

การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตโดยใช้น้ำมันพืช
เป็นแหล่งอาหารทางเลือก

STUDY OF GROWTH OF PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIA
USING VEGETABLE OIL AS AN ALTERNATIVE MEDIA



พิมพ์อร ทองพันชั่ง
PIM-ORN THONGPANCHANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2568

KMITL-2025-EN-M-227-073

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY OF GROWTH OF PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIA
USING VEGETABLE OIL AS AN ALTERNATIVE MEDIA



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING IN CHEMICAL ENGINEERING
SCHOOL OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2025
KMITL-2025-EN-M-227-073

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2025

SCHOOL OF ENGINEERING

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตโดยใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งอาหารทางเลือก
นักศึกษา	นางสาวพิมพ์อร ทองพันชั่ง
รหัสประจำตัว	63601057
ปริญญา	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
พ.ศ.	2568
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.ณัฐพล ฤกษ์เกษมสันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.พิชญุดา สมบูรณ์

บทคัดย่อ

ปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกทางการเกษตรประสบปัญหาจากการใช้สารเคมีที่มากเกินไปจนความจำเป็นแนวทางในการทำเกษตรกรรมปลอดสารจึงได้รับความสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามการเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวในปริมาณมากโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป ส่งผลให้ต้นทุนในการเลี้ยงเชื้อสูง จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟตในดิน โดยใช้น้ำมันพืชเป็นอาหารทางเลือกเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการเลี้ยงแบคทีเรีย โดยศึกษาพารามิเตอร์ทางจุลชีวศาสตร์ ด้วยแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz ทั้งนี้ได้ทำการแยกแบคทีเรียดังกล่าวจากถ่านไบโอชาร์ และคัดเลือกคุณสมบัติการละลายฟอสเฟต ด้วยการทดสอบค่าดัชนีละลายฟอสเฟต และการทดสอบ Phosphatase activity พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือก มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟตอินทรีย์ได้ดีกว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ทางการค้า (*B.subtilis* CS) โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกมีค่า Acid phosphatase activity และค่า Alkaline phosphatase activity เป็น 93.98 ± 7.31 และ 92.87 ± 6.37 4-nitrophenol $\mu\text{g/mL/h}$ ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *B.subtilis* CS มีค่า Acid phosphatase activity และค่า Alkaline phosphatase activity เป็น 80.99 ± 1.24 และ 80.74 ± 1.00 4-nitrophenol $\mu\text{g/mL/h}$ ตามลำดับ การจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค whole genome sequencing ระบุว่าเป็น *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ (*Bacillus subtilis* New strain, *Bacillus subtilis* NS) จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอน และวัดการเจริญโดยใช้ค่า OD₆₀₀ เพื่อนำมาศึกษาพารามิเตอร์ทางจุลชีวศาสตร์การเจริญด้วยแบบจำลอง Logistic และ Gompertz พบว่า *B.subtilis* NS เจริญได้ดีที่สุดในน้ำมันปาล์มเข้มข้น 1% (v/v) โดยแบบจำลอง Gompertz ให้ค่าอัตราการเจริญสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.0706 ต่อชั่วโมง และระยะ Lag phase (λ) เป็น 0.5656 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Study of Growth of Phosphate-Solubilizing Bacteria Using Vegetable Oil as an Alternative Media
Student	Ms. Pim-orn Thongpanchang
Student ID.	63601057
Degree	Master of Engineering
Program	Chemical Engineering
Year	2025
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nuttapol Lerkkasemsan
Co-Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Pichayada Somboon

ABSTRACT

The excessive use of chemical fertilizer has impacted plantation areas, making organic farming increasingly significant in agriculture, particularly through the use of plant-growth promoting bacteria (PGPB). However, cultivating PGPB with conventional media is not suitable for large-scale applications due to its high cost. The aim of this research was to study the cultivation of a new strain of bacteria, that had phosphate-solubilizing characteristics, using vegetable oil as an alternative medium for cost reduction. The kinetic parameters were fitted with the Logistic model and the Gompertz model. The bacteria were isolated from biochar and selected based on their phosphate solubilizing index and phosphatase activity. The results indicated that *Bacillus subtilis* New strain (*B.subtilis* NS), one of isolates, possessed better organic phosphate solubilizing characteristics with acid phosphatase activity and alkaline phosphatase activity of 93.98 ± 7.31 and 92.87 ± 6.37 4-nitrophenol $\mu\text{g/mL/h}$, respectively. In comparison, *Bacillus subtilis* commercial strain (*B.subtilis* CS) had acid phosphatase activity and alkaline phosphatase activity of 80.99 ± 1.24 and 80.74 ± 1.00 4-nitrophenol $\mu\text{g/mL/h}$, respectively. After selection, OD_{600} sampling was inoculated with vegetable oil to fit the growth pattern with the Logistic model and the Gompertz model. The cultivation of *B.subtilis* NS was well fitted with the Gompertz model. 1% (v/v) palm oil concentration provided the best cultivation condition, with a maximum specific growth rate (μ_{max}) 0.0706 h^{-1} and a lag phase (λ) of 0.5656 h.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ดังกล่าวสำเร็จขึ้นได้ด้วยความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการมีส่วนร่วมกับวิทยานิพนธ์นี้ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ณัฐพล ฤกษ์เกษมสันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ผศ.ดร.พิชญดา สมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ สนับสนุน ค่าใช้จ่าย และอุปกรณ์เครื่องมือในงานวิจัย รวมถึงการตรวจสอบความเรียบร้อย และข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ Dr. Wei-chih Kuan บริษัท ไบโอ ทอล์ค เทคโนโลยี (ไทยแลนด์) จำกัด, คุณกฤษณา โพธิ์ศรีขาม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, คุณอัสนี วิจิตรระกะ คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และคุณพีระพัฒน์ จังคุณดี ที่ได้ให้คำแนะนำ ในส่วนความรู้พื้นฐานด้านงานปฏิบัติการทางด้านชีววิทยา และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ในงานวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ คุณพิมพ์ใจ ภูชนะกิจ, คุณสุกานต์ภิรมย์ ศรีวงษ์ และคุณพิสันต์ ผลโพธิ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือในส่วนของการเอกสารเพิ่มเติม เครื่องมือวิเคราะห์สำหรับงานปฏิบัติการทางด้านเคมี

ขอขอบพระคุณ Dr. Mark Francis Hoolahan และ คุณอุมาภา เตโชวิบูลย์ สำนักงานบริหารวารสารวิชาการ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจไวยากรณ์ภาษาอังกฤษของบทความ

ขอขอบพระคุณครอบครัว ที่สนับสนุนทั้งกำลังทรัพย์ และกำลังใจในการทำงานวิทยานิพนธ์นี้ และบุคคลใกล้ชิดที่คอยรับฟัง และให้คำปรึกษาระหว่างการทำวิทยานิพนธ์

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์นี้ ย่อมเกิดจากความกรุณาของท่านทั้งหลายที่กล่าวนาม และมีได้กล่าวนาม หากมีสิ่งใดขาดตกบกพร่องในงานวิทยานิพนธ์ดังกล่าว ต้องขออภัยมา ณ. โอกาสนี้ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์จะเป็นประโยชน์แก่ผู้อ่านไม่มากนักน้อ

พิมพ์อร ทองพันชั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.2.1 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตในดิน และทำการระบุสายพันธุ์.....	2
1.2.2 ศึกษาองค์ประกอบอาหารทางเลือกได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ..	2
1.2.3 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่เลี้ยงด้วยอาหารทางเลือก และ นำข้อมูลจากการทดลองไปเปรียบเทียบกับแบบจำลอง Logistic และ แบบจำลอง Gompertz	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ปุ๋ยชีวภาพและบทบาทของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPB)	4
2.1.1 ความสำคัญของปุ๋ยชีวภาพ	4
2.1.2 บทบาทของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPB)	4
2.2 การละลายฟอสเฟตในดิน	5
2.2.1 ประเภทฟอสฟอรัสในดิน	5
2.2.2 กระบวนการละลายฟอสเฟตในดิน	5
2.2.3 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟต	7
2.3 แบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i> (<i>B.subtilis</i>).....	9

2.3.1 การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรีย *B.subtilis* ในการฟื้นฟูปทางชีวภาพ..... 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรีย <i>B.subtilis</i> เชิงอุตสาหกรรม.....	9
2.3.3 การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรีย <i>B.subtilis</i> เชิงเกษตรกรรม.....	10
2.4 แหล่งอาหารทางเลือกสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย.....	10
2.4.1 การใช้เศษวัสดุทางการเกษตรเป็นอาหารทางเลือกสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย ..	10
2.4.2 การใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเป็นอาหารทางเลือกสำหรับการเลี้ยง แบคทีเรีย.....	11
2.5 แบบจำลองจลนศาสตร์ของการเจริญของแบคทีเรีย	11
2.5.1 แบบจำลอง Logistic	12
2.5.2 แบบจำลอง Gompertz	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
3.1 สารเคมี	14
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	14
3.3 การแยกเชื้อแบคทีเรีย และการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟต.....	15
3.4 การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟต.....	15
3.5 การคัดเลือกองค์ประกอบอาหารทางเลือก.....	16
3.5.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย.....	16
3.5.2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนสำหรับองค์ประกอบอาหารทางเลือก.....	16
3.5.3 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนสำหรับองค์ประกอบอาหารทางเลือก.....	16
3.6 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารทางเลือกและแบบจำลองการเจริญของ แบคทีเรีย.....	17
3.6.1 การเตรียมอาหารทางเลือก	17
3.6.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย.....	17
3.6.3 การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียสำหรับศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย	17
3.6.4 แบบจำลองการเจริญของแบคทีเรีย	18
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	19
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง.....	20
4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียและการระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย	20
4.2 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต	22
4.3 การคัดเลือกองค์ประกอบอาหารทางเลือก (Alternative media).....	23
4.3.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน.....	23
4.3.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน.....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารทางเลือกและแบบจำลองการเจริญของแบคทีเรีย.....	32
4.4.1 น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งอาหารทางเลือก	32
4.4.2 น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารทางเลือก.....	33
4.4.3 น้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งอาหารทางเลือก	34
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	38
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	38
5.2 ข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม.....	40
ภาคผนวก ก. ข้อมูลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟต	50
ภาคผนวก ข. ข้อมูลเพิ่มเติมของการระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์.....	52
ประวัติผู้เขียน.....	54



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ค่าดัชนีละลายฟอสเฟต และค่า Phosphatase activity ของทั้ง 3 ไอโซเลตเปรียบเทียบกับ <i>B. subtilis</i> CS.....	22
2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของการเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NS.....	25
3 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ที่ได้ระหว่างแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz ในการเลี้ยง <i>B. subtilis</i> NS ด้วยแหล่งอาหารทางเลือกที่แตกต่างกัน.....	36
ก.1 ค่าดัชนีละลายฟอสเฟต จำนวน 3 ซ้ำ ของไอโซเลตลำดับที่ 15, 2 และ 10 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียตามท้องตลาด (<i>B. subtilis</i> CS).....	50
ก.2 ค่า Acid phosphatase activity ที่ pH 6.5 จำนวน 12 วัน ของไอโซเลตลำดับที่ 15, 2 และ 10 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียตามท้องตลาด (<i>B. subtilis</i> CS).....	50
ก.3 ค่า Alkaline phosphatase activity ที่ pH 11.0 จำนวน 12 วัน ของไอโซเลตลำดับที่ 15, 2 และ 10 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียตามท้องตลาด (<i>B. subtilis</i> CS).....	51
ข.1 การจัดลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงของไอโซเลตลำดับที่ 15.....	52
ข.2 การระบุสายพันธุ์ของไอโซเลตลำดับที่ 15.....	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์รวมกับส่วนที่ใส เพื่อหาค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต	7
2 รูปแบบการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละระยะ	12
3 โคโลนีเดี่ยวของเชื้อ <i>B.subtilis</i> NS	16
4 (ก.) โคโลนีที่คัดแยกได้จากถ่านไบโอชาร์ (ข.) ไอโซเลตที่ย้ายมาเพาะเลี้ยงใหม่แยกแต่ละเพลทเพื่อเตรียมสำหรับนำไปทดสอบค่า PSI	20
5 ตัวแทนเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า PSI สูงสุด 3 อันดับแรก (ก.) ไอโซเลตที่ 2 (ข.) ไอโซเลตที่ 10 (ค.) ไอโซเลตที่ 15	20
6 Phylogenetic tree ของไอโซเลตที่ 15	23
7 เปรียบเทียบค่า OD_{600} ของ <i>B.subtilis</i> NS ที่เลี้ยงด้วยแหล่งอาหารทางเลือกที่เป็นน้ำมันปาล์มกับแบบจำลองการเจริญเติบโต (ก.) แบบจำลอง Logistic (ข.) แบบจำลอง Gompertz	33
8 เปรียบเทียบค่า OD_{600} ของ <i>B.subtilis</i> NS ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารทางเลือกกับแบบจำลองการเจริญเติบโต (ก.) แบบจำลอง Logistic (ข.) แบบจำลอง Gompertz	34
9 เปรียบเทียบค่า OD_{600} ของ <i>B.subtilis</i> NS ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งอาหารทางเลือกกับแบบจำลองการเจริญเติบโต (ก.) แบบจำลอง Logistic (ข.) แบบจำลอง Gompertz	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

PGPB	แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth-Promoting Bacteria)
OD ₆₀₀	Optical density at 600 nm
PVK agar	อาหารแข็ง Pikovskaya's
PSI	ค่าดัชนีละลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Index)
PCR	Polymerase chain reaction
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
PDA	อาหารแข็ง Potato dextrose agar
MSM	อาหาร Mineral salt medium
rpm	รอบต่อนาที (Round Per Minute)
BPW	บัฟเฟอร์ เปปโตน วอเตอร์ (Buffered Peptone Water)
<i>B.subtilis</i> NS	<i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ใหม่ (<i>Bacillus subtilis</i> New strain)
<i>B.subtilis</i> CS	<i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ที่ขายในท้องตลาด (<i>Bacillus subtilis</i> Commercial strain)
APA	ค่า Acid phosphatase activity
ALPA	ค่า Alkaline phosphatase activity

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

จากกระแสการบริโภคที่เพิ่มสูงขึ้นในปัจจุบัน เกษตรกรจึงมีความจำเป็นในการใช้ปุ๋ยเคมี และสารเคมีทางการเกษตร เพื่อให้ทันต่อความต้องการในการบริโภค ปุ๋ยเคมีจึงมีความนิยมอย่างมาก โดยเฉพาะเกษตรกรกรมเชิงอุตสาหกรรม ทั้งนี้ปุ๋ยเคมีประกอบไปด้วยสารเคมีสังเคราะห์ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เป็นต้น การใช้ปุ๋ยเคมีที่มากเกินไปส่งผลกระทบต่อสมดุลแร่ธาตุในดิน และทำลายดินได้[1] เนื่องจากพืชมีขีดจำกัดในการใช้สารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต รวมไปถึงปุ๋ยเคมียังก่อให้เกิดมลภาวะต่อนิเวศทางการเกษตร และการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ ก่อให้เกิดสารเคมีสังเคราะห์ที่ตกค้างในดิน[2] การประยุกต์ใช้เทคนิคเกษตรปลอดสารจึงเป็นอีกทางเลือกในการลดสารเคมีในพื้นที่เพาะปลูก เช่น การนำจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตมาใช้งานร่วม, การปลูกพืชหมุนเวียนเพื่อส่งเสริมความหลากหลายทางชีวภาพ[3] เป็นต้น

สำหรับเทคนิคทางชีวภาพที่นำจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมาประยุกต์ใช้ ยังต้องคำนึงถึงคุณลักษณะของดินที่เพาะปลูก, สายพันธุ์จุลินทรีย์ และการหลังสารของพืชและจุลินทรีย์เอง[4] นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังมีบทบาทในการบำรุงรักษาพืชและลดความเครียดของพืช[5], เป็นสารกำจัดศัตรูพืชปลอดสาร, ส่งเสริมระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม และเพิ่มสารอาหารในดิน[6] อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดหากทำการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ในระดับใหญ่ เช่น ข้อพิจารณาในด้านกฎหมาย, ความซับซ้อนเชิงเทคนิค, การติดต่อทางพันธุวิศวกรรม และต้นทุนการผลิต[7] ต้นทุนการดำเนินการ และความเหมาะสมในกระบวนการผลิต เนื่องจากแต่ละขั้นตอนมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูง[8]

การประเมินองค์ประกอบที่เป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์จากแหล่งตามธรรมชาติที่มีในท้องถิ่น และสามารถทดแทนสารอาหารที่มีทั่วไปได้ จะช่วยลดต้นทุนและก่อให้เกิดความคุ้มค่า[9] โดยพิจารณาจากปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ผลิตภัณฑ์, อัตราการผลิต และผลพลอยได้[10] ร่วมกับการใช้แบบจำลองทางจุลชีวศาสตร์ที่สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตจุลินทรีย์ในเชิงของการศึกษาพารามิเตอร์ที่สำคัญของกระบวนการผลิตจุลินทรีย์ขนาดใหญ่, การศึกษาความเหมาะสมและการเพิ่มเติมการออกแบบกระบวนการทางชีวภาพ[11] เช่น Rengesh Balakrishnan et. al., ทำการเลี้ยง *Lactobacillus delbrueckii* NBRC3202 (*L. delbrueckii* NBRC3202) ด้วยการนำเศษกากรำข้าวบดที่มีราคาต่ำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทางเลือก สำหรับผลิต D(-)lactic acid (DLA) ที่สามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์บรรจุภัณฑ์อาหาร และสารอนุพันธ์ในอุตสาหกรรม โดยใช้แบบจำลองทางจุลชีวศาสตร์สอดคล้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยเงื่อนไขการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch

fermentation) [12] นอกจากนี้การเลี้ยงจุลินทรีย์ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพชนิดเหลว ถูกพัฒนาโดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มสารอิมัลซิฟายเออร์ (Emulsifier), สารเหนียว หรือสารปกป้องเพื่อช่วยยืดอายุของจุลินทรีย์[13] หรือทดแทนสารอาหารดั้งเดิมด้วยแหล่งอาหารทางเลือก เช่นเดียวกันกับรูปแบบปุ๋ยชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการกระจายในดิน และยากต่อการชะล้างด้วยน้ำ[14] ในขณะที่งานวิจัยก่อนหน้านี้ น้ำมันพืชที่ถูกคัดเลือก เพื่อรักษาสภาพแบคทีเรียในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพ เพราะน้ำมันพืชมีองค์ประกอบของ หมู่อัลเคน, ไฮโดรอัลเคน และวงอะโรมาติก ซึ่งเสมือนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปลอดภัยสำหรับแบคทีเรีย และประหยัดต้นทุน[15]

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตในดิน
- 1.2.2 ศึกษาองค์ประกอบอาหารทางเลือกได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน
- 1.2.3 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกที่เลี้ยงด้วยอาหารทางเลือก และนำข้อมูลจากการทดลองไปเปรียบเทียบกับแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 การคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตในดิน
 - 1) ทดสอบคุณสมบัติการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ด้วยวิธีการวัดค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing index; PSI) ด้วยอาหารแข็ง Pikovskaya's (PVK agar) ที่ประกอบด้วย Calcium phosphate
 - 2) ทดสอบคุณสมบัติการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ด้วยวิธีการทดสอบฟอสฟาเตส (Phosphatase assay) ด้วยอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 4-Nitrophenyl phosphate
- 1.3.2 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตในดิน
 - 1) ระบุ Genus ของสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการ 16S rDNA sequencing
 - 2) ระบุ Species ของสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการ whole genome sequencing
- 1.3.3 การคัดเลือกองค์ประกอบอาหารทางเลือก (Alternative media)
 - 1) คัดเลือกแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำมันปาล์ม, น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันรำข้าว บนอาหารแข็ง
 - 2) คัดเลือกแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ และยูเรีย บนอาหารแข็ง
- 1.3.4 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตด้วยแบบจำลองการเจริญ
 - 1) ศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์จากผลการทดลองด้วยแบบจำลอง Logistic
 - 2) ศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์จากผลการทดลองด้วยแบบจำลอง Gompertz

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.5 ตัวแปรที่ศึกษา

- 1) ตัวแปรอิสระ องค์ประกอบอาหารทางเลือกได้แก่ น้ำมันปาล์ม, น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันรำข้าว
- 2) ตัวแปรตาม ค่าความชุ่มชื้นแบคทีเรีย และค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากแบบจำลอง
- 3) ตัวแปรควบคุม
 - สายพันธุ์แบคทีเรียที่ทำการแยกได้
 - ความเร็วรอบในการบ่ม 200 รอบต่อนาที
 - อุณหภูมิในการบ่ม 37 องศาเซลเซียส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟตในดิน ทั้งรูปแบบฟอสเฟตอินทรีย์ และฟอสเฟตอินทรีย์
- 1.4.2 คัดเลือกองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทางเลือกที่เหมาะสม ทั้งแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน
- 1.4.3 พารามิเตอร์ที่สำคัญในการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อทางเลือกแต่ละชนิด สามารถต่อยอดในการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บทนี้จะกล่าวถึงบทบาทของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช(PGPB)และปุ๋ยชีวภาพ, การละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย, แหล่งอาหารทางเลือกสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และแบบจำลองจลนศาสตร์ของการเจริญของแบคทีเรีย

2.1 ปุ๋ยชีวภาพและบทบาทของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB)

2.1.1 ความสำคัญของปุ๋ยชีวภาพ

ปุ๋ยอินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือปุ๋ยจุลินทรีย์ถูกกำหนดให้เป็นสารที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และส่วนผสมของสารที่ย่อยสลายได้ซึ่งใช้กับดิน เมล็ดพืช หรือพื้นผิวพืช ซึ่งจะเข้าไปตั้งรกรากภายในส่วนที่ต้องการใช้ประโยชน์[16] ปุ๋ยอินทรีย์ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะเข้าไปเจริญเติบโตในส่วนต่างๆของพืช ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่เพียงแต่จะช่วยเพิ่มสารอาหารในดิน แต่ยังปกป้องพืชจากศัตรูพืช และโรคต่างๆได้อีกด้วย[17] การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ทดแทนปุ๋ยอนินทรีย์เพื่อปลูกพืช จึงเหมาะสมที่จะเป็นแนวทางในการทำเกษตรกรรมที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม หรือเกษตรกรรมปลอดสารเคมีในการปรับปรุงสภาพแวดล้อมในการเพาะปลูก ความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค และความยั่งยืนทางการเกษตร[18]

2.1.2 บทบาทของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB)

แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มีความสามารถที่แตกต่างกัน สามารถปรับปรุงหรือทำให้พืชเจริญเติบโตอย่างเหมาะสม ดังนี้

- 1) การเปลี่ยนแร่ธาตุในดินให้อยู่ในรูปแบบที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต เช่น แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากกาทะกอนระบบบำบัดน้ำเสียในสถานะที่มีเกลือแอมโมเนียมสูง สามารถนำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและปรับปรุงคุณภาพดิน[19] หรือแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่แยกได้จากดินบริเวณรากพืช สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต [20]
- 2) การปรับปรุงความทนต่อสภาวะความเครียดของพืช เช่น แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ ACC-deaminase ช่วยปรับปรุงการเจริญเติบโตของต้นมะเขือได้ในสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเครียดจากความร้อน[21] หรือแบคทีเรียผลิต IAA ฮอโรโมนช่วยให้ ผักกาดหอมทนต่อสภาวะดินเค็มสูงได้ดี[22] การควบคุมเชื้อก่อโรคในพืช เช่น แบคทีเรียช่วยให้ต้นเซลเครส มีเนื้อเยื่อแข็งแรงมากขึ้น และสามารถควบคุม โรคเหี่ยวได้ดี [23] หรือแบคทีเรียส่งผลต่อกรดซาลิไซลิก (SA) หรือกรดจัสโมนิก ซึ่งสามารถชะลอโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ และการสะสมไวรสในมันฝรั่งได้[24]

2.2 การละลายฟอสเฟตในดิน

2.2.1 ประเภทฟอสฟอรัสในดิน

ฟอสฟอรัสจัดเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของรากพืช โดยจัด อยู่ในกลุ่มธาตุอาหารประเภทมหาธาตุ พบได้ในรูปฟอสฟอรัสอินทรีย์และฟอสฟอรัสอนินทรีย์ ซึ่งมีอยู่ใน ปริมาณที่น้อยและมีการเคลื่อนที่สู่พืชน้อยเช่นกัน เมื่อเทียบกับธาตุอาหารหลักอื่น [25], [26] ทั้งนี้ รูปแบบของฟอสฟอรัสในดิน จัดเป็น 2 กลุ่มหลักคือ 1) ฟอสฟอรัสอินทรีย์ มีอยู่ 40 ถึง 65 %ของ ฟอสฟอรัสทั้งหมด พบในซากพืชและซากสัตว์ในดิน ซึ่งพืชไม่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรง ทั้งนี้จุลินทรีย์ ในดินมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนรูปฟอสฟอรัสอินทรีย์ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้งานได้ และ 2) ฟอสฟอรัสอนินทรีย์ มีอยู่ 35 ถึง 70 %ของฟอสฟอรัสทั้งหมด ประกอบด้วย กลุ่มฟอสฟอรัส อนินทรีย์ที่พืชนำไปใช้งานได้ (สารละลายอนินทรีย์) ซึ่งมีทั้งรูปแบบที่ละลายในน้ำและละลายในดิน [27] กลุ่มฟอสฟอรัสอนินทรีย์ที่ถูกดูดซับติดกับผิวดิน อะลูมิเนียมออกไซด์ แคลเซียมออกไซด์ และ เพอร์รัสออกไซด์ โดยฟอสฟอรัสกลุ่มนี้พืชจะนำไปใช้งานได้ทีละน้อย[27], [28] และกลุ่มแร่ฟอสฟอรัส ที่มีทั้งแร่ฟอสเฟตปฐมภูมิ (แร่อะพาไทต์, แร่วาริสไซด์, และแร่สเตรนไจต์) และแร่ฟอสเฟตทุติยภูมิ (อะลูมิเนียมฟอสเฟต, เพอร์รัสฟอสเฟต และแคลเซียมฟอสเฟต) ฟอสเฟตที่กล่าวข้างต้นนี้ พืชจะ นำไปใช้งานได้ทีละน้อยจากการฟุ่กร่อนของแร่และการละลายน้ำ ทั้งฟอสฟอรัสอินทรีย์และ ฟอสฟอรัสอนินทรีย์รวมกันเป็นฟอสฟอรัสในดินทั้งหมด[27] จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ได้เข้ามามี บทบาทในการเปลี่ยนฟอสฟอรัสอินทรีย์และอนินทรีย์ให้เป็นรูปแบบฟอสฟอรัสที่พืชสามารถนำไปใช้ งาน โดยผลิตเอนไซม์ หรือกรดอินทรีย์เพื่อใช้ในการเปลี่ยนรูปแบบฟอสฟอรัสดังกล่าว[29]

2.2.2 กระบวนการละลายฟอสเฟตในดิน

สำหรับแร่ธาตุฟอสเฟตในดิน ที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต มี 2 ประเภท ประกอบด้วยแร่ธาตุฟอสเฟตอนินทรีย์ แร่ธาตุฟอสเฟตอินทรีย์ ซึ่งจะกล่าวถึงดังนี้

1) กระบวนการละลายฟอสเฟตอนินทรีย์

จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ จุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟต อนินทรีย์ (Inorganic solubilizing bacteria) เช่น กระบวนการเปลี่ยนฟอสเฟตอนินทรีย์ด้วยกรด อินทรีย์กับแร่แคลเซียมฟอสเฟต โดยกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นร่วมกับคาร์บอกซิลและแคตไอออนคีเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งผลให้ค่า pH ลดลง สำหรับดินที่มีสภาพเป็นด่าง ที่ฟอสเฟตสามารถตกตะกอนในรูปแคลเซียมฟอสเฟต ร่วมกับหินฟอสเฟต (ฟลูออราพาไทต์และฟรานโคไลต์) ซึ่งเป็นฟอสเฟตอนินทรีย์ในดินที่ไม่ละลายน้ำ จะทำให้ความสามารถในการละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ของดินลดลง ดังนั้นจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจะเพิ่มปริมาณฟอสเฟตที่พืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโตจากการผลิตกรดอินทรีย์ ซึ่งส่งผลทำให้ pH ของดินลดลง[30] กระบวนการผลิตสารไซเดอโรฟอรัส (Siderophore) กับแร่อะลูมิเนียมฟอสเฟต หรือแร่เฟอร์รัสฟอสเฟต ด้วยกระบวนการ Solubilization สำหรับจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตก็สามารถผลิตสาร Siderophore ได้เช่นกันถือเป็นกระบวนการในการคีเลตเหล็กหรือสารประกอบเชิงซ้อนที่มีเฟอร์รัสฟอสเฟตในดินเป็นองค์ประกอบ[31] กระบวนการคีเลชัน (Chelation) จากกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต จะละลายฟอสเฟตอนินทรีย์ในดินที่ไม่ละลายน้ำด้วยสารกลุ่มคีเลชันกับไอออนของโลหะ กรดเหล่านี้มีผลในการละลายสารประกอบฟอสเฟตจำพวกโลหะ เช่น แคลเซียมฟอสเฟตเป็นส่วนใหญ่ หรืออะลูมิเนียมฟอสเฟต หรือเฟอร์รัสฟอสเฟต เป็นต้น เมื่อทำปฏิกิริยาแล้วจะได้ฟอสเฟตในรูปแบบที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นกรดอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต หรือคีเลตไอออนบวกที่จับฟอสเฟต ทำให้ความสามารถในการละลายของฟอสเฟตจะเพิ่มขึ้นตามโครงสร้างโมเลกุลของกรดอินทรีย์ โดยเฉพาะจำนวนกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล มีอิทธิพลอย่างมากต่อความสามารถในการทำคีเลตไอออนของโลหะ รวมถึงชนิดและตำแหน่งของลิแกนด์ ที่นอกเหนือจากความแรงของกรดแล้ว ยังเป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพในกระบวนการละลายอีกด้วย[32]

2) กระบวนการละลายฟอสเฟตอินทรีย์

สำหรับกระบวนการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ ซึ่งประกอบไปด้วยอินทรีย์วัตถุ ที่มีค่าของฟอสฟอรัสอินทรีย์ในดินมีมากถึง 30-50% ของฟอสฟอรัสทั้งหมด และฟอสเฟตอินทรีย์ของดินส่วนใหญ่อยู่ในรูปของอินซิทอลฟอสเฟต (ดินไฟเตส) สารประกอบฟอสเฟตอินทรีย์ อื่นๆ ที่ได้รับรายงานได้แก่ ฟอสโฟโมโนเอสเทอร์ ฟอสโฟไดเอสเทอร์ ฟอสโฟลิปิด กรดนิวคลีอิก และฟอสโฟทริเอสเทอร์ เป็นต้น ดังนั้นการสลายตัวของฟอสเฟตอินทรีย์มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟอสเฟตในชีวมวลของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Microorganisms, PSM) กระบวนการทางชีววิทยานี้มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนฟอสฟอรัส เอนไซม์กลุ่มต่าง ๆ มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการนี้ กลุ่มแรกคือเอนไซม์ที่ dephosphorylate พันธะฟอสเฟอรัส-เอสเทอร์หรือฟอสโฟแอนไฮโดรด์ของสารประกอบอินทรีย์ จัดเป็นกรดฟอสฟาเตสที่ไม่เฉพาะเจาะจง (Non-specific acid phosphatases, NSAPs) ซึ่งเอนไซม์ NSAPs ที่มีการศึกษามากที่สุดที่จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตปล่อยออกมาคือ กลุ่มเอนไซม์ฟอสโฟโมโนเอสเทอเรส หรือที่เรียกว่า เอนไซม์ฟอสฟาเตส มีทั้งรูปแบบที่เป็นกรด (Acid phosphatases) หรือด่าง (Alkaline phosphatases) ซึ่งจะใช้ฟอสเฟตอินทรีย์เป็นสารตั้งต้นเพื่อแปลงเป็นรูปแบบอนินทรีย์ บางงานวิจัยกล่าวว่า บาซิลลัสในดินและสเตรปโตไมซิส สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

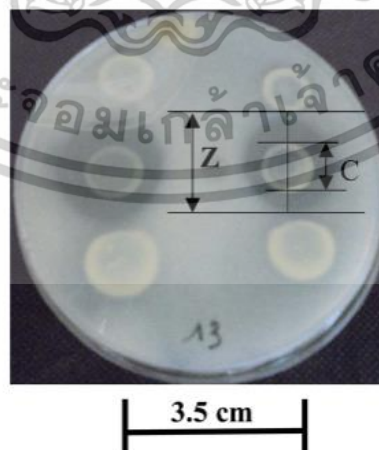
ทำการเปลี่ยนรูปแบบของฟอสเฟตอินทรีย์ที่ซับซ้อนผ่านการผลิตเอนไซม์นอกเซลล์ (Extracellular enzyme) เช่น ฟอสโฟเอสเทอเรส ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ฟอสฟาเตส และฟอสโฟลิเปส [33] ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในกระบวนการ Mineralization อินทรีย์ฟอสเฟต ทั้งนี้ฟอสโฟโมนเอสเทอเรส pH ของดินส่วนใหญ่ที่มีการรายงานค่า phosphatase activity มีตั้งแต่ค่าที่เป็นกรดจนถึงค่าที่เป็นกลาง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของกรดฟอสฟาเตสที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ที่เป็นเอนไซม์อีกตัวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต[30], [34]

2.2.3 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟต

1) การทดสอบดัชนีละลายฟอสเฟต (Phosphate Solubilizing Index, PSI)

สำหรับการศึกษาการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์งานวิจัยส่วนมากนิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ที่มีส่วนผสมของฟอสเฟตอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำอยู่ 2 ชนิดได้แก่ อาหาร Pikovskaya's และอาหาร NBRIP มีทั้งในรูปแบบอาหารชนิดแข็งและอาหารชนิดเหลว สามารถปรับสูตรอาหารได้ตามชนิดของฟอสเฟตอินทรีย์ที่ต้องการศึกษา โดยเพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เช่น แคลเซียมฟอสเฟต อะลูมิเนียมฟอสเฟต หรือเฟอร์รัสฟอสเฟต เป็นต้น โดยนำจุลินทรีย์ที่จำแนกได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร Pikovskaya's หรืออาหาร NBRIP จากนั้นทำการตรวจวัดค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing index, PSI) หรือ ค่า PSI โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับส่วนที่ใส หรือค่า Z (มิลลิเมตร) และเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์เพียงอย่างเดียว (มิลลิเมตร) หรือค่า C (มิลลิเมตร) ดังแสดงในสมการที่ 1 และรูปที่ 1[35]–[37]

$$PSI = \frac{Z}{C} \quad (1)$$



รูปที่ 1 แสดงการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับส่วนที่ใส เพื่อหาค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต[37]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) การทดสอบ Phosphatase activity

สำหรับวัฏจักรของฟอสเฟตอินทรีย์ สามารถทำการทดสอบคุณสมบัติของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตเพื่อให้พืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ เช่น การทดสอบ Phosphate activity ในการเปลี่ยนรูปเป็นฟอสเฟตอินทรีย์ หรือโดยการดูดซึมฟอสเฟตอินทรีย์โดยตรง ด้วยการถ่ายโอนสารอาหารที่จำเพาะและกระบวนการอื่นๆ ที่ขึ้นอยู่กับฟอสเฟตอินทรีย์ในดินด้วย ในส่วนของเอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์เพื่อเปลี่ยนรูปฟอสเฟตอินทรีย์ก็มีหลายชนิด ทั้งนี้เอนไซม์ฟอสฟาเตสที่ไม่จำเพาะ (Non-specific acid phosphatases, NSAPs) เป็นเอนไซม์ที่เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยา dephosphorylate กับพันธะ Phosphor-ester หรือพันธะ Phosphor-anhydride ของฟอสเฟต ซึ่งจัดว่าเป็นเอนไซม์ที่ได้รับการศึกษามาก โดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจะผลิตเอนไซม์ดังกล่าวตามสภาพแวดล้อมที่ค่า pH ที่แตกต่างกันโดยแบ่งเป็นเอนไซม์ Acid phosphomonoesterase และเอนไซม์ Alkaline phosphomonoesterase โดย Acid phosphomonoesterase ผลิตเอนไซม์ในสิ่งแวดล้อมที่มี pH เป็นกรด ในขณะที่ Alkaline phosphomonoesterase ผลิตเอนไซม์ในสิ่งแวดล้อมที่มี pH เป็นด่าง แม้ว่ารากพืชจะสามารถผลิต Acid phosphomonoesterase ได้ แต่แทบไม่มีการผลิตเอนไซม์ Alkaline phosphomonoesterase จึงแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Alkaline phosphomonoesterase มีความเป็นไปได้ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต โดยมีงานวิจัยที่ระบุว่าเอนไซม์ฟอสฟาเตสมีแหล่งกำเนิดจากจุลินทรีย์ และมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนรูปฟอสเฟตอินทรีย์มากกว่า สำหรับเอนไซม์ไฟเตส (Phytase) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดฟอสเฟตในรูปที่พืชสามารถใช้งานได้จากการย่อยฟอสเฟตอินทรีย์จำพวกไฟเตส โดยไฟเตสเป็นแหล่งของอินซิทอลและแหล่งกักเก็บฟอสเฟตอินทรีย์ที่สำคัญในเมล็ดพืชและเกสรดอกไม้ แม้ว่าความสามารถของพืชที่จะได้รับฟอสเฟตโดยตรงจากไฟเตสนั้นยังมีข้อจำกัด แต่การเจริญเติบโตและธาตุอาหารฟอสเฟตอินทรีย์ของพืชที่เพิ่มไฟเตสก็ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพืชถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยยีน phytase (phyA) ที่ได้มาจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ทำให้ธาตุอาหารฟอสเฟตเพิ่มขึ้นในระดับที่เพียงพอกับการเจริญเติบโตของพืช เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม โดยการให้สารอาหารเป็นฟอสเฟตอินทรีย์ ดังนั้นจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจึงมีอิทธิพลอย่างมากในการควบคุมแร่ไฟเตสในดิน อาจมีส่วนช่วยในการให้พืชได้รับฟอสเฟตเพิ่มขึ้น ในส่วนของเอนไซม์ฟอสโฟนาเตส (Phosphonatease) และเอนไซม์ C-P ไลเอส (C-P lyase) ทำหน้าที่เปลี่ยนรูปออร์กาโนฟอสเฟตซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะคาร์บอน-ฟอสฟอรัส[33], [38]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการศึกษาจะนำเชื้อจุลินทรีย์ที่จำแนกได้นำมาทำการตรวจวัดค่า Phosphatase activity จากการผลิตเอนไซม์ฟอสโฟโมโนเอสเทอเรส (Phosphomonoesterase) ซึ่งจะทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสฟอสโฟโมโนเอสเทอร์ ได้เป็นไอออนฟอสเฟตที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้ฟอสโฟโมโนเอสเทอเรสจะมีความจำเพาะในการทำงานต่อสารตั้งต้นฟอสเฟต อินทรีย์และค่า pH ของดินที่เหมาะสม จึงแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบคือ Acid phosphatase activity (APA) และ Alkaline phosphatase activity (ALPA) [39]–[41]

2.3 แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*)

แบคทีเรีย *B.subtilis* เป็นจุลินทรีย์แกรมบวกที่เติบโตได้เร็ว มีรูปร่างเป็นแท่ง เซลล์มีความยาวประมาณ 2–6 ไมโครเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 ไมโครเมตร อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญคือประมาณ 30–35 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถหลั่งเอนไซม์ไฮโดรไลติกที่สำคัญต่างๆ ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ผ่านกระบวนการผลิตเมแทบอลิต์เฉพาะทาง และการป้องกันเชื้อก่อโรคในพืช [42]

2.3.1 การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรีย *B.subtilis* ในการฟื้นฟูทางชีวภาพ

แบคทีเรีย *B.subtilis* มีบทบาทในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เนื่องจาก *B.subtilis* สามารถสร้างไบโอฟิล์ม ที่สามารถนำไปใช้ฟื้นฟูทางชีวภาพได้ ตัวอย่างการกำจัดของเสีย ได้แก่ การกำจัดของเสียจากอุตสาหกรรมมีการใช้ *B.subtilis* ที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแอมโมเนียมให้เป็นไนโตรเจน และยับยั้งเชื้อก่อโรคในเวลาเดียวกัน โดยการเคลือบบนตัวพาชีวภาพ (Bio-carriers) ในระบบบำบัดน้ำเสีย[43] หรือ การบำบัดโลหะหนักโครเมียม (Cr III) ทางชีวภาพด้วยไบโอฟิล์มของ *B.subtilis* ร่วมกับ *B.cereus* ของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมฟอกหนัง ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ [44]

2.3.2 การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรีย *B.subtilis* เชิงอุตสาหกรรม

แบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมได้หลากหลาย เช่น การประยุกต์ใช้สปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการผลิต D-allulose ที่มีฤทธิ์ต้านโรคอ้วน และเพิ่มระดับกลูโคสในเส้นเลือด[45] หรือ พื้นผิวสปอร์ (Spore surface display) ของแบคทีเรีย *B. subtilis* DB403 ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพสำหรับการผลิต D-galactose ซึ่งเป็นสารให้ความหวานแคลอรีต่ำ และสารทดแทนซูโครส จึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผ่านกระบวนการหมักแบบแบดซ์และแบบกึ่งต่อเนื่อง [46]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรีย *B.subtilis* เชิงเกษตรกรรม

แบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้โดยตรง[47] เช่น การนำไปใช้ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพตรึงไนโตรเจนแบ่งเป็น 2 รูปแบบ คือการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพากัน โดยจุลินทรีย์จะเข้าสู่รากก่อนแล้วจึงสร้างปมสำหรับการตรึงไนโตรเจนในภายหลัง เช่น ไรโซเบียมมีความสามารถตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพากัน โดยการตั้งรกรากและการสร้างปมรากกับพืชตระกูลถั่ว ซึ่งไนโตรเจนจะถูกตรึงไว้กับแอมโมเนียและทำให้พืชสามารถนำไปใช้ได้ และให้ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงไว้สูง อีกรูปแบบคือการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ รูปแบบนี้จุลินทรีย์จะมีชีวิตอยู่ได้อิสระและอยู่รอดได้บนเศษซากพืชหรือสังเคราะห์แสงเอง ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงไว้จึงค่อนข้างน้อย[48] หรือปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปได้ทั้งฟอสเฟตอินทรีย์ด้วยกระบวนการ Mineralization และฟอสเฟตอินทรีย์ด้วยกระบวนการ Solubilization [49] หรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อม[47] เช่น ยับยั้งกิจกรรม หรือขัดขวางการทำงานของเชื้อก่อโรคในพืชโดยการสร้างเอนไซม์สลายผนังเซลล์เชื้อก่อโรค หรือการต้านทานที่เหนี่ยวนำมาจากเชื้อก่อโรค เป็นต้น [50]

2.4 แหล่งอาหารทางเลือกสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย

จุลินทรีย์ต้องการธาตุอาหารหลักหลายประเภท โดยใช้แร่ธาตุขนาดใหญ่ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิกนั้น ได้แก่ คาร์บอน, ไฮโดรเจน, ออกซิเจน, ไนโตรเจน, ซัลเฟอร์, ฟอสฟอรัส ในขณะที่แร่ธาตุขนาดเล็กหลายชนิด เช่น แมงกานีส, สังกะสี และ ทองแดง จะเป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์และโคแฟกเตอร์[51] เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อคิดเป็น 30% ของต้นทุนทั้งหมด อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุนต่ำจึงมีความจำเป็นสำหรับการผลิตจุลินทรีย์ในปริมาณมาก[52] ทั้งนี้จะกล่าวถึงแหล่งอาหารทางเลือกที่นิยมนำมาใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย

2.4.1 การใช้เศษวัสดุทางการเกษตรเป็นอาหารทางเลือกสำหรับการเลี้ยง

แบคทีเรีย

สำหรับเศษวัสดุทางการเกษตรหรือเศษชีวมวล ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการนำมาเป็นแหล่งอาหารทางเลือกสำหรับแบคทีเรีย ทั้งนี้ยังเป็นการช่วยลดของเสียทางการเกษตรได้อีกด้วย เช่น การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ซึ่งใช้กำจัดศัตรูพืชชีวภาพ ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ได้จากการกรองของเหลวจากเศษผักเหลือทิ้งจากตลาด ได้แก่ มะเขือเทศ กะหล่ำปลี ถั่วเขียว กะหล่ำปลี และผักโขม ซึ่งประสิทธิภาพในการกำจัดศัตรูพืชใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐาน LB [53] หรือการเลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* B22 โดยใช้กากน้ำมันถั่วลิสงเป็นอาหารทางเลือก ซึ่งแบคทีเรีย *B.subtilis* B22 มีบทบาทในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสซึ่งจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ผงซักฟอก หนั งสิ่งทอ และการสังเคราะห์เปปไทด์ เป็นต้น [54]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเป็นอาหารทางเลือกสำหรับการเลี้ยง

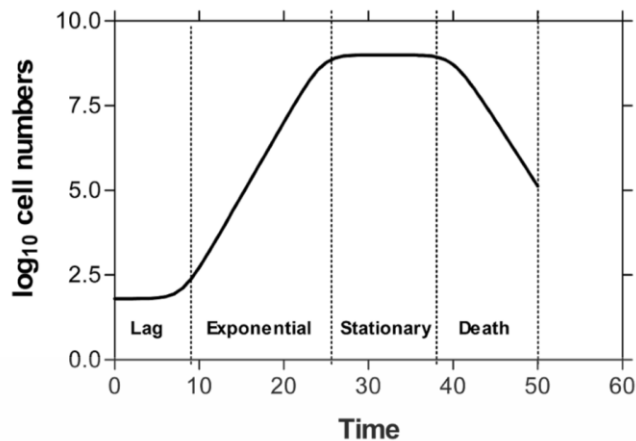
แบคทีเรีย

สำหรับของเสียจากอุตสาหกรรมบางประเภท สามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้หลากหลายรูปแบบ เพื่อเป็นการลดการปล่อยของเสียอุตสาหกรรมสู่สิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะจากอุตสาหกรรมอินทรีย์ เช่น การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose) *Gluconacetobacter xylinus* PTCC 1734 โดยใช้กากน้ำตาลหัวบีตเป็นอาหารทางเลือกในการเพาะเลี้ยง เซลลูโลสที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟิวริกเพื่อเตรียมนานอคริสตัลเซลลูโลสจากแบคทีเรีย[55] การปรับปรุงของเสียจากยีสต์ในกระบวนการหมักเบียร์เพื่อเป็นอาหารทางเลือก ในการเลี้ยงแบคทีเรีย *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 ด้วยอัลตราซาวด์มีผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด [56] การใช้กากยีสต์จากกระบวนการหมักเบียร์เป็นทางอาหารทางเลือกในการเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* ssp. INCOS 383/ATCC 9649 ซึ่งเป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรตีโอไลติก[57]

2.5 แบบจำลองจลนศาสตร์ของการเจริญของแบคทีเรีย

แบบจำลองทางจลนศาสตร์เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ช่วยให้ทำนายการเจริญของแบคทีเรียจากผลการทดลอง และสามารถประเมินพารามิเตอร์ได้ อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในด้านการควบคุมของอาหาร เช่น การกำหนดอายุในการเก็บรักษาอาหาร หรือการถนอมอาหาร [58] การพัฒนา เช่น การตอบสนองของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ [59] และเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม เช่น การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์สำหรับใช้งานในอุตสาหกรรมต่างๆ [60] เป็นต้น โดยแบบจำลองแบบปฐมภูมิ (Primary model) รูปแบบฟังก์ชัน Sigmoid เป็นฟังก์ชันที่นิยมใช้มากที่สุดในการปรับข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เนื่องจากฟังก์ชัน Sigmoid ประกอบด้วย 4 เฟสได้แก่ Lag phase, exponential phase, stationary phase, และ death phase ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งคล้ายกับเส้นโค้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์[61] ทั้งนี้จะกล่าวถึงแบบจำลองปฐมภูมิที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ แบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 รูปแบบการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละระยะ[61]

2.5.1 แบบจำลอง Logistic

แบบจำลอง Logistic เป็นแบบจำลองที่ใช้อธิบายรูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ในรูปร่าง Sigmoid และเป็น Empirical model ที่ใช้อธิบายรูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ [62] หรืออธิบายจำนวนประชากร สามารถตีความเป็นปริมาณของชีวมวลแทนที่จะเป็นจำนวนของสิ่งมีชีวิต [63] โดยแบ่งเป็น 3 ระยะของเส้นโค้งการเจริญ ได้แก่ ระยะ Lag phase, ระยะ Exponential phase หรือระยะ Log phase และระยะ stationary phase ด้วยพารามิเตอร์ 3 ค่าที่มีความหมายทางชีววิทยา ได้แก่ ระยะ Lag phase (λ), อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) และเส้นกำกับ (A) โดย λ ถูกกำหนดให้เป็นจุดตัดแกน x ของแทนเจนต์ก่อนจุดเปลี่ยนแปลงที่ระยะ exponential phase, μ_{max} คือแทนเจนต์ในจุดเปลี่ยนแปลงที่ระยะ exponential phase และ A แสดงค่าสูงสุดของฟังก์ชัน[62] อีกทั้งแบบจำลอง Logistic ได้รับการพิสูจน์ว่าเหมาะสมสำหรับการเจริญแบบแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารที่มีความเข้มข้นต่ำ[64] แต่อย่างไรก็ตามการมีความสมมาตรเป็นข้อเสียของเส้นโค้งลอจิสติกในการปรับข้อมูลการเจริญ[65]

2.5.2 แบบจำลอง Gompertz

แบบจำลอง Gompertz เป็น Empirical model ที่เสนอขึ้นเพื่อแสดงอัตราการเสียชีวิตของมนุษย์ ต่อมาแบบจำลอง Gompertz ได้รับการดัดแปลงและกำหนดพารามิเตอร์ใหม่ ส่งผลให้มีรูปแบบต่างๆ ของแบบจำลอง Gompertz ที่ปรับเปลี่ยน ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ปรากฏการณ์การเจริญของจุลินทรีย์[66] ทั้งนี้แบบจำลอง Gompertz มีความซับซ้อนมากกว่าแบบจำลอง Logistic[63] เนื่องจากเส้นโค้ง Gompertz ไม่มีความสมมาตรเข้ามาเกี่ยวข้อง และจุดเปลี่ยนของเส้นโค้ง Gompertz จะเกิดขึ้นเร็วกว่าเส้นโค้ง Logistic นอกจากนี้ เส้นโค้ง Gompertz จะเข้าถึงขีดความสามารถในการรองรับได้เร็วกว่าเส้นโค้ง Logistic คุณสมบัติทั้งหมดนี้ของเส้นโค้ง Gompertz ทำให้เส้นโค้งนี้มีประโยชน์มากขึ้นในการปรับข้อมูลการเจริญ[65] แบบจำลอง Gompertz จึงสามารถอธิบายเส้นโค้งการเจริญเติบโตที่มี “ระยะ lag phase” ได้หลากหลายรูปแบบ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในทางจุลชีววิทยา แบบจำลองนี้ใช้เป็นแบบจำลองหลักเพื่อให้พอดีกับเส้นโค้งการเจริญแบบอสมมาตร
คงที่ หรือภายใต้เงื่อนไขสภาพแวดล้อมคงที่[67]



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB)
2. อาหารแข็ง Nutrient agar (NA)
3. อาหารเหลว Nutrient broth (NB)
4. อาหารแข็ง Pikovskaya's agar (PVK)
5. อาหารแข็ง Mineral salt medium agar (MSM)
6. อาหารเหลว Mineral salt medium broth (MSM)

3.1.2 สารเคมีและองค์ประกอบเคมีอื่นๆ

1. ยูเรีย
2. Tween80 (for immiscibility between the substrates)
3. ผงสารสกัดจากยีสต์
4. กลีเซอรอล
5. น้ำมันปาล์ม
6. น้ำมันถั่วเหลือง
7. น้ำมันรำข้าว
8. D-glucose
9. Sodium hydroxide 0.1 M
10. บัฟเฟอร์เปปโตน (BPW) สำหรับล้างเซลล์แบคทีเรีย

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.2.1 เครื่องชั่งสาร 3 ตำแหน่ง (Boeco BAS 31 plus)
- 3.2.2 ตู้อบ (Mettler UF110)
- 3.2.3 ตู้บ่ม (Mettler IF30)
- 3.2.4 ตู้บ่มแบบเขย่า (Mettler ES-60)
- 3.2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Boeco SC-8)
- 3.2.6 เครื่อง UV-Spectrophotometer (Jasco V-730)
- 3.2.7 เครื่อง Visible spectrophotometer

3.2.7 ตู้ปลอดเชื้อ Bio safety cabinet (Biobase 11231 BBC 86)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.8 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (Peak instrument S-610L)
- 3.2.9 เครื่อง Hot plate (Cole-pramer)
- 3.2.10 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Science city LS-35HJ)
- 3.2.11 เครื่อง Vortex mixer (Scientific industries G-560E)
- 3.2.12 เครื่อง Microplate reader (Thermo multiskan Go)
- 3.2.13 เครื่องบ่มแบบเขย่า (New Brunswick Innova 43R)

3.3 การแยกเชื้อแบคทีเรีย และการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟต

การแยกเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้โดย นำผงถ่านไบโอชาร์มาบดละเอียดให้มีขนาดน้อยกว่า 75 ไมครอน จากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำถ่านไบโอชาร์ที่อบแล้ว 0.5 กรัม โรยบนอาหาร NA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จนกระทั่งเกิดโคโลนิบนอาหาร NA

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟต จะทำการทดสอบคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์กับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากถ่านไบโอชาร์ โดยนำเชื้อไอโซเลตมาเพาะเลี้ยงใหม่อีกครั้ง บนอาหารแข็ง PVK โดย 1 โคโลนีต่อ 1 เพลท จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของจุดแบคทีเรีย และเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนที่ใสรวมกับจุดแบคทีเรีย เพื่อนำมาทำการคำนวณค่าดัชนีการละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing index, PSI) ที่ระบุถึงคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์

โดยไอโซเลตที่มีค่า PSI 3 ลำดับแรกสูงสุด จะถูกคัดเลือกมาทำการทดสอบคุณสมบัติการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ด้วยวิธีการ Phosphatase assay ที่ระบุถึงคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ตามที่ 3.2.3.1 Phosphomonoesterases (Acid and Alkaline phosphatase) [41]

3.4 การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟต

การระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย จะทำการระบุ Genus ของแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16s rDNA sequencing โดยนำไอโซเลตที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการระบุ Species ของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค whole genome sequencing โดยเตรียมไอโซเลตที่คัดเลือกจำนวน 2 loop ในอาหารเหลว NB 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนเซลล์แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NA 150 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง และแยกส่วนเซลล์โดยเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส และนำไประบุ species

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การคัดเลือกองค์ประกอบอาหารทางเลือก

ประกอบไปด้วยการเตรียมเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกจากคุณสมบัติละลายฟอสเฟต เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกแหล่งคาร์บอน และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน

3.5.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *B.subtilis* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารรุ้น PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเชื้อแบคทีเรียขึ้นโคโลนีเดี่ยว ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 โคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *B.subtilis* NS

3.5.2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนสำหรับองค์ประกอบอาหารทางเลือก

เตรียมอาหารแข็ง MSM และเติม Tween80 เพื่อให้ส่วนประกอบรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ที่ 7.00 ด้วย Sodium hydroxide 0.1 M หลังจากนั้นรอให้องค์ประกอบอาหารทั้งหมดอิมัตัวประมาณ 5 นาที เติมน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ กลีเซอรอล, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันรำข้าว เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนควบคุมคือ D-glucose โดยเตรียมที่ความเข้มข้นระหว่าง 1-5 %(m/v) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยอโต้เคลฟที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และนำมาเทลงในเพลท รอจนกระทั่งอาหารแข็งก่อนจะนำเพลทไปพันด้วยพาราฟิล์ม เมื่อทำการทดลองคัดเลือกแหล่งคาร์บอน ให้นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อ

3.5.3 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนสำหรับองค์ประกอบอาหารทางเลือก

เตรียมอาหารแข็ง MSM ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 2 ชนิดคือ ยูเรีย และ สารสกัดจากยีสต์ จำนวน 3 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติม Tween80 เพื่อให้ส่วนประกอบรวมเป็นเนื้อเดียวกัน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ที่ 7.00 ด้วย Sodium hydroxide 0.1 M หลังจากนั้นรอให้องค์ประกอบอาหารแข็งเย็นลงแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยอโต้เคลฟที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และนำมาเทลงในเพลท รอจนกระทั่งอาหารแข็งก่อนจะนำเพลทไปพันด้วยพาราฟิล์ม เมื่อทำการทดลองคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน ให้นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อ

อาหารทั้งหมดอ้อมตัวประมาณ 5 นาที เติมน้ำกับแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลีเซอรอล, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันรำข้าว เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนควบคุมคือ D-glucose โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 3%(m/v) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และนำมาเทลงในเพลท รอจนกระทั่งอาหารแข็งก่อนจะนำเพลทไปพันด้วยพาราฟิล์ม เมื่อทำการทดลองคัดเลือกแหล่งคาร์บอน ให้นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตผลการเปลี่ยนแปลงบนเพลทว่ามีเชื้อเจริญเติบโตหรือไม่

3.6 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารทางเลือกและแบบจำลองการเจริญของแบคทีเรีย

ประกอบไปด้วยการเตรียมอาหารทางเลือกที่คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน การเตรียมแบคทีเรียที่คัดเลือกจากคุณสมบัติละลายฟอสเฟต การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียด้วยการวัดความขุ่นแบคทีเรีย (OD_{600}) และแบบจำลองการเจริญเติบโตที่ใช้เปรียบเทียบกับผลการทดลอง

3.6.1 การเตรียมอาหารทางเลือก

เตรียมอาหารเหลว MSM สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเหลว MSM ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนควบคุมคือ D-glucose 2 %(m/v) เพียงชนิดเดียว (สำหรับเตรียมเซลล์แบคทีเรีย) จำนวน 400 มิลลิลิตร และอาหารเหลว MSM ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนสำหรับการทดลอง ได้แก่ D-glucose 2 %(m/v), น้ำมันปาล์ม 1, 3 และ 5 %(v/v), น้ำมันถั่วเหลือง 1, 3 และ 5 %(v/v) และน้ำมันรำข้าว 1, 3 และ 5 %(v/v) อย่างละ 50 มิลลิลิตร

3.6.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจากเพลทตั้งต้นมาเพาะเลี้ยงในเพลทอาหารแข็ง MSM ที่ประกอบด้วย D-glucose 2 %(m/v) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นย้ายนำโคโลนีเดี่ยวจำนวน 2 โคโลนีลงในอาหารเหลว MSM ที่ประกอบด้วย D-glucose 2 %(m/v) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นผสมหัวเชื้อแบคทีเรียกับอาหารเหลว MSM ที่ประกอบด้วย D-glucose 2 %(m/v) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.6.3 การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียสำหรับศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 3.6.2 ถ่ายลงในหลอดทดลองพลาสติกฆ่าเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่เครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย BPW และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง จากนั้นเทส่วนเหนือตะกอนเซลล์ทิ้ง และนำส่วนของเซลล์ไปปรับค่าความขุ่นที่ความเอกซาร์นี้ เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ตั้งต้นให้เท่ากับ 0.1 ด้วย BPW ต่อมาปิเปตอาหารทางเลือกที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 3.7.1 จำนวน 150 ไมโครลิตรลงใน 96-well plate จากนั้นปิเปตสารละลายแบคทีเรียที่ $OD_{600} = 0.1$ จำนวน 50 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าความขุ่นเริ่มต้น และระยะเวลาที่กำหนด ของแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.6.4 แบบจำลองการเจริญของแบคทีเรีย

แบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz คือแบบจำลองปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับการอธิบายการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในทั้งจำนวนประชากร และค่าความขุ่นเซลล์ต่อเวลา ภายใต้สภาพแวดล้อมคงที่ โดยข้อมูล OD_{600} เทียบกับเวลาจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม OriginPro2024 โดยใช้ตัวเลือก Sigmoid function และตัวเลือกอัลกอริทึมวนซ้ำ Levenberg Marquardt [68], [69] สำหรับแบบจำลอง Logistic ในสมการที่ 2 และแบบจำลอง Gompertz ในสมการที่ 3 ตามลำดับ

$$y = \frac{a}{1 + \exp[-b(t-m)]} \quad (2)$$

$$y = a \cdot \exp\{-\exp[-b(t-m)]\} \quad (3)$$

โดยที่ y คือค่า OD_{600} ที่เวลา t ใดๆ, t คือ จุดเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง, a คือ OD_{600} ของเส้นกำกับที่สูงสุด (ตัวแปรไร้มิติ), m คือเวลาที่อัตราการเติบโตสมบูรณ์สูงสุด (เวลาที่จุดเปลี่ยน) (ชั่วโมง) และ b คือค่าอัตราการเติบโตสัมพันธ์ที่กำหนด ณ จุดเวลานั้นๆ (ต่อชั่วโมง) (ความชันของเส้นสัมผัส) อย่างไรก็ตาม ค่า a , b และ m ยากต่อการตีความทางชีววิทยา ดังนั้นแบบจำลองจึงถูกจัดรูปเป็นแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz ตามที่แสดงในสมการที่ 4 และสมการที่ 5 ตามลำดับ

$$y = \frac{A}{1 + \exp\left[\frac{4\mu_{\max}}{A}(\lambda - t) + 2\right]} \quad (4)$$

$$y = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (5)$$

โดยที่ A คือ ค่า Asymptotic ที่เวลา t ใดๆ และเป็นค่าเดียวกันกับ a , λ คือระยะ Lag phase (ชั่วโมง) และ μ_{\max} คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง) นอกจากนี้ ค่า λ และค่า μ_{\max} มาจากสมการที่ 6 และ 7 สำหรับแบบจำลอง Logistic ที่จัดรูปใหม่แล้ว และจากสมการที่ 8 และ 9 สำหรับแบบจำลอง Gompertz ที่จัดรูปใหม่แล้วตามลำดับ

$$\mu_{\max} = \frac{bc}{4} \quad (6)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\lambda = m - \frac{2}{b} \quad (7)$$

$$\mu_{\max} = \frac{bc}{e} \quad (8)$$

$$\lambda = m - \frac{1}{b} \quad (9)$$

โดยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{\max}) ซึ่งคือ อัตราการเจริญเติบโตคงที่ในระยะ Exponential phase, ระยะ Lag phase (λ) คือ ระยะเวลาที่เชื้อใช้ในการปรับตัวในระยะ lag phase, ค่า asymptote (A) คือค่าสูงสุดที่แบคทีเรียเจริญเติบโตก่อนเข้าสู่ระยะ Stationary phase และ $e \approx 2.781$

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

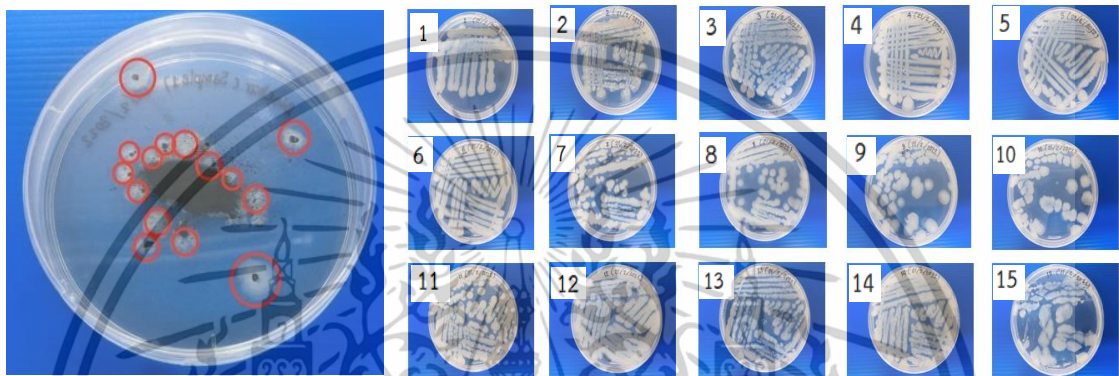
ข้อมูลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต พิจารณาโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ < 0.05 และวิธีการเปรียบเทียบข้อมูลแบบ Tukey pairwise โดยโปรแกรม Minitab Version 19.1 และข้อมูลการทดลองมีความใกล้เคียงกับแบบจำลองการเจริญเติบโต พิจารณาโดยค่า adjusted R-squared (Adj-R^2) และค่า Root Mean Square Error (RMSE)

บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียและการระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย

สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากถ่านไบโอชาร์ ได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลตดังแสดงในรูปที่ 4ก. จากนั้นย้ายแต่ละไอโซเลตมาเพาะเลี้ยงใหม่แยกในแต่ละเพลทดังแสดงในรูป 4ข. เพื่อเตรียมสำหรับการทดสอบค่าดัชนีละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilizing index, PSI) ต่อไป

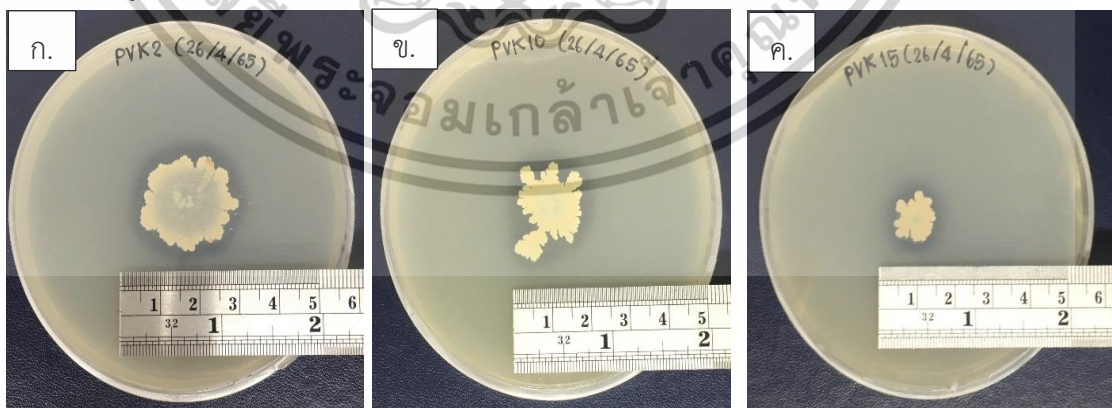


ก.

ข.

รูปที่ 4 (ก.) โคโลนีที่คัดแยกได้จากถ่านไบโอชาร์ (ข.) ไอโซเลตที่ย้ายมาเพาะเลี้ยงใหม่แยกแต่ละเพลท เพื่อเตรียมสำหรับนำไปทดสอบค่า PSI

สำหรับคุณสมบัติการละลายฟอสเฟตอนินทรีย์ เชื้อแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต ที่ได้จากการแยกเชื้อ นำมาศึกษา PSI โดยพบว่า มี 3 ไอโซเลต มีความเป็นไปได้ที่จะมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตอนินทรีย์จากค่า PSI สูงสุด 3 ลำดับแรกได้แก่ ไอโซเลตที่ 2, ไอโซเลตที่ 10 และไอโซเลตที่ 15 ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 ตัวแทนเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า PSI สูงสุด 3 อันดับแรก (ก.) ไอโซเลตที่ 2 (ข.) ไอโซเลตที่ 10 (ค.) ไอโซเลตที่ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ ค่าเฉลี่ย PSI ของไอโซเลตที่ 2, ไอโซเลตที่ 10 และไอโซเลตที่ 15 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อ *B.subtilis* ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพตามท้องตลาด (*B.subtilis* CS) โดยทำการทดลองสามซ้ำ ค่า PSI ที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดลอง *B.subtilis* CS มีค่า PSI สูงสุด ในขณะที่ไอโซเลตที่ 2, ไอโซเลตที่ 15 และไอโซเลตที่ 10 มีค่า PSI รองลงมาตามลำดับ โดยค่า PSI ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตระหว่างไอโซเลตที่ 2 และไอโซเลตที่ 15 กับไอโซเลตที่ 15 และไอโซเลตที่ 10 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกได้ว่ามีความสามารถในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ที่คล้ายคลึงกัน ที่การประเมินทางสถิติที่ค่า P-value < 0.05 และการเปรียบเทียบแบบ Tukey pairwise ที่ความเชื่อมั่น 95%

สำหรับความสามารถในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตเปรียบเทียบกับ *B.subtilis* CS จากปุ๋ยชีวภาพตามท้องตลาด พบว่าค่าเฉลี่ยของ Acid phosphatase activity (APA) และค่าเฉลี่ยของ Alkaline phosphatase activity (ALPA) ดังแสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดลอง ไอโซเลตที่ 2 มีค่า Acid phosphatase activity และ Alkaline phosphatase activity ในขณะที่ ไอโซเลตที่ 15, ไอโซเลตที่ 10 และ *B. subtilis* CS มีค่า Acid phosphatase activity และ Alkaline phosphatase activity รองลงมาตามลำดับ ซึ่งจากการเปรียบเทียบแบบ Tukey pairwise ไอโซเลตที่ 2 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไอโซเลตที่ 15 ในขณะที่ไอโซเลตที่ 10 และ *B. subtilis* CS ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ซึ่งการไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ บ่งบอกได้ถึงแบคทีเรียมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ที่คล้ายคลึงกัน ด้วยการประเมินทางสถิติที่ค่า P-value < 0.05 ค่าระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 1 ค่าดัชนีละลายฟอสเฟต และค่า Phosphatase activity ของทั้ง 3 ไอโซเลตเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* CS

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	ค่าดัชนีละลาย ฟอสเฟต*	Acid phosphatase activity (4- nitrophenol micrograms/mL/h)*	Alkaline phosphatase activity (4-nitrophenol micrograms/mL/h)*
ไอโซเลตที่ 2	1.129±0.008 ^{b**}	94.73±6.70 ^a	95.94±6.34 ^a
ไอโซเลตที่ 10	1.108±0.006 ^c	85.20±9.34 ^c	84.21±8.86 ^c
ไอโซเลตที่ 15	1.116±0.004 ^{bc}	93.98±7.31 ^{ab}	92.87±6.37 ^{ab}
<i>B.subtilis</i> CS	1.150±0.001 ^a	80.99±1.24 ^c	80.74±1.00 ^c

*ผลการทดลองของแบคทีเรียแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**ตัวอักษรเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญจากการเปรียบเทียบ Tukey pairwise comparison

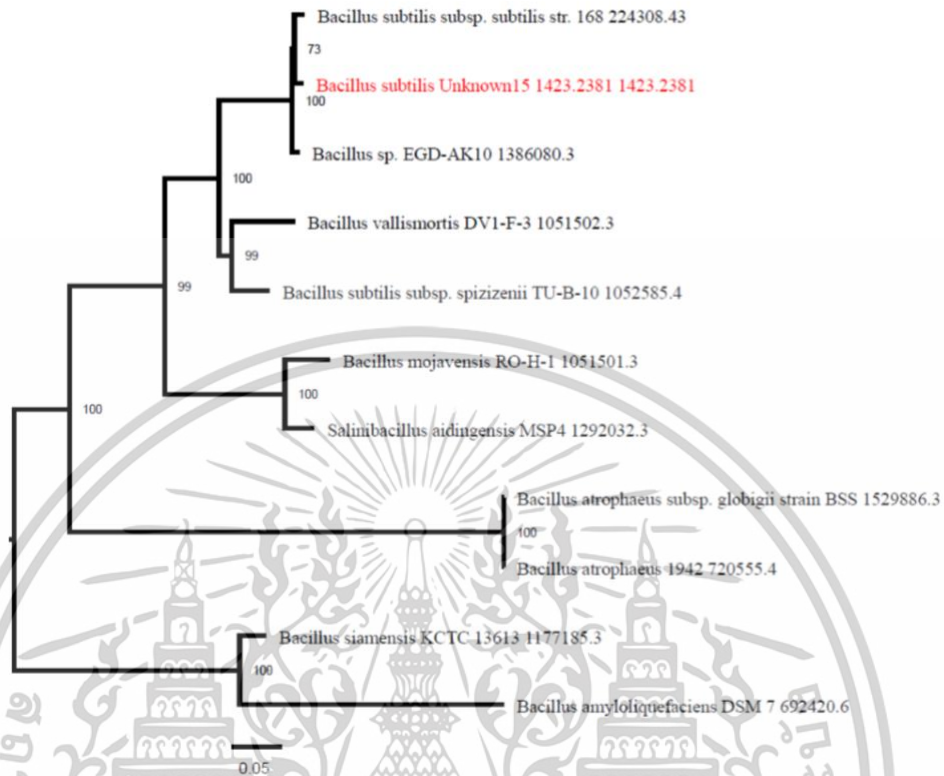
จากผลการทดลองของค่าดัชนีละลายฟอสเฟต และค่า Phosphatase activity ของไอโซเลตที่ 15 ถูกคัดเลือกเพื่อนำไประบุสายพันธุ์เนื่องจาก เมื่อนำมาทำการทดลองเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ก่อนนำไประบุสายพันธุ์ ปริมาณเซลล์ของไอโซเลตที่ 15 มีมากกว่าไอโซเลตที่ 2 แสดงถึงความสามารถในการรอดชีวิต กรณีนำไปทำการทดลองต่อไป และไอโซเลตที่ 15 ยังมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ได้ดีกว่า *B. subtilis* CS จากค่า phosphatase activity อีกด้วย ทั้งนี้คุณสมบัติการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ที่มากกว่าการละลายฟอสเฟตอนินทรีย์ของแบคทีเรีย เหมาะสมต่อการนำไปใช้ร่วมกับปุ๋ยคอก หรือปุ๋ยอินทรีย์ที่มีฟอสเฟตอินทรีย์เป็นส่วนประกอบในปริมาณมาก [70]

4.2 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต

ไอโซเลตที่ 15 ถูกจัดจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์ตามลำดับนิวคลีโอไทด์สายพันธุ์อ้างอิง ซึ่งสามารถประเมินได้ใกล้เคียงกับ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เช่น *B.tequilensis*, *B.cabrialesii*, *B.inaqosorum* และ *B.subtilis* (ดังแสดงในตารางที่ ข.1) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองไม่สามารถระบุได้ชัดเจนสำหรับความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ดังนั้นไอโซเลตที่ 15 จึงต้องทำการศึกษาต่อยอดด้วยวิธีการ whole genome sequencing หรือ Nucleotide sequencing ที่ตำแหน่งยีนส์อื่นเปรียบเทียบกับชนิดของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันในระดับจำเพาะ

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี Whole genome sequence ไอโซเลตที่ 15 ถึงระบุว่าเป็นสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ หรือ *Bacillus subtilis* NS (ดังแสดงในตารางเสริมที่ 2) การอธิบายจีโนมของไอโซเลตที่ 15 ด้วยวิธีการ RAST tool kit (RASTtk) [71] สามารถระบุความจำเพาะ

ของจีโนมอยู่ที่ 1423.2381 ไอโซเลตที่ 15 ถูกอธิบายด้วย รหัสยีนส์ที่ 11 อนุกรมวิธานของจีโนม และ แผนภูมิ Phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 Phylogenetic tree ของไอโซเลตที่ 15

ข้อมูลการวิเคราะห์เชิงวิวัฒนาการที่ใช้ในการจัดหมวดหมู่จีโนมอ้างอิงและตัวแทนข้อมูลจากศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (NCBI) ที่ระบุโดย Mash/MinHash [72] ได้แก่ การ Map การจัดตำแหน่งโปรตีนกับกลุ่มโปรตีนทั่วโลก PATRIC (PGFams) และการเชื่อมโยงเมทริกซ์ข้อมูลจากชุดร่วมของกรดอะมิโนและการจัดตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ และสร้างค่าสนับสนุนสำหรับแผนภูมิต้นไม้

4.3 การคัดเลือกองค์ประกอบอาหารทางเลือก (Alternative media)

4.3.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน

B.subtilis NS สามารถเติบโตได้ดีบนอาหาร MSM ที่ประกอบไปด้วย กลีเซอรอล, น้ำมันรำข้าว และน้ำมันปาล์ม ในขณะที่ปริมาณ *B.subtilis* NS จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2

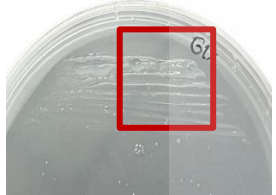
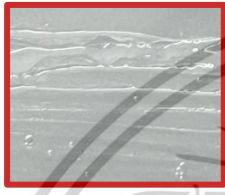
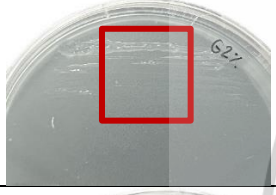

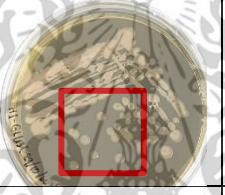
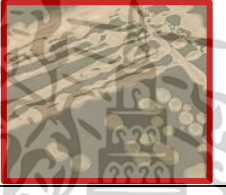


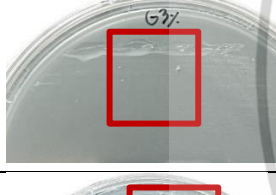



4.3.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน

จากการเปรียบเทียบระหว่างแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่งระหว่างสารสกัดจากยีสต์ และ ยูเรีย ปริมาณ *B.subtilis* NS มีการเจริญเติบโตบนสารสกัดจากยีสต์มากกว่าแหล่งไนโตรเจนยูเรีย ดังแสดงในตารางที่ 2

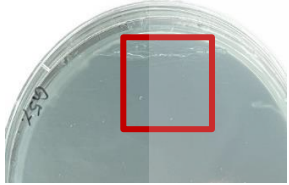
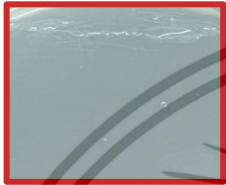
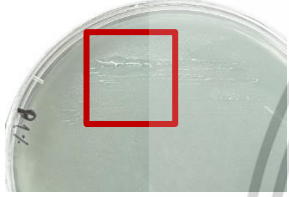


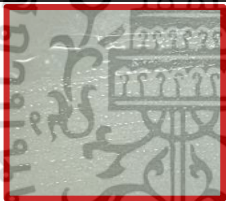
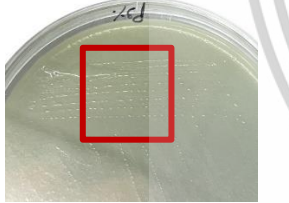







เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





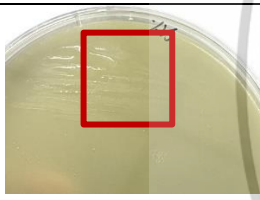



ตารางที่ 2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* NS

แหล่งคาร์บอน	การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน (ไม่มีแหล่งไนโตรเจน)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย)	
1%(w/v), กลีเซอรอล						
2%(w/v), กลีเซอรอล						
3%(w/v), กลีเซอรอล						
4%(w/v), กลีเซอรอล						

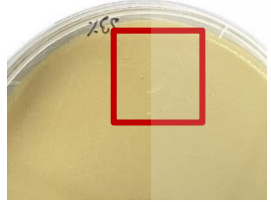

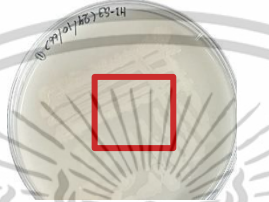


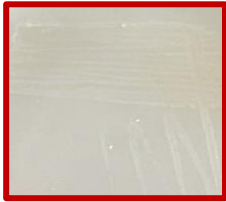
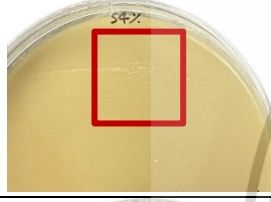



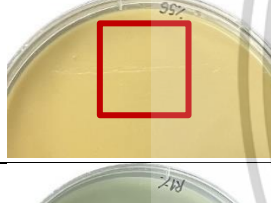
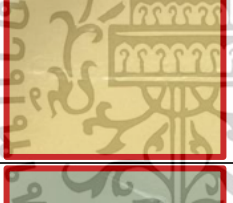






ตารางที่ 2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* NS (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน (ไม่มีแหล่งไนโตรเจน)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย)	
5%(w/v), กลีเซอรอล						
1%(w/v), น้ำมันปาล์ม						
2%(w/v), น้ำมันปาล์ม						
3%(w/v), น้ำมันปาล์ม						







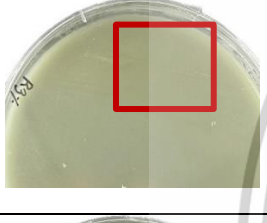



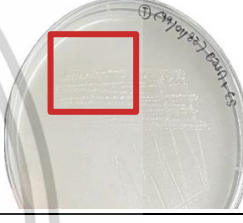

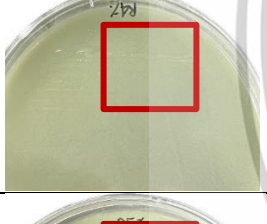











ตารางที่ 2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* NS (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน (ไม่มีแหล่งไนโตรเจน)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย)	
4%(w/v), น้ำมันปาล์ม						
5%(w/v), น้ำมันปาล์ม						
1%(w/v), น้ำมันถั่วเหลือง						
2%(w/v), น้ำมันถั่วเหลือง						

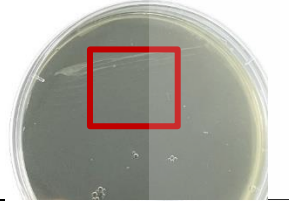

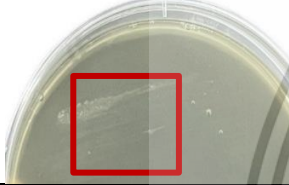


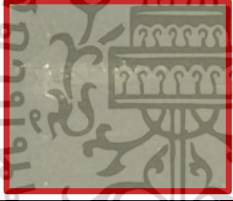


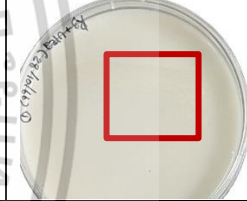



ตารางที่ 2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* NS (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน (ไม่มีแหล่งไนโตรเจน)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย)	
3%(w/v), น้ำมันถั่วเหลือง						
4%(w/v), น้ำมันถั่วเหลือง						
5%(w/v), น้ำมันถั่วเหลือง						
1%(w/v), น้ำมันรำข้าว						

ตารางที่ 2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* NS (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน (ไม่มีแหล่งไนโตรเจน)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย)	
2%(w/v), น้ำมันรำข้าว						
3%(w/v), น้ำมันรำข้าว						
4%(w/v), น้ำมันรำข้าว						
5%(w/v), น้ำมันรำข้าว						

ตารางที่ 2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* NS (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน (ไม่มีแหล่งไนโตรเจน)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย)	
1%(w/v), D-glucose (Control)						
2%(w/v), D-glucose (Control)						
3%(w/v), D-glucose (Control)						
4%(w/v), D-glucose (Control)						

ตารางที่ 2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* NS (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน (ไม่มีแหล่งไนโตรเจน)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์)		การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย)	
5%(w/v), D-glucose (Control)						

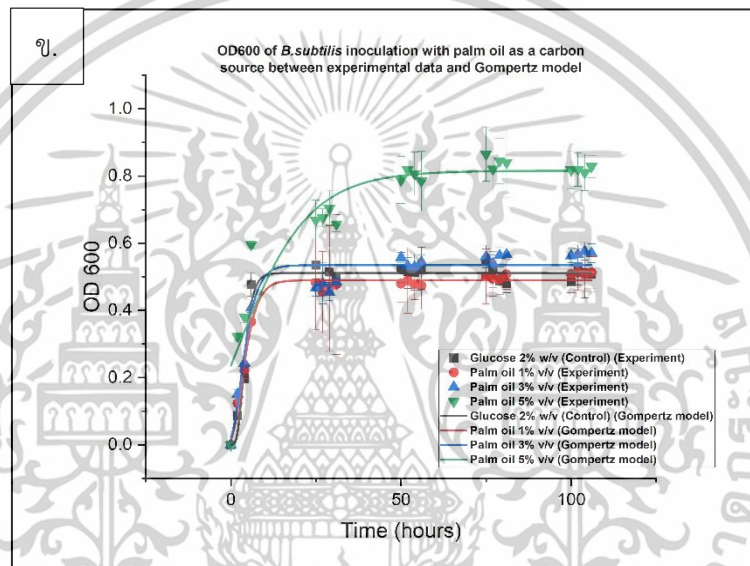
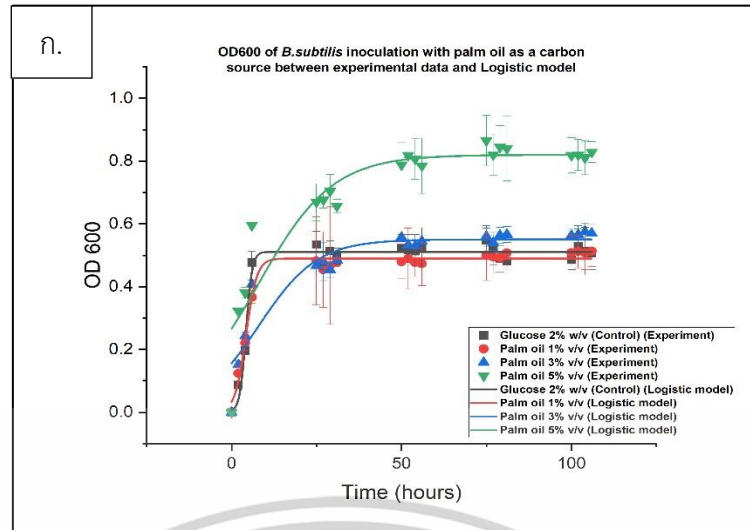


สำหรับการคัดเลือกแหล่งคาร์บอน *B.subtilis* NS สามารถเจริญเติบโตได้ดีใน กลีเซอรอล, น้ำมันรำข้าว และน้ำมันปาล์มตามลำดับ เนื่องจาก อะตอมของคาร์บอนในกลีเซอรอลมีระดับการรีดิวซ์สูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น กล่าวคือ คาร์บอนมีไฮโดรเจนจับอยู่มากกว่า จึงอยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูงกว่า[73] ในขณะเดียวกันองค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าวก็ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดโอเลอิกสูงซึ่งสามารถพบได้ในน้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าว[74] อีกทั้งงานวิจัยที่มีการศึกษาเกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรียด้วยการใช้น้ำมันที่ผ่านมา ยังกล่าวถึงองค์ประกอบไขมันของกรดโอเลอิกที่สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ไลเปสได้ดี[75] ทั้งนี้เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ทั่วไปที่สามารถย่อยสลายไขมันได้ในแบคทีเรีย[76] ในส่วนของการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถดูดซึมสารสกัดจากยีสต์ได้ง่าย และยังมียีนประกอบที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรีย[77] ดังนั้นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนดังกล่าว จึงมีความเหมาะสมสำหรับ *B.subtilis* NS

4.4 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารทางเลือกและแบบจำลองการเจริญของแบคทีเรีย

4.4.1 น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งอาหารทางเลือก

ผลการเจริญของ *B.subtilis* NS ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อทางเลือกผสมน้ำมันปาล์มในแต่ละความเข้มข้นถูกวัดค่า OD_{600} จากนั้นนำผลการทดลอง มาศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตด้วยแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz ทั้งนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตมีความใกล้เคียงกับแบบจำลอง Gompertz มากกว่าแบบจำลอง Logistic จากค่า adjusted R-squared และค่า RMSE ในขณะที่ น้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1%(v/v) มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เป็น 0.0706 ต่อชั่วโมง และระยะ Lag phase (λ) เป็น 0.5656 ชั่วโมง ด้วยค่า adjusted R-squared 0.9830 และค่า RMSE 0.0186 แต่อย่างไรก็ตาม μ_{max} และ λ ที่ได้ยังมีค่าน้อยกว่า *B.subtilis* NS ที่ถูกเลี้ยงด้วย D-glucose ซึ่งเป็นแหล่งอาหารควบคุมที่ 0.1201 ต่อชั่วโมง และ 1.9028 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยค่า adjusted R-squared 0.9609 และค่า RMSE 0.0309 ในแบบจำลอง Gompertz เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 7.

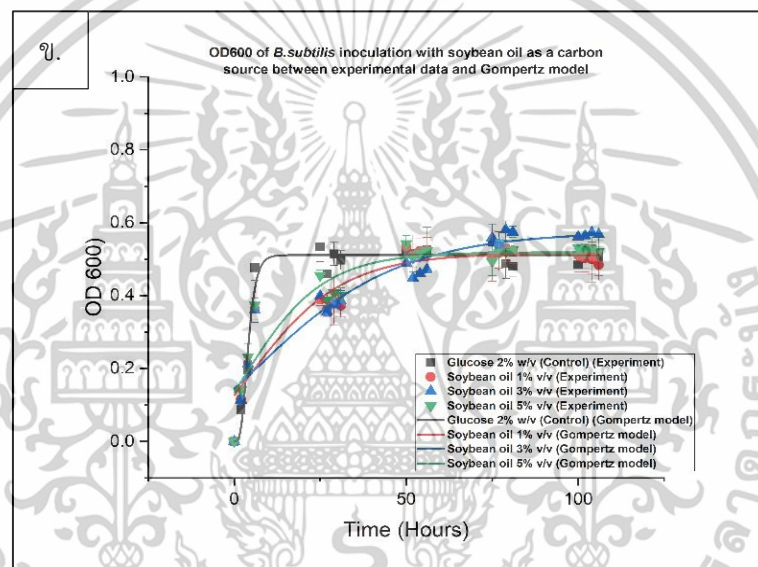
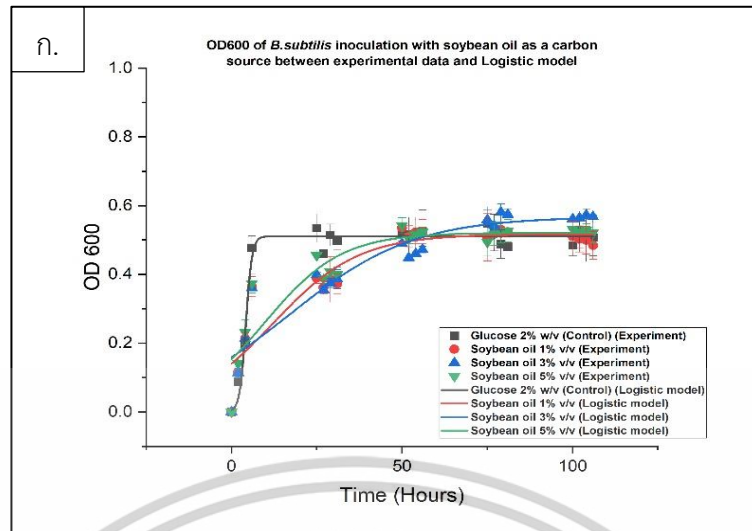


รูปที่ 7 เปรียบเทียบค่า OD₆₀₀ ของ *B.subtilis* NS ที่เลี้ยงด้วยแหล่งอาหารทางเลือกที่เป็นน้ำมันปาล์มกับแบบจำลองการเจริญเติบโต (ก.) แบบจำลอง Logistic (ข.) แบบจำลอง Gompertz

4.4.2 น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารทางเลือก

ค่า OD₆₀₀ ของ *B.subtilis* NS ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันถั่วเหลืองในแต่ละความเข้มข้น นำมาศึกษา รูปแบบการเจริญเติบโตด้วยแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz จากข้อมูลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตมีความใกล้เคียงแบบจำลอง Gompertz มากกว่าแบบจำลอง Logistic จากค่า adjusted R-squared ในขณะที่เงื่อนไขการเลี้ยงแบบคที่เรียกว่าน้ำมันถั่วเหลือง 3%(v/v) มีค่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เป็น 0.0089 ต่อชั่วโมง และระยะ Lag phase (λ) เป็น -16.1423 ชั่วโมง ด้วยค่า adjusted R-squared 0.8662 และค่า RMSE 0.0595 แต่อย่างไรก็ตาม μ_{max} และ λ ที่ได้ยังมีค่าน้อยกว่า *B.subtilis* NS ที่ถูกเลี้ยงด้วย D-glucose ซึ่งเป็นแหล่งอาหารควบคุมที่ 0.1201 ต่อชั่วโมง และ 1.9028 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยค่า adjusted R-squared 0.9609 และค่า RMSE 0.0309 ในแบบจำลอง Gompertz เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



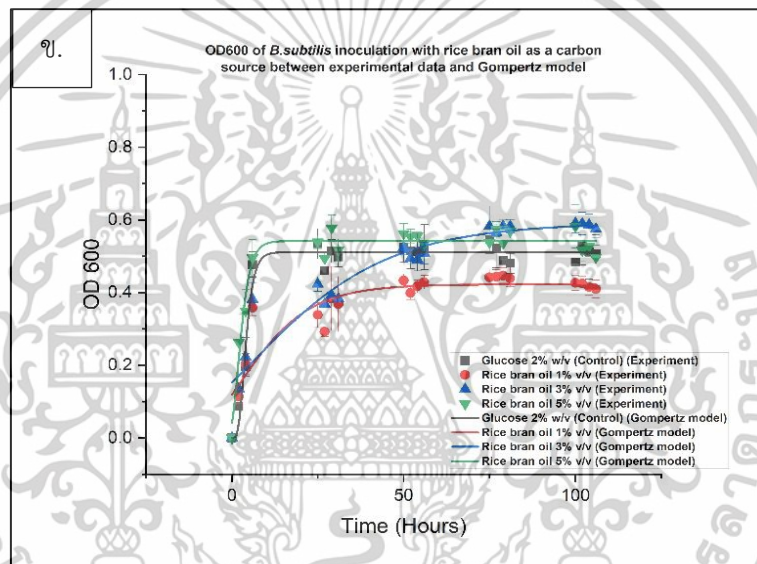
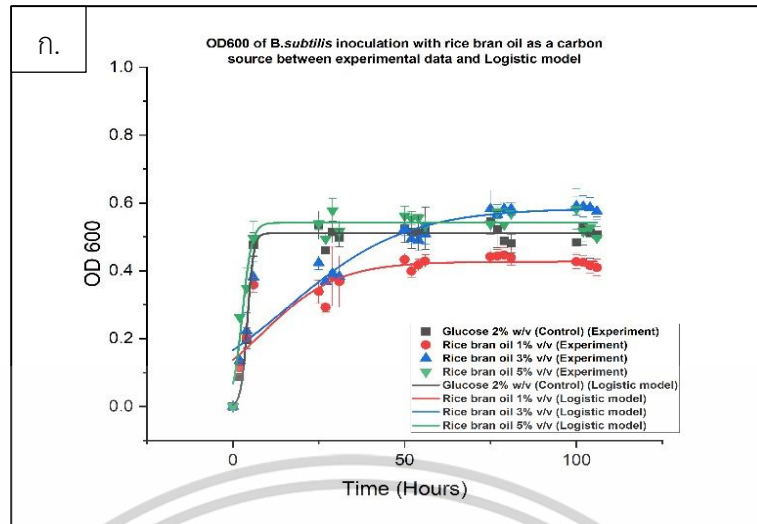
รูปที่ 8 เปรียบเทียบค่า OD₆₀₀ ของ *B. subtilis* NS ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหาร ทางเลือกกับแบบจำลองการเจริญเติบโต (ก.) แบบจำลอง Logistic (ข.) แบบจำลอง Gompertz

4.4.3 น้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งอาหารทางเลือก

ค่า OD₆₀₀ ของ *B. subtilis* NS ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันรำข้าว ในแต่ละความเข้มข้น ถูกนำมาศึกษา รูปแบบการเจริญเติบโตด้วยแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตมีความใกล้เคียงแบบจำลอง Gompertz มากกว่าแบบจำลอง Logistic จากค่า adjusted R-squared ในขณะที่ น้ำมันรำข้าว 5%(v/v) มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เป็น 0.1041 ต่อชั่วโมง และระยะ Lag phase (λ) เป็น -0.0901 ชั่วโมง ด้วยค่า adjusted R-squared 0.9476 และค่า RMSE 0.0318 แต่อย่างไรก็ตาม μ_{max} และ λ ที่ได้ยังมีค่าน้อยกว่า *B. subtilis* NS ที่ถูกเลี้ยงด้วย D-glucose ซึ่งเป็นแหล่งอาหารควบคุมที่ 0.1201 ต่อชั่วโมง และ 1.9028 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยค่า adjusted R-squared 0.9609 และค่า RMSE 0.0309 ใน

แบบจำลอง Gompertz เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 9. เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 เปรียบเทียบค่า OD₆₀₀ ของ *B.subtilis* NS ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งอาหารทางเลือก กับแบบจำลองการเจริญเติบโต (ก.) แบบจำลอง Logistic (ข.) แบบจำลอง Gompertz

สำหรับค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการเจริญเติบโตด้วยแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz เมื่อพิจารณาจากความเหมาะสมของข้อมูลการเจริญเติบโตกับแบบจำลอง จากค่า adjusted R-squared สูงสุดและค่า RMSE ที่ต่ำที่สุด พบว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B.subtilis* NS มีความใกล้เคียงแบบจำลอง Gompertz มากกว่าแบบจำลอง Logistic โดยข้อมูลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปาล์ม 1%(v/v) มีความเหมาะสมกับแบบจำลอง Gompertz มากที่สุดโดยมีค่า adjusted R-squared สูงสุดที่ 0.9830 และ ค่า RMSE ต่ำสุดที่ 0.0186 ในส่วนของข้อมูลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เลี้ยงด้วย D-glucose 2%(w/v), น้ำมันรำข้าว 5%(v/v) และน้ำมันถั่วเหลือง 3%(v/v) มีความเหมาะสมกับแบบจำลอง Gompertz รองลงมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับโดยมีค่า adjusted R-squared 0.9609, 0.9476 และ 0.8662 และค่า RMSE 0.0309, 0.0318 และ 0.0595 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ที่ได้ระหว่างแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz ในการเลี้ยง *B.subtilis* NS ด้วยแหล่งอาหารทางเลือกที่แตกต่างกัน

แหล่งอาหาร ทางเลือก	ความ เข้มข้น	ค่า OD ₆₀₀ สูงสุด (A)	Lag phase (λ) (ชั่วโมง)	อัตราการ เจริญเติบโตจำเพาะ (μ _{max}) (ต่อชั่วโมง)	Adj-R ²	RMSE
แบบจำลอง Logistic						
Glucose (Control)	2%(v/v)	0.5108	2.4003	0.1399	0.9723	0.0260
น้ำมันปาล์ม	1%(v/v)	0.4896	0.9994	0.0759	0.9814	0.0195
น้ำมันปาล์ม	3%(v/v)	0.5505	-9.2119	0.0160	0.8572	0.0594
น้ำมันปาล์ม	5%(v/v)	0.8199	-13.7382	0.0189	0.8389	0.0887
น้ำมันถั่ว เหลือง	1%(v/v)	0.5169	-12.6852	0.0103	0.8417	0.0599
น้ำมันถั่ว เหลือง	3%(v/v)	0.5678	-19.1246	0.0078	0.8541	0.0621
น้ำมันถั่ว เหลือง	5%(v/v)	0.5208	-12.5522	0.0116	0.8384	0.0594
น้ำมันรำข้าว	1%(v/v)	0.4271	-13.7892	0.0096	0.7713	0.0577
น้ำมันรำข้าว	3%(v/v)	0.5847	-18.5133	0.0085	0.8566	0.0630
น้ำมันรำข้าว	5%(v/v)	0.5417	-0.0556	0.0970	0.9357	0.0352
แบบจำลอง Gompertz						
Glucose (Control)	2%(v/v)	0.5113	1.9028	0.1201	0.9609	0.0309
น้ำมันปาล์ม	1%(v/v)	0.4899	0.5656	0.0706	0.9830	0.0186
น้ำมันปาล์ม	3%(v/v)	0.5347	0.3988	0.0759	0.9359	0.0398
น้ำมันปาล์ม	5%(v/v)	0.8157	-9.3068	0.0253	0.8560	0.0838
น้ำมันถั่ว เหลือง	1%(v/v)	0.5169	-10.1850	0.0123	0.8501	0.0583

*ตัวหนังสือหนาแสดงถึงค่า adjusted R-squared สูงสุดของแต่ละน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ที่ได้ระหว่างแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz ในการเลี้ยง *B.subtilis* NS ด้วยแหล่งอาหารทางเลือกที่แตกต่างกัน (ต่อ)

แหล่งอาหารทางเลือก	ความเข้มข้น	ค่า OD ₆₀₀ สูงสุด (A)	Lag phase (λ) (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ_{max}) (ต่อชั่วโมง)	Adj-R ²	RMSE
แบบจำลอง Gompertz						
น้ำมันถั่วเหลือง	3%(v/v)	0.5760	-16.1423	0.0089	0.8662	0.0595
น้ำมันถั่วเหลือง	5%(v/v)	0.5194	-9.1397	0.0147	0.8539	0.0565
น้ำมันรำข้าว	1%(v/v)	0.4230	-8.6485	0.0137	0.7895	0.0554
น้ำมันรำข้าว	3%(v/v)	0.5922	-15.6990	0.0096	0.8670	0.0606
น้ำมันรำข้าว	5%(v/v)	0.5420	-0.0901	0.1041	0.9476	0.0318

*ตัวหนังสือหนาแสดงถึงค่า adjusted R-squared สูงสุดของแต่ละน้ำมัน

ทั้งนี้ แบบจำลอง Gompertz แสดงถึงรูปแบบการเจริญเติบโตของ *B.subtilis* NS ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตที่ไม่สมมาตรโดยที่ ระยะ Lag phase เกิดขึ้นในระยะเวลานั้นและมีค่าติดลบ[78] ต่อมาจึงเกิดระยะ Exponential phase อย่างรวดเร็วจนกระทั่งเข้าสู่ระยะ Stationary phase[67] ในลักษณะโค้ง Sigmoid ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับแบบจำลอง Gompertz ที่ตามทฤษฎีระบุไว้ว่า การเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะมีลักษณะเป็นกราฟ Exponential ที่เวลาต่างๆ[68] นอกจากนี้แบบจำลอง Gompertz ยังสามารถบ่งบอกถึงค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 3 ค่า จากผลการทดลองได้แก่ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ซึ่งคือ อัตราการเจริญเติบโตคงที่ในระยะ Exponential phase, ระยะ Lag phase (λ) คือระยะเวลาที่เชื้อใช้ในการปรับตัวในระยะ lag phase และค่า asymptote (A) คือค่าสูงสุดที่แบคทีเรียเจริญเติบโตก่อนเข้าสู่ระยะ Stationary phase ดังที่ Zweitering และคณะได้กล่าวไว้[68]

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

B.subtilis NS เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดี ซึ่งคัดแยกมาจาก ถ่านไบโอชาร์ จากผลทดสอบการละลายฟอสเฟตอินทรีย์เปรียบเทียบกับเชื้อทางการค้า *B.subtilis* CS พบว่า *B.subtilis* NS มีค่า Acid phosphatase activity และค่า Alkaline phosphatase activity เป็น 93.98 ± 7.31 และ 92.87 ± 6.37 4-nitrophenol $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{h}$ ตามลำดับ ในขณะที่ *B.subtilis* CS มีค่า Acid phosphatase activity และค่า Alkaline phosphatase activity เป็น 80.99 ± 1.24 และ 80.74 ± 1.00 4-nitrophenol $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{h}$ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *B.subtilis* NS มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ได้สูงกว่า *B.subtilis* CS อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ *B.subtilis* NS ยังสามารถเจริญได้ในน้ำมันพืช โดยจากการศึกษาการเจริญของ *B.subtilis* NS แสดงให้เห็นว่าการเจริญของ *B.subtilis* NS มีความใกล้เคียงกับแบบจำลอง Gompertz ซึ่งกราฟการเจริญเพิ่มขึ้นเป็นรูปร่าง Exponential แปรผันตามเวลา และเป็นไปตามทฤษฎีแบบจำลอง Gompertz เมื่อทำการเลี้ยง *B.subtilis* NS ด้วยน้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้น 1%(v/v) โดยให้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ ได้แก่ ค่า Maximum specific growth rate (μ_{max}) เป็น 0.0706 ต่อชั่วโมง ที่แสดงถึงอัตราเร็วในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในระยะ Exponential phase และ Lag phase (λ) เป็น 0.5656 ชั่วโมง ที่แสดงถึงช่วงระยะเวลาปรับตัวในการเจริญเติบโตระยะเริ่มต้น เมื่อพิจารณาจากค่า adjusted R-squared สูงสุดที่ 0.9830 และค่า RMSE ต่ำสุดที่ 0.0186

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ข้อเสนอแนะในการวิจัย

- (1) ศึกษาผลของความเข้มข้นที่ต่างกันของน้ำมันพืช รวมถึงการผสมระหว่างน้ำมันหลายชนิด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพอาหารทางเลือกต่อการเจริญของแบคทีเรีย
- (2) วิเคราะห์องค์ประกอบและโครงสร้างของน้ำมันพืช เพื่อเชื่อมโยงถึงการเลือกใช้ออกประกอบในน้ำมันพืชสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (เช่น ปริมาณกรดไขมันอิสระหรือสารประกอบเชิงลบต่อการเจริญของจุลินทรีย์)
- (3) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะที่ใกล้เคียงกับการใช้งานจริง เช่น การตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำไปใช้ในพื้นที่เพาะปลูกทดลองกับพืชแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(4) ศึกษาถึงปัจจัยที่ทำให้ระยะ Lag phase มีค่าเป็นลบ ที่นอกจากจะแสดงถึงการปรับตัวในช่วงเริ่มต้นของการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว[78] ยังแสดงถึงความซับซ้อนของระยะ Lag phase ที่มีความเกี่ยวข้องกับเงื่อนไขของสภาวะการเลี้ยงเชื้อ ที่สัมพันธ์กับแบบจำลองทุติยภูมิ (Secondary model) [79] เช่น pH, อุณหภูมิ, Water activity, [80] ค่าออกซิเจนละลาย และความเข้มข้นเซลล์ [81]

(5) สามารถนำค่าพารามิเตอร์จากการทดลอง มาช่วยในการคาดการณ์แนวโน้มการเจริญของแบคทีเรีย และช่วยในการออกแบบการทดลองเกี่ยวกับเชื้อ *B.subtilis* NS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงสามารถวางแผนในการเก็บตัวอย่างได้ดีขึ้น

5.2.2 ข้อเสนอแนะเพื่อการประยุกต์ใช้

(1) สามารถนำ *B. subtilis* NS ที่เลี้ยงด้วยแหล่งอาหารทางเลือก ไปพัฒนาต่อเป็นปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบน้ำหรือเม็ด รวมทั้งศึกษาถึงความคงตัวของแบคทีเรียในระยะยาวเมื่อนำไปใช้งานจริง และการเก็บรักษา ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมา น้ำมันพืชนอกจากจะสามารถเป็นแหล่งอาหารทางเลือก ยังมีคุณสมบัติยากต่อการชะล้างด้วยน้ำ ทำให้แบคทีเรียคงอยู่ที่หน้าดินได้ดี[14]

(2) ควรพิจารณาถึงความปลอดภัยของน้ำมันพืชที่นำมาใช้เป็นแหล่งอาหารทางเลือกสำหรับแบคทีเรีย หากนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม เช่น การนำน้ำมันพืช หรือวัตถุดิบจากน้ำมันที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร ควรมีการควบคุมคุณภาพ และตรวจสอบองค์ประกอบของวัตถุดิบดังกล่าว ที่อาจส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

5.2.3 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

(1) พัฒนาระบบการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารทางเลือกแบบกึ่งต่อเนื่อง หรือแบบชีวปฏิกรณ์ เพื่อประเมินความสามารถในการขยายระดับการผลิต

(2) ศึกษาการแสดงออกของยีนแบคทีเรียที่คัดเลือกที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฟอสฟาเตสในระดับโมเลกุลเพื่อเสริมความเข้าใจกลไกการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่คัดเลือก

บรรณานุกรม

- [1] Y. Esmailian, M. B. Amiri, A. Tavassoli, A. Caballero-Calvo, and J. Rodrigo-Comino, "Replacing chemical fertilizers with organic and biological ones in transition to organic farming systems in saffron (*Crocus sativus*) cultivation," *Chemosphere*, vol. 307, no. June, 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.135537.
- [2] P. Pathania, A. Rajta, P. C. Singh, and R. Bhatia, "Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 30, no. October, p. 101842, 2020, doi: 10.1016/j.bcab.2020.101842.
- [3] Z. Rchiad *et al.*, "Soil Depth Significantly Shifted Microbial Community Structures and Functions in a Semiarid Prairie Agroecosystem," *Front. Microbiol.*, vol. 13, no. June, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.815890.
- [4] X. Li, J. Rui, Y. Mao, A. Yannarell, and R. Mackie, "Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 68, pp. 392–401, 2014, doi: 10.1016/j.soilbio.2013.10.017.
- [5] Husna *et al.*, "Phytohormones producing rhizobacteria alleviate heavy metals stress in soybean through multilayered response," *Microbiol. Res.*, vol. 266, no. October 2022, p. 127237, 2023, doi: 10.1016/j.micres.2022.127237.
- [6] S. Rauf and Z. Nazli, "Organic Horticulture Techniques for Eco-Friendly Agriculture," *Trends Biotechnol. Plant Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 20–24, 2024, doi: 10.62460/tbps/2024.018.
- [7] A. Yadav and K. Yadav, "Challenges and Opportunities in Biofertilizer Commercialization," *SVOA Microbiol.*, vol. 5, no. 1, pp. 01–14, 2024, doi: 10.58624/svoamb.2024.05.037.
- [8] S. Yoosathaporn, P. Tiangburanatham, S. Bovonsombut, A. Chaipanich, and W. Pathom-aree, "A cost effective cultivation medium for biocalcification of *Bacillus pasteurii* KCTC 3558 and its effect on cement cubes properties," *Microbiol. Res.*, vol. 186–187, pp. 132–138, 2016, doi: 10.1016/j.micres.2016.03.010.
- [9] S. Ghasemi and M. Ahmadzadeh, "Optimisation of a cost-effective culture medium for the large-scale production of *Bacillus subtilis* UTB96," *Arch. Phytopathol. Plant Prot.*, vol. 46, no. 13, pp. 1552–1563, 2013, doi: 10.1080/03235408.2013.771469.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [10] O. Konzock and J. Nielsen, "TRYing to evaluate production costs in microbial biotechnology," *Trends Biotechnol.*, vol. xx, no. xx, pp. 1–9, 2024, doi: 10.1016/j.tibtech.2024.04.007.
- [11] J. Almquist, M. Cvijovic, V. Hatzimanikatis, J. Nielsen, and M. Jirstrand, "Kinetic models in industrial biotechnology - Improving cell factory performance," *Metab. Eng.*, vol. 24, pp. 38–60, 2014, doi: 10.1016/j.ymben.2014.03.007.
- [12] R. Balakrishnan, S. R. R. Tadi, S. K. Rajaram, N. Mohan, and S. Sivaprakasam, "Batch and fed-batch fermentation of optically pure D (-) lactic acid from Kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) bran residue hydrolysate: growth and inhibition kinetic modeling," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 50, no. 4, pp. 365–378, 2020, doi: 10.1080/10826068.2019.1697934.
- [13] G. Kumari, V. K. Upadhayay, J. Pradhan, and R. Prasad, "A methodology to develop liquid formulation of biofertilizer technology," vol. 12, no. 11, pp. 875–881, 2023, [Online]. Available: www.thepharmajournal.com.
- [14] Nurmayulis, F. R. Eris, H. Maida, D. Hastuti, and Y. R. Denny, "Effect of Biofertilizer Formulation with Addition of Consortium of Microbes and Biosurfactant DEA Palm Olein to Growth of Cacao (*Theobroma cacao*) Seedling," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 978, no. 1, 2022, doi: 10.1088/1755-1315/978/1/012013.
- [15] S. K. Lee *et al.*, "Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodospseudomonas palustris* strain PS3," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 18, pp. 7977–7987, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7582-9.
- [16] C. O. Onyia, A. M. Okoh, and O. Irene, "Production of Plant Growth-Promoting Bacteria Biofertilizer from Organic Waste Material and Evaluation of Its Performance on the Growth of Corn (&i&t;Zea mays&t;/i&t;)," *Am. J. Plant Sci.*, vol. 11, no. 02, pp. 189–200, 2020, doi: 10.4236/ajps.2020.112015.
- [17] A. I. Daniel *et al.*, "Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety," *Microorganisms*, vol. 10, no. 6, 2022, doi: 10.3390/microorganisms10061220.
- [18] J. Nabati, A. Nezami, A. Yousefi, E. Oskoueian, A. Oskoueian, and M. J. Ahmadi-Lahijani, "Biofertilizers containing plant growth promoting rhizobacteria enhance nutrient uptake and improve the growth and yield of chickpea plants in an arid environment," *Sci. Rep.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2025, doi: 10.1038/s41598-025-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

93070-w.

- [19] C. Rodriguez-Gonzalez, C. Ospina-Betancourth, and J. Sanabria, “High resistance of a sludge enriched with nitrogen-fixing bacteria to ammonium salts and its potential as a biofertilizer,” *Bioengineering*, vol. 8, no. 5, 2021, doi: 10.3390/bioengineering8050055.
- [20] S. A. Rahman, H. Yusef, and H. Dhaini, “Phosphate solubilization potential of rhizosphere soil bacteria and their possible use as biofertilizers,” *Egypt. J. Bot.*, vol. 61, no. 2, pp. 655–668, 2021, doi: 10.21608/ejbo.2021.50174.1584.
- [21] T. Mukhtar *et al.*, “Mitigation of heat stress in solanum lycopersicum l. by ACC-deaminase and exopolysaccharide producing *Bacillus cereus*: Effects on biochemical profiling,” *Sustain.*, vol. 12, no. 6, 2020, doi: 10.3390/su12062159.
- [22] J. Fortt *et al.*, “Bacterial Modulation of the Plant Ethylene Signaling Pathway Improves Tolerance to Salt Stress in Lettuce (*Lactuca sativa* L.),” *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 6, no. March, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3389/fsufs.2022.768250.
- [23] M. V. Rodriguez *et al.*, “Anatomical and Biochemical Changes Induced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Stand Up for *Arabidopsis thaliana* Seedlings From *Ralstonia solanacearum* Infection,” *Front. Plant Sci.*, vol. 10, no. December, pp. 1–20, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.01618.
- [24] D. Beris, I. Theologidis, N. Skandalis, and N. Vassilakos, “*Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and Potato virus y,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-28677-3.
- [25] T. D. Landis and E. Van Steenis, “Macronutrients - Phosphorus,” pp. 6–14, 2005.
- [26] M. Berg, M. Meehan, D. Franzen, and T. Scherer, “Phosphorus Behavior In the Environment,” *North Dakota State Univ.*, vol. 1298, no. June, pp. 1–4, 2018.
- [27] R. Prasad and D. Chakraborty, “Phosphorus Basics: Understanding Phosphorus Forms and Their Cycling in the Soil,” *Alabama Coop. Ext. Syst.*, pp. 1–4, 2019, [Online]. Available: https://www.aces.edu/wp-content/uploads/2019/04/ANR-2535-Phosphorus-Basics_041719L.pdf.
- [28] R. Prasad, S. Prasad, and R. Lal, *Advances in Soil Science; SOIL PHOSPHORUS*, 1st ed. 2016.
- [29] J. Tian, F. Ge, D. Zhang, S. Deng, and X. Liu, “Roles of Phosphate Solubilizing

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Microorganisms from,” *Biology (Basel)*, vol. 10, p. 158, 2021.
- [30] E. T. Alori, B. R. Glick, and O. O. Babalola, “Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. JUN, pp. 1–8, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00971.
- [31] P. Rawat, S. Das, D. Shankhdhar, and S. C. Shankhdhar, “Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake,” *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, vol. 21, no. 1, pp. 49–68, 2021, doi: 10.1007/s42729-020-00342-7.
- [32] F. Z. Aliyat, M. Maldani, M. El Guilli, L. Nassiri, and J. Ibjibijen, “Phosphate-Solubilizing Bacteria Isolated from Phosphate Solid Sludge and Their Ability to Solubilize Three Inorganic Phosphate Forms: Calcium, Iron, and Aluminum Phosphates,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 5, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3390/microorganisms10050980.
- [33] Y. Park, M. Solhtalab, W. Thongsomboon, and L. Aristilde, “Strategies of organic phosphorus recycling by soil bacteria: acquisition, metabolism, and regulation,” *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 14, no. 1, pp. 3–24, 2022, doi: 10.1111/1758-2229.13040.
- [34] G. Kalayu, “Phosphate Solubilizing Microorganisms : Promising Approach as Biofertilizers,” vol. 2019, 2019.
- [35] D. Mazumdar, S. P. Saha, and S. Ghosh, “Isolation, screening and application of a potent PGPR for enhancing growth of Chickpea as affected by nitrogen level,” *Int. J. Veg. Sci.*, vol. 26, no. 4, pp. 333–350, 2020, doi: 10.1080/19315260.2019.1632401.
- [36] A. Pande, P. Pandey, S. Mehra, M. Singh, and S. Kaushik, “Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize,” *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 15, no. 2, pp. 379–391, 2017, doi: 10.1016/j.jgeb.2017.06.005.
- [37] A. Ouattara, K. Coulibaly, I. Konate, B. I. Kebe, A. S. Tidou, and A. Filali-Maltouf, “Selection of Cocoa Tree (*Theobroma cacao* Linn) Endophytic Bacteria Solubilizing Tri-Calcium Phosphate, Isolated from Seedlings Grown on Soils of Six Producing Regions of Côte d’Ivoire,” *Adv. Microbiol.*, vol. 09, no. 09, pp. 842–852, 2019, doi: 10.4236/aim.2019.99051.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [38] S. B.Seema, Riyaz Z.Sayyed, M. H.Trivedi, and T. A.Gobi, "Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, no. 12, pp. 3305–3307, 2013, doi: 10.1128/jcm.35.12.3305-3307.1997.
- [39] J. Stephen, S. Shabanamol, K. S. Rishad, and M. S. Jisha, "Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) and *Burkholderia* sp. (MTCC 8369) under greenhouse conditions," *3 Biotech*, vol. 5, no. 5, pp. 831–837, 2015, doi: 10.1007/s13205-015-0286-5.
- [40] B. C. Behera *et al.*, "Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India," *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 15, no. 1, pp. 169–178, 2017, doi: 10.1016/j.jgeb.2017.01.003.
- [41] R. W. Weaver *et al.*, *METHODS OF SOIL ANALYSIS PART 2 Microbiological and Biochemical Properties*, 1st ed. 1994.
- [42] J. Errington and L. T. van der Aa, "Microbe profile: *Bacillus subtilis*: Model organism for cellular development, and industrial workhorse," *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 166, no. 5, pp. 425–427, 2020, doi: 10.1099/mic.0.000922.
- [43] X. Zhang *et al.*, "A sustainable bio-carrier medium for wastewater treatment: Modified basalt fiber," *J. Clean. Prod.*, vol. 225, pp. 472–480, 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2019.03.333.
- [44] K. Sundar, I. M. Sadiq, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran, "Bioremoval of trivalent chromium using *Bacillus* biofilms through continuous flow reactor," *J. Hazard. Mater.*, vol. 196, pp. 44–51, 2011, doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.066.
- [45] W. He, B. Jiang, W. Mu, and T. Zhang, "Production of d -Allulose with d -Psicose 3-Epimerase Expressed and Displayed on the Surface of *Bacillus subtilis* Spores," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 64, no. 38, pp. 7201–7207, 2016, doi: 10.1021/acs.jafc.6b03347.
- [46] Q. Guo *et al.*, "Enhanced D-tagatose production by spore surface-displayed L-arabinose isomerase from isolated *Lactobacillus brevis* PC16 and biotransformation," *Bioresour. Technol.*, vol. 247, no. September 2017, pp. 940–946, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.187.
- [47] R. Ortíz-Castro, H. A. Contreras-Cornejo, L. Macías-Rodríguez, and J. López-Bucio,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- “The role of microbial signals in plant growth and development,” *Plant Signal. Behav.*, vol. 4, no. 8, pp. 701–712, 2009, doi: 10.4161/psb.4.8.9047.
- [48] S. . SHAH, V. V. . RAMANAN, A. V. SINGH, and S. A. K, “Potential and Prospect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Lentil,” *Sci. Lentil Prod.*, no. 6, pp. 431–451, 2018.
- [49] A. E. Richardson and R. J. Simpson, “Soil microorganisms mediating phosphorus availability,” *Plant Physiol.*, vol. 156, no. 3, pp. 989–996, 2011, doi: 10.1104/pp.111.175448.
- [50] O. S. Olanrewaju, B. R. Glick, and O. O. Babalola, “Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 11, pp. 1–16, 2017, doi: 10.1007/s11274-017-2364-9.
- [51] P. Jadhav, M. Sonne, A. Kadam, and S. Patil, “Formulation of Cost Effective Alternative Bacterial Culture Media Using Fruit and Vegetables Waste,” *Int. J. Curr. Res. Rev.*, vol. 10, no. 2, pp. 6–15, 2018, doi: 10.7324/ijcr.2018.1022.
- [52] V. Revin, E. Liyaskina, M. Nazarkina, A. Bogatyreva, and M. Shchankin, “Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 49, pp. 151–159, 2018, doi: 10.1016/j.bjm.2017.12.012.
- [53] X. Pan *et al.*, “Effect of *Bacillus thuringiensis* biomass and insecticidal activity by cultivation with vegetable wastes,” *R. Soc. Open Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 0–7, 2021, doi: 10.1098/rsos.201564.
- [54] P. Elumalai, J. M. Lim, Y. J. Park, M. Cho, P. J. Shea, and B. T. Oh, “Agricultural waste materials enhance protease production by *Bacillus subtilis* B22 in submerged fermentation under blue light-emitting diodes,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 43, no. 5, pp. 821–830, 2020, doi: 10.1007/s00449-019-02277-5.
- [55] M. Salari, M. Sowti Khiabani, R. Rezaei Mokarram, B. Ghanbarzadeh, and H. Samadi Kafil, “Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 122, pp. 280–288, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.136.
- [56] D. Lin, P. Lopez-Sanchez, R. Li, and Z. Li, “Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- nutrient source,” *Bioresour. Technol.*, vol. 151, pp. 113–119, 2014, doi: 10.1016/j.biortech.2013.10.052.
- [57] T. R. dos S. Mathias, P. F. de Aguiar, J. B. de Almeida e Silva, P. P. M. de Mello, and E. F. C. Sérvulo, “Brewery waste reuse for protease production by lactic acid fermentation,” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 55, no. 2, pp. 218–224, 2017, doi: 10.17113/ftb.55.02.17.4378.
- [58] M. L. Pla, S. Oltra, M. D. Esteban, S. Andreu, and A. Palop, “Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/365025.
- [59] Y. Yano, T. Oguma, H. Nagata, and S. Sasaki, “Application of logistic growth model to pharmacodynamic analysis of in vitro bactericidal kinetics,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 87, no. 10, pp. 1177–1183, 1998, doi: 10.1021/js9801337.
- [60] D. M. S. C. Dissanayake and F. M. Ismail, “Mathematical modeling of bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* using rotating biological fermentor,” *Proc. - 27th Eur. Conf. Model. Simulation, ECMS 2013*, no. 1989, pp. 459–465, 2013, doi: 10.7148/2013-0459.
- [61] J. E. Tillotson, *Modeling Microbial*. 2004.
- [62] S. Dimov, N. Kirilov, S. Peykov, and I. Ivanova, “Growth characteristics of twenty *Lactobacillus delbrueckii* strains isolated from bulgarian home made yoghurts,” *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 21, no. 2, pp. 172–176, 2007, doi: 10.1080/13102818.2007.10817439.
- [63] S. Hanief, L. Prasakti, Y. S. Pradana, and R. B. Cahyono, “Growth kinetic of,” vol. 020065, no. October, 2020.
- [64] D. E. Wachenheim, J. A. Patterson, and M. R. Ladisch, “Analysis of the logistic function model: Derivation and applications specific to batch cultured microorganisms,” *Bioresour. Technol.*, vol. 86, no. 2, pp. 157–164, 2003, doi: 10.1016/S0960-8524(02)00149-9.
- [65] M. Dhar and P. Bhattacharya, “Comparison of the logistic and the Gompertz curve under different constraints,” *J. Stat. Manag. Syst.*, vol. 21, no. 7, pp. 1189–1210, 2018, doi: 10.1080/09720510.2018.1488414.
- [66] J. Wang and X. Guo, “The Gompertz model and its applications in microbial growth and bioproduction kinetics: Past, present and future,” *Biotechnol. Adv.*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- vol. 72, no. February, p. 108335, 2024, doi: 10.1016/j.biotechadv.2024.108335.
- [67] P. Micha and M. G. Corradini, “Microbial growth curves: What the models tell us and what they cannot,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 51, no. 10, pp. 917–945, 2011, doi: 10.1080/10408398.2011.570463.
- [68] M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. Van’t Riet, “Modeling of the bacterial growth curve,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, no. 6, pp. 1875–1881, 1990, doi: 10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990.
- [69] J. B. J. Njalam’mano and E. M. N. Chirwa, “Determination of Growth Parameters of Butyric Acid-Degrading Bacterium, *Achromobacter xylosoxidans*, as a Function of Constant Temperatures in Batch System,” *Chem. Eng. Trans.*, vol. 76, pp. 1321–1326, 2019, doi: 10.3303/CET1976221.
- [70] S. Bhodiwal and T. Barupal, “Phosphate solubilizing microbes: an incredible role for plant supplements,” *MOJ Ecol. Environ. Sci.*, vol. 7, no. 5, pp. 170–172, 2022, doi: 10.15406/mojes.2022.07.00263.
- [71] T. Brettin *et al.*, “RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes,” *Sci. Rep.*, vol. 5, 2015, doi: 10.1038/srep08365.
- [72] B. D. Ondov *et al.*, “Mash: Fast genome and metagenome distance estimation using MinHash,” *Genome Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1186/s13059-016-0997-x.
- [73] I. Poblete-Castro, C. Wittmann, and P. I. Nikel, “Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 13, no. 1, pp. 32–53, 2020, doi: 10.1111/1751-7915.13400.
- [74] S. Ibrahim, M. Y. A. Shukor, N. A. Yazid, and S. A. Ahmad, “Microbial degradation of vegetable oils: A review,” *Malaysian J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 21, no. 3, pp. 45–55, 2018.
- [75] A. Urszula Fabiszewska and E. Białecka-Florjańczyk, “Factors Influencing Synthesis of Extracellular Lipases By *Yarrowia Lipolytica* in Medium Containing Vegetable Oils,” *J. Microbiol. Biotechnol. food Sci.*, vol. 4, no. 3, pp. 231–237, 2014, doi: 10.15414/jmbfs.2014-15.4.3.231-237.
- [76] M. G. Pereira, S. M. Mudge, and J. Latchford, “Bacterial degradation of vegetable oils,” *Chem. Ecol.*, vol. 14–15, no. 1–4, pp. 291–303, 1998, doi:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10.1080/02757549808037610.

- [77] S. The, I. Diseases, and N. M. Apr, “Studies on Bacterial Nutrition : The Possible Role of Inorganic Salts and of Alterations in the Culture Medium in Providing Growth-Promoting Effects Author (s): Stewart A . Koser , R . D . Finkle , A . Dorfman and Felix Saunders Published by : Oxford Un,” vol. 62, no. 2, pp. 202–208, 2016.
- [78] Y. Masson, P. Ainsworth, D. Fuller, H. Bozkurt, and Ş. Ibanoglu, “Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere,” *J. Food Eng.*, vol. 54, no. 2, pp. 125–131, 2002, doi: 10.1016/S0260-8774(01)00193-5.
- [79] M. Aalto-Araneda *et al.*, “Strain variability of *Listeria monocytogenes* under NaCl stress elucidated by a high-throughput microbial growth data,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 86, no. 6, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1128/AEM.02378-19.
- [80] M. I. E. Halmi, M. S. Shukor, W. L. W. Johari, and M. Y. Shukor, “Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta*,” *Asian J. Plant Biol.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–6, 2014, doi: 10.54987/ajpb.v2i1.81.
- [81] M. Caramihai and I. Severi, “Bioprocess Modeling and Control,” *Biomass Now - Sustain. Growth Use*, 2013, doi: 10.5772/55362.
- [82] J. W. Gatson, B. F. Benz, C. Chandrasekaran, M. Satomi, K. Venkateswaran, and M. E. Hart, “*Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 56, no. 7, pp. 1475–1484, 2006, doi: 10.1099/ijs.0.63946-0.
- [83] S. de los Santos Villalobos, R. I. Robles, F. I. Parra Cota, J. Larsen, P. Lozano, and J. M. Tiedje, “*Bacillus cabrialesii* sp. Nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*triticum turgidum* subsp. durum) in the yaqui valley, Mexico,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 69, no. 12, pp. 3939–3945, 2019, doi: 10.1099/ijsem.0.003711.
- [84] C. A. Dunlap, M. J. Bowman, and D. R. Zeigler, “Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. inaquosorum, *Bacillus subtilis* subsp. spizizenii and *Bacillus subtilis* subsp. stercoris to species status,” *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 113, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1007/s10482-019-01354-9.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [85] T. F. S. Barradas, A. C. P. Santos, A. L. Moro, and F. F. Araujo, “Bacillus Subtilis [Ehrenberg. (1835) Cohn 1872] improves water use efficiency in maize under drought conditions and two light intensities,” *Appl. Ecol. Environ. Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 3885–3895, 2018, doi: 10.15666/aeer/1604_38853895.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

ข้อมูลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติละลายฟอสเฟต

ตารางที่ ก.1 ค่าดัชนีละลายฟอสเฟต จำนวน 3 ซ้ำ ของไอโซเลตลำดับที่ 15, 2 และ 10 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียตามท้องตลาด (*B.subtilis* CS)

ตัวอย่างที่	<i>B.subtilis</i> CS	ไอโซเลตลำดับที่ 15	ไอโซเลตลำดับที่ 2	ไอโซเลตลำดับที่ 10
1	1.149	1.111	1.136	1.102
2	1.150	1.115	1.132	1.109
3	1.152	1.120	1.120	1.113

ตารางที่ ก.2 ค่า Acid phosphatase activity (4-nitrophenol micrograms/mL/h) ที่ pH 6.5 จำนวน 12 วัน ของไอโซเลตลำดับที่ 15, 2 และ 10 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียตามท้องตลาด (*B.subtilis* CS)

วันที่	<i>B.subtilis</i> CS	ไอโซเลตลำดับที่ 15	ไอโซเลตลำดับที่ 2	ไอโซเลตลำดับที่ 10
1	82.64	73.33	83.31	60.18
2	79.16	87.73	80.54	77.38
3	81.05	92.87	90.35	83.62
4	80.35	94.13	95.05	82.11
5	81.11	95.33	97.57	85.63
6	81.40	95.87	95.03	88.15
7	83.04	100.03	100.85	90.43
8	82.50	98.71	96.95	92.71
9	80.52	99.28	100.76	86.14
10	79.59	95.43	97.86	87.97
11	79.79	97.93	97.54	93.02
12	80.77	97.18	100.91	95.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 ค่า Alkaline phosphatase activity (4-nitrophenol micrograms/mL/h) ที่ pH 11.0 จำนวน 12 วัน ของไอโซเลตลำดับที่ 15, 2 และ 10 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียตามท้องตลาด (*B.subtilis* CS)

วันที่	<i>B.subtilis</i> CS	ไอโซเลตลำดับที่ 15	ไอโซเลตลำดับที่ 2	ไอโซเลตลำดับที่ 10
1	80.28	74.75	85.65	60.15
2	78.94	88.03	81.41	78.56
3	80.52	90.73	92.06	78.62
4	83.00	92.46	97.45	84.00
5	80.48	96.68	96.39	84.63
6	79.95	97.12	98.79	85.08
7	81.31	94.93	98.36	88.53
8	80.99	95.73	99.76	88.23
9	80.05	97.21	101.33	90.57
10	81.56	95.61	99.92	87.26
11	81.03	96.94	99.97	93.18
12	80.76	94.29	100.23	91.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ข้อมูลเพิ่มเติมของการระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์

ตารางที่ ข.1 การจัดลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงของไอโซเลตลำดับที่ 15

No	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise similarity (%)	Mismatch / Total nt.
1.	<i>Bacillus tequilensis</i>	KCTC1362 2	Gatson et al.2006[82]	AYTO0100004 3	99.93	1/1346
2.	<i>Bacillus cabrialesii</i>	TE3	De Los Santos Villalobos et al. 2019[83]	MK462260	99.93	1/1346
3.	<i>Bacillus inaquosorum</i>	KCTC1342 9	(Rooney et al. 2009) Dunlap et al. 2020[84]	AMXN0100002 1	99.93	1/1346
4.	<i>Bacillus subtilis</i>	NCIB3610	(Ehrenberg e 1835) Cohn 1872[85]	ABQL0100000 1	99.85	2/1346

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 การระบุสายพันธุ์ของไอโซเลตลำดับที่ 15

Genome	ANIb [%]	Aligned [%]	Aligned [bp]	Total [bp]
<i>Bacillus subtilis</i> E1	98.37	93.89	3797327	4044405
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> str. 168 [T]	98.35	93.32	3774403	4044405
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> DSM 10 [T]	98.35	93.31	3773681	4044405
<i>Bacillus subtilis</i> type strain: N	98.33	93.93	3798932	4044405
<i>Bacillus subtilis</i> B4143	98.33	93.28	3772822	4044405
<i>Bacillus subtilis</i> HJ5	98.02	92.51	3741362	4044405



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวพิมพ์อร ทองพันชั่ง
วัน เดือน ปีเกิด 4 พฤษภาคม 2537
ที่อยู่ บ้านเลขที่ 111/35 หมู่ 5 ตำบลหนองครก อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ รหัสไปรษณีย์ 33000

ประวัติการศึกษา:

2565 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา อาชีวอนามัยและความปลอดภัย มหาวิทยาลัย
สุโขทัยธรรมธิราช
2559 วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย:

2568 นำเสนอผลงานวิชาการ Study of Biomass Productivity of
Phosphate-Solubilizing Bacteria Using Rice Bran Oil as an
Alternative Media งานประชุมวิชาการนานาชาติ the 34th Thai
Institution of Chemical Engineering and Applied
Chemistry International Conference (TICHe2025) จังหวัดชลบุรี
2563 วิศวกรผลิตภัณฑ์ บริษัท อินเทอร์เน็ต วอเตอร์ทรีทเมนต์ จำกัด จังหวัด
ขอนแก่น
2560 วิศวกร บริษัท 505 โกลบอล จำกัด จังหวัดนครราชสีมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้