บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 วัสดุ

2.1.1 เมล็ดข้าวพันธุ์ลูกแดงปัตตานี

2.1.2 กลูโคส (glucose)

2.1.3 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate: $(NH_4)_2SO_4$)

2.1.4 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl)

2.1.5 แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulphate: $MnSO_4 \bullet 2H_2O$)

2.1.6 แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate: $MgSO_4 \bullet 7H_2O$)

2.1.7 โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride: KCl)

2.1.8 โซเดียมฟีเทต (sodium phytate: Na-Phytate)

2.1.9 อะลูมินัมฟีเทต (aluminum phytate: Al-Phytate)

2.1.10 ไอรอนฟีเทต (iron phytate: Fe-Phytate)

2.1.11 อะลูมินัมฟอสเฟต (aluminum phosphate: $AlPO_4$)

2.1.12 ไอรอนฟอสเฟต (iron phosphate: $FePO_4$)

2.1.13 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium di-hydrogen phosphate: KH_2PO_4)

2.1.14 โซเดียมอะซิเทต (sodium acetate: $CH_3COONa \bullet 3H_2O$)

2.1.15 โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate: Na_2CO_3)

2.1.16 เทตราไนโทรฟีนีลฟอสเฟตไดโซเดียมเฮตาไฮเดรต (4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate: $C_6H_4NNa_2O_6P \bullet 6H_2O$)

2.1.17 พาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol: $O_2NC_6H_4OH$)

2.1.18 วุ้น (agar)

2.1.19 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-sodium hydrogen phosphate dehydrate: $Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$)

2.1.20 โซเดียม-โพแทสเซียมทาเทรต (Na-K tartrate: $C_4H_4KNaO_6 \bullet 4H_2O$)

2.1.21 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH)

2.1.22 โซเดียมซาลิไซเลต (sodium salicylate: $C_7H_5O_3$)

2.1.23 โซเดียมไนโทรพรัสไซด์ (sodium nitroptusside dihydrate: $C_5FeN_6Na_2O \bullet 2H_2O$)

2.1.24 โซเดียมไฮโพคลอไรด์ (sodium hypochloride: NaClO)

2.1.25 แอมโมเนียมฟลูออไรด์ (ammonium fluoride: NH_4F)

2.1.26 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: HCl)

2.1.27 แอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate: $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \bullet 4H_2O$)

2.1.28 กรดกำมะถัน (sulphuric acid: H_2SO_4)

2.1.29 แอนทิโมนีโพแทสเซียมทาร์เทรต (antimony potassium tartrate: $KSbO \bullet C_4H_4O_6 \bullet 5H_2O$)

2.1.30 กรดบอริก (boric acid: H_3BO_3)

2.1.31 กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid: $C_6H_8O_6$)

2.1.32 แอมโมเนียมไนเทรต (ammonium nitrate: NH_4NO_3)

2.1.33 โพแทสเซียมไนเทรต (potassium nitrate: KNO_3)

2.1.34 แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride: $CaCl_2$)

2.1.35 เฟอรัสซัลเฟต (ferrous sulphate: $FeSO_4 \bullet 7H_2O$)

2.1.36 โซเดียม-อีดีทีเอ (Na_2-EDTA: $C_{10}H_{14}N_2O_8 \bullet Na_2 \bullet 2H_2O$)

2.1.37 ซิงค์ซัลเฟต (zink sulphate: $ZnSO_4 \bullet 7H_2O$)

2.1.38 คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate: $CuSO_4 \bullet 5H_2O$)

2.1.39 ไดโซเดียมโมลิบเดต (di-sodium molybdate: $Na_2MoO_4 \bullet 2H_2O$)

2.1.40 โคบอลต์คลอไรด์ (cobalt chloride: $CoCl_2 \bullet 6H_2O$)

2.1.41 โพแทสเซียมไอโอเดต (potassium iodate: KIO_3)

2.1.42 กรดซิลิซิก (silicic acid moist: 13-20% SiO_4)

2.1.43 อะลูมินัมคลอไรด์ (aluminum chloride: $AlCl_3 \bullet 6H_2O$)

2.1.44 กรดไนทริก (nitric acid: HNO_3)

2.1.45 กรดเพอร์คลอริก (perchloric acid: $HClO_4$)

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ธาตุอาหารในพืช

2.2.2 เครื่องแก้วสำหรับการปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน

2.2.3 ตู้ปลอดเชื้อ

2.2.4 ตู้บ่มเชื้อ

2.2.5 ตู้อบ

2.2.6 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

2.2.7 เครื่องเขย่า

2.2.8 เครื่องหมุนเหวี่ยง

2.2.9 เครื่องชั่ง

2.2.10 เครื่องวิสิเบิล สเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (visible photometer)

2.2.11 เครื่องเฟลมโฟโทมิเตอร์ (flame photometer)

2.2.12 เครื่องอะตอมมิกแอบซอบชันสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (atomic absorption spectrophotometer)

2.2.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.2.14 หลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีแดง

2.2.15 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

2.2.16 เตาย่อยตัวอย่างพืช

2.3 วิธีดำเนินการ

2.3.1 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินและรากพืชบางชนิดในดินกรดจัด

2.3.1.1 การเก็บดิน ทำการเก็บตัวอย่างดิน จากบริเวณดินกรดจัดที่ตำบลโคก-กระดูกหมู อำเภอเมือง จังหวัดนราธิวาส และเก็บตัวอย่างดินกรดจัดและดินเค็มที่เป็นกรดจัด บริเวณบ้านเหมืองจาก (very-fine, mixed, superactive, acid, isohyperthermic, Sulfic Endoaquepts) และบ้านบางเตง (very-fine, mixed, semiactive, isohyperthermic, Sulfaqueptic Dystraquerts) อำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุง บริเวณทะเลสาบสงขลาบ้านท่านางหอม (very-fine, mixed, superactive, acid, isohyperthermic, Sulfic Endoaquepts) อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา และตำบลโคกกระดูกหมู จังหวัดนราธิวาส (very-fine, mixed, superactive, acid, isohyperthermic, Sulfic Endoaquepts) โดยใช้พลั่วสนามขุดลงไปลึก 0-30 เซนติเมตร เนื่องจากเป็นบริเวณที่รากพืชปรากฏอยู่ โดยเก็บ 3 จุดของแต่ละบริเวณ ใส่ถุงพลาสติก และนำมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี และธาตุอาหารของดินดังนี้ ความเป็นกรดด่างของดิน (1:5 ดิน:น้ำ) ค่าการนำไฟฟ้า (1:5 ดิน:น้ำ) อินทรียวัตถุ (Walkley and Black method) ไนโตรเจนทั้งหมดในดิน (Kjeldahl method) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Bray II method) อะลูมินัมที่แลกเปลี่ยนได้ (สกัดโดย 1 M KCl) โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (สกัดโดย 1 M NH_4OAc pH 7) (จำเป็น, 2547)

2.3.1.2 เก็บตัวอย่างรากพืช โดยเก็บรากพืชที่สามารถเจริญได้ดีในบริเวณดินกรดจัด ได้แก่ เสม็ด หญ้าเพนนิกัม กก และโคลงเคลง โดยใช้พลั่วสนามขุด และเก็บตัวอย่างมาให้มีดินติดรากขึ้นมาด้วย เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก

2.3.1.3 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ในดิน และบริเวณดินเขตอิทธิพลของราก (rhizosphere soil) ชั่งดินชื้น 1 กรัมใส่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 99 มิลลิลิตร ส่วนการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินเขตอิทธิพลของรากนั้น นำรากพืชไปสะบัดดินออก และนำรากพืชดังกล่าวไปแกว่งในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 99 มิลลิลิตร เพื่อให้ดินเขตอิทธิพลของรากหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย หลังจากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า แล้วนำไปดรอบเพลท (drop plate) บนอาหารแข็งสูตร modified Pikovskaya (กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.2 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.005 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัมต่อลิตร และฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4 และในอาหารมีแหล่งของฟอสฟอรัสในรูปต่างๆ คือ ไอรอนฟอสเฟต (iron phosphate: $FePO_4$) อะลูมินัมฟอสเฟต (aluminum phosphate: $AlPO_4$) และโซเดียมไฟเทต (sodium phytate: Na phytate) ซึ่งเป็นฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ หากเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ แสดงว่าจุลิน-ทรีย์สามารถละลายฟอสฟอรัสและนำไปใช้ประโยชน์ได้ หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้น นำออกมาและนำเชื้อที่เจริญไปทำการสตรีค-เพลท (streak plate) บนอาหารแข็งที่มีแหล่งของฟอสฟอรัสชนิดเดียวกับอาหารที่เชื้อดังกล่าวเจริญ เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำไปบ่มไว้ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิด โดยสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการดรอบเพลต นำโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาสตรีคเพลตในอาหารสูตรเดิมจนกระทั่งได้เป็นโคโลนีเดี่ยว และทำการเก็บเชื้อไว้ในอาหารแข็งสูตร modified Pikovskaya สำหรับทดสอบขั้นตอนต่อไปที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2.3.1.4 การเทียบเคียงชนิดของจุลินทรีย์ โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ นำจุ-ลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร modified Pikovskaya ซึ่งมีฟอสฟอรัสในรูปไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-patassium hydrogen phosphate: K_2HPO_4) และนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Isoplant II kit (Wako Pure Chemical Industries Co. Ltd., Japan) นำดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำพีซีอาร์ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1525R ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 30 รอบโดย denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extention ที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาหาลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM 310 Genetic Analyzer with a Big Dye Terminator version (3.0) และใช้ไพร-เมอร์ 357f, 636f, 926f, 1112f, 327r, 518r, 803r, 1080r และ 1389r ในการวิเคราะห์

ลำดับเบส นำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน BLASTN database program (Hoo *et al*., 2004)

2.3.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัส

2.3.2.1 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) มี 3 ซ้ำ โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ทั้งหมดมาในเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มีแหล่งของฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต โดยใส่กล้าเชื้อจำนวน 2 ลูป (loop) แล้วนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยวัดที่เวลา 4, 8 และ 20 วัน ในแต่ละครั้งที่วัดกิจกรรมของเอนไซม์จะบันทึกค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร การเจริญเติบโตที่ค่าการดูดกลืนแสง 630 นาโนเมตร สำหรับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสทำโดยดูดเชื้อในอาหารเหลว 0.1 มิลลิลิตร เติม 200 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเทตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 (sodium acetate buffer pH 4.8) จำนวน 2 มิลลิลิตร และเติม 10 มิลลิโมลาร์ พาราไนโทรฟีนอลฟอสเฟต (p-nitrophenly phosphate) จำนวน 0.10 มิลลิลิตร ในขณะเดียวกันเตรียมสารละลายมาตรฐานพาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol) ความเข้มข้น 0, 200, 400, 800, 1600 และ 3200 ไมโครโมลาร์ โดยดูดสารละลายมาตรฐาน 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ จำนวน 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นจำนวน 0.1 มิลลิลิตร นำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานไปวางในอ่างน้ำที่อุณหภูมิน้ำ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว (saturated sodium carbonate) จำนวน 3.6 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 20 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 และวัดการดูดกลืนแสงโดยเครื่องวิสิเบิลสเปกโตรโฟโต-มิเตอร์ (visible spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร คำนวนค่าที่ได้และแสดงผลในหน่วยนาโนโมลต่อนาทีต่อปริมาณเชื้อ 1 มิลลิลิตร (nmol min^{-1} mL^{-1})

2.3.2.2 การผลิตกรดอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ มี 3 ซ้ำ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งของฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต โดยใส่กล้าเชื้อจำนวน 2 ลูป เมื่อครบ 4, 7, 10 และ 14 วัน นำเชื้อมากรองเอาส่วนใสไปวิเคราะห์กรดอินทรีย์โดยเครื่องคาปิลารีไอออนแอนนาไลเซอร์ (capillary ion analyzer)

2.3.2.3 ความสามารถในการใช้ฟอสฟอรัสในรูปต่างๆโดยจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ มี 3 ซ้ำ โดยเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดทุกสายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีฟอสฟอรัสในรูปโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต อะลูมินัมฟอสเฟต ไอรอน-ฟอสเฟต อะลูมินัมไฟเทต ไอรอนไฟเทต และโซเดียมไฟเทต ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร โดยใส่กล้าเชื้อจำนวน 2 ลูป จากนั้น นำมาทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ แอซิดฟอสฟาเทส และการเจริญเติบโตที่ค่าการดูดกลืนแสง 630 นาโนเมตรที่เวลา 14 วัน

2.3.2.4 การทดสอบการละลายของอินทรีย์ฟอสฟอรัสโดยเชื้อจุลินทรีย์ ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต โดยใส่กล้าเชื้อจำนวน 2 ลูป หลังจากเลี้ยงเชื้อ 14 วัน (กิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสไม่เปลี่ยนแปลง) นำไปทดสอบการละลายอินทรีย์ฟอสฟอรัส โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ มี 3 ซ้ำ โดยดูดเชื้อจำนวน 3 มิลลิลิตร ทดสอบกับสารแขวนลอยอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต ไอรอนไฟเทต และอะลูมินัมไฟเทต (ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ) จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมง ทำการดูดสารแขวนลอยแต่ละตำรับการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์หลังบ่ม โดยการทำให้เกิดสีโดยวิธีโมลิบดีนัมบลู (ภาคผนวก)

2.3.2.5 การทดสอบการละลายอนินทรีย์ฟอสฟอรัสโดยเชื้อจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ มี 3 ซ้ำ โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารสูตร modified Pikovskaya จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีฟอสฟอรัสความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ฟอสฟอรัสในรูปไอรอนฟอสเฟต และอะลูมินัมฟอสเฟต และใส่กล้าเชื้อจำนวน 2 ลูป เลี้ยงเชื้อในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 14 วัน จากนั้น แบ่งเชื้อที่เลี้ยงไว้ออกเป็น 2 ส่วน คือ ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและไม่ต้ม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โดยนำไปทำให้เกิดสีโดยวิธีโมลิบดีนัมบลู

2.3.3 ผลของไนโตรเจนและแคตไอออนบางชนิดต่อการเจริญของจุลินทรีย์

2.3.3.1 รูปของไนโตรเจนต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เลี้ยงจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง (*Ustilago* sp. PM103) และไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ (*Acidocella* sp. AM101) (เป็นตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด) ในอาหารสูตร modified Pikovskaya จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมไฟเทต โดยใส่กล้าเชื้อจำนวน 2 ลูป วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ มี 3 ซ้ำ ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด และในอาหารใช้รูปของไนโตรเจนที่ใส่ในอาหาร

2 รูป คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate: $(NH_4)_2SO_4$) และโซเดียมไนเทรต (sodium nitrate: $NaNO_3$) (โดยใส่แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และใส่โซเดียมไนเทรต 0.3215 กรัมต่อลิตร) สามารถจัดตำรับการทดลองออกเป็นดังนี้

ตำรับที่ 1 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง + แอมโมเนียมซัลเฟต

ตำรับที่ 2 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง + โซเดียมไนเทรต

ตำรับที่ 3 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสต่ำ + แอมโมเนียมซัลเฟต

ตำรับที่ 4 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสต่ำ + โซเดียมไนเทรต

ทำการบันทึกข้อมูลทุก ๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตโดยวัดการเจริญเติบโตที่ค่าการดูดกลืนแสง 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวิสิเบิลสเปกโตรโฟโทมิเตอร์ วัดความเป็นกรดด่าง กรองตัวอย่างโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 5 และนำสารที่ได้ไปวัดไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมไอออน โดยวิธีวัดการดูดกลืนแสง (ภาคผนวก) วิเคราะห์แมกนีเซียม โดยเครื่องอะตอมมิกแอบซอบชันสเปคโทรโฟโทมิเตอร์ (atomic absorption spectrophotometer) และวิเคราะห์โพแทสเซียม และโซเดียมโดยเครื่องเฟลมโฟโทมิเตอร์ (flame photometer)

2.3.3.2 ผลของอะลูมินัม เหล็ก และแมงกานีสต่อการเจริญเติบโต และกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสของจุลินทรีย์ เลี้ยงจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง (*Ustilago* sp. PM103) และไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ (*Acidocella* sp. AM101) วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ มี 3 ซ้ำ โดยทดสอบจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด และใส่แคตไอออนต่าง ๆ ลงในอาหาร คือ อะลูมินัมในรูปอะลูมินัมคลอไรด์ (aluminum chloride: $AlCl_3 \bullet 6H_2O$) เหล็กในรูปเฟอรัสซัลเฟต (ferrous sulphate: $FeSO_4 \bullet 7H_2O$) แมงกานีสในรูปแมงกานีสซัลเฟต (manganese sulphate: $MnSO_4 \bullet 2H_2O$) และชุดควบคุม (ไม่ใส่แคตไอออน) โดยคำนวณให้มีแคตไอออนความเข้มข้น 0, 5 และ 10 มิลลิกรัมของแคตไอออนต่อลิตร ในอาหารสูตร modified Pikovskaya จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีฟอสฟอรัสในรูปโซเดียมฟีเทตเป็นแหล่งฟอสฟอรัส และใส่กล้าเชื้อจำนวน 2 ลูป จัดตำรับการทดลองออกเป็นดังนี้

ตำรับที่ 1 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง (ควบคุม)

ตำรับที่ 2 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง + อะลูมินัม 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตำรับที่ 3 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง + อะลูมินัม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตำรับที่ 4 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง + เหล็ก 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตำรับที่ 5 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง + เหล็ก 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตำรับที่ 6 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง + แมงกานีส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตำรับที่ 7 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสสูง + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตำรับที่ 8 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสต่ำ + อะลูมินัม 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตำรับที่ 9 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสต่ำ + อะลูมินัม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ตำรับที่ 10 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสต่ำ + เหล็ก 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ตำรับที่ 11 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสต่ำ + เหล็ก 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ตำรับที่ 12 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสต่ำ + แมงกานีส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
ตำรับที่ 13 จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสต่ำ + แมงกานีส 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส และวัดการเจริญเติบโตที่ค่าการดูดกลืนแสง 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่เวลา 14 วัน

2.3.4 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการละลายฟอสฟอรัส

2.3.4.1 ผลของความเป็นกรดด่างต่อความเป็นประโยชน์ของอินทรีย์ฟอสฟอ-รัส วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ เตรียมอาหารสูตร modified Pikovskaya ที่มีอินทรีย์ฟอสฟอรัส 3 รูป คือ โซเดียมไฟเทต อะลูมินัมไฟเทต และไอรอนไฟเทต ทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร 3 ระดับ คือ ไม่ปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 4 และปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำมาเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 และวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โดยการทำให้เกิดสีโดยวิธีโมลิบดีนัมบลู

2.3.4.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อความเป็นประโยชน์ของอนินทรีย์ฟอส-ฟอรัส วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ เตรียมอาหารสูตร modified Pikovskaya ที่มี อนินทรีย์ฟอสฟอรัส 2 รูป คือ อะลูมินัมฟอสเฟต และไอรอนฟอสเฟต ทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร 3 ระดับ คือ ไม่ปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าความเป็น กรดด่างก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 4 และ ปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำมาเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 และวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์โดยการทำให้เกิดสีโดยวิธีโมลิบดีนัมบลู

2.3.5 การใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสให้กับพืช

2.3.5.1 การเตรียมตัวอย่างพืช และอาหารที่ใช้ปลูกพืช นำเมล็ดข้าวพันธุ์ลูกแดงปัตตานี ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรปลูกในบริเวณดินกรดจัด เพราะ

สามารถทนกรดได้ดี (จิระศักดิ์ และคณะ, 2542) ฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮโพคลอไรต์ (sodium hypochlorite: NaClO) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง และเพาะในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 วัน คัดเลือกเมล็ดที่มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมาปลูกในอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige & Skoog (MS) ความ-เป็นกรดด่าง 4 ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 2.1 จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร จนต้นกล้ามีความสูงประมาณ 2 นิ้ว (อายุ 10 วัน)

2.3.5.2 การทดสอบการใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของพืช ในอาหารที่มีฟอสฟอรัสในรูปอะลูมินัมฟอสเฟต และไอรอนฟอสเฟต ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการละลายฟอสฟอรัสสูงสุดในอาหารเหลวสูตร modified Pikovskaya จนกระทั่งมีกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสไม่เปลี่ยนแปลง (14 วัน) โดยดูดเชื้อจำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ในบริเวณรอบ ๆ ต้นกล้า วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ มี 4 ซ้ำ โดยปลูกข้าวในอาหารที่มีตำรับการทดลองดังนี้

ตำรับที่ 1 อาหารที่มีฟอสฟอรัสในรูปโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ตำรับที่ 2 อาหารที่มีฟอสฟอรัสในรูปอะลูมินัมฟอสเฟต

ตำรับที่ 3 อาหารที่มีฟอสฟอรัสในรูปอะลูมินัมฟอสเฟต + เชื้อ *Ustilago* sp. PM103

ตำรับที่ 4 อาหารที่มีฟอสฟอรัสในรูปไอรอนฟอสเฟต

ตำรับที่ 5 อาหารที่มีฟอสฟอรัสในรูปไอรอนฟอสเฟต + เชื้อ *Ustilago* sp. PM103

หลังจากปลูก 1 เดือน นำต้นข้าวไปวัดความสูง ความยาวราก และชั่งน้ำหนักสด และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักแห้งของต้นข้าว วิเคราะห์ฟอสฟอรัสในพืช โดยนำไปย่อยโดยกรดผสมไนตริกเพอร์คลอริก (HNO_3-$HClO_4$) และทำให้เกิดสีวิธีเยลโลโมลิบโดวาเนโดฟอสฟอริกแอซิด (yellow molybdovanado-phosphoric acid method) (ภาคผนวก)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของอาหารสูตร Murashige & Skoog

ธาตุ	สูตร	น้ำหนักสาร (กรัมต่อลิตร)	หมายเหตุ
Stock A			
ไนโตรเจน	NH_4NO_3	16.5	ใช้ stock A 100
โพแทสเซียม	KNO_3	19.0	มิลลิลิตรสำหรับเตรียม
แคลเซียม	$CaCl_2.2H_2O$	4.4	อาหาร 1 ลิตร
แมกนีเซียม	$MgSO_4.7H_2O$	3.7	
Stock B			
ฟอสฟอรัส	$AlPO_4$	0.1970	ใช้ stock B 100
	FePO4	0.2430	มิลลิลิตรสำหรับเตรียม
	KH_2PO_4	0.2200	อาหาร 1 ลิตร
Stock C			
เหล็ก	$FeSO_4.7H_2O$	2.78	ใช้ stock C 10 มิลลิลิตร
	Na_2EDTA	3.73	สำหรับเตรียมอาหาร 1 ลิตร
Stock D			
แมงกานีส	$MnSO_4.H_2O$	2.23	ใช้ stock D 1 มิลลิลิตร
สังกะสี	$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	สำหรับเตรียมอาหาร 1
โบรอน	H_3BO_3	6.20	ลิตร
ทองแดง	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	
โมลิบดีนัม	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025	
	$CoCl_2.6H_2O$	0.25	
	Kl	0.083	
Stock E			
ซิลิกอน	SiO_2 13-20% (silicic acid)	15.41	ใช้ stock E 15 มิลลิลิตร สำหรับอาหาร 1 ลิตร