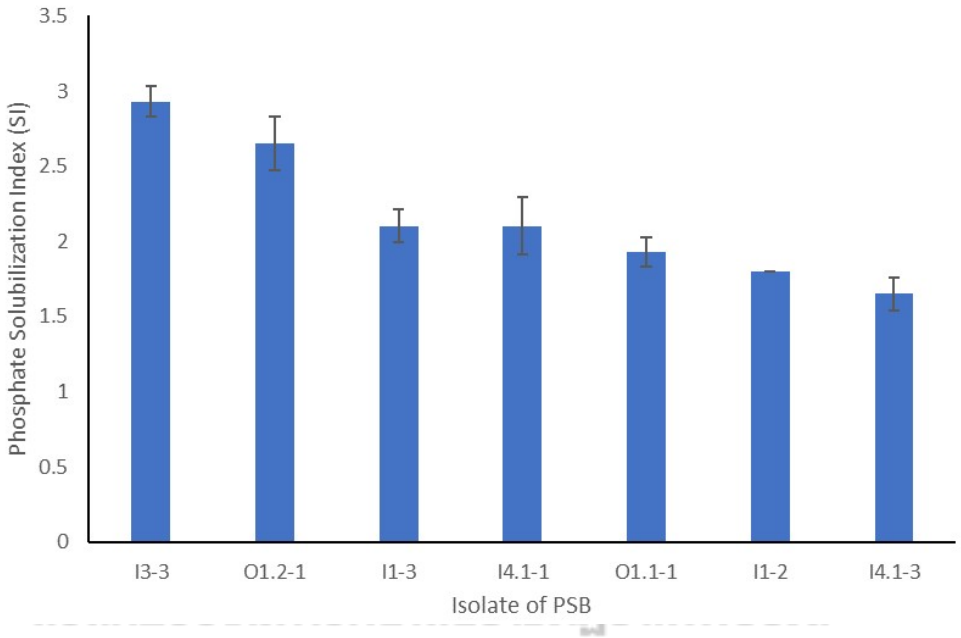
บทที่ 4
ผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรีย PSB ที่มีความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต

จากการคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินสวนผลไม้จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรีย PSB ที่ให้วงใสบนอาหารแข็ง PVK ได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตโดยพิจารณาจากค่าดัชนีการละลาย (SI) จาก 13 ไอโซเลท พบว่ามี 7 ไอโซเลท ที่สามารถละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตได้ โดยมีค่า SI อยู่ในช่วง 1.65 ถึง 2.93 โดยไอโซเลท I3-3 มีค่าดัชนีการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตสูงที่สุดเท่ากับ 2.93 ± 0.10 รองลงมาคือ ไอโซเลท O1.2-1 (2.65 ± 0.18) (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทนี้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป



ภาพที่ 4.1 ดัชนีการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตของแบคทีเรีย PSB

ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างแบคทีเรีย PSB ไอโซเลทที่แสดงกิจกรรมการละลายฟอสเฟต โดยเกิดวงใสรอบดิสก์มาตรฐาน

ผลการจำแนกจีนัสของแบคทีเรียที่มีความสามารถละลายฟอสเฟต

จากการคัดเลือกแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลท I3-3 และ O1.2-1 ที่มีค่าดัชนีการละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดบนอาหารแข็ง PVK นำมาจัดจำแนกจีนัสโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ พบไอโซเลท I3-3 มีลักษณะโคโลนีสีขาว ขอบเรียบ กลมนูน (ภาพที่ 4.3ก) จัดอยู่ในแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน การเรียงตัวของเซลล์ต่อกันเป็นสายสั้น (ภาพที่ 4.4ก) ไอโซเลท O1.2-1 มีลักษณะโคโลนีสีขาวเหลือง ขอบเรียบ กลมนูน (ภาพที่ 4.3ข) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลม เรียงตัวต่อกันเป็นสายสั้น (ภาพที่ 4.4ข) ส่วนผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อการจัดจำแนกจีนัสของทั้ง 2 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 4.1 จากข้อมูลทั้งหมดจึงสามารถจัดจำแนกจีนัสของแบคทีเรียได้เป็น *Alcaligense* sp. I3-3 และ *Xantrobacter* sp. O1.2-1 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกจีนัสของแบคทีเรียไอโซเลท I3-3 และ O1.2-1

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และปฏิกิริยาชีวเคมี	**I3-3**	**O1.2-1**
Gram stain	Negative	Negative
Cell	rod	rod
Nutrient broth	+	-
Oxidase test	+	+
Catalase test	+	+
Indole Production test	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

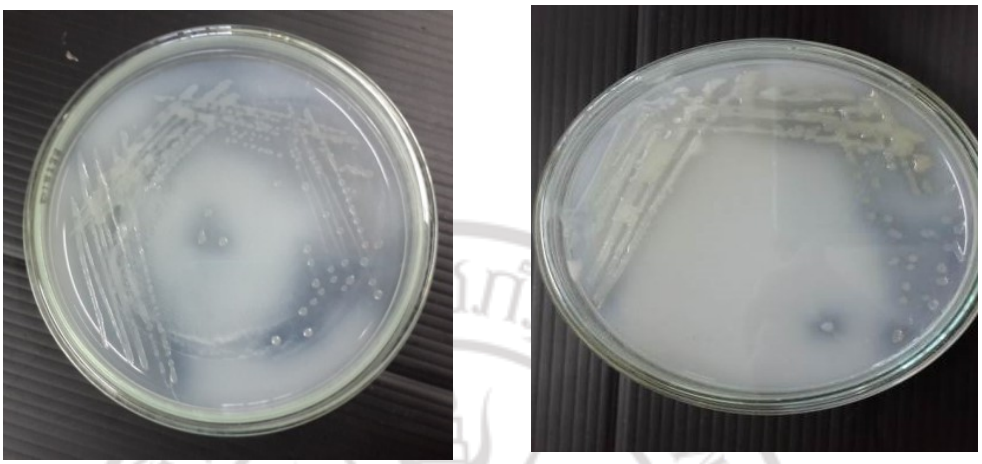
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และปฏิกิริยาชีวเคมี	I3-3	O1.2-1
Motility test	+	+
Nitrate and Nitrite test	-	+
Lysine decarboxylase	-	-
Citrate Utilization	+	-
Urease test	-	-
MacConkey agar	pink	white
TSI	A/A-	N/N
Oxidation-Fermentation	fermentative	oxidative
Gelatin hydrolysis	-	-
Acid from glucose	+	-
Carbon sources for growth:*		
D – Glucose	-	-
L – Arabinose	-	-
D - Mannitol	-	-
ผลการจัดจำแนก	*Alcaligenes*	*Xantrobacter*

หมายเหตุ :

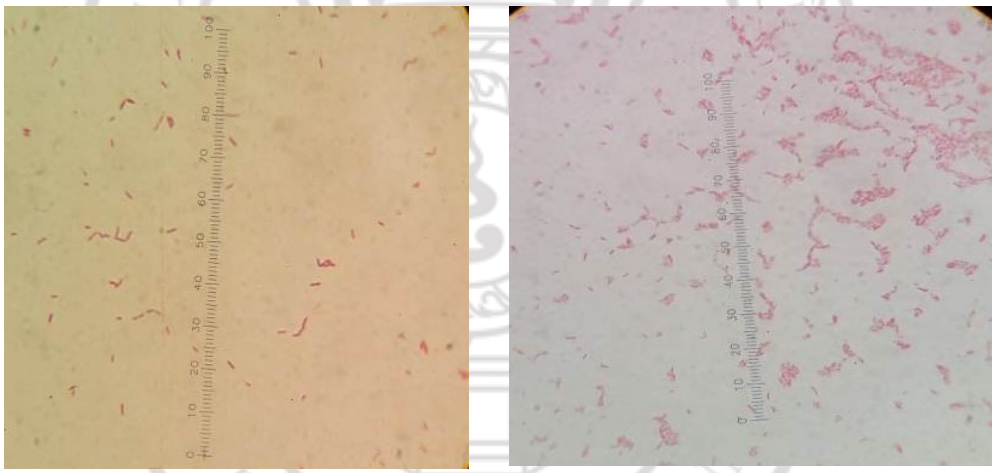
+	คือ	เชื้อมีเอนไซม์ที่ทดสอบ หรือเจริญได้ในแหล่งสารตั้งต้น
-	คือ	เชื้อไม่มีเอนไซม์ที่ทดสอบ หรือเจริญได้ในแหล่งสารตั้งต้น
A/A	คือ	แบคทีเรียหมักย่อยน้ำตาลได้มากกว่า 1 ชนิด เกิดสีเหลืองทั้งหมด
N/N	คือ	แบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลใด ๆ เลย
Fermentative	คือ	แบคทีเรียมีการย่อยคาร์โบไฮเดรตแบบ Fermentative
Oxidative	คือ	แบคทีเรียมีการย่อยคาร์โบไฮเดรตแบบ Oxidative
[*]	คือ	ผลการทดสอบ API 20 E

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ก. ข.

ภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของไอโซเลท I3-3 (ก.) และ O1.2-1 (ข.) บนอาหารแข็ง PVK



ก. ข.

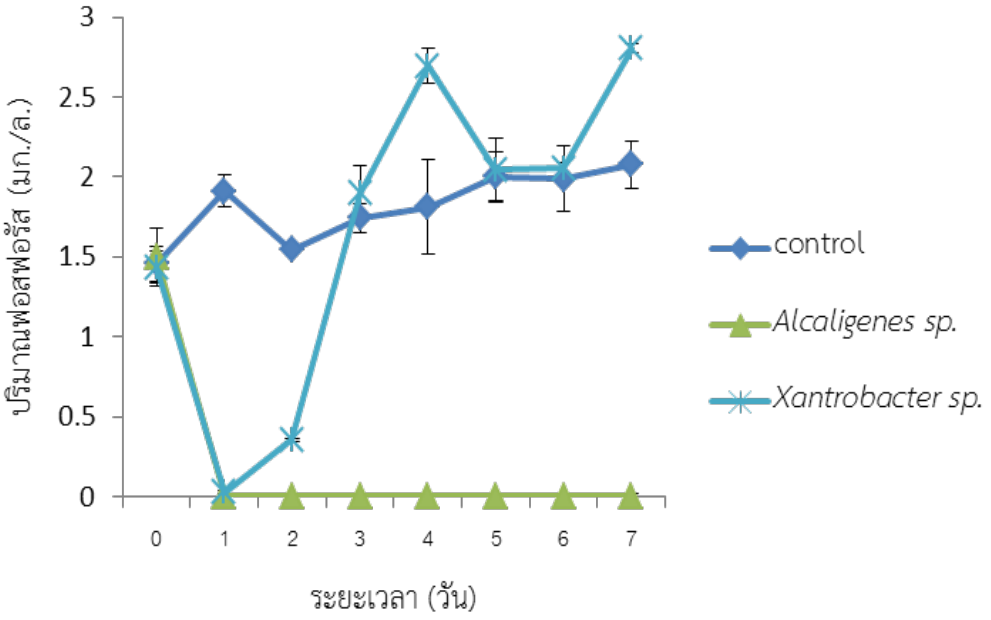
ภาพที่ 4.4 ลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ของไอโซเลท I3-3 (ก.) และ O1.2-1 (ข.) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ปริมาณการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตของ *Alcaligenes* sp. I3-3 และ *Xantrobacter* sp. O1.2-1

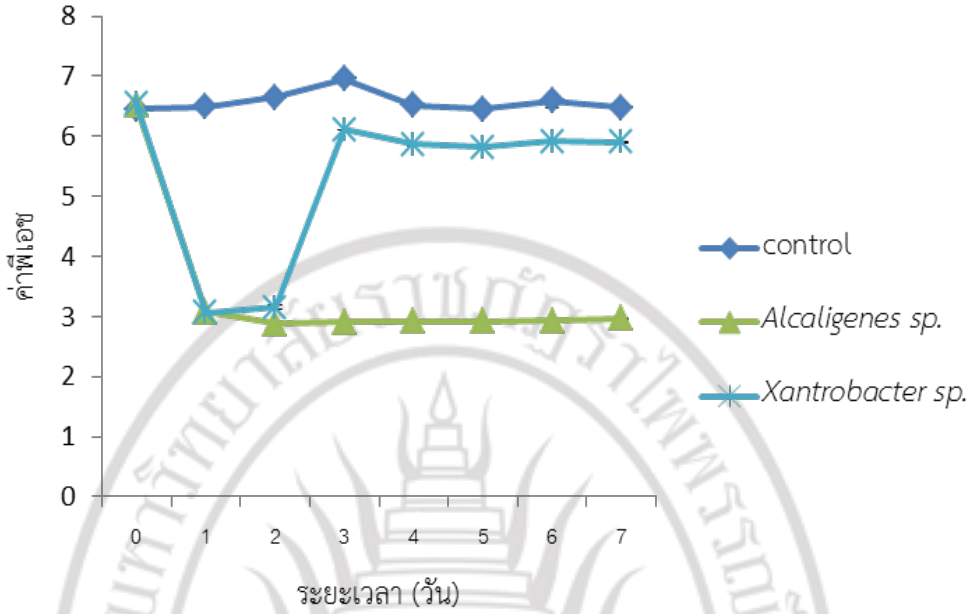
จากการทดสอบประสิทธิภาพการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตของ *Alcaligenes* sp. I3-3 และ *Xantrobacter* sp. O1.2-1 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไตรแคลเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ ด้วยวิธีมาตรฐานโมลิบดีนัมบลู ผลการทดลองพบว่า ในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อมีปริมาณฟอสฟอรัสอยู่ในช่วง 1.45 ± 0.10 ถึง 2.07 ± 0.15 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนในชุดทดลองที่เติมเชื้อวันที่ 0 มีปริมาณฟอสฟอรัสละลายอยู่ในอาหารเหลวมีค่าเท่ากับ 1.43 ± 0.09 ถึง 1.44 ± 0.18 มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ 4.5) และมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.51 ± 0.00 ถึง 6.55 ±

0.00 (ภาพที่ 4.6) สำหรับชุดทดลองที่เติม *Alcaligenes* sp. I3-3 พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสลดลงจาก 1.49 ± 0.18 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 0 เป็น 0.00 ± 0.00 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 1 และมีค่าคงที่ตลอดการทดลอง 7 วัน (ภาพที่ 4.5) สอดคล้องกับค่าพีเอช ซึ่งลดลงจาก 6.51 ± 0.00 ในวันที่ 0 เป็น 3.07 ± 0.00 ในวันที่ 1 และมีค่าคงที่ตลอดการทดลอง 7 วัน (ภาพที่ 4.6) ส่วนชุดทดลองที่เติม *Xantrobacter* sp. O1.2-1 พบว่ามีปริมาณฟอสฟอรัสลดลงจาก 1.43 ± 0.09 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 0 เป็น 0.02 ± 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 1 หลังจากนั้นมีปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นตลอดการทดลองโดยในวันที่ 7 มีปริมาณ 2.80 ± 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ 4.5) ส่วนค่าพีเอชในอาหารมีค่าลดลงจาก 6.55 ± 0.00 ในวันที่ 0 เป็น 3.06 ± 0.01 ในวันที่ 1 หลังจากนั้นมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นสูงที่สุด วันที่ 3 วัดได้ 6.10 ± 0.00 แล้วคงที่ตลอดการทดลอง (ภาพที่ 4.6) ผลที่ได้จากการทดลองนี้พบว่า *Xantrobacter* sp. O1.2-1 มีประสิทธิภาพการละลายได้ดีกว่าชุดควบคุม 0.72 ± 0.12 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพที่ 4.5 ปริมาณการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต ของแบคทีเรีย PSB เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PVK ที่เติมไตรแคลเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน ข้อมูลที่แสดงเป็น Mean ± SD

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

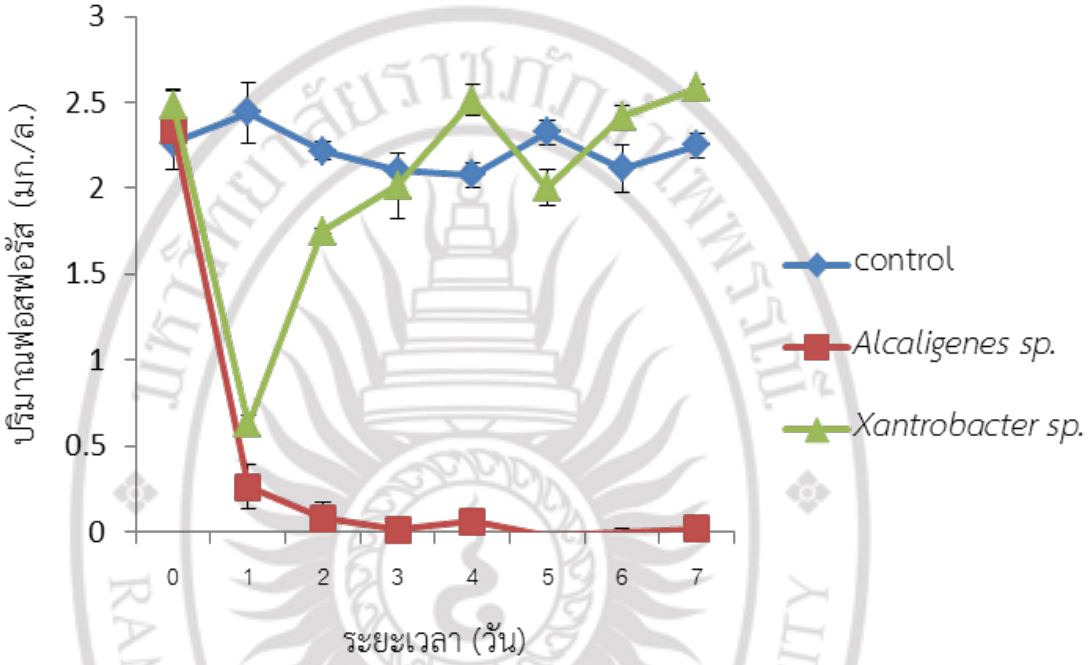


ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในชุดทดลองที่เติมแบคทีเรีย PSB เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PVK ที่เติมไตรแคลเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน ข้อมูลที่แสดงเป็น Mean ± SD

ปริมาณการละลายเฟอร์ริกฟอสเฟตของ *Alcaligenes* sp. I3-3 และ *Xantrobacter* sp. O1.2-1

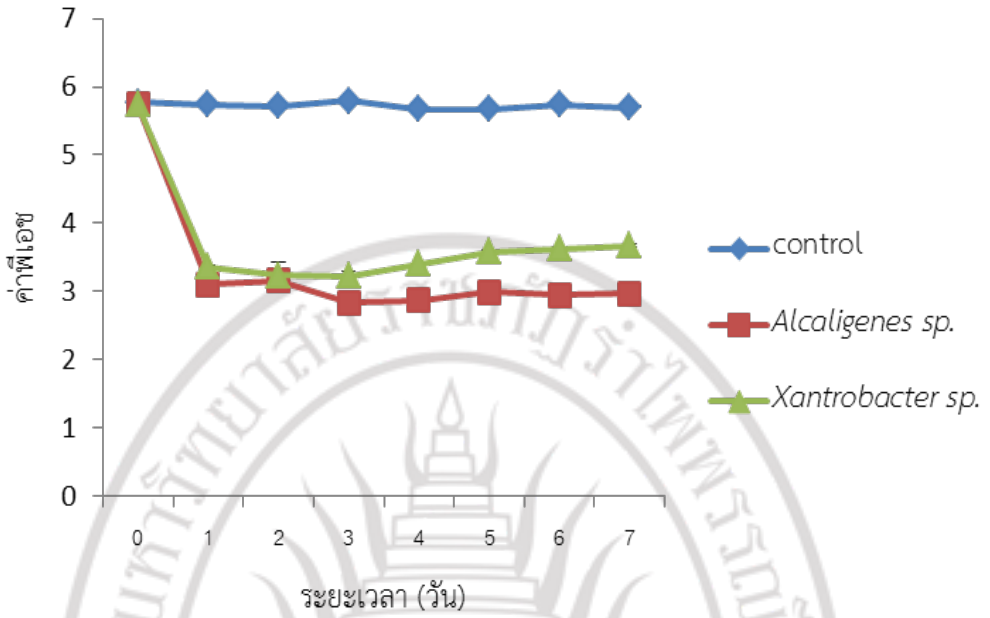
ในการทดลองนี้มีการเปลี่ยนจากการเติมฟอสเฟตในรูปแคลเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัม/ลิตร เป็นเฟอร์ริกฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร เพื่อเป็นการเลียนแบบการตกตะกอนของฟอสเฟตในธรรมชาติที่อาจพบการตกตะกอนของฟอสเฟตในรูปแบบอื่น ๆ นอกเหนือจากแคลเซียมฟอสเฟต ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อมีปริมาณฟอสฟอรัสอยู่ในช่วง 2.24 ± 0.06 ถึง 2.26 ± 0.15 มิลลิกรัม/ลิตร ตลอดการทดลอง (ภาพที่ 4.7) เช่นเดียวกับค่าพีเอชในอาหารมีค่าคงที่ ในช่วง 5.69 ± 0.01 ถึง 5.77 ± 0.02 ตลอดการทดลอง 7 วัน (ภาพที่ 4.8) ชุดการทดลองที่เติม *Alcaligenes* sp. I3-3 พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสลดลงจาก 2.34 ± 0.22 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 0 เป็น 0.26 ± 0.12 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 1 และมีปริมาณที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ตลอดการทดลอง 7 วัน (ภาพที่ 4.7) สอดคล้องกับค่าพีเอชซึ่งลดลงจาก 5.74 ± 0.05 ในวันที่ 0 เป็น 3.10 ± 0.05 ในวันที่ 1 และมีค่าคงที่ตลอดการทดลอง 7 วัน (ภาพที่ 4.8) ชุดทดลองที่เติม *Xantrobacter* sp. O1.2-1 พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสลดลงจาก 2.48 ± 0.08 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 0 เป็น 0.62 ± 0.05 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 1 จากนั้นมีปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นตลอดการทดลองโดยวันที่ 7 มีปริมาณสูงสุด 2.58 ± 0.01

มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ 4.7) ผลจากการทดลองนี้พบว่า *Alcaligenes* sp. I3-3 มีประสิทธิภาพการละลายเฟอร์ริกฟอสเฟตต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ ในขณะที่ *Xantrobacter* sp. O1.2-1 มีประสิทธิภาพการละลายเฟอร์ริกฟอสเฟตได้สูงกว่าชุดควบคุม 0.45 ± 0.21 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพที่ 4.7 ปริมาณการละลายเฟอร์ริกฟอสเฟต ของแบคทีเรีย PSB เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PVK ที่เติมเฟอร์ริกฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน ข้อมูลที่แสดงเป็น Mean ± SD

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในชุดทดลองที่เติมแบคทีเรีย PSB เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PVK ที่เติมเฟอร์ริกฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน ข้อมูลที่แสดงเป็น Mean ± SD

การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตพร้อมใช้

จากการนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง (*Xantrobacter* sp. O1.2-1) มาพัฒนาให้อยู่ในรูปหัวเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสูตรน้ำพร้อมใช้ โดยเตรียมหัวเชื้อพร้อมใช้ในรูปของเซลล์ที่มีชีวิตจำนวนมาก (~ 10^8 cfu/ml) เก็บรักษาหัวเชื้อในสูตรน้ำ (Liquid formulation) ที่แตกต่างกัน 5 สูตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืด อุณหภูมิห้อง เพื่อจำลองสภาพการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์ เป็นเวลา 3 เดือน วิเคราะห์ประสิทธิภาพของสูตรอาหารโดยการนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทุกเดือน เป็นเวลา 3 เดือน และทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตบนอาหาร PVK ของหัวเชื้อที่เก็บครบ 3 เดือน จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 พบว่าเซลล์ที่มีชีวิตของ *Xantrobacter* sp. O1.2-1 ที่เก็บรักษาในหัวเชื้อสูตรน้ำชนิดต่าง ๆ มีปริมาณเซลล์ในช่วง 10^7-10^8 cfu/ml ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเริ่มต้นการทดลอง (เดือนที่ 0) มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากัน (~10^8 cfu/ml) ในทั้ง 5 สูตร liquid formulations หลังจากนั้นปริมาณเซลล์ในทั้ง 5 สูตร มีปริมาณเซลล์ลดลง 1 log cycle (~10^7 cfu/ml) ในเดือนที่ 1 และค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลองในเดือนที่ 3

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ *Xantrobacter* sp. O1.2-1 (cfu/ml) ที่เก็บรักษาในหัวเชื้อสูตรน้ำชนิดต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

Formulation no.	0 month	1st month	2nd month	3rd month
PB	3.2×10^8	1.5×10^7	1.3×10^7	1.9×10^7
DNB+G	5.0×10^8	8.5×10^7	7.5×10^7	3.7×10^7
PVK+P	5.5×10^8	3.3×10^7	7.9×10^7	8.5×10^7
BM	9.3×10^8	2.9×10^7	2.1×10^7	2.8×10^7
PBM	2.6×10^8	2.1×10^7	1.4×10^7	1.2×10^7

ในด้านประสิทธิภาพของ liquid formulation ในการรักษาประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของ *Xantrobacter* sp. O1.2-1 โดยการประเมินค่า SI ของหัวเชื้อที่เก็บรักษานาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าหัวเชื้อ O1.2-1 ละลายฟอสเฟตสูตรน้ำทั้ง 5 สูตร ยังคงประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต โดยมีค่า SI ในช่วง 2.26-2.98 โดยหัวเชื้อสูตร BM มีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตได้สูงสุด (2.98 ± 0.26) ตามด้วยหัวเชื้อสูตร PVK+P (2.82 ± 0.09) ในขณะที่หัวเชื้อสูตร PBM มีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตได้ต่ำสุด (2.26 ± 0.32) โดยมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม โดยสรุปสูตรอาหาร 4 สูตร ได้แก่ PB, DNB+G, PVK+P และ BM มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของ *Xantrobacter* sp. O1.2-1 โดยมีค่า SI ในช่วง 2.54-2.98 สอดคล้องกับการมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในช่วง 1.9-8.5 $\times 10^7$ cfu/ml

ตารางที่ 4.3 ค่าประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต (SI) ของ *Xantrobacter* sp. O1.2-1 ที่เก็บรักษาในหัวเชื้อสูตรน้ำชนิดต่างๆ ภายหลังการเก็บ 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

Formulation no.	SI level
PB	2.54 ± 0.06
DNB+G	2.65 ± 0.04
PVK+P	2.82 ± 0.09
BM	2.98 ± 0.26
PBM	2.26 ± 0.32
Control (fresh culture)	2.41 ± 0.12

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี