีดั้งเดิมทำให้เข้าใจถึงคุณสมบัติพื้นฐานของเชื้อ และนำเอาคุณสมบัติเหล่านี้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบในทางการค้า เพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ อีกทั้งเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวกและรวดเร็วเช่น BIOLOG® และ API system (Nannipieri *et al.*, 2003)

วิธีการศึกษาในระดับโมเลกุล (Molecular technique)

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในธรรมชาติในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการศึกษาในระดับโมเลกุล (DNA และ RNA) เป็นอย่างมาก เพราะไม่จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อ รวดเร็วและว่องไว สามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในระดับสปีชีส์ และยีนีส หรือความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กับกลุ่มสิ่งมีชีวิตชั้นสูงได้ วิธีการตรวจวิเคราะห์มีอยู่หลายวิธี เช่น amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), ribosomal intergenic spacer analysis (RISA), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) หรือ temperature gradient gel

electrophoresis (TGGE) วิธีการเหล่านี้ส่วนใหญ่อาศัยวิธีการเบื้องต้นในการทำ polymerase chain reaction (PCR) และศึกษาความหลากหลายของจำนวนชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ จากความแตกต่างของ “fingerprint” ที่ได้จากการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล แต่วิธีนี้ก็มีข้อเสีย เช่น โครงสร้างของยีนในแบคทีเรียมีหลาย operon อาจทำให้การทำ PCR หรือการทำ cloning เกิดความผิดพลาด เกิดการซ้อนทับของแถบ DNA หรือ RNA pattern ทำให้การประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์คลาดเคลื่อน (Kent and Triplett, 2002; Prosser, 2002)

การวิเคราะห์รูปแบบของ fatty acid

การวิเคราะห์รูปแบบและองค์ประกอบของ phospholipid fatty acid (PLFA) หรือ fatty acid methyl ester (FAME) เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ เนื่องจาก phospholipid เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ที่พบได้ทั้งในเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต การเปลี่ยนแปลงของ phospholipid profiles ยังสัมพันธ์กับความผันแปรของความอุดมสมบูรณ์ของกลุ่มสิ่งมีชีวิต จึงสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้มาอ้างอิงกับฐานข้อมูลของเชื้อบริสุทธิ์ที่ทราบ biosynthetic pathway แล้ว เช่น MIDI, Newark และ Delaware (Nannipieri *et al.*, 2003)

จากความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในธรรมชาติทั้งชนิด ปริมาณ และกิจกรรมของจุลินทรีย์ จึงได้นำเอาจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรอย่างกว้างขวาง และเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี ตัวอย่าง *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* เป็นต้น เพราะเชื่อว่าจะมีความปลอดภัย ไม่เกิดการสะสมของสารเคมีต่างๆ ในระบบห่วงโซ่อาหาร จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนด้วยตัวเองจึงนำมาใช้ซ้ำได้ จุลินทรีย์เป้าหมายไม่พัฒนาความต้านทานต่อจุลินทรีย์ด้วยกันเองเหมือนกับการใช้สารเคมี เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศ (Shen, 1997)

จุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อระบบนิเวศและการเกษตร ในด้านการส่งเสริมการเจริญพัฒนาของพืช และปรับปรุงคุณภาพดิน เรียกว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชทั้งในทางตรงและทางอ้อม (ตารางที่ 1) PGPR มีความหลากหลายทั้งชนิดและปริมาณ พบในดินทั่วไป และตามบริเวณต่างๆ ของพืช ได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อคัดเลือกลายพันธุ์จุลินทรีย์เหล่านี้จากธรรมชาติ การพัฒนาลายพันธุ์ ศึกษากลไกการทำงาน และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เพื่อนำมาใช้

ประโยชน์ทางการเกษตร (Glick, 1995; Glick *et al.*, 1999; Hallmann *et al.*, 1997; Lindow and Brandl, 2003)

ตารางที่ 1 กลไกทางตรงและทางอ้อมที่เกี่ยวข้องในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดย PGPR

Direct Mechanisms	Indirect Mechanisms
• Solubilization of Phosphate • Nitrogen Fixation • Sequestering Iron by Siderophores • Production of Phytohormones (Auxin, Cytokinin, Gibberelin) • Lowering Ethylene Concentration	• Antibiotic Production • Depletion of Iron from the Rhizosphere • Induced Systemic Resistance • Production of Fungal Cell Wall Lysing Enzymes • Competition for Sites on the Root

ดัดแปลงจาก: Glick *et al.* (1999)

อิทธิพลของ PGPR ต่อการเจริญและพัฒนาของพืชมีอยู่หลายกลไก (Glick *et al.*, 1999) ได้แก่

การตรึงไนโตรเจนให้แก่พืช

แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนแบ่งออกเป็น free-living bacteria และ symbiotic bacteria แบคทีเรียกลุ่มแรกพบได้ในดินทั่วไป และพบมากบริเวณรอบรากพืช หรือส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช ได้แก่ *Azotobacter*, *Azospirillum* แบคทีเรียกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มหลัง แต่เป็นประโยชน์สำหรับการเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดินทั่วไป สำหรับ symbiotic bacteria เป็นกลุ่มที่พบอาศัยอยู่อย่างจำเพาะเจาะจงกับชนิดพืช โดยเฉพาะภายในปมรากหรือปมที่ลำต้นของพืชตระกูลถั่ว แบคทีเรียกลุ่ม *Rhizobium* จัดเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่สำคัญในกลุ่มนี้ และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงมาก จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเกษตรกรรม เพราะช่วยเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดิน ปรับปรุงคุณภาพของดิน

การสังเคราะห์และปลดปล่อย siderophore

ธาตุเหล็กเป็นธาตุที่สำคัญสำหรับเซลล์สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ แต่ในดินธาตุเหล็กมักอยู่ในรูปที่เซลล์นำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์และปลดปล่อยสารที่เรียกว่า siderophore ซึ่งมีสมบัติจำเพาะในการจับกับธาตุเหล็ก (Fe^{3+}) แล้วนำเข้าสู่เซลล์ เพื่อใช้ประโยชน์ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับพืชและมีคุณสมบัติดังกล่าว จึงช่วยปกป้องพืชจากจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ก่อโรคพืชมีความสามารถในการแข่งขัน และนำธาตุเหล็กไปใช้ประโยชน์ได้น้อยกว่าจุลินทรีย์ที่สามารถปลดปล่อยสาร siderophore

ความสามารถในการสังเคราะห์ phytohormones

PGPR หลายชนิดสามารถสังเคราะห์ phytohormone ที่มีความสำคัญต่อการเจริญพัฒนา และเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานต่าง ๆ ของเซลล์พืช เช่น auxin และ cytokinin ตัวอย่างเช่น auxin ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนารากของพืช การศึกษาเกี่ยวกับ indoleacetic acid (IAA) ที่มีผลต่อการสร้างและประสิทธิภาพของ root nodules โดย IAA ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นมีอิทธิพลต่อกระบวนการตอบสนองทางชีวภาพระหว่างพืชกับ symbiotic bacteria ซึ่งยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของกลไกนี้ได้ชัดเจน (Srinivasan *et al.*, 1996)

การละลายแร่ธาตุอาหารพืชให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียและรา สามารถละลายแร่ธาตุอาหารพืชที่ถูกตรึงหรือตกตะกอนอยู่ในดินให้ละลายออกมาอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์กับพืช เช่น การปลดปล่อยธาตุฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงอยู่ในดิน หรือหินฟอสเฟต ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* และ *Erwinia* (Rodríguez and Fraga, 1999) สำหรับเชื้อรา เช่น mycorrhiza, *Aspergillus* และ *Penicillium* (Subba Rao, 1993; Tilak *et al.*, 2005)

การแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

กลไกนี้ก็นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในลักษณะของ biocontrol agent เพื่อป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคพืช หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่เป็นอันตรายกับพืช เช่น แมลงศัตรูพืช โดยอาศัยความสามารถในการเจริญแข่งขันกันระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิต เพื่อการครอบครองอาณาเขตและแหล่งอาหาร PGPR ที่สามารถเจริญได้ดีกว่าสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นอาจปลดปล่อยสารบางอย่างไปยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น เช่น สารปฏิชีวนะ กรดบางชนิด

กลไกต่าง ๆ ข้างต้นแสดงถึงประโยชน์และความสำคัญของ PGPR ต่อพืชและระบบการเกษตร ซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรในการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติเป็นปุ๋ยชีวภาพ หรือปุ๋ยจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มผลผลิตพืช ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี และลดต้นทุนการผลิตจากการซื้อปุ๋ยเคมีอีกทางหนึ่ง เพราะเกษตรกรสามารถผลิตปุ๋ยชีวภาพใช้เองได้

ฟอสฟอรัส

ความสำคัญของฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารพืชที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของพืช ทั้งส่วนที่อยู่เหนือดินและราก (คณาจารย์ภาควิชาปฐพี, 2548: 294-306) เนื่องจากฟอสฟอรัสมีบทบาทสำคัญในการสะสมและถ่ายทอดพลังงานของเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกชนิด และเป็นองค์ประกอบของเซลล์ พืชที่ขาดแคลนธาตุฟอสฟอรัสไม่ว่าระยะใดของวงจรชีวิตจะแสดงความผิดปกติ เจริญเติบโตช้า ลำต้นแคระแกรน การติดดอกติดผลต่ำ คุณภาพของเมล็ดลดลง (Brady and Weil, 2002: 592-621; Tisdale *et al.*, 1985: 189-248) ฟอสฟอรัสเกือบทั้งหมดที่พบในพืชมาจากดิน แต่พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสในดินที่อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์สำหรับพืชมีอยู่น้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณทั้งหมดในดิน เนื่องจากฟอสฟอรัสในดินมีความสามารถในการเคลื่อนที่ต่ำ ถูกตรึงและตกตะกอนโดยปฏิกิริยาเคมีได้ง่าย ปลดปล่อยออกมาได้ยาก

รูปของฟอสฟอรัสในดิน

รูปของฟอสฟอรัสในดินแบ่งออกเป็นสองรูปหลักคือ ฟอสฟอรัสอินทรีย์ เป็นหินแร่ที่สะสม หรือถูกตรึงอยู่ในดินในรูปของสารประกอบฟอสฟอรัสที่รวมตัวอยู่กับธาตุอื่น เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก อะลูมิเนียม และฟลูออรีน รวมถึงไอออนอิสระของฟอสเฟตที่ละลายอยู่ในสารละลายดินและเป็นประโยชน์สำหรับพืช อีกรูปหนึ่งคือ ฟอสฟอรัสอินทรีย์ ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายดิน หรือเป็นองค์ประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต ได้แก่ inositol phosphate, phytic acid และ phospholipid

การเปลี่ยนรูปของฟอสฟอรัสในดินระหว่างรูปอนินทรีย์ และอินทรีย์ เกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ ประกอบด้วย ปัจจัยทางชีวภาพจากกระบวนการ mineralization และ immobilization ของจุลินทรีย์ และกิจกรรมของพืชที่บริเวณราก รวมถึงอิทธิพลจากปัจจัยทางกายภาพ และทางเคมีของดิน ได้แก่ ปฏิกริยาการตรึง การตกตะกอน และการดูดซับ (Hinsinger, 2001) ซึ่งอิทธิพลจากปัจจัยทั้งสามล้วนส่งผลกระทบต่อปริมาณและรูปของฟอสฟอรัสในดิน โดยเฉพาะรูปที่เป็นประโยชน์สำหรับพืชในสารละลายดินอย่างมาก

ฟอสฟอรัสอินทรีย์ในรูปที่ถูกตรึงหรือถูกดูดซับไว้ในดิน และ/หรือฟอสฟอรัสอินทรีย์ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตจะเป็นแหล่งสำรองฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สำหรับพืชอย่างช้า ๆ โดยจะค่อย ๆ ได้รับการปลดปล่อยออกมาจากแหล่งที่ตรึงฟอสฟอรัสไว้ เมื่อมีสถานะที่เอื้อต่อการปลดปล่อย หรือหลังจากที่เซลล์สิ่งมีชีวิตถูกย่อยสลาย

ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน

ฟอสฟอรัสในดินที่เป็นประโยชน์สำหรับพืชอยู่ในรูปของไอออนฟอสเฟตที่ละลายอยู่ในสารละลายดิน เรียกว่า orthophosphate รูปที่สำคัญคือ HPO_4^{2-} และ H_2PO_4^- ความเข้มข้นของฟอสเฟตในสารละลายดินมีปริมาณน้อยกว่า 1 ppm (Rodríguez and Fraga, 1999) ซึ่งถูกควบคุมปริมาณจากปัจจัยทางกายภาพและเคมีของดิน โดยเฉพาะอิทธิพลของค่าความเป็นกรดและด่างของดิน ซึ่งในสารละลายดินที่มีสภาพเป็นกรดมีแนวโน้มของฟอสเฟตส่วนใหญ่เป็น H_2PO_4^- แต่ดินที่มีแนวโน้มเป็นด่างฟอสเฟตส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ HPO_4^{2-} และค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการละลายของฟอสเฟตในดินควรมีค่าอยู่ระหว่าง 5.5 ถึง 7.0 (Sekhar and Aery, 2001)

การเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของฟอสฟอรัสในดิน

ธาตุฟอสฟอรัสในดินมักพบอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์สำหรับพืช เนื่องจากธาตุนี้มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาการตรึง การตกตะกอน และละลายได้ยาก จึงทำให้พืชเกิดการขาดแคลนฟอสฟอรัส ทั้งที่ในดินมีปริมาณฟอสฟอรัสอยู่มาก (กิตตินันท์, 2543) นอกจากนี้พืชไม่สามารถดูดดึงเอาฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้เต็มที่ เพราะฟอสฟอรัสแพร่กระจายไปสู่รากพืชได้ช้า หรือรากพืชไม่สามารถขอนไขไปยังแหล่งที่มีธาตุนี้ละลายอยู่ได้ โดยเฉพาะถ้าพืชนั้นมีระบบรากที่ไม่แข็งแรง

การปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของฟอสฟอรัสในดินอย่างเช่น การใส่ปุ๋ยเคมีซึ่งเป็นปุ๋ยฟอสเฟตรูปละลายง่าย ได้แก่ ปุ๋ยซิงเกิลฟอสเฟต ปุ๋ยซูเปอร์ฟอสเฟต ปุ๋ยแอมโมเนียมฟอสเฟต และปุ๋ยทริเปิลฟอสเฟต จะพบว่าปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้จากปุ๋ยประมาณ 10-25 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในทันที อีกประมาณ 75-90 เปอร์เซ็นต์ถูกตรึงอยู่ในดินอย่างรวดเร็ว และพืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ยาก (คณาจารย์ภาควิชาปฐพี, 2548: 294-306; Tisdale *et al.*, 1985: 189-248) ในสภาพดินกรดฟอสเฟตมีแนวโน้มที่จะถูกตรึงอยู่กับธาตุเหล็ก อะลูมิเนียม และแมงกานีส เนื่องจากที่สภาวะความเป็นกรดธาตุเหล่านี้จะละลายออกมาอยู่ในรูปไอออนอิสระ และทำปฏิกิริยากับไอออนฟอสเฟตได้ดี แต่ในสภาพดินที่เป็นด่างฟอสเฟตจะถูกตรึงได้ง่ายโดยธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียม (Hinsinger, 2001)

วิธีการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสเฟตในดินวิธีอื่นได้แก่ การปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของดิน การปรับค่าความเป็นกรดและด่างของดินให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพื่อลดปฏิกิริยาการตรึงและตกตะกอนของฟอสเฟตในดิน การเพิ่มปริมาณฟอสเฟตอินทรีย์ ปรับปรุงวิธีการใส่ปุ๋ยฟอสเฟตโดยโรยปุ๋ยเป็นแถวลึกในดินในกลีแฉะพืช (banding application) และการใช้ปุ๋ยหินฟอสเฟต (กิตตินันท์, 2543; ปัทมา, 2547: 119-177)

หินฟอสเฟต

หินฟอสเฟต เป็นสินแร่ธรรมชาติที่มีองค์ประกอบของธาตุฟอสฟอรัสอยู่เป็นจำนวนมาก โดยแร่ฟอสเฟตที่สำคัญคือ แร่อะพาไทต์ มีสูตรทางเคมี $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})_2$

แหล่งแร่ฟอสเฟตในธรรมชาติมีหลายรูปแบบ แบ่งตามลักษณะการเกิดได้เป็น 3 แบบ คือ แบบหินอัคนี ซึ่งเป็นแร่อะพาไทต์ที่เกิดร่วมกับมวลหินอัคนีซับซ้อนชนิดหินคาร์โบนาไทต์ แบบที่สองคือหินฟอสเฟต แบบกัวโน ที่มีลักษณะการเกิดแบบเคมีชีวภาพจากการสะสมของมูลนก มูลค้างคาว หรือซากกระดูกสัตว์ในทะเลต่างๆ และสุดท้ายหินฟอสเฟต แบบหินตะกอนภาคพื้นมหาสมุทร ซึ่งเกิดจากการสะสมและตกตะกอนของสารละลายฟอสเฟตที่ผุพังสลายตัวโดยกระบวนการทางธรรมชาติ พบในภาคพื้นมหาสมุทรบริเวณไหล่ทวีป (upwelling zone) และเป็นแหล่งสำรองหินฟอสเฟตที่สำคัญ เนื่องจากมีคุณภาพและปริมาณมาก จึงมีความสำคัญต่อการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ (สุวิชัย และ พิทักษ์, ม.ป.ป.)

หินฟอสเฟตส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ประโยชน์แล้ว พบว่าร้อยละ 90 ใช้ในอุตสาหกรรมปุ๋ยเคมี ที่เหลือนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น การผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ (Zapata and Roy, 2004)

แหล่งแร่ฟอสเฟตในประเทศไทย

แหล่งหินฟอสเฟตที่มีการสำรวจพบในประเทศไทยเป็นแหล่งแร่ฟอสเฟตแบบกัวโน ซึ่งได้จากการสะสมของมูลค้างคาว พบตามถ้ำและเทือกเขาหินปูน มีขนาดเล็กและปริมาณน้อย จึงไม่สามารถพัฒนาให้เป็นแหล่งแร่ฟอสเฟตที่มีศักยภาพสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยขนาดใหญ่ แหล่งแร่ฟอสเฟตแบบกัวโนพบได้หลายจังหวัดของประเทศไทย เช่น ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบูรณ์ แพร่ ลำพูน สุโขทัย เลย กระบี่ สุราษฎร์ธานี และภูเก็ต (อาภารัตน์, 2549)

ปุ๋ยหินฟอสเฟต

ปุ๋ยหินฟอสเฟตเป็นการนำหินฟอสเฟตมาบดและใส่ลงดิน เพื่อใช้เป็นปุ๋ยสำหรับเพิ่มธาตุฟอสฟอรัสในดินโดยตรง หินฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นปุ๋ยควรมีปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณฟอสเฟตที่เป็นประโยชน์สำหรับพืช (คิดในรูป P_2O_5) ไม่น้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ จึงจะเหมาะสำหรับการใช้เป็นปุ๋ยหินฟอสเฟต (ธงชัย, 2546: 123-142)

การใช้หินฟอสเฟตเป็นปุ๋ยพบว่ามิใช่ได้แก่ สามารถใช้เป็นปุ๋ยได้โดยตรง มีราคาถูกประหยัด ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นแหล่งธาตุอาหารอื่นที่จำเป็นสำหรับพืช ส่วน

ข้อเสียบางประการของปุ๋ยหินฟอสเฟตที่อาจจะไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้กับระบบพืชและดินบางชนิด เนื่องจากปุ๋ยหินฟอสเฟตเป็นปุ๋ยประเภทละลายช้า จึงอาจไม่เหมาะจะนำไปใช้กับพืชที่มีระยะการเพาะปลูกสั้น อีกทั้งไม่ค่อยละลายในดินที่มีสภาพเป็นกลาง หรือต่างทำให้ประสิทธิภาพของปุ๋ยลดลง นอกจากนี้ปุ๋ยหินฟอสเฟตยังมีองค์ประกอบของธาตุอาหารพืชที่แตกต่างกันตามแหล่งที่มา ทำให้คุณภาพและความเป็นประโยชน์ของฟอสเฟตที่มีต่อพืชไม่แน่นอน (อาภารัตน์, 2549) ดังนั้นการนำหินฟอสเฟตมาใช้เป็นปุ๋ยโดยตรง จึงควรคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพและความเป็นประโยชน์ของฟอสเฟตที่มีต่อพืช ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายประการ ได้แก่ ปริมาณฟอสเฟตที่เป็นประโยชน์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากหินฟอสเฟต ความแปรปรวนจากขนาดของหินฟอสเฟต เกรดของปุ๋ยหินฟอสเฟต คุณสมบัติของดินทั้งทางกายภาพและเคมีของดินแต่ละระบบ สภาพอากาศ ชนิดของพืช การจัดการภายในระบบการเกษตร และวิธีการใส่ปุ๋ย เป็นต้น (Zapata and Roy, 2004)

จากแนวทางการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของธาตุฟอสฟอรัส และการแก้ปัญหาความไม่เป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินที่เกิดขึ้น โดยการเลือกใช้ปุ๋ยฟอสเฟตรูปละลายง่าย ซึ่งมีประสิทธิภาพดี แต่ราคาแพง และ/หรือการเลือกใช้ปุ๋ยหินฟอสเฟตที่มีราคาถูก ใช้ได้ง่าย แต่ไม่มีความแน่นอนในเรื่องประสิทธิภาพของปุ๋ย ดังนั้นเพื่อให้เกิดความคุ้มค่าและประโยชน์สูงสุด จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาแนวทางอื่นที่จะสามารถเพิ่มความไม่เป็นประโยชน์ของธาตุฟอสฟอรัสในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งจากแร่ฟอสฟอรัสที่มีอยู่แล้วในดิน หรือจากปุ๋ยฟอสเฟต แนวทางหนึ่งที่ได้ได้รับความสนใจ และมีการศึกษาวิจัยอย่างมากคือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการช่วยปรับปรุงและเพิ่มธาตุฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน หรือที่เรียกว่า จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Microorganisms) จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมีหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซิส จุลินทรีย์เหล่านี้พบได้ทั่วไปในดิน เช่น *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Subba Rao, 1993)

การศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพในการปลดปล่อยธาตุฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์สำหรับพืชโดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมีอยู่อย่างกว้างขวาง ทั้งการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ศึกษาบทบาทและกลไกการละลายฟอสเฟตของเชื้อ การปรับปรุงสายพันธุ์ศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ และ/หรือการนำเชื้อไปใช้กับพืชโดยตรง ทั้งการใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตผสมร่วมกับเชื้อชนิดอื่น เพื่อการเพิ่มธาตุอาหารพืชหลากหลายชนิด การใช้เชื้อละลายฟอสเฟตร่วมกับหินฟอสเฟต และ/หรือปุ๋ยอินทรีย์ประเภท

ต่าง ๆ เป็นต้น (Arcand and Schneider, 2006; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Kucey *et al.*, 1989; Rodríguez and Fraga, 1999)

Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSMs)

PSMs เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราที่มีความสามารถในการละลายแร่ธาตุฟอสฟอรัสในรูปสารประกอบอนินทรีย์ที่ถูกตรึงในดิน ให้ละลายออกมาอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (อาการ์ตัน, 2549) ซึ่งจะช่วยให้ส่งเสริมการเจริญของพืช และเพิ่มธาตุฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเป็นที่รู้จักและนำมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่ช่วงทศวรรษที่ 1950's ในประเทศรัสเซียและประเทศแถบยุโรปตะวันออก โดยนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *B. megaterium* var *phosphaticum* มาใช้เพื่อเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุฟอสฟอรัสในดิน และใช้ชื่อทางการค้าว่า phosphobacterrin (Kudzin and Yaroshevich, 1962; Kvaratskheliya, 1962; Menkina, 1963) ผลจากการใช้เชื้อนี้พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตพืชได้ 10% (Mishustin and Naumova, 1962) Subba Rao(1993) ได้รวบรวมรายงานและสรุปการใช้ประโยชน์จาก phosphobacterin รวมถึงแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *B. polymyxa*, *B. pulvifaciens* และ *P. striata* ในประเทศอินเดีย พบว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่กล่าวมาสามารถเพิ่มผลผลิตพืชหลายชนิด

PSMs แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (มุกดา, 2547) ดังนี้

1. กลุ่มจุลินทรีย์ที่ช่วยดูดซับธาตุฟอสฟอรัสให้กับพืช ได้แก่ เชื้อราไมคอร์ไรซา เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ส่วนของเส้นใยเชื้อราจะชอนไชเข้าไปในดิน ช่วยดูดธาตุอาหาร โดยเฉพาะธาตุฟอสฟอรัส ทำให้พืชที่มีเชื้อนี้อยู่ได้รับธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณที่เพียงพอ นอกจากนี้ไมคอร์ไรซายังช่วยป้องกันไม่ให้ฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาถูกตรึงโดยปฏิกิริยาทางเคมีของดิน แต่เชื้อราไมคอร์ไรซามีข้อจำกัดที่ต้องอยู่กับพืชอาศัยที่มีความจำเพาะเจาะจง จึงยังไม่สามารถเลี้ยงและเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ การผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อจำเป็นต้องเพาะเชื้อในพืชอาศัยและวัสดุปลูกที่เหมาะสมเท่านั้น

2. จุลินทรีย์ย่อยสลายหินฟอสเฟต เป็นแบคทีเรียที่สามารถทำให้หินฟอสเฟตละลายเป็นประโยชน์ต่อพืช (Phosphate Solubilizing Bacteria; PSB) มีอยู่หลายชนิด กิจกรรมของจุลินทรีย์พวกนี้จะช่วยย่อยสลายหินฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์แก่พืชเช่น *Bacillus*,

Pseudomonas, *Thiobacillus* จุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างกรดออกมาละลายฟอสฟอรัส ปริมาณที่ละลายออกมาจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งจะเห็นว่า *Bacillus* sp. จัดเป็นกลุ่มที่น่าจะมีศักยภาพสูงกว่าแบคทีเรียอื่น ในแง่การนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากคุณสมบัติการสร้าง endospore ซึ่งทำให้มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมสูงกว่าเซลล์ปกติ

จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีปริมาณและการกระจายแตกต่างกัน ซึ่งธงชัย และคณะ (2533) ได้ศึกษาปริมาณและการกระจายของจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตในดินต่าง ๆ พบว่าในชุดดินร้อยเอ็ด บางเลน กำแพงแสน และเสนา พบปริมาณแบคทีเรียและเชื้อราที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ปริมาณแตกต่างกัน โดยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในชุดดิน ร้อยเอ็ด บางเลน กำแพงแสน และเสนา คิดเป็น 15.25, 13.36, 6.16 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณเชื้อราที่พบในชุดดินต่าง ๆ คิดเป็น 51.49, 5.34, 29.73 และ 33.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาตัวอย่างชุดดินร้อยเอ็ดในดินนาและดินดอนที่ระดับความลึกแตกต่างกันสองระดับ พบว่าในดินชั้นบนสามารถพบปริมาณแบคทีเรียและเชื้อราที่ละลายฟอสเฟตได้มากกว่าในดินระดับลึกลงไป และในดินนาจะพบปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมากกว่าในดินดอน ขณะที่ในดินดอนมีแนวโน้มพบเชื้อราละลายฟอสเฟตมากกว่าในดินนา ซึ่งอิทธิพลของชนิดดินและการเขตกรรมที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดิน (ธงชัย, 2546: 123-142)

จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในธรรมชาติพบว่ามีรายงานการแยกเชื้อจากดิน และบริเวณรอบรากพืช ดังแสดงในตารางที่ 2 และแสดงให้เห็นว่ามีทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซิส แบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้มีหลากหลายชนิด ส่วนเชื้อราที่พบส่วนใหญ่เป็นพวก *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยเชื้อที่แยกได้จาก rhizosphere มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตสูงกว่าเชื้อที่แยกจาก non-rhizosphere โดยแบคทีเรีย *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นกลุ่มเชื้อที่มีศักยภาพสูงในการละลายฟอสเฟต (Tilak et al., 2005) แต่เชื้อราจะมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้ดีกว่าแบคทีเรีย (Arcand and Schneider, 2006)

การแยกและคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟต

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

จากรายงานการแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง พบรายงานการสูญเสียคุณสมบัติการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งของแบคทีเรีย Sperber (1958a) รายงานว่าแบคทีเรียที่แยกจาก rhizosphere ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ที่แยกจากดิน สูญเสียความสามารถในการละลายฟอสเฟตในรูป อะพาไทต์ ภายหลังทำการทดสอบบนอาหารแข็งในครั้งต่อไป และหลังจากถ่ายเชื้อผ่านไปจำนวน 6 ครั้ง คงเหลือแบคทีเรียที่แสดงการละลายฟอสเฟตได้อีกเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ Kucey (1983) พบว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่แยกจากดินมีแนวโน้มในการสูญเสียคุณสมบัติการละลายฟอสเฟตเช่นกัน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในเชื้อรา

วิธีการแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่กล่าวมาค่อนข้างใช้เวลาในการบ่มเลี้ยงเชื้อนาน ต่อมาจึงได้มีผู้ที่พยายามปรับปรุงสูตรอาหาร เพื่อการแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ดังตัวอย่าง

Gupta *et al.* (1994) ปรับปรุงสูตรอาหาร Pikovskaya agar medium เพื่อความรวดเร็วในการตรวจหาจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้บนอาหารแข็ง โดยเติม bromophenol blue เป็นดัชนีบ่งชี้การเกิดกรด (indicator) มีช่วง pH 3.0-4.6 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสังเกตการสร้างบริเวณใสสีเหลืองรอบโคโลนีของเชื้อ เนื่องจากการละลายฟอสเฟตและการเปลี่ยนสีของ indicator เกิดจากการลดลงของค่า pH เมื่อเชื้อสร้างกรด และสรุปว่าวิธีนี้ให้ผลดีกว่าการสังเกตบริเวณใสในอาหาร Pikovskaya medium แบบเดิม

ตารางที่ 2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่าง ๆ ในธรรมชาติ และชนิดของเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟต

อ้างอิง	แหล่งคัดแยก	จุลินทรีย์
Sperber (1958a)	บริเวณรอบรากพืช และดิน	<i>Arthrobacter</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Sarcina</i> และ <i>Serratia</i>
Gaur <i>et al.</i> (1973)	หินฟอสเฟต และดิน	<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus carbonum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. wentii</i>
Banik and Dey (1982)	ดิน	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>B. firmus</i> (B7650 และ B7651), <i>Micrococcus</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. candidus</i> , <i>A. fumigatus</i> และ <i>Penicillium</i> sp.
Illmer and Schinner (1992)	ดิน	<i>Pseudomonas</i> sp. และ <i>Penicillium</i> sp.
De Freitas <i>et al.</i> (1997)	บริเวณรอบราก	<i>B. brevis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. thuringiensis</i> และ <i>Xanthomonas maltophilia</i>
Kim <i>et al.</i> (1997)	บริเวณรอบราก	<i>Rahnella aquatilis</i>
Pal (1998)	ดิน	<i>Bacillus</i> sp.

ตารางที่ 2 (ต่อ)

อ้างอิง	แหล่งคัดแยก	จุลินทรีย์
Vazquez <i>et al.</i> (2000)	บริเวณรอบราก	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Chryseomonas</i> <i>luteola</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. taylorae</i> , <i>Kluyvera</i> <i>cryocrescens</i> , <i>Paenibacillus</i> <i>macerans</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Vibrio proteolyticus</i> , <i>Xanthomonas</i> <i>agilis</i> และ <i>Aspergillus</i> sp.
Hwangbo <i>et al.</i> (2003)	บริเวณรอบราก	<i>Enterobacter intermedium</i>
Chen <i>et al.</i> (2006)	ดิน	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>A. ureafaciens</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Chryseobacterium</i> sp., <i>Delftia</i> sp., <i>Gordonia</i> sp., <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Serratia</i> <i>marcescens</i>

Nautiyal (1999) ได้ปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (NBRIP) เพื่อการแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในดิน จากการศึกษาพบว่าอาหารเหลวสูตรปรับปรุงนี้มีประสิทธิภาพในการแยกจุลินทรีย์สูงกว่าการแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตด้วยอาหารเหลว Pikovskaya's medium ถึง 3 เท่า แต่จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยกจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตรด้วยวิธี plate assay พบว่าให้ผลการแยกเชื้อไม่แตกต่างกัน และต่อมา Mehta and Nautiyal (2001) ได้ปรับปรุงสูตรอาหาร NBRIP โดยเติม bromophenol blue เพื่อความรวดเร็วในการแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

Rodríguez and Fraga (1999) กล่าวถึงข้อเสียของการหาปริมาณฟอสเฟตใน culture filtrate ที่ใช้ฟอสเฟตรูปละลายยากเป็นแหล่งฟอสเฟตว่า วิธีการนี้ไม่ได้คำนึงถึงปริมาณฟอสเฟตที่เซลล์นำไปใช้ประโยชน์ระหว่างการเจริญ และความแตกต่างของฟอสเฟตระหว่างอัตราการปลดปล่อยกับการนำเข้าสู่เซลล์ อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการละลายของฟอสเฟตและปริมาณฟอสเฟตที่ตรวจวิเคราะห์ได้ เนื่องจากช่วงที่เซลล์มีอัตราการนำฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ ปริมาณฟอสเฟตในอาหารจะลดลง และเมื่ออัตราการนำฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ลดลง เช่น ระยะเวลาที่เซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase ระดับของฟอสเฟตในอาหารจะเพิ่มขึ้น

กลไกการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์

การละลายฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์มีกลไกหลักที่สำคัญคือ การสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ (organic acid) ออกนอกเซลล์ และการลดลงของค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ของสภาพแวดล้อม กรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์สร้างและปลดปล่อยออกมามีหลายชนิด เช่น acetic, gluconic, 2-ketogluconic, lactic, malonic, oxalic และ succinic acid (Rodríguez and Fraga, 1999) จากตารางที่ 3 แสดงชนิดของกรดอินทรีย์ใน culture filtrate ที่เกี่ยวข้องกับการละลายฟอสเฟตจากแบคทีเรียหลายชนิด สังเกตว่ากรดอินทรีย์ที่เชื้อแต่ละชนิดสร้างและปลดปล่อยออกมามีความคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันบ้างที่จำนวนชนิดของกรดที่สามารถวิเคราะห์ได้ นอกจากนี้เชื้อชนิดเดียวกันอาจผลิตกรดที่เหมือนหรือต่างชนิดกัน ซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับอาหาร สภาพการเลี้ยงเชื้อ และวิธีการวิเคราะห์ ผลจากตารางที่ 3 ชี้ให้เห็นว่าชนิดของกรดอินทรีย์ที่พบว่าแบคทีเรียสร้างและปลดปล่อยออกมามากที่สุดสามอันดับแรกคือ succinic, citric และ lactic acid

ตารางที่ 3 ชนิดของกรดอินทรีย์ที่พบใน culture filtrate ภายหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว

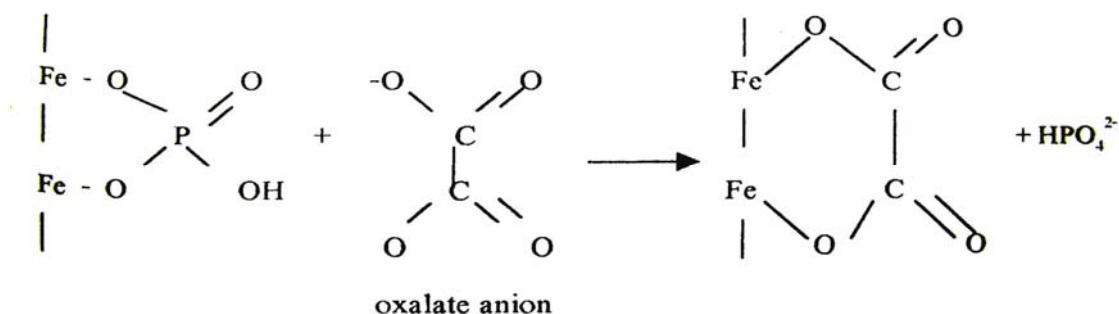
แบคทีเรีย	ชนิดกรดอินทรีย์	แหล่งฟอสเฟต	อ้างอิง
<i>Arthrobacter</i> sp.	citric, lactic, malonic และ oxalic	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Banik and Dey (1982), Chen <i>et al.</i> (2006)
<i>A. ureafaciens</i>	citric และ lactic	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Chen <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus</i> sp.	citric,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

ตารางที่ 3 (ต่อ)

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

กลไกการปลดปล่อยฟอสเฟตที่ถูกดูดซับหรือตกตะกอนอยู่กับธาตุโลหะประจุบวกของกรดอินทรีย์ เกิดจากการแข่งขันกันระหว่างไอออนประจุลบของกรดอินทรีย์กับฟอสเฟต ในการทำปฏิกิริยากับไอออนโลหะประจุบวก เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} และ Al^{3+} โดยไอออนประจุลบของกรดอินทรีย์สามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีเสถียรภาพมากกว่า และทำให้ฟอสเฟตที่จับยึดอยู่กับโลหะประจุบวกถูกปลดปล่อยออกมาและอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์สำหรับพืช (Wityakorn, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 1 นอกจากบทบาทในการเพิ่มธาตุอาหารพืชของกรดอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุอาหารพืชที่เคลื่อนที่ได้ยากอย่าง เช่น ฟอสฟอรัส พบว่ากรดอินทรีย์มีบทบาทในการลดความเป็นพิษของธาตุโลหะหนักบางชนิดให้กับพืชในดิน เช่น อะลูมิเนียม และสังกะสี (Jones, 1998; Ryan *et al.*, 2001)

นอกจากการสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ พบรายงานการละลายฟอสเฟตจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดซัลฟูริกของเชื้อ *Thiobacillus* ซึ่งส่งผลต่อสภาพความเป็นกรดด่างของดิน ทำให้ดินมีสภาพเป็นกรด และเหมาะสมต่อการละลายของธาตุฟอสฟอรัส (Kucey *et al.*, 1989; Otero *et al.*, 1995; Stamford *et al.*, 2003)



ภาพที่ 1 ปฏิกริยาการปลดปล่อยฟอสเฟตที่จับยึดอยู่กับเหล็ก ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์
หลังจากที่ไอออนประจุลบของกรดอินทรีย์ Oxalic ทำปฏิกิริยากับเหล็ก เกิดเป็น
สารประกอบเชิงซ้อนที่มีเสถียรภาพกว่า

ที่มา: ปัทมา (2547: 119-177)

แม้ว่าการสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นกลไกหลักที่สำคัญ และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าเกี่ยวข้องกับการละลายฟอสเฟต Roos and Luckner (1984) และ Illmer and Schinner (1992) ได้เสนอว่ากลไก proton exchange mechanism เป็นอีกหนึ่งกลไกที่สามารถปลดปล่อยฟอสเฟตไอออนจากแหล่งฟอสเฟตอินทรีย์ได้ แต่กระนั้นการละลายของฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์ก็มีความซับซ้อนที่อาจจะมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องอีก เช่น สรีรวิทยาของเชื้อ การเจริญสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ และอาหาร (Cunningham and Kuiack, 1992) อีกทั้งมีรายงานการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ซึ่งไม่สัมพันธ์กับการลดลงของค่าความเป็นกรด่างของสิ่งแวดล้อมด้วย เช่น จาการายงานการวิจัยของ Asea *et al.* (1988); Banik and Dey (1982); Gaur *et al.* (1973); Kucey *et al.* (1989); Mehta and Bhide (1970) และ Sperber (1958a)

ประโยชน์จากการศึกษาจุลินทรีย์ที่พบในธรรมชาติ และมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต สามารถนำเชื้อเหล่านี้มาพัฒนา ปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และ/หรือนำไปประยุกต์ใช้ด้านการเกษตรในรูปของปุ๋ยชีวภาพ สำหรับเพิ่มธาตุฟอสฟอรัสให้แก่พืชและดิน ด้วยคุณสมบัติที่โดดเด่นในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของหินฟอสเฟตคุณภาพต่ำ ให้สามารถละลายและปลดปล่อยฟอสฟอรัสรูปที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะช่วยปรับปรุงคุณภาพของธาตุฟอสฟอรัสในดิน เพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช ที่สำคัญช่วยประหยัดต้นทุนการผลิตเนื่องจากปุ๋ยชีวภาพ มีราคาถูก หาได้ง่าย อีกทั้งสามารถนำไปผลิตใช้ได้เลย จึงเป็นหนึ่งทางเลือกที่ดีในการลดการใช้ปุ๋ยเคมี ที่มีราคาแพง

การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในการเกษตร

จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้งแบคทีเรีย และรา ได้รับความสนใจศึกษาพัฒนาจากหลายประเทศ ตั้งแต่การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับเพิ่มธาตุฟอสฟอรัสในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพัฒนาให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ประโยชน์ ในรูปของผงเชื้อ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการพัฒนา และมีขายในทางการค้า เช่น ฟอสโฟแบคทีริน จากประเทศรัสเซีย ไออาร์ไมโครฟอส จากประเทศอินเดีย และไบโอฟอสก้า จากประเทศไทย (อาภารัตน์, 2549)

จุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพเหล่านี้อาจใช้ในลักษณะหัวเชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว หรือหลายชนิดผสมกัน เพื่อความเป็นประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น การผสมเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจน (*Rhizobium*, *Azotobacter*) ร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) และเชื้อรา (*Aspergillus*, *Penicillium* และ mycorrhiza) เชื้อต่างๆ ที่นำมาผลิตขายตามท้องตลาดต่างได้รับการโฆษณาว่ามีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มผลผลิตและธาตุอาหารพืช แต่การนำผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไปใช้จริงโดยเกษตรกรอาจพบว่าประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตได้มากตามคำโฆษณา เนื่องจากปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น จุลินทรีย์เหล่านี้ไม่มีประสิทธิภาพสูงจริงดังคำโฆษณา กลไกการทำงานของเชื้อยังไม่ได้ได้รับการศึกษาอย่างแท้จริง เชื้อไม่สามารถเจริญแข่งขันกับเชื้อที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติได้ การนำจุลินทรีย์ไปใช้กับพืชที่ไม่เหมาะสมเพราะเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดต้องการพืชอาศัยที่มีความจำเพาะเจาะจง และอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อลดลง หรือไม่ สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชในด้านใดด้านหนึ่ง

Bacillus sp. ที่ละลายฟอสเฟตได้

จากรายงานการศึกษาเชื้อ *Bacillus* ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ ซึ่งนอกจากเชื้อ *B. megaterium* var. *phosphaticum* พบรายงานเชื้อ *Bacillus* อีกหลายชนิด ได้แก่ *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmis*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. mycoides*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. pulvificiens* และ *B. subtilis* (Tilak et al., 2005) ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตทั้งในรูปของสารประกอบฟอสเฟตอนินทรีย์ หรือหินฟอสเฟต เชื้อเหล่านี้สามารถแยกได้จากธรรมชาติ ทั้งจากดิน บริเวณรอบรากพืชหลายชนิด และหินฟอสเฟต เป็นต้น

Toro *et al.* (1997) ได้ศึกษาการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุฟอสฟอรัสจากหินฟอสเฟต เพื่อปรับปรุงคุณภาพธาตุฟอสฟอรัสในดิน จากการใช้เชื้อราอับสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *Glomus intraradices* ร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *B. subtilis* และ *Enterobacter* sp. โดยทำการทดลองกับหัวหอม (*Allium cepa* L.) พบว่าเชื้อราไมคอร์ไรซาที่ใช้ร่วมกับ *B. subtilis* ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช และเพิ่มการละลายของหินฟอสเฟต อีกทั้งพบว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟตทำหน้าที่เป็น mycorrhiza helper bacteria ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชของ *G. intraradices* ซึ่งจะช่วยให้การดูดซับธาตุฟอสฟอรัสให้แก่พืช

El-Komy (2005) ได้ศึกษาการเพิ่มธาตุไนโตรเจน และฟอสฟอรัสในข้าวสาลีของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Azospirillum lipoferum* ร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *B. megaterium* โดยวิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรียทั้งสองไว้บนวัสดุรองรับ พบว่าข้าวสาลีที่ได้รับเชื้อทั้งสองชนิด มีน้ำหนักแห้ง และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มขึ้น อีกทั้งธาตุฟอสฟอรัสที่พบในพืชเพิ่มขึ้น 37 และ 53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสาลีที่ได้รับเชื้อ *A. lipoferum* เพียงชนิดเดียว และข้าวสาลีที่ไม่ได้รับเชื้อทั้งสองชนิดตามลำดับ รวมถึงเสนอแนะว่าการใช้แบคทีเรียทั้งสองชนิดร่วมกัน ส่งเสริมการดูดซับธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของพืชได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียช่วยปรับปรุงสมดุลธาตุอาหารให้แก่พืช

Çakmakçi *et al.* (2006) ได้จัดจำแนกชนิด PGPB ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากพืช พบว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติสามารถตรึงไนโตรเจน และ/หรือละลายฟอสเฟตได้ หลังจากนำเชื้อแต่ละชนิดมาศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิด sugar beet พบว่า sugar beet ที่ได้รับเชื้อแสดงการเจริญเติบโตดี มีปริมาณใบ ราก และปริมาณน้ำตาลสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ และสรุปว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ประกอบด้วย *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Pseudomonas putida* RC06 และ *Rhodobacter capsulatus* RC04 แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *B. megaterium* RC07 มีศักยภาพที่ดีเพียงพอสำหรับการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ อย่างไรก็ตามปัจจัยจากชนิดของเชื้อ ปริมาณสารอินทรีย์ในดิน ระยะการเจริญของพืช ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว และปัจจัยการเจริญอื่น ๆ ล้วนมีผลต่อการตอบสนองการเจริญเติบโตของพืชด้วยเช่นกัน

จากตัวอย่างงานวิจัยแสดงถึงศักยภาพการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุฟอสฟอรัสของเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อการส่งเสริมการเจริญของพืช ทั้งจากการใช้เชื้อกับพืชโดยตรงเพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับเชื้อชนิดอื่นทั้งแบคทีเรีย และรา เพื่อเพิ่มความเป็นประโยชน์ และความหลากหลาย

ของธาตุอาหารพืชอื่นในดิน รวมถึงช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซับธาตุฟอสฟอรัสบริเวณรากพืช นอกจากนี้การนำเชื้อมาผสมรวมกับการใช้ปุ๋ยหินฟอสเฟต และ/หรือปุ๋ยอินทรีย์ชนิดอื่นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการละลายของปุ๋ยฟอสเฟตให้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่ามีรายงานถึง *Bacillus* ที่แสดงการละลายฟอสเฟตในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชผ่านกลไกการละลายฟอสเฟต หากแต่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชผ่านทางกลไกอื่น อย่างเช่น การสร้างฮอร์โมนพืช auxin (De Freitas *et al.*, 1997)

ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ตั้งแต่การคัดเลือกเชื้อในธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพสูง ศึกษากลไกการทำงานของเชื้อให้เป็นที่เข้าใจชัดเจน สามารถปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น ตลอดจนการปรับปรุงและพัฒนาวิธีการนำไปใช้ได้ง่าย ได้ประโยชน์ และประสบความสำเร็จสูงสุด จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 เชื้อ *Bacillus* sp. จากแหล่งเก็บเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (DMKU)

1.2 เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน และหินฟอสเฟตแหล่งต่างๆ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี(ภาคผนวก ก)

2.1 Nutrient agar (NA)

2.2 Nutrient broth (NB)

2.3 Pikovskaya's medium [PVK] (Subba Rao, 1993)

2.4 National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium [NBRIP] (Nautiyal, 1999)

2.5 reagent A และ B สำหรับวิเคราะห์ soluble phosphate (ภาคผนวก ข) (ทัศนีย์ และ จงรักษ์, 2542: 37-40)

2.6 distilled water

3. อุปกรณ์

3.1 หลอดทดลองขนาด 16X150 มิลลิเมตร

3.2 ฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.3 กระบอกตวงแก้วขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.4 ขวดปริมาตรขนาด 25, 100 และ 200 มิลลิลิตร

3.5 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.6 ปีเปตแก้วขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.7 ปีเปตอัตโนมัติขนาด 200 และ 1,000

- 3.8 เข็มเจียเชื้อ
- 3.9 ไม้จิ้มฟัน
- 3.10 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
- 3.11 ตู้เจียเชื้อ (laminar flow)
- 3.12 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 3.13 เครื่องเขย่า (shaker)
- 3.14 เครื่องชั่งสาร
- 3.15 เครื่องชั่งสองแขน (balance)
- 3.16 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- 3.17 เครื่องวัด pH (pH meter)
- 3.18 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 3.19 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 3.20 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- 3.21 Hot plate
- 3.22 สไลด์
- 3.23 กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน และหินฟอสเฟต

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและหินฟอสเฟตแหล่งต่าง ๆ ซึ่งตัวอย่าง 1 กรัม เติมนลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นใช้เข็มเจียเชื้อเจียตัวอย่างสารแขวนลอยดิน หรือหินฟอสเฟต จีดลงบนอาหาร NA แบบ cross streak จำนวน 10 ซ้ำ นำหลอดสารตัวอย่างแขวนลอยดิน หรือหินฟอสเฟตส่วนที่เหลือไปอุ่นในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วใช้เข็มเจียเชื้อเจียสารตัวอย่างเจียลงบนอาหาร NA แบบ cross streak จำนวน 10 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้เข็มเจียเชื้อเจียแบคทีเรียที่เจริญเป็น colony เดียวมา cross streak บน NA จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อที่แยกได้บน NA slant ที่อุณหภูมิห้อง

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งที่เค็มวัน

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่รวบรวมจากข้อ 1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แบบ cross streak บ่มเชื่อนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขียนแบคทีเรียที่เจริญบน ผิวหน้าอาหาร NA แท่งเชื้อลงบนอาหารแข็งสำหรับทดสอบการละลายฟอสเฟตสูตร PVK และ NBRIP (3 ซ้ำ) โดยวิธี point inoculation แบบ heavy inoculum บ่มเชื่อนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบและบันทึกการเกิดบริเวณใสของการละลายฟอสเฟตจากเชื้อแต่ละไอโซเลต โดยบันทึก เป็นผลบวกหรือลบ

3. การเก็บรักษาแบคทีเรีย

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ แบบการเก็บรักษาเชื้อระยะยาวในสารละลาย glycerol 10% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาเชื้อระยะสั้นเพื่อใช้เป็นเชื้อต้นตอ สำหรับใช้งานบน NA slant ที่อุณหภูมิห้อง

4. การศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 2 มาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการละลาย ฟอสเฟตในอาหารเหลว (ไม่เค็มวัน) สูตร PVK และ NBRIP ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย

4.1.1 ใช้เข็มเขียนเชื้อเขียนเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยวิธี cross streak บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง

4.1.2 ใช้เข็มเขียนเชื้อเขียนโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแต่ละชนิดจากข้อ 4.1.1 ถ่ายเชื้อลง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว NB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบประมาณ 150 rpm เพื่อให้อากาศ นาน 4-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (มีปริมาณเชื้อ โดยประมาณ 10^7 - 10^8 cfu / ml)

4.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทดสอบการละลายฟอสเฟต

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว NB (ข้อ 4.1.2) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสูตร PVK หรือ NBRIP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้อากาศ นาน 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (3 ชั่วโมง) โดยชุดควบคุมจะไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย

4.3 การวิเคราะห์การละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ทำการเก็บตัวอย่างที่เจริญในอาหารเหลวสูตร PVK และ NBRIP (ข้อ 4.2) เมื่อครบกำหนด โดยดูดตัวอย่างเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวแต่ละสูตรปริมาตร 20 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอดปั่นตกตะกอน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10-15 นาที แยกเอาส่วนใส และกรองส่วนใสผ่านกระดาษกรอง whatman No.1 เพื่อแยกเอาตะกอน $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ที่อาจตกค้างและอาจรบกวนการวิเคราะห์ผลปริมาณฟอสเฟตรูปละลายได้ (การปั่นและการกรองอาจทำหลายครั้งจนได้ของเหลวใส) นำส่วนใสที่ผ่านการกรอง (culture filtrate) แล้ว ส่วนหนึ่งไปวัดค่า pH และบันทึกค่า pH ที่วัดได้ อีกส่วนหนึ่งนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ water soluble phosphate ใน culture filtrate โดยดูดตัวอย่างที่ทราบปริมาตรแน่นอนประมาณ 1-10 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์หา available phosphorus ในภาคผนวก ข (ทักษิณีย์ และ จงรักษ์, 2542: 37-40)

5. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ ค่า pH และการละลายฟอสเฟต

5.1 การเตรียมกล้ำเชื้อแบคทีเรีย

ทำตามข้อ 4.1 แต่ถ่ายโคโลนีเดี่ยวลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว NB ปริมาตร 70 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบประมาณ 150 rpm เพื่อให้มีอากาศ นาน 6-7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

5.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทดสอบการละลายฟอสเฟต

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว NB (ข้อ 5.1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสูตร PVK หรือ NBRIP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

นำไปเขย่าให้อากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 ชั่วโมง และวันที่ 2, 4 และ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ

5.3 การเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์การละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว

เก็บตัวอย่างที่เจริญในอาหารเหลวแต่ละสูตรในข้อ 5.2 ตามเวลาที่กำหนด ทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

5.3.1 การตรวจนับปริมาณเซลล์ (viable count) ด้วยวิธี serial dilution plate count บนอาหาร NA โดยดูดตัวอย่างเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวแต่ละสูตรปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และทำการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับในสารละลายเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงดูดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนผิวอาหาร NA เกลี่ย (spread) ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร (3 ซ้ำ) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 16-24 ชั่วโมง จึงตรวจนับและบันทึกผลจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.3.2 การตรวจนับปริมาณสปอร์ด้วยวิธี spore count บนอาหาร NA โดยดูดตัวอย่างเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวแต่ละสูตรปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลอดเปลา์ปลอดเชื้อ ทั้งนี้จะทำการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับในสารละลายเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ตามระยะเวลาที่เหมาะสม นำหลอดตัวอย่างไปอุ่นในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และเขย่าแรงทันที จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนผิวอาหาร NA เกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร (3 ซ้ำ) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน ประมาณ 16-24 ชั่วโมง จึงตรวจนับและบันทึกผลจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.3.3 การวัดค่า pH และการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำตามขั้นตอน 4.3

นำผลข้อ 5.3.1, 5.3.2 และ 5.3.3 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่า pH และการละลายฟอสเฟต

6. การจำแนกชนิด *Bacillus* sp. ที่สามารถละลายฟอสเฟต

การจัดจำแนกชนิดเชื้อด้วยวิธี conventional method ศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบริสุทธิ์ โดยการตรวจลักษณะการเจริญ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วย ขนาด รูปร่าง การติดสีแกรมบวกหรือแกรม variable การมี endospore การมีเกรนูล และการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase การเจริญในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนในอาหาร anaerobic growth agar ความสามารถในการเจริญบนอาหาร citrate หรือ propionate การสร้างเอนไซม์ lecithinase บนอาหาร egg yolk agar การสร้าง extracellular เอนไซม์ไปย่อยสลายแป้ง starch, casein และ gelatin การรีดิวซ์ไนเตรท การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต เช่น D-glucose, L-arabinose, D-xylose และ D-mannitol เป็นต้น ตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.2 (Sneath, 1986)

7. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ระยะเวลาการวิจัย

ตุลาคม 2547 ถึง กุมภาพันธ์ 2550

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรีย

รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ (ตารางที่ 4) เพื่อนำมาศึกษาความสามารถในการละลายสารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์ในรูป $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ประกอบด้วย แบคทีเรีย *Bacillus megaterium*¹ ATCC14581, *Bacillus megaterium* DSM3228 และแบคทีเรียจากแหล่งเก็บเชื้อ DMKU ดังนี้ เชื้อที่ได้รับการจำแนกชนิดว่าเป็น *B. megaterium* จำนวน 10 สายพันธุ์ เชื้อ *Bacillus* sp. ที่สร้างเอนไซม์เพคตินเนสจำนวน 5 สายพันธุ์ และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1 ซึ่งเชื่อดังกล่าวได้เคยทดสอบความสามารถการละลายฟอสเฟตในอาหารแข็ง และอาหารเหลวสูตร PVK นอกจากนี้ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่มีรายงานว่ามีปริมาณฟอสฟอรัสสูงจำนวน 4 ตัวอย่าง และจากตัวอย่างหินฟอสเฟตที่มีจำหน่ายทางการค้ารวมจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างสารแขวนลอยดินและหินฟอสเฟตมาแยกเชื้อ โดยซิดเชื้อลงบนอาหาร NA

ตารางที่ 4 จำนวนและแหล่งที่มาของแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทดสอบการละลายฟอสเฟต

แบคทีเรีย	จำนวนเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ N11	1	DMKU
<i>B. megaterium</i> ¹ ATCC14581	1	ATCC
<i>B. megaterium</i> var phosphaticum DSM3228	1	DSM
<i>B. megaterium</i>	10	DMKU
<i>Bacillus</i> ที่สร้างเอนไซม์ pectinase	5	DMKU
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1	1	DMKU
แบคทีเรียที่แยกจากดิน (4 ตัวอย่าง)	208	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
แบคทีเรียที่แยกจากหินฟอสเฟต (5 ตัวอย่าง)	136	ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
รวม	363	

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 24 ชั่วโมง และนำตัวอย่างสารแขวนลอยดินและหินฟอสเฟตอีก ส่วนหนึ่งไปผ่านกระบวนการ heat shock โดยอุ่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ก่อนนำมาฉีดเชื้อลงบนอาหาร NA เพื่อแยก เชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสปอร์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เก็บโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบน ผิวน้ำอาหาร NA ได้ทั้งสิ้นจำนวน 344 ไอโซเลต ทำให้เชื่อบริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปทดสอบการ ละลายฟอสเฟตในอาหารแข็งต่างสูตรต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารแข็งต่างสูตร

จากการทดสอบความสามารถในการละลายสารประกอบฟอสเฟตอนินทรีย์รูปตะกอน แคลเซียมไตรฟอสเฟต ($(Ca_3(PO_4)_2)$) บนอาหารแข็งสูตร PVK และ NBRIP ของแบคทีเรียจากแหล่ง ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 7 วัน บนอาหารแข็งทั้งสองสูตร ผลการ ทดสอบได้แสดงไว้ในตารางที่ 5 พบว่าเชื้อจำนวน 22 ไอโซเลตให้ผลบวกการละลายฟอสเฟตบน อาหารแข็ง PVK และ 21 ไอโซเลตให้ผลบวกการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง NBRIP ซึ่ง แบคทีเรียอาจแสดงบริเวณใสของการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งสูตรใดสูตรหนึ่ง หรือทั้งสอง สูตร โดยจำนวนแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตได้ทั้งในอาหารแข็ง PVK และ NBRIP มีจำนวน 12 ไอโซเลต ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างดิน และหินฟอสเฟต (ตารางที่ 6) ที่ไม่ผ่านการ heat shock ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการ heat shock ไม่พบเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟต

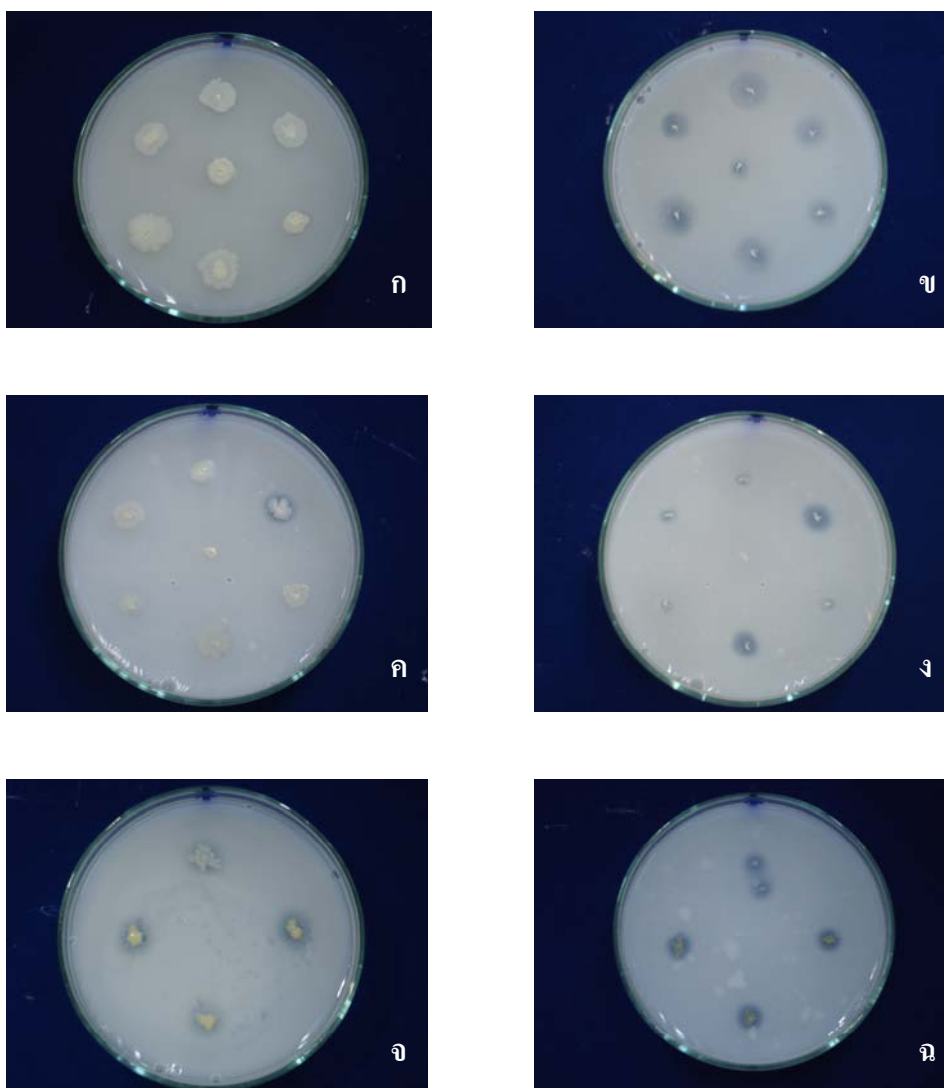
จากการทดลองนี้พบว่าแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ แสดงลักษณะบริเวณใส ของการละลายฟอสเฟตในอาหารแข็งทั้งสองสูตร ภายใต้อิโคโลนี มีขนาดเล็ก และไม่ชัดเจนดัง ตัวอย่างในภาพที่ 2 แสดงว่าเชื้อสามารถละลายฟอสเฟตได้เพียงบางส่วนเท่านั้น ยกเว้น *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11 ที่แสดงการละลายฟอสเฟตในอาหารแข็งทั้งสองสูตรได้อย่าง ชัดเจน (รูปที่ จ และ ฉ) และเชื้อ *B. megaterium* var *phosphaticum* DSM3228 ซึ่งเป็นเชื้อที่คาดว่า น่าจะละลายฟอสเฟตได้นั้นไม่แสดงผลการละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตร และ พบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PVK มักมีขนาดโคโลนีที่กว้างกว่าเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง NBRIP แสดงว่าเชื้อเจริญบนอาหารแข็ง PVK ได้ดีกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารแข็ง NBRIP อาจเป็น เพราะในอาหารแข็งสูตร PVK มี yeast extract เป็นส่วนประกอบที่เป็น growth factor ช่วยส่งเสริม การเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียที่ให้ผลบวกการละลายฟอสเฟตในอาหารแข็งสูตร PVK และ NBRIP

แบคทีเรีย	จำนวนเชื้อ	อาหาร	
		PVK	NBRIP
<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ N11	1	1	1
<i>B. megaterium</i> ¹ ATCC14581	1	0	0
<i>B. megaterium</i> var <i>phosphaticum</i> DSM3228	1	0	0
<i>B. megaterium</i> (DMKU)	10	4	1
<i>Bacillus</i> sp. ที่สร้างเอนไซม์ pectinase	5	0	0
<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1	1	0	0
แบคทีเรียที่แยกจากดิน (4 ตัวอย่าง)	208	9	6
แบคทีเรียที่แยกจากหินฟอสเฟต (5 ตัวอย่าง)	136	8	13
รวม	363	22	21

ตารางที่ 6 แหล่งที่มาของแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้บนอาหารแข็งทั้งสองสูตร (PVK และ NBRIP)

แหล่งที่มา	รหัสเชื้อ
ดิน	A228, C216, C46 และ C411
หินฟอสเฟต	BKRP5, BKRP10, Korp16, Korp17, Korp23, Korp24, T1RP13 และ T2RP13



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีและบริเวณไฮการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย ที่แยกจากดินและหิน ฟอสเฟต ซึ่งนำมาศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง สูตร PVK (ก และ ข) และ NBRIP (ค และ ง) สำหรับภาพ จ และ ฉ แสดงลักษณะ โคโลนีและบริเวณไฮการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PVK และ NBRIP ตามลำดับ

Nautiyal (1999) ได้ปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP ขึ้นเพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ได้สรุปผลการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร NBRIP และ PVK ว่าไม่แตกต่างกัน และเสนอแนะว่าการแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง โดยการสังเกตการสร้างบริเวณใสของการละลายฟอสเฟตในเบื่องต้นอาจยังไม่เพียงพอ เพราะเชื้อที่ไม่แสดงการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง อาจละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวที่มีตะกอนฟอสเฟตอินทรีย์ได้ เนื่องจากอัตราการแพร่ของกรดแต่ละชนิดที่เชื่อปลดปล่อยสู่อาหารแข็งสองสูตรดังกล่าวอาจไม่เท่ากัน การหาปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ในอาหารเหลวจึงเป็นวิธีการที่มีความถูกต้องมากกว่า ดังนั้นจากผลการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งของเชื้อที่ไม่มีความชัดเจน และละลายได้เพียงบางส่วนนั้น จึงอาจเป็นเพราะการแพร่ของกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณของกรดที่เชื่อปลดปล่อยออกมา

การแยกแบคทีเรียบนอาหารแข็งนี้พบว่าบริเวณใสของการละลายฟอสเฟตของเชื้อลดลงเมื่อนำมาทดสอบซ้ำอีก สังเกตได้จากความชัดเจนของบริเวณใสที่ลดลงจากที่เคยทดสอบในครั้งแรก ๆ ซึ่ง Sperber (1958a) และ Kucey (1983) ได้เคยรายงานว่าความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งที่ลดลงของแบคทีเรียหลังมีการถ่ายเชื้อหลายครั้ง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในเชื้อรา

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟต

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งสูตร PVK และ NBRIP จำนวน 12 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากดิน และหินฟอสเฟต นำเชื่อดังกล่าวมาจำแนกชนิดซึ่งผลได้แสดงในตารางที่ 7 ในการศึกษาและตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เชลล์รูปร่างท่อน มีขนาดและการจัดเรียงตัวแบบเชลล์เดี่ยวหรือสองเชลล์เรียงตัวแบบ palisade หรือต่อกันเป็นสายสั้นหรือสายยาว พบการสร้างแกนทุกสายพันธุ์ และภายหลังย้อมสีสปอร์ พบการสร้างเอนโดสปอร์ภายในเชลล์ทุกสายพันธุ์

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของแบคทีเรีย พบว่าทุกสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญภายใต้สภาวะขาดออกซิเจน ในอาหาร anaerobic agar โดยเจริญเติบโตอยู่บริเวณผิวหน้าอาหารเท่านั้น จึงจัดแบคทีเรียกลุ่มนี้ทั้งหมดเป็นพวกต้องการอากาศ (aerobic bacteria) ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase (catalase test) พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ชนิด

นี้ได้ ประกอบกับสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เป็นรูปท่อน และมีการสร้างสปอร์ จึงจัดแบคทีเรียกลุ่มนี้ให้อยู่ในยีนัส *Bacillus* ตามเกณฑ์ของ Sneath (1986) ที่กำหนดรายละเอียดของยีนัส *Bacillus* ไว้ว่ามีคุณสมบัติดิสแกรมบวก หรือแกรม variable เซลล์มีรูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์ มีความต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญในปริมาณที่แตกต่างกันคือ อาจเป็น aerobe หรือ facultative anaerobe และสามารถสร้างเอนไซม์ catalase

จากผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา ดังกล่าว สรุปว่าแบคทีเรียที่คัดแยกจากดิน และหินฟอสเฟตจำนวน 12 สายพันธุ์นี้จัดอยู่ในยีนัส *Bacillus* กลุ่ม IA (Gordon, 1989) เนื่องจากมีเซลล์ขนาดใหญ่ สร้างเกรนูล เอนโดสปอร์มีรูปร่างรีหรือทรงกระบอก และไม่ทำให้เซลล์โป่งออก สปอร์มีตำแหน่งอยู่บริเวณกลางเซลล์ จำแนกได้ชัดเจนว่าทุกสายพันธุ์เป็น *B. megaterium* เนื่องจากทุกสายพันธุ์ไม่เจริญภายใต้สภาพขาดออกซิเจน ไม่สร้างเอนไซม์ lecithinase จากการทดสอบการย่อย lecithin ในอาหาร egg-yolk agar และให้ผลลบกับการทดสอบ VP ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ *B. cereus* ที่จัดอยู่ในยีนัส *Bacillus* กลุ่ม IA เช่นเดียวกัน แต่มีคุณสมบัติเป็น facultative anaerobe ให้ผล VP เป็นบวก และสร้างเอนไซม์ lecithinase

จากผลการศึกษาได้จัดแบ่ง *B. megaterium* ทั้ง 12 สายพันธุ์ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่คือ กลุ่ม A และกลุ่ม B ตามเกณฑ์การสร้าง หรือไม่สร้างกรดจากน้ำตาล D-xylose และจัดแบ่งแต่ละกลุ่มออกเป็นสองกลุ่มย่อยดังนี้ กลุ่ม A1, A2, B1 และ B2 โดยอาศัยเกณฑ์การสร้าง หรือไม่สร้างเอนไซม์ urease (ตารางที่ 7) ซึ่ง Sneath (1986) ได้รายงานไว้ว่า *B. megaterium* 11-89 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลบวกในการสร้างเอนไซม์ urease ในแต่ละกลุ่มย่อยอาจมีคุณสมบัติแตกต่างกันบางประการ เช่น การทนเกลือ โดยแบคทีเรียจากทุกกลุ่มส่วนใหญ่สามารถทนเกลือได้ที่ระดับ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสายพันธุ์ C46 และ C411 จากกลุ่ม A1 และ B2 สามารถทนเกลือได้ที่ระดับ 5-7 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ A228 จากกลุ่ม A2 สามารถทนเกลือได้ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่างของการผลการทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาล การสร้างเอนไซม์ urease และการทนเกลือ ชี้ให้เห็นความหลากหลายทางชีวภาพของ *B. megaterium* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของโสภากย์ (2545) ที่ได้จำแนกชนิด *Bacillus* sp. ที่แยกจากธรรมชาติจำนวน 60 สายพันธุ์ โดยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเชื้อส่วนใหญ่จำแนกเป็น *B. megaterium* และมีความหลากหลายทางชีวภาพ เนื่องจากผลการทดสอบทางชีวเคมีที่เหมือนและแตกต่างกัน เช่น ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรท์ สร้างเอนไซม์ urease การทนเกลือที่ระดับต่างกัน และการสร้างกรดจากน้ำตาลบางชนิด

ตารางที่ 7 สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาบางประการของแบคทีเรียที่แยก
จากดิน และหินฟอสเฟต ที่แสดงความสามารถละลายฟอสเฟต

คุณสมบัติที่ศึกษา	กลุ่ม A		กลุ่ม B		<i>B. megaterium</i> ^γ
	A1 ^α	A2 ^β	B1 ^ζ	B2 ^ε	
การติดสีข้อมแบบแกรม	+	+	+	+	+
อายุ 24 ชั่วโมง					
รูปร่างของเซลล์	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน
ขนาดของเซลล์ (μm)					
กว้าง	>1	>1	>1	>1	>1
ยาว	3 - 4	3 - 4	2.5 - 4	3 - 4	2 - 5
เอนโดสปอร์	+	+	+	+	+
รูปร่าง	ellipsoidal หรือ cylindrical	ellipsoidal	ellipsoidal	ellipsoidal หรือ cylindrical	ellipsoidal หรือ cylindrical
ตำแหน่ง	central	central	central	central	central
การสร้างกรดจากน้ำตาล					
ชนิดต่าง ๆ					
D-glucose	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	d
D-xylose	+	+	-	-	d
D-mannitol	+	+	+	+	+
การเจริญได้ในอาหาร					
anaerobic agar	-	-	-	-	-
การมีแกรนูลภายในเซลล์	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์ catalase	+	+	+	+	+
การทนเกลือ					
5%	+	+	+	+	ND
7%	+	+	+	+	d
10%	+	+	+	+	ND

ตารางที่ 7 (ต่อ)

คุณสมบัติที่ศึกษา	กลุ่ม A		กลุ่ม B		<i>B. megaterium</i> ^γ
	A1 ^α	A2 ^β	B1 ^χ	B2 ^ε	
การทดสอบ VP	-	-	-	-	-
ค่า pH ในอาหาร VP ที่ 7 วัน	5.04 - 5.41	5.00 - 5.29	5.10	5.06 - 5.32	4.5 - 6.8
การรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรท์	-	-	-	-	d
การย่อยสลาย					
Starch	+	+	+	+	+
Casein	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+
Aesculin	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์					
Lecithenase	-	-	-	-	-
Urease	+	-	+	-	d
Phenylalanine deaminase	+	+	+	+	d
การเจริญบนอาหาร					
Citrate	+	+	+	+	+
Propionate	-	-	-	-	ND

หมายเหตุ α : กลุ่ม A1 ประกอบด้วยแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ BKRP10, C46, Korp17 และ T1RP13

β : กลุ่ม A2 ประกอบด้วยแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ A228, C216 และ T2RP13

χ : กลุ่ม B1 ประกอบด้วยแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ BKRP5

ε : กลุ่ม B2 ประกอบด้วยแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ C411, Korp16, Korp23 และ Korp24

γ : อ้างอิงตาม Sneath (1986); Priest *et al.* (1988) และ Gordon (1989)

d : 11–89% ของสายพันธุ์ที่ให้ผลเป็นบวก ND : ไม่พบข้อมูล

4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว PVK และ NBRIP ของแบคทีเรียที่คัดเลือก

จากการคัดเลือกแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ที่แสดงการละลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้งสูตร PVK และ NBRIP และได้จำแนกชนิดแล้วพบว่าคือ *B. megaterium* เมื่อนำมาศึกษาการละลายตะกอน $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ในอาหารเหลว PVK และ NBRIP และหาปริมาณของฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตร โดยศึกษาพร้อมกับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1 และ *B. megaterium* จำนวน 3 สายพันธุ์คือ 78100(1)/1, Ba15-2 และ Oriba1 จากแหล่งเก็บเชื้อ DMKU ซึ่งเชื้อทั้งสี่ได้เคยผ่านการทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งและอาหารเหลว PVK โดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1 ใช้เป็นเชื้อควบคุมที่ไม่สามารถละลายฟอสเฟต *B. megaterium* 3 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ปริมาณสูงในอาหารเหลว PVK จากเชื้อ *B. megaterium* ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ที่เคยนำมาทดสอบ โดยมีเชื้อ *B. megaterium* var *phosphaticum* DSM3228 เป็นเชื้ออ้างอิงที่คาดว่าจะละลายฟอสเฟตได้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 เป็นเชื้ออ้างอิงที่ไม่แสดงการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1 เป็นเชื้อควบคุมที่ไม่แสดงการละลายฟอสเฟตทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว และเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11 เป็นเชื้อควบคุมที่สามารถละลายฟอสเฟตได้

จากตารางที่ 8 และ 9 แสดงปริมาณฟอสเฟตรูปละลายได้ใน culture filtrate ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PVK และ NBRIP ภายหลังเลี้ยงเชื้อนาน 7 วัน พบการปลดปล่อยฟอสเฟตจากตะกอน $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ในอาหารเหลว PVK และ NBRIP โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11 สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวทั้งสองสูตรได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 450.6 และ 595.9 mg P L^{-1} ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *B. megaterium* จากแหล่งเก็บเชื้อต่าง ๆ มีค่าอยู่ระหว่าง 7.8-143.0 mg P L^{-1} และ 134.3-350.3 mg P L^{-1} ตามลำดับ *B. megaterium* ที่แยกจากดิน และหิน ฟอสเฟตมีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 71.4-216.4 mg P L^{-1} และ 95.5-453.8 mg P L^{-1} ตามลำดับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1 พบปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้เพียงเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ PVK (6.4 mg P L^{-1}) แต่ไม่พบการละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP ในขณะที่ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ซึ่งไม่แสดงการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งทั้งสองสูตร พบว่าสามารถละลายฟอสเฟตในรูปตะกอน $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ในอาหารเหลวทั้งสองสูตรได้ มีค่าเท่ากับ 82.0 mg P L^{-1} และ 138.1 mg P L^{-1} ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการแยกเชื้อละลายฟอสเฟตในเบื่องต้นบนอาหารแข็งที่มีตะกอนของสารประกอบฟอสเฟตอนินทรีย์ไม่สามารถ

ตารางที่ 8 ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายอยู่ใน culture filtrate ของอาหารเหลว PVK ภายหลังจากเลี้ยง เชื้อนาน 7 วัน

แหล่งที่มา	แบคทีเรีย	ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายใน	
		culture filtrate (mg P L ⁻¹) *	pH**
DMKU	<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ N11	450.6 (±34.6) ^a	4.21
ATCC	<i>B. megaterium</i> ¹ ATCC14581	7.8 (±3.1) ^g	5.92
DSM	<i>B. megaterium</i> DSM3228	89.8 (±7.0) ^{ef}	5.00
DMKU	<i>B. megaterium</i> 78100(1)/1	143.0 (±11.6) ^c	4.70
	Ba15-2	84.6 (±3.7) ^{ef}	5.00
	Oribal	137.4 (±7.7) ^d	4.75
ดิน	<i>B. megaterium</i> A228	179.2 (±15.0) ^c	4.49
	C216	99.6 (±2.8) ^e	4.73
	C46	97.1 (±14.5) ^e	5.12
	C411	216.4 (±15.1) ^b	4.63
หินฟอสเฟต	<i>B. megaterium</i> BKRP5	71.4 (±6.5) ^f	5.37
	BKRP10	82.3 (±6.7) ^{ef}	4.91
	KORP16	137.8 (±18.7) ^d	4.90
	KORP17	84.2 (±5.0) ^{ef}	4.80
	KORP23	93.5 (±8.6) ^{ef}	5.61
	KORP24	131.3 (±6.7) ^d	4.69
	T1RP13	135.2 (±8.7) ^d	4.66
	T2RP13	103.3 (±13.5) ^c	4.74
DMKU	<i>Bacillus</i> sp. N10	82.0 (±8.3) ^{ef}	4.89
	1234(3)/1	6.4 (±3.0) ^g	6.56

หมายเหตุ ตัวอักษร ^{a, b} ที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

* ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ของเชื้อ ซึ่งลบออกจากปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 114.7 mg P L⁻¹

** ค่า pH ของอาหารเหลวชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.29

ตารางที่ 9 ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายอยู่ใน culture filtrate ของอาหารเหลว NBRIP ภายหลังการเลี้ยงเชื้อมานาน 7 วัน

แหล่งที่มา	แบคทีเรีย	ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายใน culture filtrate (mg P L ⁻¹) *	pH**
DMKU	<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ N11	595.9 (±16.2) ^a	3.85
ATCC	<i>B. megaterium</i> ^t ATCC14581	134.3 (±10.5) ^{gh}	4.71
DSM	<i>B. megaterium</i> DSM3228	136.1 (±22.8) ^{gh}	4.88
DMKU	<i>B. megaterium</i> 78100(1)/1	350.3 (±15.3) ^d	4.22
	Ba15-2	145.2 (±5.47) ^g	4.80
	Oriba1	156.1 (±14.1) ^g	4.33
ดิน	<i>B. megaterium</i> A228	278.3 (±14.9) ^c	4.20
	C216	201.3 (±14.7) ^f	4.22
	C46	95.5 (±9.0) ⁱ	5.01
	C411	453.8 (±24.0) ^b	4.21
หินฟอสเฟต	<i>B. megaterium</i> BKRP5	125.0 (±4.60) ^{ghi}	4.62
	BKRP10	109.7 (±12.2) ^{hi}	4.82
	KORP16	358.3 (±25.3) ^d	4.58
	KORP17	127.6 (±9.0) ^{gh}	4.74
	KORP23	135.0 (±17.2) ^{gh}	4.75
	KORP24	293.7 (±5.6) ^c	4.31
	T1RP13	404.6 (±25.0) ^c	4.30
	T2RP13	338.8 (±26.7) ^d	4.45
DMKU	<i>Bacillus</i> sp. N10	138.1 (±20.2) ^{gh}	5.00
	1234(3)/1	-7.2 (±5.5) ^j	6.68

หมายเหตุ ตัวอักษร ^{a, b} ที่ต่างกันในแนวดิ่ง หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

* ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ของเชื้อ ซึ่งลบออกจากปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 81.2 mg P L⁻¹

** ค่า pH ของอาหารเหลวชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.41

บ่งชี้การละลายฟอสเฟตที่แท้จริงของจุลินทรีย์ ดังที่ Nautiyal (1999) ได้รายงานไว้ และได้รายงานปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเหลวสูตร PVK และ NBRIP ภายหลังเลี้ยงแบคทีเรียนาน 14 วัน ดังนี้ *Pseudomonas* sp. มีค่าอยู่ระหว่าง $8-35 \mu\text{g P ml}^{-1}$ และ $26-90 \mu\text{g P ml}^{-1}$ ตามลำดับ และ *Bacillus* sp. มีค่าอยู่ระหว่าง $8-17 \mu\text{g P ml}^{-1}$ และ $21-60 \mu\text{g P ml}^{-1}$ ตามลำดับ El-Komy (2005) รายงานว่า *P. fluorescens* และ *B. megaterium* สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูตร PVK หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน มีค่าเท่ากับ $126.6 \mu\text{g P ml}^{-1}$ และ $106.5 \mu\text{g P ml}^{-1}$ ตามลำดับ และ Chen *et al.* (2006) ได้รายงานว่า *B. megaterium* สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูตร NBRIP มีค่าอยู่ระหว่าง $72.2-270.2 \text{ mg P L}^{-1}$ หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 3 วัน

หากเปรียบเทียบข้อมูลการละลายฟอสเฟตของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในการทดลองนี้ กับการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. ที่นักวิจัยอื่นได้เคยรายงานไว้ จะเห็นว่าปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้จากแบคทีเรียแต่ละชนิด หรือต่างสายพันธุ์ มีค่าแตกต่างกันและหลากหลาย แสดงให้เห็นว่าการละลายฟอสเฟตจากแหล่งฟอสเฟตที่ละลายได้ยากในอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรานั้น มีความแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย อาจรวมถึงระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

นอกจากนี้ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองนี้ผู้วิจัยสังเกตพบว่า อาหารเหลวทั้งสองสูตรมีค่า pH ลดลงภายหลังการนิ่งมาเชื้อ แม้ว่าจะทำการปรับค่า pH ประมาณ 7.0 ก่อนการนิ่งมาเชื้อก็ตาม โดยค่า pH หลังการนิ่งมาเชื้อค่า pH จะลดลงถึง 5.4 ในอาหารเหลว PVK และ 5.7 สำหรับอาหารเหลว NBRIP ดังนั้นจึงใช้วิธีปรับค่า pH ของอาหารหลังการนิ่งมาเชื้อตลอดการทดลอง ซึ่งที่มาของสูตรอาหารทั้งสองต่างปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการนิ่งมาเชื้อ แต่รายงานของ Chen *et al.* (2006) ซึ่งศึกษาการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในอาหารเหลว NBRIP ได้รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ มีค่า pH เท่าเดิมประมาณ 6.8-7.0 ภายหลังการทดลองเป็นเวลาสามวัน ซึ่งไม่ได้กล่าวถึงการปรับค่า pH ก่อนหรือหลังการนิ่งมาเชื้อ และ Gupta *et al.* (1994) ซึ่งศึกษาการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียและเชื้อราในอาหารเหลว PVK ได้หมายเหตุไว้ว่าค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 5.6 แม้ว่าจะได้ปรับค่า pH ของอาหารก่อนการนิ่งมาเชื้อให้มีค่าประมาณ 6.7 ก็ตาม ดังนั้นค่า pH ของอาหารสูตรเดียวกันหลังการนิ่งมาเชื้อที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง หรือเปลี่ยนแปลงไปก็ตามนั้น ยังไม่ทราบสาเหตุที่ชัดเจน แต่ในกรณีที่ค่า pH ของอาหารลดลงหลังการนิ่งมาเชื้อ อาจเกิดจากส่วนประกอบในสูตรอาหารมีโอกาสทำปฏิกิริยากัน หลังได้รับความร้อน จึงมีผลให้ค่า pH ของอาหารลดลง นอกจากนี้ถ้าค่า

pH เริ่มต้นของอาหารหลังการนึ่งฆ่าเชื้อลดลง และไม่ได้มีการปรับให้มีค่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ จึงอาจมีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อ และการละลายฟอสเฟต เป็นต้น

สำหรับอาหารเหลวควบคุมทั้ง PVK และ NBRIP ที่ไม่เติมเชื้อ พบว่าใน culture filtrate มีฟอสเฟตรูปละลายได้ปลดปล่อยออกมาบางส่วน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 114.7 และ 81.2 mg P L⁻¹ ตามลำดับ ซึ่ง Reyes *et al.* (1999) ได้รายงานว่าในอาหารเหลวที่ไม่เติมเชื้อและนำไปเขย่า พบการละลายฟอสเฟตบางส่วนจากแหล่ง FePO₄ และ AlPO₄ ที่เติมลงในอาหาร แต่ไม่พบการละลายจากการใช้ hydroxyapatite (HA) เป็นแหล่งฟอสเฟต นอกจากนี้ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเหลวควบคุมสูตร PVK มีปริมาณสูงกว่าในอาหารเหลวควบคุมสูตร NBRIP เล็กน้อย Hoberg *et al.* (2005) กล่าวถึงการหลีกเลี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีส่วนประกอบของสารอาหารที่ไม่สามารถจำแนกองค์ประกอบได้ เช่น yeast extract และ peptone เพื่อศึกษาการปลดปล่อยฟอสเฟตของเชื้อ *Gordonia* sp. และ *Pseudomonas fluorescens* เพราะสารอาหารเหล่านี้มีสารจำพวกกรดอินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย จึงอาจมีผลกระทบต่อการปลดปล่อยฟอสเฟต ดังนั้น yeast extract ในอาหารเหลวควบคุมสูตร PVK อาจมีผลต่อปริมาณฟอสเฟตที่ละลายอยู่ใน culture filtrate

Nautiyal (1999) ได้รายงานว่าปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้โดยแบคทีเรียชนิดเดียวกันในอาหารเหลวสูตร NBRIP มีปริมาณสูงกว่าปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเหลวสูตร PVK ประมาณ 3 เท่า และกล่าวว่า yeast extract มีผลกระทบต่อการปลดปล่อยฟอสเฟต ซึ่งผลจากตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับรายงานของ Nautiyal (1999) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการเปรียบเทียบปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ในอาหารเหลว PVK และ NBRIP เช่น *B. megaterium* สายพันธุ์ 78100(1)/1, *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C216, C411, KORP16, KORP24, T1RP13 และ T2RP13 T2RP13 ยกเว้น *B. megaterium* ATCC14581 มีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเหลว NBRIP สูงกว่าในอาหารเหลว PVK ถึง 17 เท่า ซึ่งการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูตร PVK ของเชื้อ *B. megaterium* ATCC14581 เกิดขึ้นน้อยมาก และผลใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1 และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเหลวสูตร PVK และ NBRIP ของแบคทีเรียชนิดและสายพันธุ์เดียวกัน

แบคทีเรีย	ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายใน		Independent Sample Test	
	culture filtrate (mg P L ⁻¹)			
	PVK	NBRIP	t	Sig (2-tailed)
<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ N11	450.6	595.9	-6.585	0.003*
<i>B. megaterium</i> ^t ATCC 14581	7.8	134.3	-19.966	0.000*
<i>B. megaterium</i> DSM 3228	89.8	136.1	-3.354	0.028*
<i>B. megaterium</i> 78100(1)/1	143.0	350.3	-18.680	0.000*
Ba15-2	84.6	145.2	-15.922	0.000*
Oribal	137.4	156.1	-2.023	0.113 ^{ns}
A228	179.2	278.3	-8.133	0.001*
C216	99.6	201.3	-11.802	0.000*
C46	97.1	95.5	0.063	0.953 ^{ns}
C411	216.4	453.8	-14.497	0.000*
BKRP5	71.4	125.0	-11.609	0.000*
BKRP10	82.3	109.7	-3.409	0.027*
KORP16	137.8	358.3	-12.139	0.000*
KORP17	84.2	127.6	-7.256	0.002*
KORP23	93.5	135.0	-3.737	0.020*
KORP24	131.3	293.7	-31.802	0.000*
T1RP13	135.2	404.6	-17.607	0.000*
T2RP13	103.3	338.8	-13.618	0.000*
<i>Bacillus</i> sp. N10	82.0	138.1	-4.444	0.011*
1234(3)/1	6.4	-7.2	3.750	0.020*

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p < 0.05)

^{ns} หมายถึง ค่าที่แตกต่างกันไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p > 0.05)

แต่อย่างไรก็ตามจากผลที่แสดงในตารางที่ 10 ซึ่งให้เห็นว่าไมโซแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่สามารถละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBRIP ได้สูงกว่าเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PVK เช่น *B. megaterium* สายพันธุ์ Oriba1 และ C46 ซึ่งการละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรทั้งสองสูตรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

กลไกหลักในการละลายสารฟอสเฟตอนินทรีย์ของจุลินทรีย์ ที่มีผู้อธิบายไว้ว่าเป็นการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกนอกเซลล์ และค่า pH ที่ลดลงของสิ่งแวดล้อม จากตารางที่ 8 และ 9 ผลการทดลองสนับสนุนกลไกนี้ เนื่องจากค่า pH ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1 ที่เป็นเชื้อควบคุมที่ไม่สามารถละลายฟอสเฟต ไม่แสดงค่า pH ลดลงในอาหารเหลวสูตร PVK และ NBRIP (6.56 และ 6.68 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลวชุดควบคุมทั้งสองสูตรที่ไม่เติมเชื้อ (6.29 และ 6.41 ตามลำดับ) ในขณะที่แบคทีเรียอื่นที่นำมาศึกษาแสดงค่า pH ลดลงมีค่าอยู่ระหว่าง 4.21–5.92 และ 3.85–5.01 ตามลำดับ และพบปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ในอาหารเหลวทั้งสองสูตร (ตารางที่ 8 และ 9) ซึ่งการไม่ละลายฟอสเฟตของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1234(3)/1 อาจเนื่องจากเชื้อไม่สร้างและปลดปล่อยกรดออกนอกเซลล์ จึงไม่แสดงการละลายฟอสเฟต หรืออาจกล่าวได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตรอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อสายพันธุ์นี้ ดังนั้นจากการทดลองจึงแสดงว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ มีอิทธิพลต่อการละลายฟอสเฟตในรูปสารประกอบ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ จากการปลดปล่อยกรดออกนอกเซลล์ และเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมให้มีสภาพเป็นกรด นอกจากนี้มีรายงานชนิดกรดอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการละลายฟอสเฟตของ *Bacillus* sp. ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PVK และ NBRIP ดังนี้

Gupta *et al.* (1994) รายงานชนิดกรดอินทรีย์จากการศึกษาการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย และเชื้อรา พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PVK สร้าง citric และ oxalic acid

Chen *et al.* (2006) พบว่า *B. megaterium* สร้าง citric, lactic และ propionic acid ในอาหารเหลว NBRIP

Kpomblekou-A and Tabatabai (1994) ได้ศึกษาอิทธิพลของกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ต่อการปลดปล่อยฟอสเฟตรูปที่เป็นประโยชน์จากหินฟอสเฟต และสรุปว่าชนิดของหมู่ฟังก์ชัน โครงสร้างและปริมาณของกรดอินทรีย์ มีส่วนสำคัญยิ่งต่อการละลายฟอสเฟตได้ปริมาณมากหรือน้อย โดยหมู่ฟังก์ชันประเภท คาร์บอกซิลิก (-COOH) และไฮดรอกซิล (-OH) เป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีอิทธิพลต่อการละลายฟอสเฟตสูง และกรดอินทรีย์ที่มีจำนวนหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลหลายหมู่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีกว่ากรดอินทรีย์ที่มีจำนวนหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลน้อย

นอกจากโครงสร้างของกรดอินทรีย์เป็นปัจจัยกำหนดความมากน้อยของการปลดปล่อยฟอสเฟตแล้ว ค่า pH ของระบบมีส่วนสำคัญเช่นกัน (ปัทมา, 2547: 119-177) เพราะค่า pH ของระบบที่แตกต่างกันมีความสัมพันธ์กับค่าการแตกตัว (pKa) ของกรดอินทรีย์ (Hoberg et al., 2005) เนื่องจากกรดอินทรีย์แต่ละชนิดมีตำแหน่งและจำนวนหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกัน จึงมีค่า pKa ต่างกันและมีได้หลายค่า เช่น citric acid มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก 3 หมู่ และมีค่า pKa 3 ค่า ดังนี้ 3.13, 4.76 และ 6.40 ขณะที่ lactic acid มีหมู่คาร์บอกซิลิก 1 หมู่ และมีค่า pKa เพียงค่าเดียวคือ 3.86 (Mendham et al., 2000: 769) ดังนั้นกรดอินทรีย์ที่สามารถให้อิออนประจุลบได้มากย่อมมีโอกาสเพิ่มการปลดปล่อยฟอสเฟตที่จับยึดกับโลหะประจุบวก เช่น Ca^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} ได้มากขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบค่า pH และปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่เลี้ยงในอาหารเหลวต่างสูตร พบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NBRIP ส่วนใหญ่แสดงการละลายฟอสเฟตสูงกว่าเชื้อชนิดเดียวกันที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PVK ซึ่งสูงกว่า 2-3 เท่าในบางสายพันธุ์ เช่น *B. megaterium* สายพันธุ์ C411, KORP16, KORP24, T1RP13 และ T2RP13 และค่า pH ในอาหารเหลวสูตร NBRIP ส่วนใหญ่มีค่าลดลงต่ำกว่าค่า pH ในอาหารเหลวสูตร PVK แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสร้างกรดได้ดีในอาหารเหลวสูตร NBRIP

จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 ในอาหารเหลวทั้งสองสูตร สังเกตว่าเชื้อมีการสร้างเมือก ซึ่งเป็นลักษณะโดยธรรมชาติของเชื้อชนิดนี้ Banik and Dey (1982) ได้รายงานว่าแบคทีเรียที่สร้างเมือกให้ผลการละลายฟอสเฟตที่น้อยกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างเมือก ดังนั้นเมือกอาจมีผลกระทบต่อการปลดปล่อยฟอสเฟต เนื่องจากเมือกเป็นสารประกอบจำพวก polysaccharide ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบสำคัญ ดังนั้นเชื้อจึงอาจใช้แหล่งคาร์บอนส่วนหนึ่งในอาหารสำหรับการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ เป็นผลให้ปริมาณคาร์บอนที่เข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมอื่นมีปริมาณลดลง (Chenu, 1995) ซึ่งหนึ่งในนั้นอาจเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอินทรีย์ของเซลล์ อีกทั้ง

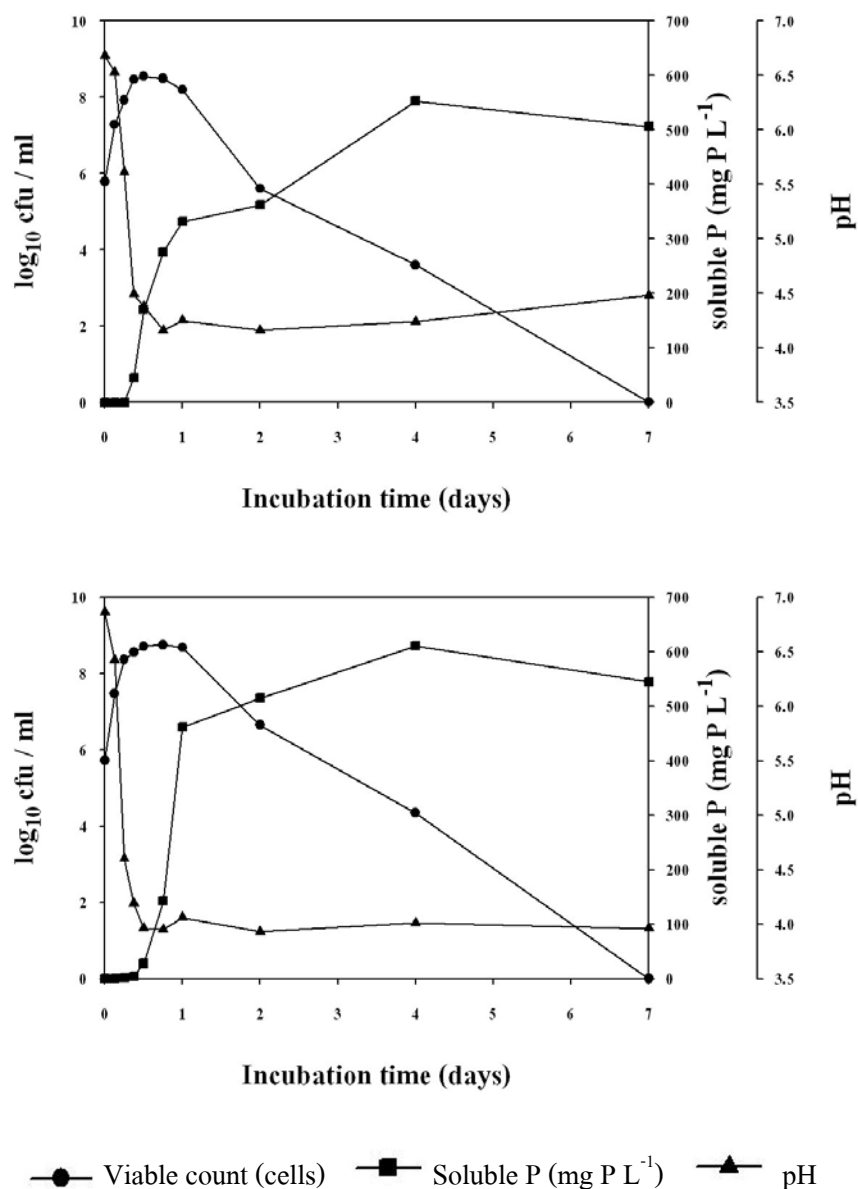
ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ ที่เชื้อสร้างและปลดปล่อยออกนอกเซลล์ย่อมมีผลต่อการละลายฟอสเฟตได้ปริมาณมากหรือน้อย อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 8 และ 9 ได้แสดงว่าการละลายฟอสเฟตของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10 กับเชื้อบางสายพันธุ์ ซึ่งไม่สร้างเมือกในอาหารเหลว ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เช่น BKRP5, KORP13 และ KORP23 แสดงว่าเชื้อที่สามารถสร้างเมือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจไม่จำเป็นต้องละลายฟอสเฟตได้น้อยกว่าเชื้อที่ไม่สร้างเมือก แต่อาจเป็นแนวโน้มที่เชื่อว่าจุลินทรีย์ที่สร้างเมือกจะมีโอกาสละลายฟอสเฟตได้น้อยกว่าเชื้อชนิดอื่น

จากข้อมูลที่กล่าวมาแสดงว่าชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ ลักษณะทางสรีรวิทยา การเจริญของเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ มีอิทธิพลต่อการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ (Cunningham and Kuiack, 1992)

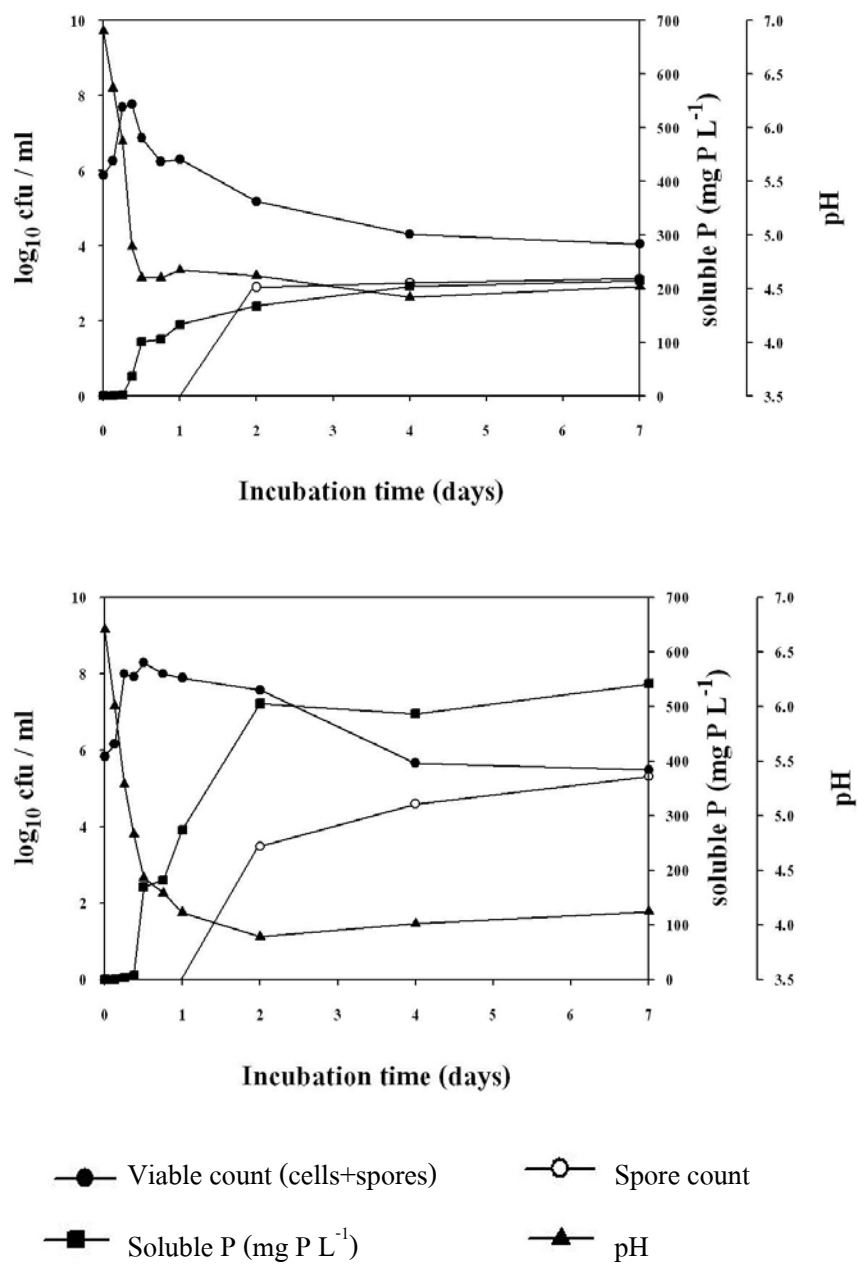
5. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย ค่า pH และการละลายฟอสเฟต ในอาหารเหลว PVK และ NBRIP

เนื่องจากข้อมูลที่มีผู้กล่าวว่าการเจริญของเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีผลกระทบต่อการละลายฟอสเฟต และจากการทดลองนี้ได้ใช้อาหารเหลวต่างสูตรสำหรับการศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย ดังนั้นเพื่อศึกษาว่าการเจริญของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารต่างสูตรมีผลต่อการละลายฟอสเฟตหรือไม่ จึงได้คัดเลือกแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11, *B. megaterium* สายพันธุ์ C411 และ *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แสดงการละลายฟอสเฟตได้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออื่น นำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ ค่า pH และการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว PVK และ NBRIP

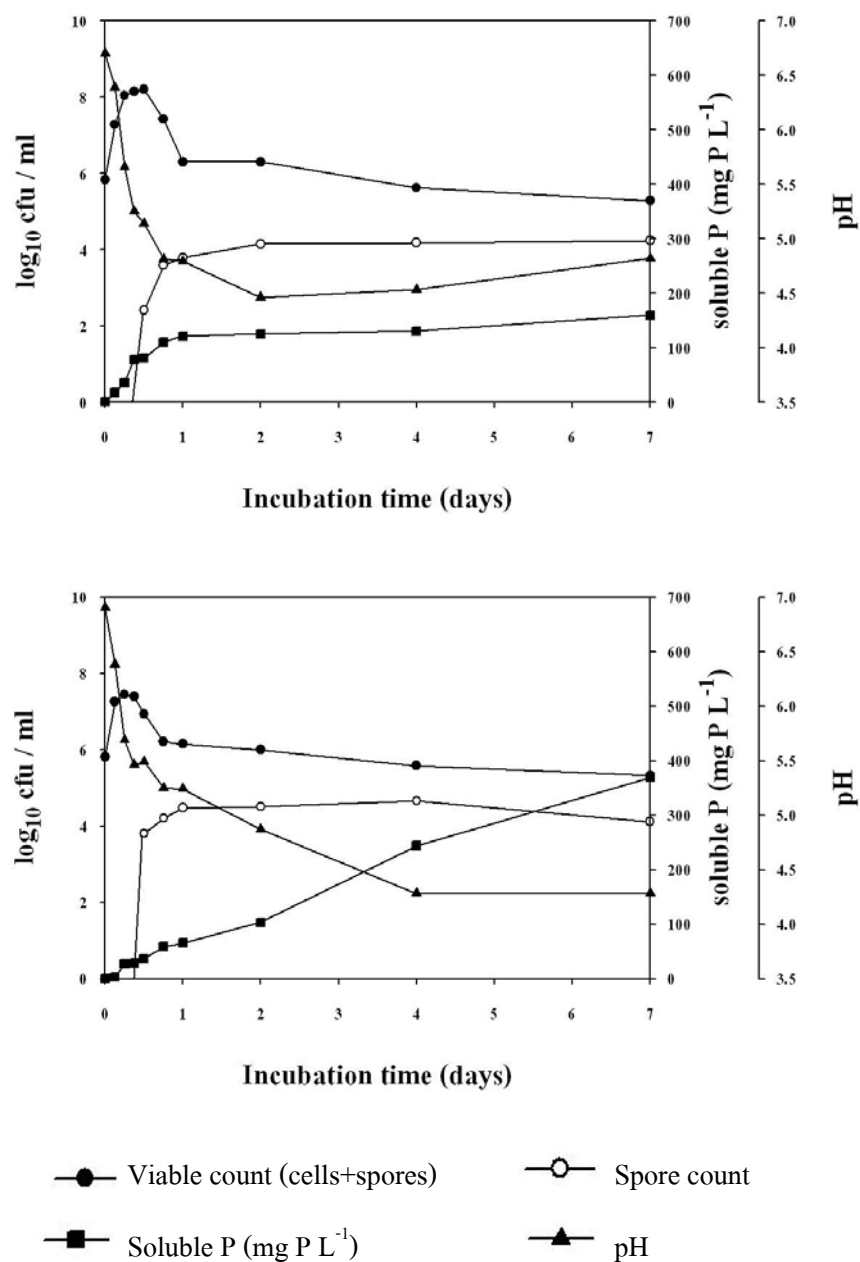
จากภาพที่ 3, 4 และ 5 ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11, *B. megaterium* สายพันธุ์ C411 และ *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 ค่า pH และปริมาณฟอสเฟตที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวทั้งสองสูตร จากกราฟพบว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวของแบคทีเรียทั้งสามที่เจริญในอาหารเหลวต่างสูตรมีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน ซึ่งจากเส้นกราฟการเจริญ (viable count) ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันในอาหารเหลวต่างสูตร แสดงว่าการเจริญของแบคทีเรียในอาหารต่างสูตรมีความใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11 และ



ภาพที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11 ค่า pH และปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร PVK (บน) และ NBRIP (ล่าง) โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 ชั่วโมง วันที่ 2, 4 และ 7



ภาพที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ C411 ค่า pH และปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร PVK (บน) และ NBRIP (ล่าง) โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 ชั่วโมง วันที่ 2, 4 และ 7



ภาพที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 ค่า pH และปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร PVK (บน) และ NBRIP (ล่าง) โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 ชั่วโมง วันที่ 2, 4 และ 7

B. megaterium ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร แสดงให้เห็นว่าการละลายฟอสเฟตจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อ และมีปริมาณสูงสุดในช่วงที่แบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase และคงที่เมื่อปริมาณเซลล์ลดจำนวนลง หรือเข้าสู่ระยะเป็นสปอร์ และจากกราฟเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่า pH และการละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แสดงให้เห็นว่าค่า pH ที่ลดลงมีอิทธิพลต่อการละลายฟอสเฟตอย่างชัดเจน โดยจากกราฟแสดงให้เห็นว่าค่า pH ของอาหารลดลงอย่างมาก ในช่วงที่เชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่จำนวนเซลล์คงที่ กิจกรรมของเชื้อจึงเป็นไปเพื่อการสร้างและผลิตสารที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีพ หรือเตรียมพร้อมสำหรับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นสปอร์ การแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์ รวมถึงการปลดปล่อยของเสียออกจากเซลล์ มีผลให้อาหารมีสภาพเป็นกรด ค่า pH ลดลงคงที่เมื่อกิจกรรมของเซลล์ลดลง เพราะจำนวนเซลล์ลดลง และ/หรือเข้าสู่ระยะเป็นสปอร์ การเปลี่ยนแปลงลดลงของค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟอสเฟตที่ละลายเพิ่มขึ้นในอาหารเหลว ซึ่งพบว่าการละลายฟอสเฟตค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามสภาพความเป็นกรดที่ค่อย ๆ เพิ่มขึ้น และการละลายฟอสเฟตสูงสุดเมื่อค่า pH ลดลงต่ำสุด ซึ่งพบประมาณวันที่สองของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อค่า pH คงที่ตลอดการเลี้ยงเชื้อ การละลายฟอสเฟตก็คงที่เช่นกัน ยกเว้นแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 ในอาหารเหลวสูตร NBRIP

นอกจากนี้กราฟได้แสดงว่าองค์ประกอบในอาหารเหลวแต่ละสูตร มีอิทธิพลต่อการละลายฟอสเฟตของเชื้อ เนื่องจากปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในอาหารแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังที่ได้เคยกล่าวแล้วว่า yeast extract ในอาหารเหลว PVK มีผลให้การละลายฟอสเฟตลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว NBRIP (Nautiyal, 1999) และพบว่าในอาหารเหลว NBRIP ทั้งจากที่เลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *B. megaterium* มีสภาพความเป็นกรดมากกว่าในอาหารเหลว PVK ซึ่งหากเปรียบเทียบค่า pH ของอาหารเหลว NBRIP กับ PVK ในวันที่สองของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ พบว่าค่า pH ของอาหารเหลว NBRIP มีค่าต่ำกว่าค่า pH ของอาหารเหลว PVK ยกเว้นเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 ที่ค่า pH ของอาหารเหลว NBRIP มีค่าลดต่ำกว่าค่า pH ของอาหารเหลวสูตร PVK ในวันที่สี่ของการเลี้ยงเชื้อ

จากรายงานผลของ Reyes *et al.* (1999) ได้แสดงถึงปริมาณของแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีผลกระทบต่ออัตราการละลายฟอสเฟตของรา *Penicillium rugulosum* ทั้งสายพันธุ์เดิม และสายพันธุ์กลาย พบว่าในอาหารเหลวที่มีปริมาณแอมโมเนียม 7.0 มิลลิโมลาร์ การละลายฟอสเฟต

จากแหล่งฟอสเฟต HA ลดลง และการเจริญของเชื้อราถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมสูงถึง 36.0 มิลลิโมลาร์ แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมเพียง 0.7 มิลลิโมลาร์ พบว่า HA แสดงการละลายได้สูงสุด ซึ่งผลของการเจริญและการละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม AlPO_4 เป็นแหล่งฟอสเฟตให้ผลในลักษณะคล้ายคลึงกัน

ดังนั้นหากพิจารณาส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร ซึ่งใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าในอาหารเหลวสูตร PVK มีปริมาณแอมโมเนียมสูงกว่าอาหารเหลวสูตร NBRIP ประมาณ 5 เท่า ซึ่งจากกราฟอาจกล่าวได้ว่าแอมโมเนียมไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย เพราะเส้นกราฟการเจริญ (viable count) ของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทั้งสองสูตร แสดงจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณแอมโมเนียมในอาหารอาจมีผลต่อปริมาณกรดที่พบในอาหาร

ในกรณีการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 พบลักษณะที่เรียกว่า Biofloculation เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBRIP อย่างชัดเจน (ภาพที่ 6) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากการรวมตัวกันของเชื้อกับตะกอนของ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ขนาดตะกอนใหญ่ขึ้น และตกลงสู่ก้นภาชนะ น้ำเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใส Biofloculation ของเชื้อนี้เกิดขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนกระทั่งวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจะค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาพเดิมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อกลับขุ่นอีกครั้ง ตะกอนขนาดใหญ่ที่พบหายไป แต่ในแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11 และ *B. megaterium* สายพันธุ์ C411 ไม่พบว่าเกิด Biofloculation



ภาพที่ 6 ลักษณะ floc-forming และ nonfloc-forming ของแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 ในอาหารเหลว NBRIP (ขวา) และ PVK (ซ้าย) ตามลำดับ

จากรายงานของ Sobeck and Higgins (2002) ได้แสดงถึงกลไกและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกิด Bioflocculation ในกระบวนการ Activated sludge ของระบบบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ ตามทฤษฎีที่เคยมีผู้กล่าวไว้ พบว่าผลการทดลองได้สนับสนุนกลไกการเกิด Bioflocculation ตามทฤษฎี divalent cation bridging (DCB) theory ซึ่งไอออนประจุบวกที่มีอิทธิพลต่อการเกิด Bioflocculation มากที่สุดคือ ไอออนประจุบวกสองของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เนื่องจากผนังเซลล์ของจุลินทรีย์มีสภาพเป็นประจุลบ สามารถดูดซับหรือจับยึดอยู่กับไอออนประจุบวก และทำให้เซลล์เกิดการรวมตัวเข้าด้วยกัน ไอออนประจุบวกที่จับอยู่ที่ผิวเซลล์หนึ่งสามารถไปจับกับเซลล์อื่นในระบบได้อีก คล้ายกับเป็นสะพานเชื่อมระหว่างเซลล์ เมื่อเซลล์มีการรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักมากขึ้นก็จะตกตะกอนลงมา ซึ่งกระบวนการนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย

ดังนั้นการเกิด Bioflocculation ของแบคทีเรีย *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร NBRIP อธิบายได้ว่าเป็นผลจากสรีรวิทยาของเชื้อ และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBRIP มีส่วนประกอบของ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในปริมาณสูง ซึ่งเป็นแหล่งของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ที่ดี ซึ่งจากปัจจัยทั้งสองข้างต้นสามารถพบลักษณะ Bioflocculation ของ *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 ที่เจริญในอาหารเหลว PVK ได้เช่นกัน แต่กลับไม่พบลักษณะดังกล่าวของเชื้อนี้ในอาหารเหลวสูตร PVK ซึ่งจากข้อมูลของ Sobeck and Higgins (2002) ได้กล่าวอีกว่าปริมาณไอออนประจุบวกหนึ่ง เช่น Na^+ , NH_4^+ และ K^+ มีผลลดคุณสมบัติของ flocculation และเมื่อทดลองเพิ่มปริมาณไอออนของ Na^+ เข้าสู่ระบบบำบัด พบว่ามีผลกระทบต่อ flocculation เช่น คุณสมบัติการรวมตัวกันเป็นตะกอนขนาดใหญ่ และคุณสมบัติการตกตะกอนลดลง จึงอธิบายว่าส่วนประกอบของอาหารเหลวสูตร PVK บางชนิดมีผลต่อการเกิด Bioflocculation ที่ลดลงของเชื้อ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณของไอออนประจุบวกของ Ca^{2+} เป็นส่วนใหญ่ แต่ Mg^{2+} มีปริมาณน้อย เพราะในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งของ Mg^{2+} เพียงแหล่งเดียวจาก $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ซึ่งมีปริมาณน้อยมาก (0.1 กรัมต่อลิตร)

นอกจากนี้ลักษณะ Bioflocculation ซึ่งไม่พบใน *B. megaterium* สายพันธุ์ C411 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBRIP แสดงถึงความแตกต่างทางด้านสรีรวิทยาของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ และแสดงถึงความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่ม *B. megaterium*

สรุป

จากการแยกแบคทีเรียได้จำนวน 344 ไอโซเลต จากดิน และหินฟอสเฟตที่มีขายทางการค้า นำมาศึกษาความสามารถในการละลายสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตรูปละลายยาก $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร PVK และ NBRIP พบว่าแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต แสดงการละลายฟอสเฟตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทั้งสูตร PVK และ NBRIP จึงคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มนี้สำหรับศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวสูตร PVK และ NBRIP และจากการจำแนกชนิดแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลต โดยวิธีการแบบดั้งเดิมประกอบด้วย การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาบางประการของเชื้อ สามารถจัดจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจนว่าเป็น *B. megaterium* ซึ่งในที่นี้ได้แบ่งแยกออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ตามความสามารถในการสร้างหรือไม่สร้างกรดจากน้ำตาล D-xylose และการสร้างหรือไม่สร้างเอนไซม์ urease

จากการศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของ *B. megaterium* ทั้ง 12 สายพันธุ์ ที่แยกจากดิน และหินฟอสเฟต รวมกับแบคทีเรียจากแหล่งเก็บเชื้อต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N11 แสดงการละลายฟอสเฟตได้ปริมาณสูงสุด มีค่าเท่ากับ 450.6 และ 595.9 mg P L^{-1} ตามลำดับ *B. megaterium* สายพันธุ์ C411 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มของ *B. megaterium* และ *Bacillus* sp. ที่เลือกมาทดสอบ และมีค่าเท่ากับ 216.4 และ 453.8 mg P L^{-1} ตามลำดับ ซึ่งจากปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ในอาหารเหลวทั้งสองสูตร แสดงว่าการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียนั้นมีความแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และจากการทดลองได้สนับสนุนสมมติฐานของการละลายฟอสเฟต ซึ่งเกิดจากการสร้างและปลดปล่อยกรดออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากค่า pH ที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการคัดเลือก และการละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างสูตร แสดงว่าการศึกษาการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียในอาหารเหลวมีประสิทธิภาพดีกว่าในอาหารแข็ง เนื่องจากแบคทีเรียที่ไม่แสดงการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งอาจสามารถละลายฟอสเฟตได้ในอาหารเหลว และการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร NBRIP แสดงประสิทธิภาพดีกว่าการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่เจริญในอาหารเหลวสูตร PVK ทั้งนี้ส่วนประกอบบางชนิดในสูตรอาหาร เช่น yeast extract และ

ปริมาณแอมโมเนียม อาจจะมีผลต่อการละลายฟอสเฟตได้ปริมาณมากหรือน้อย รวมทั้งการสร้างและปลดปล่อยกรดออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย ค่า pH และการละลายฟอสเฟต ในอาหารเหลวแต่ละสูตร พบว่าแบคทีเรียแสดงการละลายฟอสเฟตได้ดีเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase และผลได้แสดงว่าค่า pH ที่ลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรมีอิทธิพลต่อการละลายฟอสเฟตอย่างชัดเจน

นอกจากนี้ในการศึกษาพบว่า *B. megaterium* สายพันธุ์ T1RP13 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBRIP สามารถเกิด Biofloculation ซึ่งเป็นอิทธิพลจากปัจจัยทางสรีรวิทยาของเชื้อ และส่วนประกอบของอาหาร ลักษณะดังกล่าวนี้ไม่พบที่เกิดใน *B. megaterium* สายพันธุ์ C411 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในยีนส์เดียวกัน จึงแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติทางสรีรวิทยาที่แตกต่างและหลากหลายของ *B. megaterium*

ดังนั้นจากการศึกษาแบคทีเรียละลายฟอสเฟตนี้ ได้สนับสนุนกลไกการละลายฟอสเฟตผ่านกลไกการสร้างและปลดปล่อยกรดออกนอกเซลล์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลดลงของค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีอิทธิพลหรือปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง และกระทบต่อการละลายฟอสเฟตได้ปริมาณมากหรือน้อย ดังนี้ ชนิดและสายพันธุ์ คุณสมบัติทางสรีรวิทยา การเจริญของแบคทีเรีย รวมถึงส่วนประกอบในสูตรอาหาร เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

ในการแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตนี้อาจทำการแยกเชื้อโดยการชั่งตัวอย่างจากธรรมชาติที่ต้องการแยกเชื้อ ใส่ลงในอาหารเหลวสำหรับการศึกษาจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตโดยตรง เพื่อเป็นการจำกัดการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่ไม่สามารถเจริญในอาหารทดสอบได้ และเป็นวิธีการที่สามารถแยกจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้โดยตรง และอาจมีการเติมสารบางชนิด เช่น antibiotic ลงในอาหารสำหรับการแยกเชื้อ เพื่อจำกัดการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการศึกษา นอกจากนี้ควรแยกเชื้อโดยวิธีการ cross streak ร่วมกับวิธีการ spread เพื่อให้ได้เชื้อปริมาณมากและมีความหลากหลาย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย ค่า pH และการละลายฟอสเฟตแสดงให้เห็นว่าสามารถลดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อจากเดิม 7 วัน ตามคำแนะนำของผู้ที่ได้เคยวิจัยมาก่อนหน้านี้ เหลือเพียง 1-3 วัน (ตามความเหมาะสมของชนิดแบคทีเรีย) ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กิตตินันท์ ชีระวรรณวิไล. 2543. เอกสารทางวิชาการ ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปุ๋ย และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ปุ๋ย. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.
- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 10. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และ จงรักษ์ จันทรเจริญสุข. 2542. แบบฝึกหัดและคู่มือปฏิบัติการ การวิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาปฐพีวิทยา, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ธงชัย มาลา. 2546. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุภาพ บุรณากาญจน์ และ วันทนีย์ พึ่งแสง. 2533. ปริมาณและการกระจายของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ในดินต่าง ๆ, น. 587-595. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปัทมา วิทยากร. 2547. ความอุดมสมบูรณ์ของดินชั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- มุกดา สุขสวัสดิ์. 2547. ชุดคู่มือการเกษตร: ปุ๋ยอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- สุวิรัช สัมปัตตะวนิช และ พัทธ์ชัย รัตนจารุรักษ์. ม.ป.ป. บทความวิชาการ เรื่อง “ ฟอสเฟต”. แหล่งที่มา: http://www.dmr.go.th/knowledge/BMR_Publication/บทความทางวิชาการ/ฟอสเฟต.pdf, 26 มิถุนายน 2547.

โสภากย์ สิริศักดิ์พร. 2544. การจัดจำแนก *Bacillus* sp. ที่ isolate ได้จากธรรมชาติ โดยการทดสอบทางชีวเคมี. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. (เอกสารไม่ตีพิมพ์).

อาภารัตน์ มหาจันทร์. 2549. ปุ๋ยชีวภาพจากจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต กับอนาคตการเกษตรของประเทศไทย. บริษัท ซีเอ็ดยูเคชั่น จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ.

Arcand, M.M. and K.D. Schneider. 2006. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. **An. Acad. Bras. Cienc.** 78: 791-807.

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

Banik, S. and B.K. Dey. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. **Plant and Soil** 69: 353-364.

Barea, J.M., M.J. Pozo., R. Azcón and C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. **J. Exp. Bot.** 56: 1761-1778.

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

Çakmakçi, R., F. Dönmez., A. Aydın and F. Şahin. 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. **Soil Biol. Biochem.** 38: 1482-1487.

- Chen, Y.P., P.D. Rekha., A.B. Arun., F.T. Shen., W.-A. Lai and C.C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Appl. Soil Ecol.** 34: 33-41.
- Chenu, C. 1995. Extracellular Polysaccharides: An interface between microorganisms and soil constituents, 217-233. In P.M. Huang, J. Berthelin, J.-M. Bollag, W.B. McGill and A.L. Page, eds. **Environmental Impact of Soil Component Interactions Natural and Anthropogenic Organics volume 1**. CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Cunningham, J.E. and C. Kuiack. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 1451-1458.
- De Freitas, J.R., M.R. Banerjee and J.J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of conola (*Brassica napus* L.). **Biol. Fertil. Soils** 24: 358-364.
- El-Komy, H.M.A. 2005. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. **Food Technol. Biotechnol.** 43: 19-27.
- Gaur, A.C., M. Madan and K.P. Ostwal. 1973. Solubilization of phosphatic compounds by native microflora of rock phosphates. **Indian J. Exp. Biol.** 11: 427-429.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Can. J. Microbiol.** 41: 109-117.
- Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin and D.M. Penrose. 1999. **Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria**. Imperial College Press., London .

Gordon, R.E. 1989. The Genus *Bacillus*, pp. 109-126. In W.M. O'Leary, ed. **Practical Handbook of Microbiology**. CRC Press Inc., USA.

Gupta, R., R. Singal, A. Shankar, R.C. Kuhad and R.K. Saxena. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 40: 255-260.

Gyaneshwar, P., G. Naresh Kumar, L.J. Parekh and P.S. Poole. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil** 245: 83-93.

Hallmann, J., A. Quadts-Hallmann, W.F. Mahaffee and J.W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** 43: 895-914.

Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil** 237: 173-195.

Hoberg, E., P. Marschner and R. Lieberei. 2005. Organic acid exudation and pH changes by *Gordonia* sp. and *Pseudomonas fluorescens* grown with P adsorbed to goethite. **Microbiol. Res.** 160: 177-187.

Hwangbo, H., R.D. Park, Y.W. Kim, Y.S. Rim, K.H. Park, T.H. Kim, J.S. Suh and K.Y. Kim. 2003. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedius*. **Curr. Microbiol.** 47: 87-92.

Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biol. Biochem.** 24: 389-395.

Jones, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. **Plant and Soil** 205: 25-44.

- Kent, A.D. and E.W. Triplett. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annu. Rev. Microbiol.** 56: 211-236.
- Kim, K.Y., D. Jordan and H.B. Krishnan. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. **FEMS Microbiol. Lett.** 153: 273-277.
- Kpombrekou-A, K. and M.A. Tabatabai. 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. **Soil Sci.** 158: 442-453.
- Kucey, R.M.N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Can. J. Soil Sci.** 63: 671-678.
- H.H. Janzen and M.E. Leggett. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Adv. Agron.** 42: 199-228.
- Kudzin, Y.K. and I.V. Yaroshevich. 1962. The use of phosphorobacterin in the chernozem zone. **Microbiology** (translated from Russian). 31: 889-891.
- Kvaratskheliya, M.T. 1962. The advantages of using bacterial fertilizers. **Microbiology** (translated from Russian). 31: 892-895.
- Lindow, S.E. and M.T. Brandl. 2003. Microbiology of the phyllosphere. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 1875-1883.
- Mehta, S. and C.S. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. **Curr. Microbiol.** 43: 51-56.
- Mehta, Y.R. and V.P. Bhide. 1970. Solubilization of tricalcium phosphate by some soil fungi. **Indain J. Exp. Biol.** 8: 228-229.

- Mendham, J., R.C. Denney and M. Thomas. 2000. **Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis**. Pearson Education Limited, England.
- Menkina, R.A. 1963. Bacterial fertilizers and their importance for agriculture plants. **Microbiology** (translated from Russian). 32: 297-301.
- Mishustin, E.N. and A.N. Naumova. 1962. Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. **Microbiology** (translated from Russian). 31: 442-452.
- Nannipieri, P., J. Ascher, M.T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara and G. Renella. 2003, Microbial diversity and soil functions. **Eur. J. Soil Sci.** 54: 655-670.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.** 170: 265-270.
- Otero, A.P., G. Curutchet., E. Donati and P. Tedesco. 1995. Action of *Thiobacillus thiooxidans* on sulphur in the presence of a surfactant agent and its application in the indirect dissolution of phosphorus. **Proc. Biochem.** 30: 747-750.
- Pal, S.S. 1998. Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. **Plant and Soil** 198: 169-177.
- Prosser, J.I. 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil** 244: 9-17.
- Priest, F.G., M. Goodfellow and C. Todd. 1988. A numerical classification of the Genus *Bacillus*. **J. Gen. Microbiol.** 134:1847-1882.

- Reyes, I., L. Bernier., R.R. Simard and H. Antoun. 1999. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. **FEMS Microbiol. Ecol.** 28: 281-290.
- Rodríguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol. Adv.** 17: 319-339.
- Roos, W. and M. Luckner. 1984. Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. **J. Gen. Microbiol.** 130: 1007-1014.
- Ryan, P.R., E. Delhaize and D.L. Jones. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 52: 527-560.
- Sekhar, D.M.R. and N.C. Aery. 2001. Phosphate rock with farmyard manure as P fertilizer in neutral and weakly alkaline soils. **Curr. Sci.** 80: 1113-1115.
- Shen, D. 1997. Microbial diversity and application of microbial products for agricultural purposes in China. **Agric. Ecosystems Environ.** 62: 237-245.
- Sneath, P.H.A. 1986. Endospore forming gram-positive rods and cocci, pp. 1104-1207. *In* P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams and Wilkins Company, USA.
- Sobeck, D.C. and M.J. Higgins. 2002. Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. **Water Res.** 36: 527-538.
- Sperber, I.J. 1958a. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Aust. J. Res.** 9: 778-781.

Sperber, I.J. 1958b. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. **Aust. J. Res.** 9: 782-787.

Srinivasan, M., D.J. Petersen and F.B. Holl. 1996. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Can. J. Microbiol.** 42: 1006-1014.

Stamford, N.P., P.R. Santos., A.M.M.F. Moura., C.E.R.S. Santos and A.D.S. Freitas. 2003. Biofertilizers with natural phosphate, sulphur and *Acidithiobacillus* in a soil with low available-P. **Scientia Agricola** 60: 767-773.

Subba Rao, N. S. 1993. **Biofertilizers in Agriculture and Forestry.** 3rd ed., Oxford and IBH Publ. Co.

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

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

Toro, M., R. Azcón and J.-M. Barea. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability(³²P) and nutrient cycling. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4408-4412.

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

Wityakorn, P. 2004. **Advanced Soil Fertility**. 2nd ed. Faculty of Agriculture, Khonkhaen Univ., Khonkhaen. (in Thai) Cited N.V. Hue. 1990. Interaction of $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$ applied to an Oxisol and previous sludge amendment: Soil and crop response. **Communication in Soil Science and Plant Analysis** 21: 69-73.

Zapata, F. and R. N. Roy. 2004. **Use of phosphate rocks for sustainable agriculture**. Available source: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5053e/y5053e00.pdf>, August 3, 2006.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้หลังเตรียมส่วนผสมแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์

1. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ: Nutrient broth คือ Nutrient agar ที่ไม่เติมวุ้น

2. Pikovskaya's medium (Subba Rao, 1993)

Glucose	10.0	กรัม
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5.0	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0002	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0002	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับ pH ประมาณ 7.0 หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ

3. National Botanical Research institute's Phosphate growth medium (Nautiyal, 1999)

Glucose	10.0	กรัม
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5.0	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25	กรัม
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
ปรับ pH ประมาณ 7.0 หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ		

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์หา available phosphorus (ทัศนีย์ และ จงรักษ์, 2542: 37-40)1. การเตรียมน้ำยาสำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตใน culture filtrate

1.1 สารละลาย A

Ammonium molybdate	12	กรัม
Antimony potassium tartate	0.2908	กรัม
5N H ₂ SO ₄	1000	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย A โดยใช้ ammonium molybdate 12 กรัมละลายในน้ำ deionized ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ละลาย antimony potassium tartate 0.2908 กรัมในน้ำ deionized ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เอาสารละลายทั้งสองนี้ใส่ลงไปใน 5N H₂SO₄ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็น 2 ลิตร เก็บไว้ในขวดแก้ว ในสภาพที่มีด

1.2 สารละลาย B

Ascorbic acid	1.056	กรัม
---------------	-------	------

ละลาย ascorbic acid 1.056 กรัม ในสารละลาย A 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สารละลาย B ที่เตรียมแล้วจะต้องใช้ทันที และเก็บไว้ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

1.3 สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต

KH ₂ PO ₄	0.2195	กรัม
---------------------------------	--------	------

เตรียมโดยละลาย KH₂PO₄(A.R.) 0.2195 กรัม ในน้ำกลั่น จนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร สารละลายมาตรฐานนี้จะมีฟอสฟอรัสอยู่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การวิเคราะห์หาปริมาณของฟอสเฟตในตัวอย่าง

2.1 การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายฟอสเฟต

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตจากข้อ 1.3 มาทำการเจือจางลง 10 เท่า จากนั้นดูดเอาสารละลายนี้ ปริมาตร 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร บรรจลงไปในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนมีปริมาตรประมาณ 20 มิลลิลิตร เติมสารละลาย B ลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนในขวดปริมาตรจนมีปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วเริ่มอ่านเปอร์เซ็นต์ transmittance (%T) ของน้ำยานี้ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ transmittance ที่อ่านได้จาก spectrophotometer กับความเข้มข้นของฟอสเฟตในสารละลายมาตรฐาน เพื่อใช้เปรียบเทียบหาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่าง

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างประมาณ 1-10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนมีปริมาตรประมาณ 20 มิลลิลิตร เติมสารละลาย B ลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนในขวดปริมาตรจนมีปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วเริ่มอ่านเปอร์เซ็นต์ transmittance ของน้ำยานี้ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

การที่จะพิจารณาว่าควรจะใช้ปริมาณตัวอย่างเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของฟอสเฟตที่มีอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งจะต้องทดลองดูก่อน เช่น ใช้ปริมาณตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ปรากฏว่าสีของปฏิกิริยาเข้มเกินไปจนเกินกว่าค่าของกราฟมาตรฐาน ก็จำเป็นต้องลดปริมาณของตัวอย่างให้น้อยลง หรืออาจจะต้องเจือจางสารตัวอย่างลงก่อน

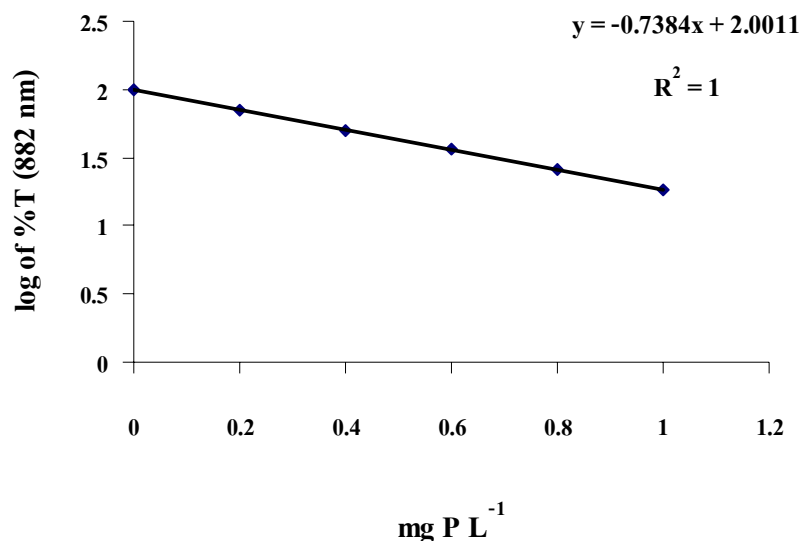
การวัดสีของฟอสเฟตโดยวิธีนี้จะต้องปรับค่า pH ให้เป็น 5.0 โดยใช้ p-nitrophenol 0.25% เป็นดัชนีบ่งชี้ ซึ่งจะมีสีเหลืองในด่าง ไม่มีสีในกรด

การคำนวณหาปริมาณของฟอสเฟตที่วิเคราะห์ได้เป็น มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร
คำนวณดังนี้

$$\frac{\text{ปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่าง (มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่าง}} = \frac{Z \times \text{ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

Z คือค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ: กรณีที่ปริมาณฟอสเฟตใน culture filtrate มีปริมาณสูง และได้ทำการเจือจาง culture filtrate ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ ให้นำค่าระดับความเจือจางนั้นมาคำนวณด้วย



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ transmittance ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของฟอสเฟตในสารละลายมาตรฐาน

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวนิจกาด การอำนวย

เกิดวันที่ 26 มีนาคม พ.ศ. 2523

สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา วท.บ.(ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศิลปากร (พ.ศ. 2545)