การคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการละลายฟอสเฟต

Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from Soil and Optimization for Groeth and Phosphate Solubilization

วิไลวรรณ ไชยศร*

Wilaiwan Chaisorn*

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปไม่สามารถละลายได้ เช่น ไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($Ca_3(PO_4)_2$ เฟอริกฟอสเฟต ($FePO_4$) และอลูมิเนียมฟอสเฟต ($AlPO_4$) เพื่อช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตจากดินในนาข้าว สวนยางพารา สวนปาล์มน้ำมัน และแปลงผัก ในจังหวัดนครศรีธรรมราช โดยเลี้ยงในอาหารคัดเลือกชนิด Pikovskaya agar และทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตในอาหารเหลวด้วยวิธี Watanabe และ Olsen's method จากผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต ซึ่งแสดงลักษณะวงใสรอบโคโลนีได้ทั้งหมด 17 ไอโซเลต จากดินทั้งทุกแหล่ง โดยไอโซเลต VP2 ที่คัดแยกได้จากที่ดินแปลงผักมีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด (วงใสขนาด 15±0.30 มิลลิเมตร) หลังจากนั้นเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมการละลายฟอสเฟตโดยการปรับปรุงองค์ประกอบของอาหาร Pikovskaya (PVK medium) พบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะประกอบด้วย กลูโคส 7.5 g/L เป็นแหล่งคาร์บอน $(NH_4)_2SO_4$ 6 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ยีสต์สกัด 2.5 g/L และอื่นๆ ตามสูตรดั้งเดิมเป็นองค์ประกอบที่เหมาะสม สำหรับปัจจัยทางด้านเคมี-กายภาพที่เหมาะสมคือปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 หรือ 7.0 และปรับอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 vvm โดยภายใต้สภาวะที่เหมาะสมค่าการเจริญและกิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูงสุดกับ 5.91 g/L น้ำหนักเซลล์แห้งและ 44.42 mg/L ตามลำดับ

คำสำคัญ : แบคทีเรีย, การละลายฟอสเฟต, สภาวะที่เหมาะสม

* อาจารย์ประจำสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
Corresponding author email: chaisorn.w@gmail.com

Abstract

Bacteria were able to solubilize phosphate available to plant from insubilize phosphate such as tricalcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$), ferric phosphate (FePO4) and aluminum phosphate (AlPO4) that their effectiveness on promoting the plant growth. This research aimed to screen phosphate solubilizing bacteria from soil from plantation of rice, rubber, palm and vegetable in Nakhon Si Thammarat by Pikovskaya agar and test effectiveness of Phosphate solubilization in liquid media by Watanabe and Olsen's method. The results showed that 17 isolates of phosphate solubilizing bacteria was obtained from all sources of soil. The most effective isolate was VP2 isolated from vagatable plantation gave higher solubilized activity (halozone of 15 mm). After that, the optimal conditions for VP2 growth and phosphate solubilization activity were studied by modified compostions of Pikovskaya medium (PVK medium) by conventional method. The optimal compositions of medium were contained with glucose 7.5 g/L as carbon source, $(NH_4)_2SO_4$ 6 g/L as nitrogen source, yeast extract 0.2 g/L and other composition of PVK medium. The physiochemical conditions were adjusted initial pH of culture medium at 6.0 or 7.0 and aeration rate of 2.0 vvm. Under the optimal condition, the maximum of VP2 growth and phosphate solubilization were 5.91 g/L DCW and 44.42 mg/L, respectively.

Keyword: Bacteria, Phosphate solubilizing, optimization

1. บทนำ

ฟอสฟอรัส (P) เป็นธาตุอาหารหลักของพืช ซึ่งมีผลต่อการงอกของราก การออกดอก การสร้างหัวและการสุกของผล ดินส่วนมากมีฟอสฟอรัสทั้งรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปที่ละลายยากหรือไม่ละลายและเป็นฟอสฟอรัสที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ซึ่งมีอยู่ประมาณ 95 – 99 เปอร์เซ็นต์ (Pradhan and Sukla, 2005) ซึ่งในดินโดยทั่วไปฟอสฟอรัสในดินมี 4 รูปแบบ คือ ฟอสฟอรัสที่ละลายอยู่ในสารละลายดิน ฟอสฟอรัสดูดยึดอยู่กับอนุภาคดิน ฟอสฟอรัสที่จับอยู่กับอินทรียวัตถุในดิน และสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟต ซึ่งฟอสฟอรัสจะมีประโยชน์ได้ก็ต่อเมื่อฟอสฟอรัสถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในรูปฟอสฟอรัสที่ละลายในดินเท่านั้นที่พืชสามารถดูดใช้ได้ (Brady, 2002) แต่อย่างไรก็ตามจากการที่ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลายดินมีค่อนข้างต่ำมาก สำหรับการชดเชยที่มาจากการละลายโดยธรรมชาติของฟอสฟอรัสอาจจะไม่พอเพียง สำหรับวิธีการชดเชยที่จะทำให้ฟอสฟอรัสในสารละลายดินมีเพียงพอถือว่าเป็นสิ่งที่มีความซับซ้อน เพราะฟอสฟอรัสพร้อมที่จะเกิดปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นๆ ที่อยู่ในดินแล้วเกิดเป็นสารประกอบต่างๆ เกิดขึ้น เช่น สารประกอบของแคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก อลูมินัม และฟลูออรีน เมื่อดินเป็นกรด

หรือเป็นด่าง ซึ่งทำให้ฟอสฟอรัสมีปริมาณต่ำและไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช (Stevenson, 2005) ดังนั้นการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มสารอาหารให้แก่พืชจึงเป็นการวิธีการที่เกษตรกรใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยที่การใช้ปุ๋ยเคมีในแปลงพืชผลทางการเกษตรของเกษตกรในปัจจุบันมีผลกระทบอย่างหนึ่งที่สำคัญคือการสะสมฟอสฟอรัสในรูปที่พืชไม่สามารถใช้ได้ในดินสะสมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ดังจะเห็นได้ว่าปัจจุบันปัญหาที่ดินที่ใช้ในการทำการเกษตรต่อเนื่องเป็นเวลานานเกิดปัญหาดินเสื่อมคุณภาพ (ยงยุทธ และคณะ 2551) ดังนั้นถ้าสามารถย่อยละลายฟอสเฟตในดินกลุ่มที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ให้พืชสามารถใช้ได้จัดเป็นแนวอย่างหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งจุลินทรีย์ในธรรมชาติบางชนิดมีศักยภาพในการละลายฟอสเฟตในดินให้พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตมีอยู่หลายกลุ่มทั้ง แอคติโนมัยซีท แบคทีเรีย และเชื้อรา เช่น *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., และ *Xanthomonas* spp. โดยจุลินทรีย์เป็นตัวที่ช่วยดูดซับธาตุฟอสฟอรัสในดินซึ่งปกติแล้วรากพืชไม่สามารถละลายฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายให้ละลายออกมาเป็นประโยชน์ต่อพืชได้ การละลายฟอสเฟตเกิดจากจุลินทรีย์สร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดไปย่อยละลายฟอสฟอรัสรูปที่ไม่ละลายให้มีละลายออกมาและเป็นฟอสฟอรัสที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ สารที่มีฤทธิ์เป็นกรดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมีทั้งเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซีติค กรดแลคติค และกรดอนินทรีย์ เช่น กรดไนตริค และกรดซัลฟูริค กรดอินทรีย์บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต (Chelate) กับแคลเซียมและแมกนีเซียม สามารถละลายฟอสเฟตทำให้ฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น (Yadav and Dadarwal, 1997) การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์เพื่อให้เกิดการละลายฟอสเฟตในดินที่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถใช้ได้ให้สามารถใช้ได้เป็นการใช้ประโยชน์จากแร่ธาตุที่มีอยู่ในดินหรือปุ๋ยเคมีที่เติมลงไปในดินให้เกิดประโยชน์สูงสุด ลดปริมาณปุ๋ยเคมี ซึ่งจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วทำให้มีศักยภาพสูงในการใช้ประโยชน์

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่คัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตโดยทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์และประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดิน

นำตัวอย่างดินจาก 4 แหล่ง คือ นาข้าว สวนยางพารา สวนปาล์มน้ำมัน และแปลงผัก โดยเก็บตัวอย่างดินที่ความลึก 15 เซนติเมตร จาก 6 จุดในหนึ่งตำแหน่งพื้นที่ นำตัวอย่างดินทำให้แห้งเพื่อให้ได้น้ำหนักดินตัวอย่างเริ่มต้นที่เท่ากันแล้วบดละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินทำโดยนำตัวอย่างดิน 1 กรัม มาเติมลงไป 9 มิลลิลิตรของนำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเขย่าให้กัน ทำ Serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8} ตามลำดับ 0.1 มิลลิลิตรของความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} นำไปเกลี่ย (spread) จานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Pikovskaya's agar medium (PVK) (Sharma, *et al.,* 2011) ที่มี Tricalcium phosphate ซึ่งไม่ละลายน้ำ นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน คัดเลือกจุลินทรีย์ที่โคโลนีเกิดวงใส วัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นด้วยเวอเนียร์ (Vernier caliper)

2.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลวสังเคราะห์ชนิด Pikovskaya's broth (PVK) บนที่เขย่าทีความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) นาน 16 ชั่วโมง ($O.D._{600nm}$~0.5-0.7) แล้วถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลวสังเคราะห์ชนิด Pikovskaya's broth (PVK) ที่มีการแปรผันองค์ประกอบและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ และทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ค่าการเจริญ (น้ำหนักเซลล์แห้ง) และค่าการละลายฟอสเฟตทุก 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง

2.2.1 องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตละลายฟอสเฟต

2.2.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอน ศึกษาผลแหล่งคาร์บอน 3 แหล่ง คือ กลูโคส ซูโครส กากน้ำตาล ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

2.2.1.2 ผลของความเข้มของแหล่งคาร์บอน ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยแปรผันความเข้มข้น 5 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร

2.2.1.3 ศึกษาผลแหล่งของไนโตรเจน ศึกษาผลแหล่งไนโตรเจน 3 แหล่ง คือ $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 และยูเรีย ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร

2.2.1.4 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยแปรผันความเข้มข้น คือ 2, 4, 6, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร

2.2.1.5 ผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัด ศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัด โดยแปรผันความเข้มข้น คือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

2.2.2 สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต

2.2.2.1 ผลพีเอชเริ่มต้นของอาการเลี้ยงเชื้อ ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยแปรผันพีเอช คือ 5, 6, 7, 8 และ 9 โดยการปรับพีเอชด้วย 5M NaOH และ 5M HCl

2.2.2.2 ผลของอากาศต่อการเจริญและการละลายฟอสเฟต ศึกษาผลของการให้อากาศโดยใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีปริมาตอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ลิตร โดยแปรผันอัตราการให้อากาศ คือ 1.5, 2.0 และ 2.5 vvm

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารสังเคราะห์ที่มีการแปรผันสภาวะทดสอบบนที่เขย่าทีความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) นาน 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ วัดค่าการเจริญโดยวิเคราะห์จากน้ำหนักของเซลล์แห้ง (Dry cell weight; DCW) และการละลายฟอสเฟต นำหนักที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนตำก่อนเซลล์และน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ออกจากกัน นำตะกอนเซลล์ล้างด้วยน้ำกลั่น หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์นำมาหาความเข้มข้นของฟอสเฟตโดยวิธีของ Watanabe และ Olsen's method (1965)

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance) โดยวิเคราะห์ค่าวาเรียนซ์ (one way analysis of variance) ตามการจัดการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) ทดสอบความความแตกต่างระหว่างการทดลองโดยใช้ค่า F-test ใช้ Least Significant Difference (LSD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในกรณีที่พบความแตกต่างระหว่างในชุดการ ทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS for window version 12.0

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดิน

3.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

แบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินคัดแยกได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Pikovskaya's agar medium (PVK) (Sharma, *et al.,* 2011) ที่มี Tricalcium phosphate ซึ่งไม่ละลายน้ำ ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน โคโลนีเกิดวงใสที่สามารถละลายฟอสเฟตได้จะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี จากการทดลองพบว่าจำนวนแบคทีเรียได้ทั้งหมด เท่ากับ 2.3×10^7, 3.3×10^5, 4.2×10^4 และ 6.0×10^7 CFU/mL สำหรับพื้นที่ นาข้าว สวนยางพารา สวนปาล์มน้ำมัน และแปลงผัก ตามลำดับ แต่จากโคโลนีทั้งหมดพบว่าสามารถคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตซึ่งแสดงลักษณะวงใสเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง PVK ได้ 3, 5, 2 และ 7 ไอโซเลต ตามลำดับ ผลของประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตจาก 17 ไอโซเลตที่แยกได้จากดินทั้ง 4 แหล่งสามารถละลายฟอสเฟตซึ่งให้ลักษณะวงใสรอบๆ โคโลนีพบว่าไอโซเลต R3, RP5, PP2 และ VP2 เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดสำหรับพื้นที่ นาข้าว สวนยางพารา สวนปาล์มและแปลงผักตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยมีค่าวงใสของการละลายเท่ากับ 7±0.14, 13±0.14, 12±0.30 และ 15±0.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้จึงคัดเลือกไอโซเลต VP2 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดไปศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต

3.2 ผลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย

3.2.1 องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตละลายฟอสเฟต

3.2.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอน ผลของแหล่งคาร์บอน 3 แหล่ง คือ กลูโคส ซูโครส และกากน้ำตาล โดยใช้ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตจากเชื้อไอโซเลต VP2 พบว่าแหล่งของคาร์บอนที่ต่างกันมีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต โดยการเจริญสูงที่สุดเท่ากับ 0.91, 0.76 และ 0.40 กรัมต่อลิตร และประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดเท่ากับ 7.41, 3.92 และ 4.29 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาล ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้การเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต

3.2.1.2 ผลของความเข้มของแหล่งคาร์บอน กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดที่คัดเลือกได้เมื่อศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้น 5 ความเข้มข้น

คือ ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร ต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของไอโซเลต VP2 พบว่าการเจริญสูงสุด (น้ำหนักเซลล์แห้ง) เท่ากับ 0.88, 1.70, 2.06, 2.91 และ 0.69 กรัมต่อลิตร และประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงสุด เท่ากับ 16.61, 20.63, 20.91, 25.87 และ 8.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยจากการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้น (0, 2.5, 5.0 และ 7.5 กรัมต่อลิตร) ประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของไอโซเลต VP2 เพิ่มขึ้นแต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 10 กรัมต่อลิตร พบว่าประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตลดลง ดังนั้นจากการทดลองพบว่าไอโซเลต VP2 ให้การเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงสุด (2.9 กรัมต่อลิตร และ 25.87 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ในอาหาร PVK-medium ที่มีการปรับสูตรอาหารโดยใช้น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตโดยวัดขนาดของวงใสของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารแข็ง PVK เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสนาน 7 วัน

พื้นที่	ไอโซเลต	ประสิทธิภาพการละลาย (ขนาดวงใส) (มิลลิเมตร)
นาข้าว	R1	5±0.20
	R2	3±0.15
	R3	7±0.14
สวนยางพารา	RP1	7±0.21
	RP2	8±0.31
	RP3	3±0.20
	RP4	6±0.21
	RP5	13±0.14
สวนปาล์มน้ำมัน	PP1	7±0.15
	PP2	12±0.30
แปลงผัก	VP1	7±0.24
	VP2	15±0.30
	VP3	9±0.37
	VP4	6±0.12
	VP5	8±0.25
	VP6	11±0.18
	VP7	10±0.21

3.2.1.3 ผลแหล่งของไนโตรเจน ผลของแหล่งไนโตรเจน 3 แหล่ง คือ Urea, $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต เมื่อเลี้ยงไอโซเลต VP2 ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ

$(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งให้การเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดเท่ากับ 3.53 กรัมต่อลิตร และ 33.90 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตจากไอโซเลต VP2 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) บนเครื่องเขย่า (180 rpm) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Nitrogen source	Maximum	
(0.5 g/L)	DCW (g/l)	Phosphate solubilization (g/L)
Urea	2.23[a]	20.11[a]
$(NH_4)_2SO_4$	3.53 [b]	33.90[b]
NH_4NO_3	1.59[c]	14.87[c]

หมายเหตุ [a, b, c,] Different letters in the same column indicate the significant diferrence ($p < 0.05$)

3.2.1.4 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ผลการศึกษาผลของความเข้มข้น (2, 4, 6, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร) ของแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียไอโซเลต VP2 พบว่าการเจริญของเชื้อสูงสุดเท่ากับ 1.97, 3.43, 3.69, 3.90 และ 3.44 กรัมต่อลิตร (ภาพที่1a) และประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงสุดเท่ากับ 24.45, 28.48, 32.90, 30.60 และ 29.55 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 1b) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ให้การละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด คือ 6 กรัมต่อลิตร

3.2.1.5 ผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัด จากผลการศึกษาผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PVK-medium ที่มีการ แปรผันความเข้มของยีสต์สกัด 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญสูงที่สุด (น้ำหนักเซลล์แห้ง) เท่ากับ 1.96, 3.43, 3.69. 3.90 และ 3.43 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 2a) ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงสุดเท่ากับ 26.14, 34.79, 31.90, 31.13 และ 28.72 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 2b) ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของยีสต์สกัดมีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต โดยความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสมคือ 2.5 กรัมต่อลิตร

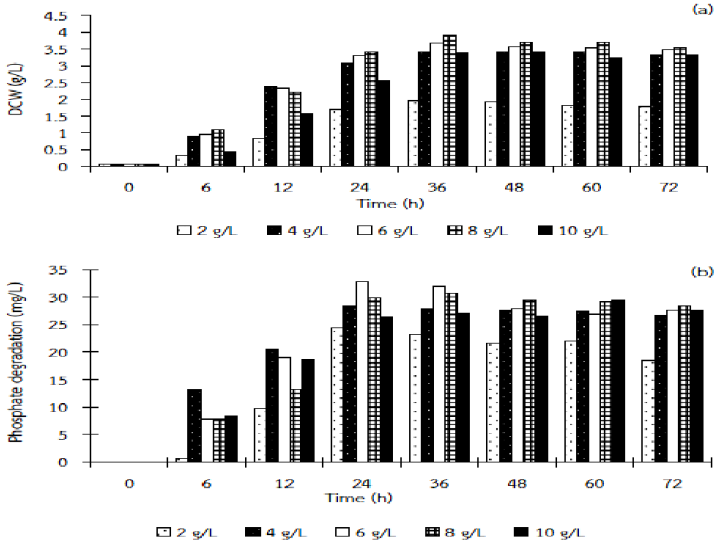
3.2.2 สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต

3.2.2.1 ผลพีเอชเริ่มต้นของอาการเลี้ยงเชื้อ จากการทดลองพบว่า เมื่อศึกษาผลของพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 5.0, 6.0, 6.5, 7.0 และ 8.0 ต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของไอโซเลต VP2 พบว่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 5.0, 6.0, 6.5, 7.0 และ 8.0 มีผลต่อการเจริญ (ภาพที่ 3a) และประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต (ภาพที่ 3b) โดยมีการเจริญ (น้ำหนักเซลล์แห้ง) สูงสุดเท่ากับ 2.32, 4.15, 5.30, 5.74 และ 1.96 กรัมต่อลิตร และประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงสุดเท่ากับ 3.92, 31.95, 40.17, 40.23 และ 20.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้าน

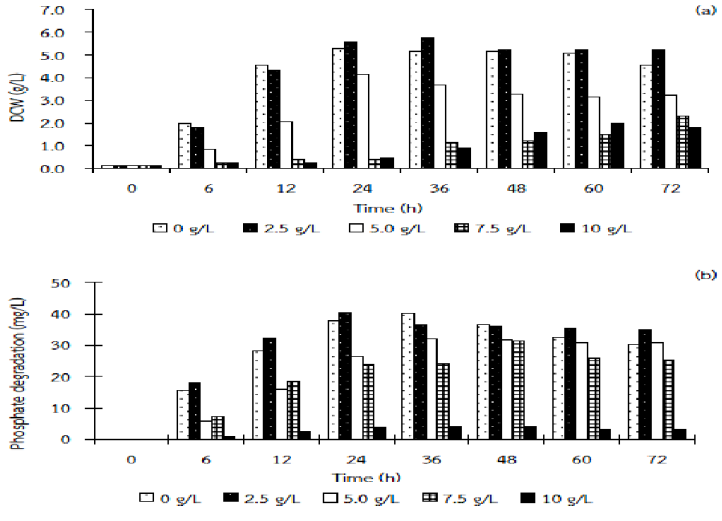
เท่ากับ 7.0 จะมีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดโดยมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 5.74 กรัมต่อลิตร และ 40.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 จะให้ค่าการเจริญที่สูงที่สุดแต่เมื่อพิจารณาการผลิตละลายฟอสเฟตชีวภาพพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น 6.5 และ 7.0 ให้การผลิตละลายฟอสเฟตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) จะเห็นได้ว่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตละลายฟอสเฟตเป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตละลายฟอสเฟตของไอโซเลต VP2

3.2.2.2 ผลของอากาศต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต

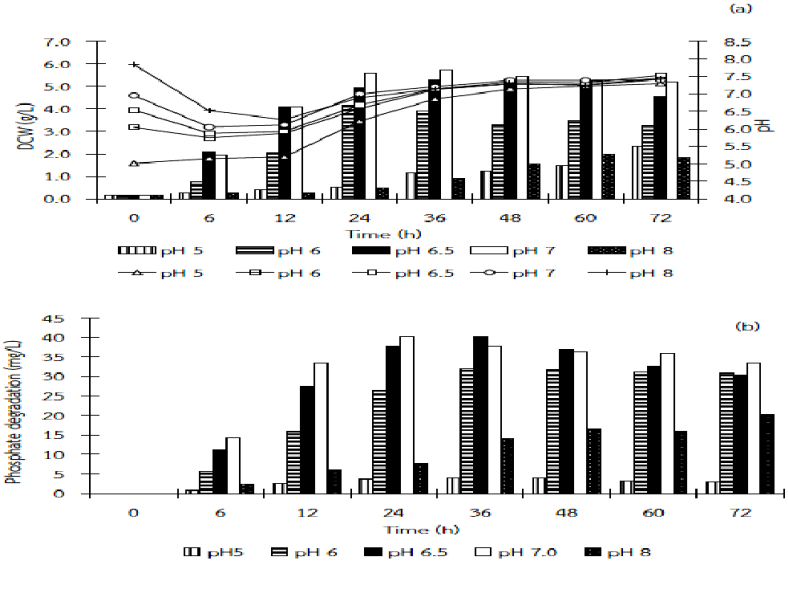
จากการทดลองเมื่อศึกษาผลของอัตราการให้อากาศด้วยอัตรา 1.5, 2.0 และ 2.5 vvm ต่อการเจริญ (ภาพที่ 4a) และประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต (ภาพที่ 4b) ซึ่งจากการทดลองพบว่าผลของอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5, 2.0 และ 2.5 vvm จะให้การเจริญที่สูงที่สุดเท่ากับ 4.85, 5.91 และ 5.78 กรัมต่อลิตร และประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตที่สูงที่สุดเท่ากับ 39.42, 44.42 และ 41.38 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าเมื่อให้อากาศเท่ากับ 2.0 vvm จะให้การเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตที่สูงที่สุด โดยอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมจะส่งผลต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในสภาวะการเลี้ยง



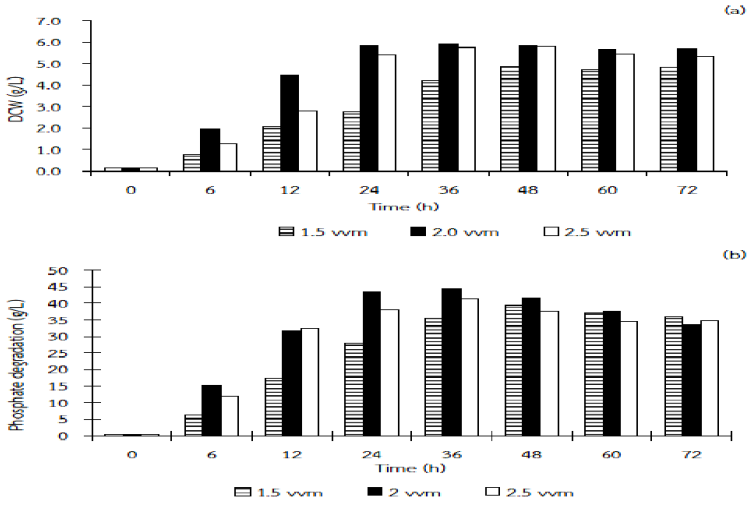
ภาพที่ 1 ผลของความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ (แหล่งไนโตรเจน) ต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตจากไอโซเลต VP2 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 ℃) บนเครื่องเขย่า (180 rpm) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 ผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตจากเชื้อ VP2 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 ℃) บนเครื่องเขย่า (180 rpm) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ พีเอชของน้ำเลี้ยงเชื้อและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตจากไอโซเลต VP2 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 ℃) บนเครื่องเขย่า (180 rpm) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 ผลการให้อากาศต่อการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตจากไอโซเลต VP2 ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) บนเครื่องเขย่า (180 rpm) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4. การอภิปรายและสรุปการผลวิจัย

แบคทีเรียย่อยที่มีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุดคือไอโซเลต R3, RP5, PP2 และ VP2 ซึ่งถูกคัดเลือกได้จากตัวอย่างดินนาข้าว ดินสวนยางพารา ดินสวนปาล์มน้ำมัน และดินแปลงผัก ตามลำดับ โดย ไอโซเลตVP2 เป็นไอโซเลตที่แยกได้จากแปลงผักที่มีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตที่ดีที่สุดจากทั้ง 4 ไอโซเลต จากผลการทดลองแปลงผักมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้มากที่สุดและเป็นบริเวณที่พบแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมการละลายฟอสเฟตที่สูง (ขนาดวงใส 15 มิลลิเมตร) คือ ไอโซเลต VP2 ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าพื้นที่ปลูกผักจะมีการให้ปุ๋ยและปริมาณน้ำที่บ่อยมากกว่าพื้นที่เกษตรอื่นๆ ซึ่งส่งผลให้มีปัจจัยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่า ถึงแม้ว่าจะมีพื้นที่นาข้าวแต่เนื่องด้วยในขณะที่เก็บตัวอย่างมาทำวิจัยเป็นช่วงระยะเวลาหลังการเก็บเกี่ยวของนาข้าว ไม่มีน้ำขัง ดินมีความแห้ง ส่งผลต่อปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ โดยปริมาณของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดินจะขึ้นอยู่กับชนิดของดินและพื้นที่ของเกษตรกรรมแต่ละประเภทที่แตกต่างกัน (ยงยุทธ, 2551) สำหรับพื้นที่สวนยางพาราและสวนปาล์มน้ำมันนั้นเป็นพื้นที่ไม่ค่อยได้มีการปรับสภาพหรือบำรุงรักษาดิน เช่น การรดน้ำ การพรวนดิน จึงเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการละลายฟอสเฟต เมื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญและประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตพบว่าแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็นปัจจัยสำคัญส่งเสริมในการเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟต องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ PVK-medium ที่มีการปรับปรุงองค์ประกอบให้เหมาะสมพบว่ากลูโคสความเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 6 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร เมื่อใส่เข้าไปร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆในอาหาร PVK-medium เดิมซึ่งประกอบด้วย Magnesium Sulphate ($MgSO_4.7H_2O$) 0.1 กรัมต่อลิตร Calcium Phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) 5 กรัมต่อลิตร NaCl 0.2 กรัม

ต่อลิตร KCl 0.2 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.2H_2O$ 0.002 กรัมต่อลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้น 6.5 และ 7 และควบคุมอัตราการให้อากาศ 2.0 vvm สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตได้สูงขึ้น ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) และแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต $[NH_4)_2SO_4]$ มีผลต่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ความเข้มข้นของกลูโคสที่สูงเกินไปมีผลต่อแรงดันภายในเซลล์ซึ่งมีผลยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์สารเมทาบอไลท์ภายในเซลล์ ประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ขึ้นกับสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์โดยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจัดเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมจะมีช่วยในการเจริญและเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ (Cunningham and Kuiack, 1992; Whitelaw, 2000; Mehata and Nautiyal, 2001; Pradhan and Sukla, 2005) โดยในการศึกษาครั้งนี้กลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตจัดเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับแบคทีเรียไอโซเลต VP2 ในขณะที่ *Aspergillus awamori* มีแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด คือซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร (Jena and Rath, 2014) มากไปกว่านั้นระยะเวลาของการเลี้ยงจะมีผลต่อประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตได้เช่นเดียวกัน โดยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมานอกเซลล์เพื่อละลายฟอสเฟต เช่น เอนไซม์ phosphatase เมื่อเลี้ยงเชื้อตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 5 กิจกรรมการละลายฟอสเฟตจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อไปถึงวันที่ 6 และหลังจากนั้นประสิทธิภาพของเอนไซม์จะลดลง (Qureshi, *et al.,* 2010, Lakeswari 2012). เป็นซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากประสิทธิภาพของเมทาบอลิซึมในการละลายสารอาหารหรือเกิดกระบวนการออโตไลซิสของเซลล์ (Lata, *et al.,*, 2013) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยเมื่อมีความเข้มข้นที่เหมาะสมจะให้กิจกรรมการละลายฟอสเฟตดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนโปรตอนได้ดีและมีโปรตอนมากเพียงพอเมื่อมีความเข้มข้นเหมาะสม โดยในจะมี NH^{4+} ซึ่งจะทำให้ H^+เกิดขึ้น ทำให้เกิดสภาวะเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นซึ่งมีส่วนช่วยให้เกิดการละลายของฟอสเฟตได้สูงขึ้น (Sridevi *et al.,* 2007). พีเอชที่เหมาะสมสำหรับเชื้อไอโซเลต VP2 คือ พีเอช 6.5 และ 7 ซึ่งให้ประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tarkur และคณะ (2014) ที่ศึกษาผลของพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการละลายฟอตเฟตของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตของเชื้อ *pseudomonas* sp. ซึ่งทดสอบในอาหาร NBRI-P media ที่มีการปรับพีเอช 5 ถึงพีเอช 9 พบว่าพีเอชที่ให้กิจกรรมการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดคือ พีเอช 7.0 โดยมีประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตเท่ากับ 788 mg/L) หลังการเลี้ยง 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาเชื้อ *Aspergillus awamori* พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 ให้ค่าการละลายฟอสเฟตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 4 ถึง 10 (Jena and Rath, 2014) ในขณะที่ Oyeleke & Oduwole (2009) และ Daniel และคณะ (2010) ที่ได้รายงานว่า เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการละลายฟอสเฟตจะทำงานได้ดีที่พีเอชช่วง 6-8 เช่น เอนไซม์ phytase จากเชื้อ *Aspergillus* sp. 5990 (Kim, *et al.,* 1999) และ *Aspergillus niger* St-6 (Tahir, *et al.,* 2010) เมื่อพีเอชของสภาวะการเลี้ยงลดลงจะส่งผลต่อการผลิตกรดซึ่งจะมีบทบาทต่อการละลายฟอสเฟตทั้งในกลุ่มอินทรีย์ฟอสเฟตอละอนินทรีย์

(Kpomblekou and Tabatabai, 1994; Deubel, *et al.,* 2000; Hinsinger, 2001; Stevenson, 2005; Khan, *et al.,* 2007 และ Henri, *et al.,* 2008)

อัตราการให้อากาศมีผลต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในสภาวะการเลี้ยง โดยออกซิเจนปริมาณน้อยที่สุดในสภาวะการเลี้ยงต้องเท่ากับปริมาณของออกซิเจนที่เชื้อต้องการในไปใช้ในการบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ (Gerhardt and Drew, 1994) ซึ่งปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการละลายของอากาศคือความหนืด เนื่องจากเมื่อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีการสารเมทาบอไลท์ออกมานอกเซลล์จะมีผลต่อความหนืดของน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งความหนืดจะมีผลต่อการแพร่ของอากาศซึ่งถ้าปริมาณอากาศในระบบลดลงซึ่งจะส่งผลให้การเจริญและประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตที่ลดลงได้

ดังนั้นจากการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตในดินในที่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถใช้ได้ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลของเชื้อจึงเป็นงานวิจัยที่ควรดำเนินการต่อเพื่อที่ได้ทราบสายพันธุ์ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดิน เพื่อเป็นข้อมูลในการส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ต่อไปในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

6. เอกสารอ้างอิง

ยงยุทธ โอสถสภา, อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์ และชวลิต ฮงประยูร. (2551). **ปุ๋ยเพื่อการเกษตรยั่งยืน.** กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Brady, N.C. and R.R. Weil. (2002). **The Nature and Properties of soils.** New Jersey: Prentice Hall.

Cunningham, J.E. and Kuiack, C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Pencillium bilaii.* **Applied Environmental Microbiology,** 58, 1451–1458.

Daniel, R.M., Peterson, M.E. and Danson, M.J. (2010). The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. **Biochemical Journal**, 425, 353–360.

Deubel, A., Gransee, A. and Merbach, W. (2000). Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **J Plant Nutrient and Soil Science**, 163 (4), 387–392.

Henri, F., Laurette, N.N., Annette, D., John, Q., Wolfgang, M., Francois-Xavier, M. and Dieudonne, N. (2008). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. **African Journal of Microbial Research**, 2, 171–178.

Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes. **A Review of Plant Soil**, 237, 173–195.

Jena, S.K. and Rath, C.C. (2014). Effect of environmental and nutritional conditions on phosphatase activity of *Aspergillus awamori* . **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, 4 (1): 45–56

Khan, M.S., Zaidi, A. and Wani, P.A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. **A review Agronomy for Sustain Development**, 27, 29–43.

Kim, D.S., Godber, J.S. and Kim, H.R. (1999). Culture conditions for a new phytase producing fungus. **Biotechnology Letters**, 21, 1077–081.

Kpomblekou, K. and Tabatabai, M.A. (1994). Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. **Soil Science**, 158, 442–453.

Lakeswari, N. (2012). Optimization of environmental parameters for maximum tannase production from cashew husk. **International Journal of Pharmaceutics**, 2, 375–379.

Mehata, S. and Nautiyal, C.S. (2001). An efficient method for qualitative screening of pyhosphate solubilizing bacteria. **Current Microbiology**, 43, 51–56.

Oyeleke, S.B. and Oduwole, A.A. (2009). Production of amylase by bacteria isolated from a cassava waste dumpsite in Minna, Niger State, **Nigeria. African Journal of Microbiology Research**, 3, 143–146.

Pradhan, N. and Sukla, L.B. (2005). Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, 5, 850–854.

Sharma,S., Kumar, V. and Tripathi, R.B. (2011). Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil . J. Microbiol. **Biotech**. Res. 2. pp. 90-95.

Sridevi, M., Mallaiah, K.V. and Yadav, N.C.S. (2007). Phosphate solubilizing by *Rhizobium* from *Crotalaria* species. **Journal of Plant Science**, 2, 635–639.

Stevenson, F.J. (2005). **Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulphur, Micronutrients.** New York : John Wiley and Sons,

Tahir, A., Mateen, B., Saeed, S., Uslu, H. (2010). Studies on the production of commercially important phytase from *Aspergillus niger ST-6* isolated from decay ingorganic soil. **Micologia Aplicada International**, 22, 51–57.

Thakur, D., Kaur, M. and Shyam, V. (2014). Optimization of best cultural conditions for high production of phosphate solubilizing activity by fluorescent *Pseudomonas* isolated from normal and replant site of apple and pear. **The bioscan**, 9(1): 143-150.

Vats, P. and Banerjee, U.C. (2002). Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* van *Teighem* obtained from rotten wood-logs**. Process Biochemistry**, 38, 211–217.

Whitelaw, M.A. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. **Advance Agronomy**, 69, 99–151.

Yadav, K.S. and Dadarwal, K.R. (1997). Phosphate solubilisation and mobilization through soil microorganisms. In K.R. Dadarwal (Ed.), Biotechnological **Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production,** p. 351.