บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 รวบรวมและคัดเลือกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน

จากการแยกและศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนจากตัวอย่างดินที่เก็บจากภาคเหนือ ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Azotobacter Beijerinckia* และ *Azospirillum* ดังนี้ คือ

4.1.1 *Azotobacter*

สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะ colony ต่างกันได้ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยง *Azotobacter* จากดินภาคเหนือจำนวน 10 isolates ภาคกลาง 10 isolates และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 10 isolates รวมทั้งหมด 30 isolates (ตารางที่ 6) เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไปเลี้ยงเพื่อวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งในหลอดทดลอง พบว่า ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เจริญในอาหาร *Azotobacter* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่พบว่า จากดินในภาคเหนือ จุลินทรีย์ตัวอย่างที่ Nab 012 ตรึงไนโตรเจนได้มากที่สุด คือ 682.89 μmol C_2H_4/tube/h ส่วนตัวอย่างที่เหลือมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ระหว่าง 6.65 ถึง 56.49 μmol C_2H_4/tube/h ส่วนดินในภาคกลางแบคทีเรียตัวอย่างหมายเลข Cab055 มีปริมาณการตรึงไนโตรเจนสูงสุดเท่ากับ 64.70 C_2H_4/tube/h และดินจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือตัวอย่างที่ Neab044 มีปริมาณการตรึงไนโตรเจนสูงสุดเท่ากับ 38.47 C_2H_4/tube/h ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างอื่นในภาคเดียวกัน

4.1.2 *Beijerinckia*

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ *Beijerinckia* สามารถแยกจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตมีลักษณะของโคโลนีแตกต่างกันได้ในภาคเหนือ 10 isolates ภาคกลาง 10 isolates และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 10 isolates รวมทั้งหมด 30 isolates (ตารางที่ 7) เมื่อนำมาเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนพบว่า เชื้อที่เจริญได้ในอาหารสำหรับ *Beijerinckia* ที่แยกได้ในแต่ละภาคมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยที่ในภาคเหนือจุลินทรีย์ตัวอย่างที่ Nbi 007 มีแนวโน้มที่มีประสิทธิภาพการ

ไนโตรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 723.70 µmol C_2H_4/tube/h เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ ในขณะที่ตัวอย่างที่เหลือสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในระหว่าง 1.81 ถึง 17.87 µmol C_2H_4/tube/h ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินภาคกลางตรึงไนโตรเจนได้ 1.58 ถึง 64.52 µmol C_2H_4/tube/h โดยเชื้อ Cbi016 ตรึงไนโตรเจนได้มากที่สุด คือ 64.52 µmol C_2H_4/tube/h สำหรับเชื้อที่แยกได้จากดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ระหว่าง 1.44 ถึง 26.45 µmolC_2H_4/tube/h

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter* sp. ที่วัดโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) โดยเลี้ยงเชื้อระยะเวลา 7 วัน

No.	ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากภาคเหนือ		ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากภาคกลาง		ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	
	Code. No.	µmol C_2H_4/ tube/h	Code. No.	µmol C_2H_4/ tube/h	Code. No.	µmol C_2H_4/ tube/h
1	Nab012	682.89	Cab055	64.70	Neab044	38.47
2	Nab010	56.49	Cab029	46.32	Neab033	20.84
3	Nab031	53.42	Cab058	38.83	Neab043	14.33
4	Nab028	44.13	Cab030	38.77	Neab037	13.06
5	Nab018	34.81	Cab056	27.99	Neab042	11.88
6	Nab074	26.96	Cab045	18.12	Neab012	11.61
7	Nab030	21.55	Cab005	15.82	Neab032	10.51
8	Nab078	18.76	Cab009	15.21	Neab017	8.61
9	Nab029	18.06	Cab042	10.07	Neab013	8.50
10	Nab079	6.65	Cab036	2.19	Neab031	5.81
	F-test	ns		ns		ns
	%CV	371.95		163.82		110.27

ns = non significant difference

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Beijerinckia* sp. ที่วัดโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) โดยเลี้ยงเชื้อระยะเวลา 7 วัน

No.	ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากภาคเหนือ		ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากภาคกลาง		ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	
	Code. No.	µmol C_2H_4/ tube/h	Code. No.	µmol C_2H_4/ tube/h	Code. No.	µmol C_2H_4/ tube/h
1	Nbi 007	723.70	Cbi 016	64.52	Nebi 009	26.45
2	Nbi 010	17.87	Cbi 017	31.49	Nebi 006	24.27
3	Nbi 020	11.93	Cbi 013	20.84	Nebi 019	23.55
4	Nbi 014	11.33	Cbi 011	17.76	Nebi 016	19.44
5	Nbi 002	11.04	Cbi 002	9.43	Nebi 013	19.14
6	Nbi 019	4.46	Cbi 015	7.31	Nebi 007	12.41
7	Nbi 013	4.32	Cbi 014	7.18	Nebi 021	8.96
8	Nbi 004	2.85	Cbi 010	6.54	Nebi 018	4.65
9	Nbi 011	2.66	Cbi 005	5.62	Nebi 020	1.84
10	Nbi 018	1.81	Cbi 012	1.58	Nebi 010	1.44
F-test		ns		ns		ns
%CV		425.41		198.78		142.21

ns = non significant difference

4.1.3 *Azospirillum*

ในส่วนของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* สามารถเก็บรวบรวมได้จากดินในภาคเหนือ 17 isolates (ตารางที่ 8) ภาคกลาง 12 isolates (ตารางที่ 9) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 28 isolates (ตารางที่ 10) รวมทั้งหมด 57 isolates เมื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน แล้วนำไปการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติพบว่า ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากตัวอย่างดินภาคเหนือมีจุลินทรีย์บาง isolate คือ Nazs032 Nazs038 Nazs045 มีแนวโน้มที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด คือ 51.72 47.92 และ 12.44 µmol C_2H_4/tube/h ตามลำดับ ในตัวอย่างดินภาคกลางมี isolate Cazs055 ตรึงไนโตรเจนได้มากที่สุด คือ 51.62 µmol C_2H_4/tube/h และในตัวอย่างดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

isolate Neazs003 มีแนวโน้มที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าตัวอย่างอื่น ๆ คือ 46.81 μmol C_2H_4/tube/h

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azospirillum* sp. จากตัวอย่างดินภาคเหนือที่วัดโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) เลี้ยงเชื้อระยะเวลา 7 วัน

	ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากภาคเหนือ	
No.	Code. No.	μmolC_2H_4/tube/h
1	Nazs 029	3.90
2	Nazs 030	0.19
3	Nazs 031	0.18
4	Nazs 032	51.72
5	Nazs 033	0.05
6	Nazs 034	0.09
7	Nazs 035	0.13
8	Nazs 036	0.09
9	Nazs 037	0.45
10	Nazs 038	47.92
11	Nazs 039	0.07
12	Nazs 040	0.31
13	Nazs 041	0.48
14	Nazs 042	0.24
15	Nazs 043	0.30
16	Nazs 044	0.37
17	Nazs 045	12.44
F-test		ns
%CV		336.39

ns = non significant difference

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azospirillum* sp. จากตัวอย่างดินภาคกลางที่วัดโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) เลี้ยงเชื้อระยะเวลา 7 วัน

No.	ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากภาคกลาง	
	Code. No.	$\mu molC_2H_4/tube/h$
1	Cazs 046	0.00
2	Cazs 047	0.39
3	Cazs 048	0.22
4	Cazs 049	0.00
5	Cazs 050	0.00
6	Cazs 051	0.00
7	Cazs 052	0.06
8	Cazs 053	2.32
9	Cazs 054	0.00
10	Cazs 055	51.62
11	Cazs 056	0.06
12	Cazs 057	0.14
F-test		ns
%CV		565.59

ns = non significant difference

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azospirillum* sp. จากตัวอย่างดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่วัดโดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) เลี้ยงเชื้อระยะเวลา 7 วัน

	ตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	
No.	Code. No.	$\mu molC_2H_4/tube/h$
1	Neazs 001	0.15
2	Neazs 002	0.12
3	Neazs 003	46.81
4	Neazs 004	0.07
5	Neazs 005	0.03
6	Neazs 006	0.21
7	Neazs 007	0.06
8	Neazs 008	0.68
9	Neazs 009	0.28
10	Neazs 010	0.28
11	Neazs 011	0.40
12	Neazs 012	0.19
13	Neazs 013	0.09
14	Neazs 014	1.75
15	Neazs 015	0.66
16	Neazs 016	0.21
17	Neazs 017	0.52
18	Neazs 018	0.03
19	Neazs 019	0.19
20	Neazs 020	0.34
21	Neazs 021	0.34
22	Neazs 022	0.70
23	Neazs 023	0.00
24	Neazs 024	0.38
25	Neazs 025	0.17
26	Neazs 026	0.23
27	Neazs 027	0.07
28	Neazs 028	0.28
F-test		ns
%CV		609.79

ns = non significant difference

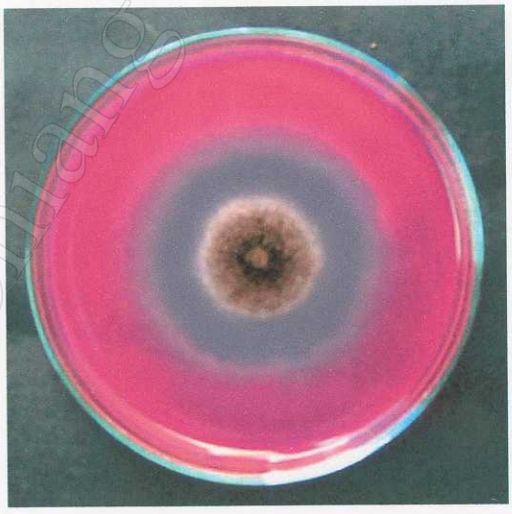
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

จากข้อมูลการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่ได้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลองบ่มกับปุ๋ยหมักในขั้นตอนต่อไปได้ดังนี้ คือ *Azotobacter* ใช้ตัวอย่าง Nab012 *Beijerinckia* ใช้ตัวอย่าง Nbi007 และเชื้อ *Azotospirillum* ใช้ตัวอย่าง Nazs032 ซึ่งมีแนวโน้มตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน

4.2 รวบรวมและคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต

4.2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟตบนอาหารแข็ง

ในการแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการสังเกต clear zone เกิดขึ้นรอบ ๆ colony ของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek ที่มี $CaH(PO_4)$ เป็นแหล่งฟอสฟอรัส (รูปที่ 2) สามารถเก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิด clear zone รอบ ๆ colony ได้ 6 isolates โดยทั้งหมดเป็นเชื้อรา ได้แก่ ตัวอย่างหมายเลข F001 F002 F003 F004 F005 และ F006 (ตารางที่ 11) ซึ่งได้นำเชื้อราทั้งหมดนี้ไปทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟอสเฟตในอาหารที่มี $Ca_3(PO_4)$ ซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสที่ละลายได้ยาก โดยใช้การเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างความกว้างของ colony และ clear zone ในการคัดเลือกประสิทธิภาพเบื้องต้น โดยใช้เกณฑ์ของสัดส่วนที่น้อยที่สุดเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายฟอสเฟตได้มากที่สุด



รูปที่ 2 ลักษณะการเกิด clear zone รอบ colony ของเชื้อรา

ตารางที่ 11 สัดส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ colony ต่อ clear zone ของเชื้อที่ย่อยสลายฟอสเฟตแต่ละ isolates ที่ระยะ 2 3 4 5 และ 6 วัน

Isolate	วันที่				
	2	3	4	5	6
F001	0.79b	0.75b	0.72c	0.71c	0.72b
F002	0.30e	0.48c	0.51e	0.55d	0.57c
F003	0.40d	0.48c	0.62d	0.64c	0.66b
F004	0.49c	0.44c	0.60d	0.64c	0.69b
F005	1.00a	1.00a	0.84b	0.81a	0.79a
F006	1.00a	1.00a	0.99a	0.75b	0.77a
F-test	*	*	*	*	*
%CV	11.78	6.47	7.04	10.17	8.94

* ค่าเฉลี่ยในแต่ละสดมภ์ที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกัน แตกต่างกันที่ $P \leq 0.05$

พบว่าในทุกระยะของการเจริญเติบโตเชื้อราแต่ละ isolate ทำให้เกิด clear zone ในสัดส่วนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กล่าวคือ ในระยะแรกของการเจริญเติบโตในวันที่ 2 และวันที่ 3 เชื้อราที่มีสัดส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ colony และ clear zone ต่ำ ได้แก่ isolate F002 F003 และ F004 ซึ่งหมายถึง เชื้อราในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยละลายฟอสเฟตได้มากกว่าเชื้อรา isolate F001 F005 และ F006 สำหรับในวันที่ 4 5 และ 6 สัดส่วนของเชื้อรา isolate F002 F003 และ F004 เพิ่มสูงขึ้น แต่ก็ยังต่ำกว่า เชื้อ isolate F001 F005 และ F006 ที่ลดลงเล็กน้อย ในระยะการเจริญเติบโตนี้ (4 ถึง 6 วัน) สัดส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ colony และ clear zone เกือบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อรา isolate F002 มีสัดส่วนต่ำกว่าเชื้ออื่น ๆ ในทุกระยะของการเจริญเติบโตอย่างชัดเจน

4.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟตในอาหารเหลว

เพื่อให้ทราบแน่ชัดถึงประสิทธิภาพการปลดปล่อยฟอสฟอรัสในปริมาณที่มากที่สุดของเชื้อราจึงได้เลือกเชื้อรา isolate F001 F002 F003 และ F004 ซึ่งมีสัดส่วนของ colony ต่อ clear zone ต่ำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี $Ca_3(PO_4)_2$ เป็นแหล่งของฟอสฟอรัส โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลง pH ในอาหารเหลว การปลดปล่อย phosphatase enzyme และการปลดปล่อยฟอสฟอรัส ผลการทดสอบพบว่า ในช่วง 3 วันแรก เชื้อราทุก isolate ให้น้ำหนักแห้งของเซลล์

(dry biomass) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 12) ตั้งแต่ 0.010-0.011 กรัม/ มิลลิลิตร และในช่วง 7 วัน หลังการใส่เชื้อมีน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 0.013 – 0.014 กรัม/ มิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเชื้อราที่มีอายุ 3และ 5 วัน

ตารางที่ 12 น้ำหนักแห้งของเชื้อราที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek

Isolate	3 วัน	5 วัน	7 วัน
	กรัม/มิลลิลิตร		
F001	0.011	0.013	0.014
F002	0.010	0.012	0.013
F003	0.011	0.010	0.013
F004	0.011	0.014	0.013
F-test	ns	ns	ns
%CV	4.94	21.83	8.27

ns = non significant difference

การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเหลว (ตารางที่ 13) พบว่าเชื้อราทุก isolate ทำให้ pH ของอาหารลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในระยะ 3 วัน หลังการเลี้ยงปรากฏว่า isolate F002 และ F004 ทำให้ pH ของอาหารลดลงจาก 5.99 เป็น 2.80 และ 2.96 ตามลำดับ ส่วนอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยง isolate F003 มี pH 3.07 ซึ่งสูงกว่า isolate F004 และ F002 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ isolate F001 มี pH 4.46 ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบในระหว่างเชื้อราด้วยกัน ในช่วง 5 วันหลังการใส่เชื้อ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ isolate F002 F003 และ F004 อยู่ในระดับใกล้เคียงกัน คือ 2.58 2.69 และ 2.57 ส่วนที่ระยะ 7 วัน หลังการใส่เชื้อ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำกว่าในระยะ 3 และ 5 วัน โดยที่เชื้อรา isolate F004 ทำให้ pH ลดลงมากที่สุด คือ มี pH 2.09 รองลงมา คือ F003 F002 และ F001 ตามลำดับ ซึ่งทุก isolate มีความแตกต่างและแตกต่างจาก control ซึ่งไม่ใส่เชื้อด้วย

ตารางที่ 13 ผลของการใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟตต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek

Isolate	3 วัน	5 วัน	7 วัน
		pH	
Ctr	5.99a	6.05a	5.94a
F001	4.46b	4.12b	3.95b
F002	2.80d	2.58c	2.66c
F003	3.07c	2.69c	2.43d
F004	2.96d	2.57c	2.09e
F-test	*	*	*
%CV	3.68	3.32	3.50

* ค่าเฉลี่ยในแต่ละสดมภ์ที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกัน แตกต่างกันที่ $P \leq 0.05$

Ctr อาหารใส่เชื้อที่ไม่มีการใส่เชื้อจุลินทรีย์

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 14) พบว่าในช่วง 3 วันหลังการใส่เชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ F003 มีปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้มากที่สุด (1,091 ppm) ในขณะที่อาหารที่ใส่เชื้อ F002 และ F004 มีประมาณ 953 และ 916 ppm ซึ่งแตกต่างจาก F003 อย่างมีนัยสำคัญ และ isolate F001 ให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ control ซึ่งไม่ใส่เชื้อ พบว่า การใส่เชื้อทุก isolate ทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ $Ca_3(PO_4)_2$ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในช่วง 5 วัน หลังการใส่เชื้อพบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุก isolate ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับช่วง 3 วันแรก ในระยะนี้เชื้อที่ทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้มีมากที่สุด คือ เชื้อ F004 (698 ppm) รองลงมา คือ เชื้อ F002 และ F003 ซึ่งไม่แตกต่างกันและให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ในช่วง 599-610 ppm ส่วน isolate F001 พบปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ 458 ppm ซึ่งต่ำกว่าเชื้อ 3 isolate แรกอย่างมีนัยสำคัญ ในช่วง 7 วัน ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ F001 F002 และ F003 สูงกว่าช่วง 5 วันเล็กน้อย ในช่วงนี้เชื้อ F003 ทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้มีมากที่สุด ประมาณ 709 ppm ส่วนเชื้อ F002 และ F004 ให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ในระดับใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 638-646 ppm ส่วน F001 ให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ 567 ppm ซึ่งต่ำกว่าเชื้อรา 3 isolate แรกอย่างมีนัยสำคัญ การที่ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ในขณะที่น้ำหนักแห้งของเซลล์เพิ่มขึ้น แสดงว่าเชื้อราได้ใช้ฟอสฟอรัสที่ละลายได้เพื่อการสร้างเซลล์

ตารางที่ 14 ผลของการใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟตต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek

Isolate	3 วัน	5 วัน	7 วัน
		ppm	
Ctr	216.74d	137.28d	118.94d
F001	722.62c	457.52c	566.68c
F002	953.41b	610.34b	638.41b
F003	1090.63a	599.43b	708.58a
F004	915.98b	697.67a	646.21b
F-test	*	*	*
%CV	11.32	16.83	6.26

* ค่าเฉลี่ยในแต่ละสดมภ์ที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกัน แตกต่างกันที่ $P \leq 0.05$

Ctr อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

จากการตรวจสอบปริมาณของเอ็นไซม์ acid phosphatase ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 15) พบว่า ในช่วง 3 วันแรก เชื้อ F002 F003 และ F004 มีความสามารถผลิตเอ็นไซม์ชนิดดังกล่าวดีกว่าเชื้อ F001 แต่ในระยะ 5 และ 7 วัน เชื้อ F003 สามารถสร้างเอ็นไซม์ได้ดีกว่าเชื้อ F002 และ F004 อย่างมีนัยสำคัญ และในช่วง 7 วันปริมาณของเอ็นไซม์ชนิดนี้มีมากกว่าที่อยู่ในช่วง 3 และ 5 วันหลังการใส่เชื้อ

จากการที่พบปริมาณเอ็นไซม์ acid phosphatase ในช่วง 7 วัน ในปริมาณที่สูงกว่าในช่วง 3-5 วันแรก และพบว่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงดังกล่าวต่ำกว่าที่พบในช่วง 3-5 วันแรก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Weaver และคณะ (1994) ที่พบว่า กิจกรรมของเอ็นไซม์ phosphatase มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่า pH ของดิน ประกอบกับปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้ลดลงและน้ำหนักแห้งของเซลล์โดยทั่วไปก็เพิ่มขึ้น แสดงว่าในช่วงดังกล่าวกิจกรรมการละลายฟอสฟอรัสของเชื้อราเหล่านี้น่าจะเกิดได้ดีกว่าช่วง 3-5 วันแรก เนื่องจาก F003 สามารถผลิตเอมไซม์ acid phosphatase ได้สูงกว่าเชื้อราอื่นและทำให้ pH ของอาหารลดลงได้ดีเป็นอันดับรองจากเชื้อ F004 แต่ทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายได้เพิ่มขึ้นได้ดีที่สุด ดังนั้นเชื้อ F003 เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการละลายฟอสเฟต เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราทั้งหมดที่ใช้ทดสอบจำนวน 4 isolates ดังนั้นจึงใช้เชื้อรา isolate F003 ซึ่งจากการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าเป็น *Aspergillus* นำไปหมักร่วมกับปุ๋ยหมักในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายฟอสเฟตต่อไป

ตารางที่ 15 ปริมาณเอ็นไซม์ phosphatase ที่ได้จากการใส่เชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek

Isolate	3 วัน	5 วัน	7 วัน
		µg/L	
F001	145.09b	158.73c	149.40c
F002	230.51a	242.71b	298.70b
F003	226.92a	280.03a	488.19a
F004	226.92a	211.13b	226.92b
F-test	*	*	*
%CV	4.00	8.46	13.86

* ค่าเฉลี่ยในแต่ละสดมภ์ที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกัน แตกต่างกันที่ $P \leq 0.05$

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการตรึงไนโตรเจนและการย่อยสลายฟอสเฟตในปุ๋ยหมัก

4.3.1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในปุ๋ยหมัก (ตารางที่ 16)

จากการใส่เชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ *Azotobacter Beijerinckia* และ *Azospirillum* ลงในปุ๋ยหมักที่ได้จากการหมักตะกอนหม้อกรองของโรงงานน้ำตาล (filter cake) พบว่า การใส่เชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดในอัตรา 10^8 cfu/กรัมปุ๋ยหมัก ในระยะ 2 สัปดาห์หลังจากการหมักมีปริมาณไนโตรเจนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปุ๋ยหมักที่ไม่ได้ใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแต่มีแนวโน้มว่าถ้าใส่กากน้ำตาล (molasses) ร่วมกับหินฟอสเฟตและจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนและจุลินทรีย์ย่อยหินฟอสเฟตทำให้ปริมาณไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้นประมาณ 29% จากปุ๋ยหมักที่ไม่ได้ใส่จุลินทรีย์ ขณะที่ถ้าไม่ใส่ molasses ปริมาณไนโตรเจนลดลงเล็กน้อย สำหรับในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าปริมาณไนโตเจนในปุ๋ยหมักที่ใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอย่างเดียวหรือใส่ร่วมกับจุลินทรีย์ย่อยสลายหินฟอสเฟตมีปริมาณลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปุ๋ยหมักที่ไม่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์หรือหินฟอสเฟต ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะในปุ๋ยหมักที่ใส่แบคทีเรียตรึงไนโตเจนจะมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย รวมทั้งมีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ละลายออกมา ทำให้เป็นประโยชน์กับจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีกิจกรรม nitrification และ denitrification ทั้งที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิด โดยจะเห็นได้จากในระยะ 2 สัปดาห์แรกของการหมักในภาชนะที่ใช้หมักยังมีอากาศอยู่บ้างจุลินทรีย์ *Nitrosomonas* และ *Nitrobacter* จะเปลี่ยนแอมโมเนียม

ไนโตรเจน (NH_4^+)ให้ไปอยู่ในรูปของไนเตรต (NO_3^-) แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปอากาศที่มีอยู่ในภาชนะที่ใช้บ่มปุ๋ยหมักลดน้อยลงจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีความสามารถทำให้เกิดกระบวนการ denitrification ซึ่งจะเกิดขึ้นต่อเมื่ออยู่ในที่อับอากาศ เช่น แบคทีเรีย *Alcaligen* และ *Pseudomonas* และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* หรือ *F. solani* ถ้าอยู่ในที่มีออกซิเจนน้อยจะเปลี่ยน nitrite ให้เป็น nitrous oxide (Bollag and Tung, 1972 อ้างโดย Elsas, *et al.*, 1997) หรือถ้าในสภาพอับอากาศนานประมาณ 7 วันเชื้อรา *Fusarium* และ *Talaromyces flavus* ก็สามารถทำให้เกิดกระบวน denitrification จาก NO_2^- หรือ NO_3^- ได้เช่นเดียวกัน (Shoun *et al.*, 1992 อ้างโดย Elsas *et al.*, 1997) ดังนั้นไนโตรเจนที่มีอยู่ในปุ๋ยหมักจึงถูกเปลี่ยนเป็น N_2 ระเหยออกไปทำให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในปุ๋ยหมักลดน้อยลง

ตารางที่ 16 ผลของเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนและเชื้อราสลายฟอสเฟต ต่อปริมาณของ N ทั้งหมดในปุ๋ยหมัก ภายหลังการใส่เชื้อเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

Total N	%N	
	2 สัปดาห์	4 สัปดาห์
Ctr	0.76	0.67a
N	0.65	0.66a
P	0.61	0.55b
N+P	0.65	0.65a
N+P+molasses	0.98	0.61c
F-test	ns	*
%CV	6.58	9.30

ns = non significant difference

* ค่าเฉลี่ยในแต่ละสดมภ์ที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกัน แตกต่างกันที่ $P \leq 0.05$

Ctr : ปุ๋ยหมักอย่างเดียว

N : ใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน

P : ใส่จุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต

N+P : ใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนและย่อยสลายฟอสเฟต

N+P+molasses : ใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนและย่อยสลายฟอสเฟตและกากน้ำตาล

4.3.2 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายหินฟอสเฟต

จากตารางที่ 17 การบ่มปุ๋ยหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนและเชื้อราย่อยสลายฟอสเฟตพบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากการบ่ม การใส่เชื้อราร่วมกับหินฟอสเฟตหรือใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนร่วมด้วยไม่ทำให้ปุ๋ยหมักมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปุ๋ยหมักที่ไม่ได้ใส่หินฟอสเฟตแต่มีแนวโน้มว่าการใส่หินฟอสเฟตและเชื้อราทำให้มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มมากขึ้น ส่วนในระยะ 4 สัปดาห์ หลังการบ่มปุ๋ยหมักพบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยหมักที่ใส่หินฟอสเฟตและจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นมากกว่าปุ๋ยหมักที่ไม่ได้ใส่หินฟอสเฟตอย่างชัดเจน($P \leq 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใส่หินฟอสเฟตร่วมกับจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนและเชื้อราทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์มีมากที่สุดรองลงมาได้แก่ การใส่หินฟอสเฟตกับเชื้อราอย่างเดียวและการใส่ molasses ร่วมด้วย โดยที่การใส่หินฟอสเฟตร่วมกับเชื้อราทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น 31.4% ในขณะที่การใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนร่วมด้วยปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นประมาณ 38.5% ส่วนการใส่ molasses ร่วมกับหินฟอสเฟตแล้วบ่มด้วยจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ทำให้ฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นประมาณ 25.6% ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าฟอสฟอรัสส่วนหนึ่งสะสะอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งในการบ่มปุ๋ยโดยมีแหล่งคาร์บอนที่ได้มาจาก molasses ทำให้มีปริมาณจุลินทรีย์เจริญมากขึ้น แต่ปริมาณฟอสฟอรัสและไนโตรเจนที่สะสมอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์จะค่อย ๆ ถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้ตายลง โดยใช้เวลาบ่มปุ๋ยหมักนานขึ้นหรือเมื่อนำปุ๋ยไปใช้ประโยชน์ในการปลูกพืช

ตารางที่ 17 ผลของเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนและเชื้อราสลายฟอสเฟต ต่อ available P ในปุ๋ยหมักภายหลังการใส่เชื้อเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

AvailableP	2 สัปดาห์	4 สัปดาห์
	ppm	
Ctr	3658.85	3636.07c
N	3486.33	3811.85c
P	4329.43	4778.65b
N+P	3951.82	5034.40a
N+P+molass	3639.32	4567.06b
F-test	ns	*
%CV	13.89	5.95

ns = non significant difference

* ค่าเฉลี่ยในแต่ละสดมภ์ที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกัน แตกต่างกันที่ $P \leq 0.5$

Ctr : ปุ๋ยหมักอย่างเดียว

N : ใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน

P : ใส่จุลินทรีย์ย่อยสลายฟอสเฟต

N+P : ใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนและย่อยสลายฟอสเฟต

N+P+molasses : ใส่จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนและย่อยสลายฟอสเฟตและกากน้ำตาล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University