การวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตสำหรับพืชตระกูลกะหล่ำ

Study on Production Technology of Phosphate Biofertilizer for Cruciferae

สุปรานี มั่นหมาย ฐูปหอม พิเนตรเสถียร ภาวนา ลิกขนานนท์

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยปัจจัยการผลิตทางการเกษตรพัฒนา

.....

บทคัดย่อ

เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่จะนำมาใช้ประโยชน์ด้านธาตุอาหารพืชฟอสฟอรัสสำหรับพืชตระกูลกะหล่ำ จึงทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากธรมชาติและที่เก็บรวบรวมไว้จำนวน 500 ไอโซเลท ให้ได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเหมาะสมสำหรับพืชตระกูลกะหล่ำ โดยทดสอบผลของจุลินทรีย์ต่อการงอกของเมล็ดพืชตระกูลกะหล่ำ คือ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก กะหล่ำปม คะน้า กวางตุ้ง ผักกาดเขียว ผักกาดขาว และผักกาดหัว คัดเลือกได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต 3 สายพันธุ์ คือ เชื้อราในจีนัส Penicillium (RPS 003F) เชื้อแบคทีเรียในจีนัส Bacillus คือ (RPS 0034B) และ เชื้อแบคทีเรียในจีนัส Pseudomonads (RPS 0081 B) จากนั้นศึกษาวิธีการผลิตจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปปุ๋ยชีวภาพ โดยศึกษาวิธีการเลี้ยงขยายปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่เหมาะสม ศึกษาหาวัสดุพาที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตแต่ละสายพันธุ์ เมื่อพิจารณาการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อในวัสดุพาที่ทดลอง และนำเอาปัจจัยด้านต้นทุนการผลิตมาพิจารณาร่วมกันพบว่า ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียด และถ่านชีวภาพ เป็นวัสดุพาที่เหมาะสม จากนั้นนำปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่ผลิตได้มาทดสอบการมีชีวิตอยู่รอดของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้ง 3 สายพันธุ์ ในดินชุดต่างๆได้แก่ ชุดดินน้ำพอง ชุดดินหุบกะพง ชุดดินตาคลี และชุดดินเขาย้อย พบว่าจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้ง 3 สายพันธุ์ ยังคงมีชีวิตอยู่รอดถึงระยะเวลา 12 เดือน โดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตชนิดรามีจำนวนอยู่ระหว่าง 10^4 - 10^5 โคโลนีต่อกรัมดิน จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตชนิดแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีจำนวนอยู่ระหว่าง 10^5 – 10^6 โคโลนีต่อกรัมดิน 3. การทดสอบประสิทธิภาพปุ๋ยละลายฟอสเฟตที่ผลิตได้ในสภาพกระถางทดลองกับคะน้า และกวางตุ้ง โดยวิธีคลุกเมล็ดก่อนปลูก และวิธีรองก้นหลุม ผลการทดลองพบว่าปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตทั้ง 3 สายพันธุ์ ทำให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของคะน้า และกวางตุ้ง สูงกว่าการไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และเทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ

คำนำ

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด ในการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้ประโยชน์ด้านปุ๋ยกำลังเป็นที่สนใจของเกษตรกร เพราะประชากรจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบหลักของระบบ ดิน-พืช การที่ประชากรจุลินทรีย์มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์นี้จะมีผลต่อการพัฒนาของพืช ยกตัวอย่างเช่น ผลการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ดินหลายชนิดสามารถละลายไอออนฟอสเฟตจากสารประกอบอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ทำให้ฟอสฟอรัสเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามการใช้กระบวนการที่ จุลินทรีย์เป็นตัวการสำคัญนี้ไปสนับสนุนด้าน

ธาตุอาหารของพืชยังต้องศึกษาเพิ่มเติม เพราะฟอสเฟตไอออนรูปที่ละลายออกมานี้จะถูกดินตรึงไว้อีกครั้งก่อนที่จะถึงผิวรากพืช อย่างไรก็ตามในกรณีของ การใช้หินฟอสเฟตซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสต้นทุนต่ำ พบว่ามีปัญหาของการใช้คือประสิทธิภาพในการใช้ต่ำ ใช้ไม่ได้ผลในดินที่มีค่า pH สูงกกว่า 5.5-6 แม้ว่ามีสภาพแวดล้อมอื่นๆเหมาะสม ทำให้ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าพืชได้รับจากปุ๋ยเคมีฟอสเฟตที่ละลายได้อื่นๆ (Khasawneh and Doll, 1979) การใช้หินฟอสเฟตเป็นปุ๋ยโดยตรงจึงไม่แพร่หลาย ได้มีความพยายามหาวิธีการหลายวิธีที่ทำให้ฟอสฟอรัสในหินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นเช่นวิธีการทางเคมี วิธีทางกายภาพโดยนำอาหินฟอสเฟตไปเผาไฟหรือบดให้ละเอียด (ลัดดาวัลย์ และคณะ, 2529) นอกจากนี้พบว่ามี จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถละลายหินฟอสเฟตออกมาเป็นประโยชน์ได้ (Sperber, 1958) ดังนั้นการทำให้ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นจากหินฟอสเฟตจากกระบวนการของจุลินทรีย์ จึงเป็นแนวทางที่น่าจะนำไปถึงจุดมุ่งหมายในการทำการเกษตรอย่างยั่งยืนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำเกษตรอินทรีย์โดยมีรายงานว่า จุลินทรีย์สามารถปลดปล่อยกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆออกมา ทำให้หินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดอินทรีย์โมเลกุลต่ำสามารถเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลายโดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับ chelation และปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน (Gerkel, 1992) จึงมีการนำเชื้อราเส้นใยมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดอินทรีย์อย่างแพร่หลาย (Matte, 1992) เฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Penicillium sp.* บางสายพันธุ์ โดยมีการศึกษาในระบบหมักร่วมกันกับหินฟอสเฟต หรือโดยการเพาะเชื้อโดยตรงเพื่อให้ไปละลายหินฟอสเฟต (Cunningham and Kuiak, 1992)

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน ทำการรวบรวมคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากดินและรากพืชได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการละลายหินฟอสเฟตในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพแปลงทดลอง และสามารถใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อการผลิตพืช แต่การจะนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางและสะดวกในการนำไปใช้ต้องผลิตให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม จึงทำการศึกษาในขั้นต้นหาวิธีการผลิตจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้อยู่ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพ จุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในครั้งนี้คือ เชื้อราในจีนัส Penicillium (RPS 003F) เชื้อแบคทีเรียในจีนัส Bacillus คือ (RPS 0034B) และ เชื้อแบคทีเรียในจีนัส Pseudomonads (RPS 0081 B) ซึ่งส่วนใหญ่พบอยู่ทั่วๆไป เป็นพวก opportunistic saprophytes ในเรื่องความต้องการธาตุอาหาร ไม่ยุ่งยาก สามารถเจริญในเกือบทุกสภาพแวดล้อมแม้มีธาตุอาหารเพียงเล็กน้อย สามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนรูปแบบที่ซับซ้อนที่สุด และมีสภาพแวดล้อมทางกายภาพ-เคมี เป็นช่วงที่กว้าง สายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นพวกรา และแบคทีเรีย ในดิน

วิธีดำเนินการ

1. การศึกษาวิธีการเลี้ยงขยายปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่เหมาะสม และหาวัสดุพาที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

อุปกรณ์

เชื้อรา *Penicillium* sp. RPS 003 F เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B และ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B วัสดุที่ทดลองใช้เป็นวัสดุพาคือ ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียดขนาด 80 เมช ซีโอไลท์ และ ถ่านชีวภาพ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และสารปฏิชีวนะ สำหรับการนับปริมาณ

เชื้อราคือ potato dextrose agar, cycloheximide สำหรับการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียคือ Nutrient agar ถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6 x 9 นิ้ว พร้อมคอขวดพลาสติก กระดาษฟลอยด์ และสำลี

วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block มี 5 กรรมวิธีการทดลอง ทำ 4 ซ้ำ โดยกรรมวิธีการทดลองมีวัสดุที่ทดลองใช้เป็นวัสดุพาคือ 1) ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียดขนาด 80 เมช 2) ซีโอไลท์ 3) ถ่านชีวภาพ 4) ปุ๋ยหมักมูลวัวผสม ซีโอไลท์ อัตรา 1:1 โดยน้ำหนัก 5) ปุ๋ยหมักมูลวัว ผสม ถ่านชีวภาพ อัตรา 1:1 โดยน้ำหนัก

ทำการเพาะเชื้อรา *Penicillium* sp. RPS 003 F ที่เลี้ยงขยายปริมาณเชื้อบนข้าวฟ่างผสมรำข้าวหยาบ อัตราส่วน 2 : 1 เพาะเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B ที่เลี้ยงขยายในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ในขวดแก้ว พร้อมให้อากาศ ลงในวัสดุอินทรีย์ชนิดต่างๆที่ทดลองใช้เป็นวัสดุพา คือ ปุ๋ยหมักมูลวัวซีโอไลท์ ถ่านชีวภาพ เก็บบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้ความชื้น (น้ำกรอง) ปริมาณที่เหมาะสมแก่ส่วนผสมดังกล่าว เก็บไว้ในถุงขนาด 7 x 11 นิ้ว จำนวน 300 กรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็น โดยกำหนดให้ปริมาณเชื้อราและแบคทีเรียเท่ากันในทุกกรรมวิธีการทดลอง เก็บบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับปริมาณเชื้อราและแบคทีเรียทุกระยะเวลา 0, 5, 15, 30, 60, 90, 180, 240 และ 360 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose agar ที่ใส่ cycloheximide และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Nutrient agar บันทึกข้อมูลปริมาณเชื้อราและแบคทีเรียในวัสดุอินทรีย์ที่ใช้เป็นวัสดุพา ที่ระยะเวลาบ่ม 0, 5, 15, 30, 60, 90, 180, 240 และ 360 วัน

2. ทดลองผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และทดสอบการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเมื่อเพาะลงดิน

อุปกรณ์

ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตเชื้อรา *Penicillium* sp. RPS 003 F เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B และเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B ดิน 4 ชุดดิน คือ ชุดดินน้ำพอง ชุดดินหุบกะพง ชุดดินตาคลี และชุดดินเขาย้อย อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และสารปฏิชีวนะสำหรับการนับปริมาณเชื้อราคือ potato dextrose agar , nutrient agar, glucose, yeast extract agar และ cycloheximide สารเคมีสำหรับการวัดประสิทธิภาพการละลายตะกอน $CaHPO_4$ วัสดุพาคือ 1) ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียดขนาด 80 เมช 2) ซีโอไลท์ 3) ถ่านชีวภาพ

วิธีการทดลอง

ทำการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในวัสดุพาชนิดต่าง ๆ จากการทดลองที่ 1 จากนั้นนำมาศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อรา *Penicillium* sp. RPS 003 F เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B และ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B เมื่อใส่ลงดินชุดดิน น้ำพอง ชุดดินหุบกะพง ชุดดินตาคลี ชุดดินเขาย้อย วางแผนการทดลองเชื้อแต่ละชนิด แบบ randomized complete block มี 4 กรรมวิธีการทดลอง ทำ 4 ซ้ำ กรรมวิธีการทดลองมี 1) ชุดดินน้ำพอง 2) ชุดดินหุบกะพง 3) ชุดดินตาคลี 4) ชุดดินเขาย้อย

ใส่ดินทดลองในจานเพาะเชื้อขนาด 20 x 150 มม. ใส่ปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตได้ลงชุดดินต่าง ๆ โดยให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน ตรวจนับปริมาณเชื้อรา RPS 003 F เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B และ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B ทุกระยะเวลา 0, 5, 15, 30, 60, 90, 180, 240 และ 360 วัน

ตรวจสอบกิจกรรมการละลายฟอสเฟตของเชื้อรา *Penicillium sp.* RPS 003 F เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B และ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B ดั้งเดิมและที่แยกได้จากดินทดลองที่ระยะเวลาบ่ม 180 และ 360 วัน เลี้ยงเชื้อแบบจุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract agar ที่เทหนา 2 ชั้น (double-layered) โดยมีตะกอน $CaHPO_4$ เป็นส่วนประกอบอยู่ชั้นบนของอาหาร ตามวิธีของ Katznelson and Boss (1959) แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิตู้บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส วัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่ปรากฏอยู่รอบโคโลนีเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียเมื่อบ่มได้ 3 วัน

3. ศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตกับพืช

อุปกรณ์

ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตเชื้อรา *Penicillium* sp. RPS 003 F เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B และเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B อุปกรณ์เครื่องแก้วคือ จานแก้วเพาะเมล็ดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุกระดาษเพาะเมล็ด และจานแก้ว เมล็ดผักตระกูลกะหล่ำ เช่น กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก คะน้า กวางตุ้ง ผักกาดขาว ผักกาดเขียว กะหล่ำปม ฯลฯ กระถางทดลอง

วิธีการ

1. ศึกษาผลกระทบของปุ๋ยชีวภาพชนิดราและแบคทีเรียต่อการงอกของเมล็ด เพาะเมล็ดพืชในกระบะเพาะที่บรรจุกระดาษเพาะเมล็ด คลุกปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดรา *Penicillium* sp. RPS 003 F ชนิดแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B และ ชนิดแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B กับเมล็ดในจานเพาะเมล็ดให้ความชื้น และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการงอกที่ระยะเวลา 3 วันจนถึง 7 วัน

ทดสอบประสิทธิภาพปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตทั้ง 8 ชนิด กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก กะหล่ำปม คะน้า กวางตุ้ง ผักกาดเขียว ผักกาดขาว และผักกาดหัว

2. ทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ต่อการเจริญเติบโตของ คะน้า และกวางตุ้ง วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block มี 5 กรรมวิธีการทดลอง ทำ 4 ซ้ำ กรรมวิธีการทดลองคือ

1. ไม่ใส่ปุ๋ย
2. ใส่ปุ๋ย 15-15-15 N-P_2O_5- K_2O กก.ต่อไร่
3. ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต RPS 003 F แบบคลุกเมล็ด + ปุ๋ยเคมี N – K_2O
4. ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต RPS 003 F แบบ รองก้นหลุม+ ปุ๋ยเคมี N – K_2O
5. ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต RPS 0034 B แบบคลุกเมล็ด + ปุ๋ยเคมี N – K_2O
6. ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต RPS 0034 B แบบรองก้นหลุม+ ปุ๋ยเคมี N – K_2O
7. ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต RPS0081 B แบบคลุกเมล็ด + ปุ๋ยเคมี N – K_2O
8. ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต RPS0081 B แบบรองก้นหลุม + ปุ๋ยเคมี N – K_2O

ทดลองครั้งที่ 1 ปลูกคะน้า ทดลองครั้งที่ 2 ปลูกกวางตุ้ง ในกระถาง ซึ่งบรรจุดินชุดดินกำแพงแสน ซึ่งมีปริมาณอินทรียวัตถุ 0.9 % pH 6.0 ใส่ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยเคมี และวัสดุทดลอง ตามกรรมวิธีการทดลองที่กำหนด ดูแลให้น้ำและ

ควบคุมโรค แมลง บันทึกข้อมูล เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพืช 3 ชนิด ที่ระยะเวลา 3 วัน จนถึง 7 วัน และความสูงของคะน้า และกวางตุ้งที่ระยะเวลา 30 และ 45วัน และน้ำหนักต้นต่อกระถาง

ระยะเวลา เดือน ตุลาคม 2551 ถึง กันยายน 2553

สถานที่ทำการทดลอง

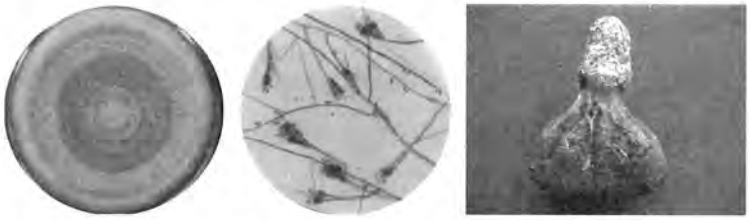
กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง

1. ศึกษาวิธีการเลี้ยงขยายปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่เหมาะสม และหาวัสดุพาที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

การทดลองเลี้ยงขยายปริมาณเชื้อรา *Penicillium* sp. (รูปที่ 1) ในสภาพห้องปฏิบัติการโดยวิธี solid-substrate fermentation พบว่าที่ระยะเวลา 10 วัน การเลี้ยงขยายจำนวนสปอร์ในส่วนผสมวัสดุอินทรีย์ เมื่อตรวจนับปริมาณสปอร์โดยใช้ counting chamber มีปริมาณสปอร์อยู่ในช่วง 10^4-10^5 สปอร์ต่อกรัม โดยปริมาณสปอร์ที่มีในกรรมวิธีข้าวฟ่างผสมรำหยาบอัตรา 1 : 1, 2 : 1 และ 1 : 2 ในกรรมวิธีข้าวโพดบดหยาบ กรรมวิธีข้าวโพดบดหยาบผสมรำหยาบอัตรา 1 : 1 เท่ากับ 5.0×10^5, 2.5×10^5, 5.0×10^5, 2.0×10^5 และ 2.5×10^5 สปอร์ต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อบ่มเลี้ยงเชื้อไปจนถึงระยะเวลา 20 วัน กรรมวิธีข้าวฟ่างผสมรำหยาบอัตรา 2 : 1 ให้ปริมาณสปอร์เชื้อรามากกว่าส่วนผสมวัสดุอินทรีย์อื่นๆ และเพิ่มมากขึ้นถึง 100 เท่าเป็น 2.0×10^7 สปอร์ต่อกรัม ที่ระยะเวลาบ่ม 30 วัน กรรมวิธีข้าวฟ่างผสมรำหยาบอัตรา 2 : 1 ให้ปริมาณสปอร์เชื้อรามากที่สุดเท่ากับ 5.0×10^8 สปอร์ต่อกรัม ส่วนกรรมวิธีข้าวฟ่างผสมรำหยาบอัตรา 1 : 1 และ 1 : 2 มีจำนวนสปอร์ที่น้อยกว่า เท่ากับ 7.5×10^7 และ 1.7×10^6 สปอร์ต่อกรัม ตามลำดับ กรรมวิธีข้าวโพดบดหยาบมีปริมาณที่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีข้าวฟ่างผสมรำหยาบอัตรา 2 : 1 คือเท่ากับ 3.8×10^8 สปอร์ต่อกรัม นอกจากนี้พบว่ากรรมวิธีข้าวฟ่างผสมรำหยาบอัตรา 2 : 1 ที่เก็บบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องมี shelf life นานพอเพียงกับการนำไปใช้ประโยชน์ในเบื้องต้นได้คือ มี shelf life ประมาณ 60 วัน

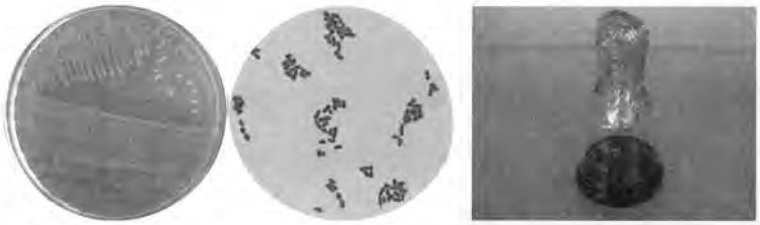
การทดลองเลี้ยงขยายปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B (รูปที่ 2) ในสภาพห้องปฏิบัติการโดยวิธี liquid-substrate fermentation การเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth เมื่อตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยใช้ viable plate count มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในช่วง 10^5-10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ระยะเวลา 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 วัน เท่ากับ 3.3×10^6, 4.5×10^8, 3.2×10^{10}, 3.5×10^{10}, 4.5×10^9, 2.2×10^8, 3.8×10^7, 5.5×10^7, 4.5×10^6, 2.5×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อบ่มเลี้ยงเชื้อไปจนถึงระยะเวลา 10 วัน ที่ระยะเวลา 3-4 วัน ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมากกว่าที่ระยะเวลาอื่นๆ เท่ากับ 3.2×10^{10} และ 3.5×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 1. จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต *Penicillium* sp. RPS 003 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงในข้าวฟ่างผสมรำหยาบ

รูปที่ 2. จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต *Bacillus* sp. RPS 0034 B ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงในNutrient Broth

การทดลองเลี้ยงขยายปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp.RPS 0081 B (รูปที่3) ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยวิธี liquid-substrate fermentation เลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth เมื่อตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยใช้ viable plate count มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในช่วง 10^{6} - 10^{14} โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ระยะเวลา 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 วัน เท่ากับ 2.3×10^{5}, 5.5×10^{7}, 4.2×10^{12}, 3.5×10^{12}, 4.5×10^{11}, 2.2×10^{10}, 3.8×10^{10}, 5.5×10^{9}, 4.5×10^{7}, 2.5×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อบ่มเลี้ยงเชื้อไปจนถึงระยะเวลา 10 วัน ที่ระยะเวลา 3-4 วัน ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมากกว่าที่ระยะเวลาอื่นๆ เท่ากับ 4.2×10^{14} และ 3.5×10^{14} โคโลนีต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3. จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต *Pseudomonads* sp.RPS 0081 B ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงในNutrient Broth

เมื่อได้วิธีการและอาหารเลี้ยงขยายเชื้อเบื้องต้นที่เหมาะสมเพื่อการผลิตเชื้อรา *Penicillium* sp. RPS 003 F เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B และ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B จึงศึกษาหาวัสดุพาที่เหมาะสมสำหรับการนำไปผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ โดยนำปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียด ซีโอไลท์ และถ่านชีวภาพ มาทดลองใช้เป็นวัสดุพาแล้วทำการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในวัสดุพาแต่ละชนิด

เชื้อรา *Penicillium* sp. RPS 003 F ผลจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียดทำให้เชื้อรามีชีวิตรอดในปริมาณที่มากกว่าวัสดุพาอื่นๆที่ทดลองและในปริมาณที่มากพอเพียงที่จะนำมาใช้ในการผลิตและเมื่อนำปัจจัยด้านราคา

ความสะดวกในการจัดหาและคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้เป็นวัสดุพา มาประกอบการพิจารณา จึงสรุปได้ว่าปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียดเหมาะที่จะใช้เป็นวัสดุพาสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดรา *Penicillium* sp. RPS 003 F

2. ทดลองผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และทดสอบการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตเมื่อเพาะลงดิน

เมื่อทดลองใส่ปุ๋ยชีวภาพรูปแบบที่ผลิตได้ลงชุดดินชุดต่างๆ 4 ชุด คือ ชุดดินน้ำพอง หุบกะพง ตาคลี และเขาย้อย เพื่อศึกษาการมีชีวิตรอดและการคงอยู่ของประสิทธิภาพของเชื้อราด้านต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถมีชีวิตรอดได้ในดินที่ใช้ในการทดลองที่ระยะเวลาบ่มตั้งแต่ 0-360 วัน ในปริมาณที่แตกต่างกัน

ปริมาณเชื้อรา RPS 003 F ที่นับได้จากชุดดินน้ำพอง ที่ระยะเวลา 5 วันเท่ากับ 3.2×10^{7} โคโลนีต่อกรัมดิน และเริ่มลดลงจนถึงระยะ เวลา 90 วัน หลังจากนั้นปริมาณลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^{5} โคโลนีต่อกรัมดิน ที่ระยะเวลาบ่ม 360 วัน โดยที่ 360 วันนับปริมาณเชื้อราได้เท่ากับ 2.2×10^{4} โคโลนีต่อกรัมดิน

ปริมาณเชื้อรา RPS 003 F ที่นับได้จากชุดดินหุบกะพง ที่ระยะเวลา 5 วัน ลดลงจากปริมาณที่ระยะเวลาเริ่มต้นเป็น 3.4×10^{6} โคโลนีต่อกรัมดิน และยังคงตรวจนับปริมาณได้ในช่วง 10^{6} โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึง 60 วัน หลังจากนั้นปริมาณลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^{4} - 10^{5} โคโลนีต่อกรัมดิน จนสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 360 วัน

ปริมาณเชื้อรา RPS 003 F ที่นับได้จากชุดดินตาคลี ที่ระยะเวลา 5 วันเท่ากับ 3.1×10^{6} โคโลนีต่อกรัมดิน ลดลงกว่าระยะเวลาเริ่มต้น แต่ยังคงตรวจนับปริมาณได้ในช่วง 10^{6} โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึง 60 วัน หลังจากนั้นปริมาณเชื้อราที่ได้จากชุดดินที่นึ่งฆ่าเชื้อลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^{4} โคโลนีต่อกรัมดิน จนสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 360 วัน

ปริมาณเชื้อรา RPS 003 F ที่นับได้จากชุดดินเขาย้อย ที่ระยะเวลา 5 วันเท่ากับ 4.2×10^{6} โคโลนีต่อกรัมดิน และยังคงอยู่ในช่วง 10^{5} โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึง 60 วัน หลังจากนี้ปริมาณลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^{4} โคโลนีต่อกรัมดิน จนสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 360 วัน

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย RPS 0034 B ที่นับได้จากชุดดินน้ำพอง ที่ระยะเวลา 5 วันเท่ากับ 3.2×10^{8} โคโลนีต่อกรัมดิน และเริ่มลดลงจนถึงระยะ เวลา 30 วัน หลังจากนั้นปริมาณลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^{5} โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 360 วัน

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย RPS 0034 B ที่นับได้จากชุดดินหุบกะพง ที่ระยะเวลา 5 วัน ลดลงจากปริมาณที่ระยะเวลาเริ่มต้นเป็น 1.2×10^{8} โคโลนีต่อกรัมดิน และยังคงตรวจนับปริมาณได้ในช่วง 10^{5} โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึง 60 วัน หลังจากนั้นปริมาณลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^{4} - 10^{5} โคโลนีต่อกรัมดิน จนสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 360 วัน

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย RPS 0034 B ที่นับได้จากชุดดินตาคลี ที่ระยะเวลา 5 วันเท่ากับ 1.3×10^{6} โคโลนีต่อกรัมดิน ลดลงกว่าระยะเวลาเริ่มต้น แต่ยังคงตรวจนับปริมาณได้ในช่วง 10^{5} โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึง 60 วัน หลังจากนั้นปริมาณเชื้อราที่ได้จากชุดดินที่นึ่งฆ่าเชื้อลดลงเหลืออยู่ในช่วง10^{4} โคโลนีต่อกรัมดิน จนสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม360 วัน

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย RPS 0034 B ที่นับได้จากชุดดินเขาย้อย ที่ระยะเวลา 5 วันเท่ากับ 2.4×10^{8} โคโลนีต่อกรัมดิน และยังคงอยู่ในช่วง 10^{5} โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึง 60 วัน หลังจากนี้ปริมาณลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^{3} โคโลนีต่อกรัมดิน จนสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 360 วัน

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย RPS 0081 B ที่นับได้จากชุดดินน้ำพอง ที่ระยะเวลา 5 วันเท่ากับ 2.2×10^{7} โคโลนีต่อกรัมดิน และเริ่มลดลงจนถึงระยะ เวลา 30 วัน หลังจากนั้นปริมาณลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^{5} โคโลนีต่อกรัมดิน ที่ระยะเวลาบ่ม 360 วัน โดยที่ 360 วันนับปริมาณเชื้อราได้เท่ากับ 2.2×10^{4} โคโลนีต่อกรัมดิน

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย RPS 0081 B ที่นับได้จากชุดดินหุบกะพง ที่ระยะเวลา 5 วัน ลดลงจากปริมาณที่ระยะเวลาเริ่มต้นเป็น 1.4 $x10^6$ โคโลนีต่อกรัมดิน และยังคงตรวจนับปริมาณได้ในช่วง 10^6 โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึง 30 วัน หลังจากนั้นปริมาณลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^4 - 10^5 โคโลนีต่อกรัมดิน จนสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 360 วัน

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย RPS 0081 B ที่นับได้จากชุดดินตาคลี ที่ระยะเวลา 5 วันเท่ากับ $1.5x10^8$ โคโลนีต่อกรัมดิน ลดลงกว่าระยะเวลาเริ่มต้น แต่ยังคงตรวจนับปริมาณได้ในช่วง 10^7 โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึง 60 วัน หลังจากนั้นปริมาณเชื้อราที่ได้จากชุดดินที่นึ่งฆ่าเชื้อลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^4 โคโลนีต่อกรัมดิน จนสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 360 วัน

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย RPS 0081 B ที่นับได้จากชุดดินเขาย้อย ที่ระยะเวลา 5 วันเท่ากับ $5.0 x10^8$ โคโลนีต่อกรัมดิน และยังคงอยู่ในช่วง 10^5 โคโลนีต่อกรัมดิน จนถึง 60 วัน หลังจากนี้ปริมาณลดลงเหลืออยู่ในช่วง 10^4โคโลนีต่อกรัมดิน จนสิ้นสุดระยะเวลาบ่ม 360 วัน

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สามารถนำปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ผลิตได้มาใช้ประโยชน์ในดินที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันได้ เพราะจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ทั้งชิดรา และแบคทีเรีย ที่เป็นส่วนประกอบหลักยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้ในปริมาณที่ลดลง และอยู่ได้ในดินเป็นระยะเวลานานถึง 360 วัน

จากการทดสอบการมีชีวิตรอดของปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้ง 3 ชนิด เมื่อเพาะลงดิน พบว่า จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้ง 3 ชนิด มีชีวิตอยู่รอดได้ในทุกชุดดิน จนถึงระยะเวลา 360 วันโดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 10^4 - 10^5 โคโลนีต่อกรัมดิน นอกจากนี้เชื้อราดังกล่าวในปุ๋ยชีวภาพยังคงมีประสิทธิภาพการละลายตะกอน $CaHPO_4$ เท่ากับหรือใกล้เคียงกับเชื้อดั้งเดิม

3. ศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตกับพืช

ศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดรา *Penicillium* sp. RPS 003 F ชนิดแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RPS 0034 B และ ชนิดเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonads* sp. RPS 0081 B ต่อการงอกของเมล็ดพืช โดยใช้เมล็ดพืช 6 ชนิดคือ กะหล่ำปลี กะหล่ำปม ผักกาดขาว ผักกาดเขียว คะน้า กวางตุ้ง เป็นตัวแทนของพืชตระกูลกะหล่ำ พบว่าปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดพืชทั้ง 6 ชนิด

ผลการศึกษาประสิทธิภาพปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตทั้ง 3 ชนิดกับ คะน้า และกวางตุ้ง พบว่า ที่ระยะเวลา 30 และ 45 วัน การใส่ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพช่วยในการเจริญเติบโตของคะน้า โดยทำให้การเจริญเติบโต และน้ำหนักต้นมากกว่าการไม่ใช้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และไม่แตกต่างกับการใช้ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะต่อคำแนะนำ

1. การศึกษาวิธีการผลิตจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในห้องปฏิบัติการพบว่า การเลี้ยงขยายปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium sp.* RPS 003 F โดยวิธี solid-substrate fermentation ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีข้าวฟ่างเป็นส่วนประกอบหลักโดยใช้ข้าวฟ่างผสมรำหยาบอัตรา 2 : 1 จะทำให้ได้สปอร์ปริมาณมากและมี shelf life ที่นานพอเพียง การเลี้ยงขยายปริมาณของ จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตชนิดแบคทีเรีย ทั้ง *Bacillus* sp. RPS 034B และ *Pseudomonads* sp. RPS 0081B ใช้วิธี liquid-substrate fermentation การเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient broth ทำให้ปริมาณเชื้อมากพอคือ 10^{10} และ 10^{12} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเลี้ยงขยายที่ระยะเวลา 3 - 4 วัน

2. การหาวัสดุพาที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถใช้ปุ๋ยหมักมูลวัวบดละเอียดและ ถ่านชีวภาพ เป็นวัสดุพาสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตได้ทั้ง 3 ชนิด และปุ๋ยชีวภาพที่ทดลองผลิตในห้องปฏิบัติการยังคงมีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตรอดชีวิตได้ในชุดดินต่างๆจนถึง 12 เดือน โดยยังคงมีปริมาณเชื้อมีชีวิต $10^4 - 10^5$ เซลล์ต่อกรัมของดิน และยังคงมีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต

3. ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทั้ง 3 ชนิด ที่ผลิตได้ มีประสิทธิภาพช่วยในการเพิ่มการเจริญเติบโตด้านความสูง และน้ำหนักคะน้า ไม่แตกต่างกับการใช้ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้ได้เทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตที่เหมาะสมกับพืชตระกูลกะหล่ำ ในเบื้องต้นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆซึ่งข้อมูลที่ได้ดังกล่าวสามารถนำมาพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตสายพันธุ์อื่นที่มีประสิทธิภาพสูงเช่นเดียวกับเชื้อรา แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส และจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตสายพันธุ์อื่น ๆ ที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงเช่นกัน แต่ต้องมีการศึกษาข้อมูลด้านอื่น ๆ เพิ่มเติม เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละประเภทแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการปัจจัยพื้นฐานแตกต่างกัน เช่น อาหาร และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการเพิ่มปริมาณเชื้อให้มีปริมาณมากให้เหมาะสมต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

ได้เทคโนโลยีการผลิต และข้อมูลพื้นฐานการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตสำหรับพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งจะเป็นแนวทางการผลิตปุ๋ยชีภาพละลายฟอสเฟตสายพันธุ์อื่น ๆ ต่อไป และสามารถนำข้อมูลที่ได้ดังกล่าวไปประยุกต์กับการผลิตปุ๋ยชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

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