



รายงานฉบับสมบูรณ์

ผลของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการ
เพาะปลูกอ้อยในสภาพแปลงทดลอง
Effect of nitrogen fixing bacteria on
sugarcane plantation in the field

โดย

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.สุวรรณา เนียมสนิท

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผศ.ดร.นิภา มลิณฑิสมัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

รศ.ดร.ประสิทธิ์ ใจศีล

มีนาคม พ.ศ. 2559

สัญญาเลขที่ RDG5650103

รายงานฉบับสมบูรณ์

ผลของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการ
เพาะปลูกอ้อยในสภาพแปลงทดลอง

Effect of nitrogen fixing bacteria on
sugarcane plantation in the field

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. ผศ.ดร.สุพรรณา เนียมสันทิ | ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 2. ผศ.ดร.นิภา มลิณทวิสมัย | ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 3. รศ.ดร.ประสิทธิ์ ใจคิล | ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

ชุดโครงการ การเพาะปลูกอ้อยด้วยจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโต
ของพืชในสภาพแปลงทดลอง

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

แบบสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัยที่ 1

1.1 ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) ผลของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเพาะปลูกอ้อยในสภาพแปลงทดลอง

(ภาษาอังกฤษ) Effect of nitrogen fixing bacteria on sugarcane plantation in the field

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย (1) นางสาวรณนา เนียมสนธิ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

หมายเลขโทรศัพท์/โทรสาร 043-202377 e-mail: suwan_ni@kku.ac.th

(2) นางนิภา มลิทธิสมย์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

หมายเลขโทรศัพท์ 043-342911 โทรสาร 043-342911

1.3 ชื่อที่ปรึกษาโครงการวิจัย

รศ.ดร. ประสิทธิ์ ใจศิลป์

ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

หมายเลขโทรศัพท์ 043-202360 โทรสาร 043-202361

1.4 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 งบประมาณที่ได้รับ 942,000 บาท

ระยะเวลาทำวิจัย ตั้งแต่ 15 กันยายน 2556 ถึง 14 สิงหาคม 2557

2. บทสรุปงานวิจัย

2.1 ความสำคัญ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล การปลูกอ้อยเพื่อให้ได้ผลผลิตของน้ำตาลสูง จำเป็นต้องมีการใส่ปุ๋ยบำรุงดิน ที่สำคัญคือปุ๋ยไนโตรเจน (nitrogen, N) ฟอสฟอรัส (phosphorus, P) และโปแตสเซียม (potassium, K) โดยไนโตรเจนเป็นธาตุที่ช่วยให้อ้อยเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบ ทำให้อ้อยแตกกอดีมีจำนวนลำมากทำให้น้ำหนักอ้อยมาก ถ้าอ้อยขาดไนโตรเจน จะทำให้ใบเหลืองแคระแกร็น แตกกอช้า หน่อไม่เจริญ อ้อยจะแก่เร็วกว่าปกติและคุณภาพอ้อยจะต่ำ ก๊าซไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่มีปริมาณมากในอากาศถึง 78 เปอร์เซ็นต์ การใส่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixing bacteria, NFB) จากอากาศในแปลงปลูกอ้อยจะช่วยลดต้นทุนในการซื้อปุ๋ยไนโตรเจน ลดการใช้ปุ๋ยเคมี เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพราะลดการชะ

ล้าหน้าดินที่มีไนโตรเจนหรือแอมโมเนียสูงแหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลทางอ้อมในการลดภาวะโลกร้อน สุวรรณ และคณะ (2552-2554) แยกเชื้อ NFB จากดินและอ้อยและพบว่าเชื้อ *Enterobacter* sp. 3LSO1 และ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ให้ประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ อ้อยในกระถาง เมื่อนำเชื้อไปเพิ่มปริมาณในวัสดุปลูก 2 ชนิด คือพีท (peat) และเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) แล้วนำไปผสมในดินเพื่อใช้ปลูกอ้อยในกระถาง พบว่าหลังจากปลูกอ้อยได้ 4 เดือน อ้อยที่ ปลูกโดยไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียหรือใส่ปุ๋ยยูเรียเพียงครั้งหนึ่ง ($\frac{1}{2}N$) ของอัตราแนะนำรวมกับการใส่เชื้อ *Enterobacter* sp. 3LSO1 หรือเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 มีการเจริญเติบโตมากกว่าหรือ เทียบเท่ากับอ้อยที่ใส่ปุ๋ยยูเรียแต่ไม่ใส่เชื้อ NFB ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษา ความสามารถของเชื้อ NFB ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ในแปลงทดลองในไร่

2.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) ผลผลิตลำเชื้อ NFB ด้วยซอล์เมตเพื่อใช้เพิ่มปริมาณและเป็นวัสดุยึดเกาะของเชื้อ
- 2) ศึกษาผลของเชื้อ NFB ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลอง
- 3) ติดตามการเปลี่ยนแปลงเชื้อ NFB ที่ใส่ลงไปดิน และต้นอ้อย ในสภาพแปลงทดลอง
- 4) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดินทางเคมีและจุลชีววิทยา

2.3 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

ตรวจวิเคราะห์ธาตุอาหารของดินที่จะใช้เตรียมแปลงปลูกทดลอง เตรียมผลิตภัณฑ์เชื้อ NFB สายพันธุ์ *Enterobacter* sp. 3LSO1 และ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 โดยใช้วัสดุปลูกทางการ เกษตร คือซอล์เมต (soilmate) โดยเลี้ยงเชื้อ NFB ในอาหารเหลว LB ผสมให้เข้ากันกับซอล์เมต เก็บ ที่อุณหภูมิประมาณ $10^{\circ}C$ นำชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ที่มีเชื้อไม่น้อยกว่า 10^7 cfu/g ไปทดลองกับอ้อยสาย พันธุ์ขอนแก่น 3 ในสภาพไร่ในพื้นที่ประมาณ 6 ไร่ โดยใส่เชื้อ 4.5 kg/แปลงย่อย การเตรียมแปลงปลูก ใช้รถไถชุดร่องอ้อยให้มีระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 1.65 เมตร ซึ่งเป็นวิธีการเตรียมแปลง เช่นเดียวกับที่ปฏิบัติในไร่ และใส่ท่อนพันธุ์อ้อยในร่องให้ห่างกันท่อนละประมาณ 30 cm ในลักษณะเป็น ร่องคู่ โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in randomized complete block design (RCBD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยเชื้อ NFB 4 ระดับ ได้แก่ 1) ไม่ใส่เชื้อ NFB (ตัวควบคุมใส่ซอล์เมตที่ นิ่งฆ่าเชื้อ) 2) เชื้อ 3LSO1 3) เชื้อ 5LSO2 4) เชื้อผสม 3LSO1 + 5LSO2 ส่วนปัจจัยปุ๋ยเคมี 3 ระดับ ได้แก่ 1) PK 2) $\frac{1}{2}N$ -PK 3) N-PK รวมทั้งหมด 12 ดำรับทดลองๆ ละ 4 ซ้ำ ขนาดแปลงในแต่ละดำรับ ทดลอง 8.5x8.5 ตารางเมตร โดยให้มีระยะขอบแต่ละดำรับทดลองห่างกันอย่างน้อย 1.5 เมตร (ตาม แนวขวางกับร่องอ้อย) ดังนั้นแต่ละแปลงทดลองจะปลูกอ้อย 5 แถว เว้น 1 แถว (ตามแนวยาวขนานกับ ร่องอ้อย) การใส่เชื้อ NFB จะใส่หลังจากปลูกอ้อยได้ 15 วัน พร้อมกับการใส่แม่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ใน อัตรา 50 kg/ไร่ และใส่ปุ๋ยอีกครั้งหลังจากปลูกอ้อยได้ประมาณ 5 เดือน โดยใช้สูตร 21-7-14 ในอัตรา 60 kg/ไร่ เก็บตัวอย่างดินและต้นอ้อยเมื่ออ้อยมีอายุ 3, 6 และ 11 เดือน เพื่อวิเคราะห์ผลของเชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลอง โดยนับจำนวนกอ วัดความสูง หาน้ำหนัก

แห่งนี้ นอกจากนี้ยังเก็บข้อมูลการสะสมปริมาณธาตุอาหารหลักในส่วนของลำต้นอ้อยและในดิน ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total P) และโปแตสเซียมทั้งหมด (Total K) รวมทั้งตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อในดิน และต้นอ้อยโดยตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ NFB โดยใช้อาหารแข็ง LGIP ที่ปราศจากไนโตรเจน นอกจากนี้ยังตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ *Entrobacter* sp. 3LSO1 และ *Stenotophomonas* sp. 5LSO2 ในดิน และต้นอ้อยโดยวิธีการติดตามยีนบางส่วน (Variable region, V3) ของ 16S RNA gene โดยใช้เทคนิค polymerized chain reaction (PCR) ร่วมกับ Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

2.4 ผลการวิจัยโดยย่อ

การเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อ NFB โดยใช้ซอเยล์เมตเป็นวัสดุพบว่าเชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากที่เตรียมในวันแรก และยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้แม้จะเก็บไว้นานถึง 45 วันก็ตาม โดยปริมาณเชื้อที่ได้ประมาณ 5.0×10^7 cfu/g นำเชื้อไปใส่ในแปลงทดลองที่ อ.บ้านแฮด ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำโดยมีค่าอินทรีย์วัตถุเท่ากับ 0.241% ค่าปริมาณ Total N 110 mg/kg

การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ไม่ทำให้ค่าความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และค่าการนำไฟฟ้าของดินที่ใช้ปลูกในทุกตำรับทดลองแตกต่างกัน แต่พบว่าทำให้ผลผลิตต่อไร่ในตำรับทดลองที่มีการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB และไม่ใส่หรือใส่ปุ๋ยยูเรียมีผลผลิตมากเทียบเท่าหรือมากกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ยยูเรียเต็มอัตรา

การตรวจติดตามเชื้อ *Entrobacter* sp. 3LSO1 และ *Stenotophomonas* sp. 5LSO2 โดยวิธีการติดตามยีนบางส่วน (Variable region, V3) ของ 16S RNA gene โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ DGGE พบว่าที่ 0 เดือน พบแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 มีแถบเดียว และพบแถบ V3 ของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 มี 3 แถบ ในตำรับทดลองที่มีการใส่นั้นๆ ซึ่งแถบที่พบนั้นตรงกับตำแหน่งของเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 2 เชื้อ ตามลำดับ ส่วนตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB จะไม่ปรากฏแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 เลย แต่เมื่อตรวจผลเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ในดินที่ 3 เดือน พบตำแหน่งแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 กระจายอยู่ทุกตำรับการทดลอง แต่ไม่พบแถบ V3 ที่ตรงกับลักษณะ 3 แถบของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 การศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ใส่ลงในแปลงทดลองในตัวอย่างรากและต้นอ้อย อายุ 3 เดือน พบแถบดีเอ็นเอในส่วน V3 ของเชื้อที่ตรงกับตำแหน่งของแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 กระจายอยู่เกือบทุกตำรับการทดลอง แต่ไม่พบแถบ V3 จากตัวอย่างที่ตรงกับลักษณะ 3 แถบของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 การตรวจผลเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ในดินและต้นอ้อยที่ 6 และ 11 เดือน ไม่พบตำแหน่งแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และ *Enterobacter* sp., 3LSO1 แต่พบจำนวนแถบ V3 ของเชื้อชนิดอื่นๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งจำนวนและความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบในดินนี้มีความสัมพันธ์กับ

ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในดินในเดือนที่ 3, 6 และ 11 โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น log 6.83, 5.05 และ 7.16 cfu/g ตามลำดับ จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการไหลมาปะปนกันถึงแม้ว่าพื้นที่แปลงทดลองจะมีความลาดเอียงเพียงเล็กน้อยก็ตาม ดังนั้นการตรวจผลของชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลองจึงมีความแปรปรวนและเห็นผลไม่ชัดเจนนัก โดยค่าเฉลี่ยความหวาน Polarity, Fiber, CCS และ Purity ของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 11 เดือนมีค่าเท่ากับ 19.37, 16.38, 11.84, 12.19 และ 84.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าผลผลิตเฉลี่ยในตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB มีค่าเฉลี่ยผลผลิต 7.17 ตัน/ไร่ มีความสูงเฉลี่ย 157.5 เซนติเมตร ในขณะที่ตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB มีค่าเฉลี่ยผลผลิต 5.93 ตัน/ไร่ มีความสูงเฉลี่ย 141.9 เซนติเมตร โดยตำรับทดลองที่ไม่ใส่หรือใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งอัตราส่วนกับการใส่เชื้อ NFB จะมีจำนวนต้นและน้ำหนักแห้งใกล้เคียงหรือมากกว่าตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ยยูเรียเต็มอัตราแสดงให้เห็นว่าการใส่เชื้อ NFB ช่วยลดการใส่ปุ๋ย N ลงได้ถึงครึ่งหนึ่งโดยผลผลิตที่ได้คงเดิมหรือมากกว่า สำหรับการสะสมปริมาณ Total NPK ในอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ที่เป็นเชื้อ 3LSO1 มีการสะสมปริมาณ Total N ในอ้อยในตำรับทดลองที่ไม่ใส่ปุ๋ยยูเรีย (N) สูงกว่าตำรับทดลองที่ใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งและเต็มอัตรา ตามลำดับ โดยพบว่าปริมาณ Total N และ Total K ในอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 6 เดือน มีแนวโน้มลดลงจากเดือนที่ 3 ประมาณกึ่งหนึ่งและลดลงอีกกึ่งหนึ่งในเดือนที่ 11 สำหรับค่าการวิเคราะห์ Total NPK, available N และ available P ในดินไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ

2.5 ผลผลิตและผลลัพธ์จากงานวิจัย

1) สามารถพัฒนากรรมวิธีในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเชื้อ NFB เชื้อ *Entrobacter* sp. 3LSO1 และ *Stenotophomonas* sp. 5LSO2 ที่เหมาะสมเพื่อใช้งานในสภาพไร่ สำหรับพื้นที่ ประมาณ 4 ไร่ สามารถผลิตได้ในเวลา 1 เดือน ต้นทุนประมาณ 10000 บาท เชื้อ *Stenotophomonas* sp. 5LSO2 เข้าไปอยู่อาศัยในรากพืชได้และมีชีวิตรอดในดินดีกว่าสายพันธุ์ *Entrobacter* sp. 3LSO1

2) สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตอ้อยได้ ผลผลิตเฉลี่ยในตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB มีค่าเฉลี่ย 7.17 ตัน/ไร่ ในขณะที่ตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB ค่าเฉลี่ยผลผลิต 5.93 ตัน/ไร่ ซึ่งแสดงว่าเชื้อ NFB สามารถเพิ่มผลผลิตโดยรวมได้มากขึ้นถึงประมาณ 20% ทางด้านคุณภาพทำให้มีความสูง มีการแตกกอมากขึ้น และมีการสะสมปริมาณ Total N ในอ้อยในตำรับทดลองที่ไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียสูงกว่าตำรับทดลองที่ใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งและเต็มอัตรา ตามลำดับ มีความหวาน CCS เท่ากับ 12.19 ดังนั้น การใช้เชื้อ *Entrobacter* sp. 3LSO1 และ *Stenotophomonas* sp. 5LSO2 สามารถทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีได้

3) คุณภาพของดินทางเคมีและทางจุลินทรีย์ไม่เห็นผลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนในเชิงปริมาณ แต่ สามารถตรวจพบเชื้อ *Stenotophomonas* sp. 5LSO2 ที่ทนอยู่ในดินได้ถึง 3 เดือน ด้วยวิธี DGGE

4) สามารถสร้างเครือข่ายเกษตรกรได้ 1 ราย คือ นางสาวรณิ จันทรเพ็ง

3. ข้อเสนอแนะเพื่อนำผลงานไปใช้ประโยชน์

การศึกษาในครั้งนี้มีข้อผิดพลาดหลายประการ อาทิเช่น การเตรียมแปลงที่ไม่อาจใส่เชื้อพร้อมกับการปลูกอ้อยซึ่งเป็นข้อจำกัดของเกษตรกรและผู้วิจัยในเรื่องเวลาและต้องการเลียนแบบการปลูกของเกษตรกร นอกจากนี้การที่มีการแบ่งแปลงย่อยโดยปลูกอ้อยทั้งหมด 5 แถวต่อตารางทดลอง (8.5x8.5 ตารางเมตร) และมีช่องว่างกันเป็นทางเดินโดยรอบแปลงทุกด้านๆ ละ 1.5 เมตร ทำให้การเจริญเติบโตของอ้อยไม่สม่ำเสมอโดยอ้อยที่อยู่แถวริมนอกสุดมีการเจริญเติบโตมากที่สุด และแถวที่อยู่ตรงกลางมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด นอกจากนี้ความลาดเอียงของแปลงทดลองแม้เพียงเล็กน้อยก็ตามก็ทำให้เชื้อสามารถไหลไปปะปนกันได้ สิ่งเหล่านี้ล้วนมีผลทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ดีเท่าที่ควร ซึ่งกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่ประเมินโครงการได้ให้ผู้วิจัยทำการทดลองซ้ำในสถานที่ใหม่ ซึ่งได้ให้ผู้วิจัยทำการทดลองโดยทำเป็นลักษณะ split plot โดยคณะผู้วิจัยได้เพิ่มจำนวนแถวในการปลูกของแต่ละตารางทดลองเป็น 9 แถว มีร่องน้ำกันแต่ละ main plot (เชื้อชนิดเดียวกัน) การเก็บผลการทดลองจะเก็บจาก 3 แถวกลางเพื่อลดอิทธิพลของอ้อยแถวริมที่มีการเจริญเติบโตมากกว่าแถวอื่นๆ นอกจากนี้ในการทดลองอื่นที่ผู้วิจัยได้ศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าเชื้อ NFB ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้เมื่อปลูกโดยใส่ปุ๋ยยูเรียเพียง 1 ใน 3 ของอัตราแนะนำสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้เทียบเท่ากับการปลูกอ้อยที่มีการใส่ปุ๋ยยูเรียเต็มอัตราแนะนำ นอกจากนี้ยังทำให้มีการสะสมของธาตุอาหารในดินและต้นอ้อยมากกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่เชื้อ NFB และที่สำคัญคือสามารถตรวจพบเชื้อ NFB ที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ในดินและในต้นอ้อยซึ่งน่าจะส่งผลดีต่อการปลูกอ้อยต่อไป

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (NFB) 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter* sp. 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้ซอฮอล์เมตเป็นวัสดุพาในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 และตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงเชื้อ NFB ที่ใส่ลงไปดินและต้นอ้อยพร้อมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการของดินทางเคมีและจุลชีววิทยาในสภาพแปลงทดลองในไร่ โดยเตรียมเชื้อ NFB ในอาหารเหลว LB ผสมให้เข้ากันกับซอฮอล์เมต เก็บที่อุณหภูมิประมาณ 10°C นำชีวภัณฑ์เชื้อ NFB 4.5 kg ที่มีเชื้อประมาณ 10^7 cfu/g ใส่ในแต่ละแปลงย่อย โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in randomized complete block design (RCBD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยเชื้อ NFB 4 ระดับ ได้แก่ 1) ไม่ใส่เชื้อ NFB 2) เชื้อ 3LSO1 3) เชื้อ 5LSO2 4) เชื้อผสม 3LSO1+5LSO2 ส่วนปัจจัยปุ๋ยเคมี 3 ระดับ ได้แก่ 1) PK 2) $\frac{1}{2}$ N-PK 3) N-PK รวมทั้งหมด 12 ดำรับทดลองๆ ละ 4 ซ้ำ การศึกษาทำในดินที่มีอินทรีย์วัตถุต่ำ แต่ละแปลงทดลองจะปลูกอ้อย 5 แถว ในพื้นที่ 8.5x8.5 ตารางเมตร ที่มีทางเดินรอบแปลงขนาด 1.5 เมตร ใส่เชื้อ NFB พร้อมกับการใส่แม่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ในอัตรา 50 kg/ไร่ จะใส่หลังจากปลูกอ้อยได้ 15 วัน และใส่ปุ๋ยอีกครั้งหลังจากปลูกอ้อยได้ประมาณ 5 เดือน โดยใช้สูตร 21-7-14 ในอัตรา 60 kg/ไร่ พบว่าเชื้อ NFB ที่ใส่ในแปลงทดลองไม่มีผลต่อค่าความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และค่าการนำไฟฟ้าของดินที่ใช้ปลูก การตรวจติดตามเชื้อ *Enterobacter* sp. 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ในดินและอ้อยใช้วิธีการติดตามยีน Variable region ส่วน V3 ของ 16S rRNA โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ DGGE พบว่าดินที่ 0 เดือน ปรากฏแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 มีแถบเดียว และพบแถบ V3 ของเชื้อ *Enterobacter* sp. 3LSO1 3 แถบ ในดำรับทดลองที่มีการใส่เชื้อนั้นๆ เท่านั้น ซึ่งตรงกับตำแหน่งที่พบในเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 2 เชื้อ นอกจากนี้ยังพบแถบของเชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 ในทุกดำรับทดลองในตัวอย่างดินและอ้อยที่ 3 และ 6 เดือนด้วย อย่างไรก็ตามแถบเหล่านี้จะจางลงเรื่อยๆ ในตัวอย่างดินและอ้อยที่ 3, 6 และ 11 เดือน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเกิดการปนเปื้อนของเชื้อ NFB ไปยังทุกดำรับทดลองและเชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าเชื้อ *Enterobacter* sp. 3LSO1 ดังนั้นจึงยากที่จะประเมินผลของเชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย อย่างไรก็ตามพบว่าผลผลิตเฉลี่ยในดำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB มีค่าเฉลี่ยผลผลิต 7.17 ตัน/ไร่ มีความสูงเฉลี่ย 157.5 เซนติเมตร ในขณะที่ดำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB ค่าเฉลี่ยผลผลิต 5.93 ตัน/ไร่ มีความสูงเฉลี่ย 141.9 เซนติเมตร โดยดำรับทดลองที่ไม่ใส่หรือใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งอัตราพร้อมกับการใส่เชื้อ NFB จะมีจำนวนต้นและน้ำหนักแห้งใกล้เคียงหรือมากกว่าดำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ยยูเรียเต็มอัตราแสดงให้เห็นว่า การใส่เชื้อ NFB ช่วยลดการใส่ปุ๋ย N ลงได้ถึงครึ่งหนึ่งโดยผลผลิตที่ได้คงเดิมหรือมากกว่า

คำสำคัญ การเพาะปลูกอ้อย, เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน, ซอฮอล์เมต, การส่งเสริมการเจริญเติบโต, สภาพแปลงทดลอง

Abstract

The present work aims to evaluate the efficiency of 2 strains of nitrogen fixing bacteria (NFB), *Enterobacter* sp. 3LSO1 and *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2, formulated by using soilmate as carrier material for enhancing growth of sugarcane variety Khon Kaen 3, to follow the changeable of these NFB in soil and sugarcane, and to study the changing of some soil chemical and microbiological properties in the field trial. The NFB were prepared in LB broth, mixed thoroughly with soilmate, stored at temperature about 10°C. The 4.5 kg of formulated NFB about 10^7 cfu/g were applied into each sub-plot. The experiments were designed in factorial by randomized complete block design (RCBD) with 2 main factors as followed: 4 NFB levels; 1) No NFB, 2) 3LSO1, 3) 5LSO2 and 4) 3LSO1 mixed with 5LSO2; and 3 chemical fertilizer levels; 1) PK 2) $\frac{1}{2}$ N-PK 3) N-PK. There were 12 treatments with 4 replicates. The studies were conducted in the low organic matter soil. Each sub-plot contained 5 rows of sugarcane in 8.5x8.5 m² with 1.5 m of space surrounded. The NFB and chemical fertilizers formula 15-15-15 at rate 50 kg/rai were applied at 15 days after planting. Only chemical fertilizers formula 21-7-14 at rate 60 kg/rai were applied again at 5 months after planting. It was found that NFB showed no effect on moisture, acid-base and the electrical conductivity of the planting soil. The monitoring of *Enterobacter* sp. 3LSO1 and *S. maltophilia* 5LSO2 were assessed by tracking Variable region, V3 of 16S RNA gene in sugarcane and in soil of each treatment by using PCR and DGGE technique. The results of soil sample at 0 month showed one band of V3 region of *S. maltophilia* 5LSO2 as well as 3 bands of V3 region of *Enterobacter* sp. 3LSO1 only in the treatments that each NFB were applied. These bands were corresponding to the bands found in pure culture. Furthermore, the position of band of *S. maltophilia* 5LSO2 was established in each soil and sugarcane samples of each treatments collected at 3 and 6 month after planting. However, this band was faded in the soil and sugarcane samples of 3, 6 and 11 months, respectively. These results suggested that NFB were contaminated in each treatment, moreover, *S. maltophilia* 5LSO2 was more survival than *Enterobacter* sp. 3LSO1. So, it was not easily to evaluate the efficiency of NFB for enhancing growth of sugarcane. However, the results showed mean production and mean height of the treatments applying the NFB were 7.17 ton/rai and 157.5 cm, while mean production and mean height of the control treatments (no NFB) were 5.93 ton/rai and 141.9 cm, respectively. Moreover, the treatments that applied no or half strength of N with NFB inoculation displayed the same amount or more number of shoots and dry weight than the treatments that applied full strength of N without NFB inoculation. These results suggested that NFB inoculation could reduce N fertilizer by up to half strength with the production remain the same or more.

Keywords Sugarcane Plantation, Nitrogen Fixing Bacteria, Soil Mate, Enhancing Growth, Field

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้ ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประสิทธิ์ ใจศิลป์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์หลายๆ ด้านทั้งด้านสถิติ ด้านเกี่ยวกับการเกี่ยวผลผลิต และขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สนั่น จอกลอย ที่ได้ให้คำปรึกษาด้านสถิติ

ขอขอบคุณ คุณกิตติพิชญ์ อังสธิตยธาวร เจ้าของไร่พุลสวัสดิ์ ที่ให้เข้าสถานที่ทดลองและให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในเรื่องการปลูกอ้อย รวมทั้งการช่วยจัดหาคนงานมาช่วยในการจัดการไร่อ้อยในช่วงเวลาต่างๆ

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณณัฐวุฒิ มีศิลป์ นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คุณธานี ธรรมรัตน์ และนายธนพงศ์ ศุภฤกษ์ ที่เป็นผู้ช่วยวิจัยในการเตรียมเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เตรียมอุปกรณ์ต่างๆ และดูแลความเรียบร้อยต่างๆ ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บุคลากร และนักศึกษาจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุกท่านที่ช่วยเป็นแรงเสริมในการเก็บเกี่ยวตัวอย่างทุก ๆ ครั้ง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เจ้าหน้าที่และบุคลากรจากศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกสำหรับสถานที่ทดลองและการวิเคราะห์ธาตุอาหาร

สารบัญ

	หน้า
แบบสรุปผู้บริหาร	ก
บทคัดย่อ	ฉ
Abstract	ช
กิตติกรรมประกาศ	ซ
สารบัญ	ณ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
คำย่อและสัญลักษณ์	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับเมื่อการดำเนินงานเสร็จสิ้นที่เป็นรูปธรรม และตัวชี้วัด ความสำเร็จของโครงการ	3
1.4 กระบวนการผลักดันผลงานดังกล่าวออกสู่การใช้ประโยชน์	5
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ความสำคัญของอ้อย	6
2.2 ความสำคัญของปุ๋ยไนโตรเจนต่อการเพาะปลูกอ้อย	6
2.3 แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับการเพาะปลูกอ้อย	8
2.4 ซอยล์เมต (Soil mate)	11
2.5 เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	12
3.1 การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้วัสดุทางการเกษตร	12
3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเพื่อ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยภายใต้สภาวะแปลงทดลอง	13
3.3 การตรวจวิเคราะห์ผลของชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ของอ้อย	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ NFB ในดิน และต้นอ้อยในแปลงปลูกทดลอง	17
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย	22
4.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินและซอร์บ์เมต	22
4.2 การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้วัสดุทางการเกษตร	23
4.3 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน	24
4.4 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงชนิดของเชื้อ NFB	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก ก ภาคผนวก	56
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	57
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้เตรียม DGGE	58
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย	59

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1	แสดงผลผลิตและตัวชี้วัดของแผนงานวิจัย	4
ตารางที่ 1.2	แสดงผลลัพธ์และตัวชี้วัดของแผนงานวิจัย	4
ตารางที่ 3.1	รายละเอียดคำรับทดลอง	14
ตารางที่ 3.2	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR สำหรับ full length ในปริมาตรรวม 20 μ l	19
ตารางที่ 3.3	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR สำหรับ V3 region ในปริมาตรรวม 50 μ l	19
ตารางที่ 4.1	ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินและซอร์บเมตก่อนปลูกอ้อย	23
ตารางที่ 4.2	ปริมาณเชื้อ NFB ที่ตรวจนับได้จากวัสดุปลูกซอร์บเมต	24
ตารางที่ 4.3	ค่าเฉลี่ยความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และค่าการนำไฟฟ้า ของดินหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน	25
ตารางที่ 4.4	ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดินหลังจากปลูกอ้อยได้ 3, 6 และ 11 เดือน	26
ตารางที่ 4.5	ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ที่ตรวจพบในรากและลำต้นอ้อยหลังจากปลูกอ้อยได้ 3, 6 และ 11 เดือน	27
ตารางที่ 4.6	ค่าเฉลี่ยความหวานของอ้อยบริเวณโคนและกลางลำต้นอ้อย หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 10 เดือน (วัดโดยใช้ hand refractometer)	28
ตารางที่ 4.7	ค่าเฉลี่ยความหวาน Polarity, Fiber, CCS และ Purity ของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 11 เดือน	29
ตารางที่ 4.8	ค่าเฉลี่ยจำนวนต้น/ไร่ และน้ำหนักแห้งต้น/ไร่ หลังจากปลูกอ้อยได้ 3, 6 และ 11 เดือน	30
ตารางที่ 4.9	ค่าเฉลี่ยความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อย และน้ำหนักสดอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 11 เดือน	31
ตารางที่ 4.10	ค่าเฉลี่ยปริมาณ Total NPK ของต้นอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน	32
ตารางที่ 4.11	ค่าเฉลี่ยปริมาณอินทรีย์วัตถุ Total N และ available N ในรูป NH_4^+ และ NO_3 ของดินที่ปลูกอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน	34
ตารางที่ 4.12	ค่าเฉลี่ยปริมาณอินทรีย์วัตถุ Total P, available P และ Total K ของดินที่ปลูกอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน	35

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 3.1	รูปวาดแปลงทดลอง 96 ตำรับทดลอง	15
ภาพที่ 3.2	การตีแปลงทดลอง 96 ตำรับทดลองโดยใช้ไม้ไผ่ปักไว้ จะเห็นการเว้นพื้นที่ทางเดินตามแนวขวางในแต่ละแปลงย่อยอย่างชัดเจน	15
ภาพที่ 3.3	แสดงการปลูกอ้อยโดยใช้รถและคนงานควบคุมในแปลงทดลอง	16
ภาพที่ 3.4	แสดงร่องการปลูกอ้อย และช่องว่างทางเดินตามแนวยาวในแปลงทดลอง	16
ภาพที่ 4.1	ภาพรวมแปลงทดลองที่ไร่อ้อยพุลสวัสดิ์ถาวร อ.บ้านแฮด จ.ขอนแก่น หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน	24
ภาพที่ 4.2	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in 40-60 % denaturing gradients of background of soil sample.	37
ภาพที่ 4.3	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in replication 3 (denaturing gradients from 40 to 60 %).	38
ภาพที่ 4.4	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in replication 4 (denaturing gradients from 40 to 60 %).	39
ภาพที่ 4.5	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in 40-60 % denaturing gradients of replication 3 for 3 months of plantation.	41
ภาพที่ 4.6	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in 40-60 % denaturing gradients of replication 4 for 3 months of plantation.	42
ภาพที่ 4.7	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in 40-60 % denaturing gradients of replication 3 for 6 months of plantation.	43
ภาพที่ 4.8	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane root in 40-60 % denaturing gradients of replication 1 for 3 months of plantation.	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 4.9	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane stalk in 40-60 % denaturing gradients of replication 1 for 3 months of plantation.	46
ภาพที่ 4.10	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane stalk in 40-60 % denaturing gradients of replication 1 for 6 months of plantation.	47
ภาพที่ 4.11	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane stalk in 40-60 % denaturing gradients of replication 1 for 12 months of plantation.	49
ภาพที่ 4.12	DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane stalk in 40-60 % denaturing gradients of replication 2 for 12 months of plantation.	50

คำย่อและสัญลักษณ์

ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
½NPK	a half of nitrogen phosphorus potassium
⅓NPK	a third of nitrogen phosphorus potassium
NH ₄ ⁺	ammonium
APS	ammonium persulfate
Ca	calcium
cm	centimeter
cfu	colony forming unit
cfu/g	colony forming unit per gram
CCS	commercial Cane Sugar
C	cytosine
DAF	day after formulation
°C	degree celsius
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
3LSO1	<i>Enterobacter</i> sp. 3LSO1
EtBr	ethidium bromide
RCBD	factorial in randomized complete block design
g	gram
G	guanine
IAA	indole-3-acetic acid
IAM	indole acetamide
kg	kilogram
kgN	kilogram nitrogen
l	liter
log	logarithm
m	meter
μl	microliter
μM	micrometer
mg	milligram

mg/ kg	milligram per kilogram
ml	milliliter
mm	millimeter
min	minute
M	molarity
MAT	month after transplantation
ng	nanogram
nm	nanometer
nmol	nanomolarity
Nested PCR	nested polymerase chain reaction
NO ₃ ⁻	nitrate
N	nitrogen
NFB	nitrogen fixing bacteria
No NFB	no nitrogen fixing bacteria
NPK	nitrogen phosphorus potassium
OM	organic matter
%	percent
P	phosphorus
PK	phosphorus potassium
K	potassium
PGPB	plant growth promoting bacteria
PCR	polymerase chain reaction
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
rpm	round per minute
5LSO2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 5LSO2
SAR	systemic acquired resistance
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TAE buffer	tris-acetate-EDTA buffer
v/v	volume per volume

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยทั่วไปหมายถึงอ้อยโรงงาน ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล ผลผลิตอ้อยในปี 2553/54 รวมประมาณ 95 ล้านตัน สามารถผลิตน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายดิบประมาณ 40 และ 55 ล้านกระสอบ ตามลำดับ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2555) นอกจากนี้ยังมีผลผลิตอื่นอีกมากมายจากอุตสาหกรรมน้ำตาล เช่น กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลผลิตรองที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ เป็นต้น จากการที่น้ำมันในตลาดโลกมีราคาสูงขึ้น ทำให้รัฐบาลส่งเสริมให้มีการผลิตเอทานอลเพื่อผสมในน้ำมันเบนซิน อันเป็นการลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงได้ทางหนึ่ง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มผลผลิตอ้อยขึ้นด้วย

การปลูกอ้อยเพื่อให้ได้ผลผลิตของน้ำตาลสูง จำเป็นต้องมีการใส่ปุ๋ยบำรุงดิน ที่สำคัญคือปุ๋ยไนโตรเจน (nitrogen, N) ฟอสฟอรัส (phosphorus, P) และโปแตสเซียม (potassium, K) โดย N เป็นธาตุที่ช่วยให้อ้อยเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบ ทำให้อ้อยแตกกอดี มีจำนวนลำมากทำให้น้ำหนักอ้อยมาก ถ้าอ้อยขาด N จะทำให้ใบเหลืองแคระแกร็น แตกหน่อช้า หน่อไม่เจริญ อ้อยจะแก่เร็วกว่าปกติและคุณภาพอ้อยจะต่ำ ก๊าซ N เป็นส่วนประกอบที่มีปริมาณมากในอากาศถึง 78 เปอร์เซ็นต์ การใส่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixing bacteria, NFB) จากอากาศในแปลงปลูกอ้อยจะช่วยลดต้นทุนในการซื้อปุ๋ย N ลดการใช้ปุ๋ยเคมี เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพราะลดการชะล้างหน้าดินที่มีไนเตรทหรือแอมโมเนียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลทางอ้อมในการลดภาวะโลกร้อน

ตั้งแต่ปี 1974 พบว่าเชื้อ *Azospirillum* สามารถตรึง N ได้และมีการค้นพบเชื้อที่สามารถตรึง N บริเวณรากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น หญ้า ข้าว ข้าวโพด อ้อย จากเดิมที่พบว่าเชื้อ *Rhizobium* สามารถตรึง N จากอากาศได้โดยการสร้างเป็นปมที่รากของพืชตระกูลถั่ว จากนั้นก็ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อกับพืชเหล่านั้นเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมี N ลง (Boddey and Dobereiner, 1988) ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการปลูกอ้อย Cavalcante and Dobereiner (1988) รายงานว่าดินที่มีการเติม N ต่ำจะพบ NFB ได้มาก และยังพบ NFB ชนิดใหม่ที่ทนกรด คือ *Acetobacter nitrocapta*n ซึ่งจะมีความสำคัญในดินที่มีการใช้ปุ๋ยร่วมด้วย เพราะเชื้อ *A. nitrocapta*n นี้จะช่วยตรึง N จากอากาศร่วมด้วยแม้ว่าดินนั้นจะมีไนเตรทปนอยู่ก็ตาม NFB ที่พบในอ้อยมีทั้งชนิดที่อยู่เป็นอิสระ ได้แก่ *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Dexia*, *Enterobacter* ส่วน NFB ที่พบอยู่ภายในรากหรือลำต้นอ้อย ได้แก่ *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Klebsiella* (Boddey and Dobereiner,

1988; Reis *et al*, 1994; Mirza *et al*, 2001; Sevilla *et al*, 2001; Loiret *et al*, 2004; Reis *et al*, 2004; Govindarajan *et al*, 2007;) นอกจากนี้ยังพบว่า NFB นี้บางชนิดมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ด้วย เช่น การสร้างสารเหนียวนำไปสร้างฮอร์โมนพืช เช่น การสร้างสาร auxin ที่เป็น indole-3-acetic acid (IAA) (Govindarajan *et al*, 2007)

Sevilla *et al* (2001) พบว่า *A. diazotrophicus* สายพันธุ์ PA15 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยสายพันธุ์ SP70-1143 ทั้งในสภาพเรือนทดลอง และสภาพไร่ โดยพบว่าในสภาพที่ไม่มี N อ้อยที่มีการปลูกเชื้อ *A. diazotrophicus* เจริญเติบโตดีกว่าและมีปริมาณ N ทั้งหมดมากกว่าอ้อยที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงกลไกการตรึง N ของเชื้อแล้วเปลี่ยนถ่ายไปยังต้นอ้อยเมื่อปลูกอ้อยในสภาวะที่ไม่จำกัด N ก็พบว่าอ้อยที่มีการปลูกเชื้อ *A. diazotrophicus* มีการเจริญเติบโตดีกว่าอ้อยที่ไม่มีการปลูกเชื้อ *A. diazotrophicus* แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย

Oliveira *et al* (2006) ศึกษา NFB ชนิดต่างๆ เช่น *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia* ทั้งที่เป็นเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมกับอ้อย 2 สายพันธุ์ในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ อุดมสมบูรณ์ปานกลาง และอุดมสมบูรณ์มาก โดยศึกษาเปรียบเทียบกับปลูกอ้อยตามปกติในไร่ พบว่า NFB สามารถเพิ่มผลผลิตอ้อยในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ดินที่อุดมสมบูรณ์ปานกลาง ผลผลิตจะเพิ่มขึ้นไม่มากนัก แต่ในดินที่อุดมสมบูรณ์มาก ผลผลิตจะลดลงเล็กน้อย การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเชื้อ พันธุ์อ้อย และดิน ซึ่งจะต้องเหมาะสมกัน จึงจะเกิดประโยชน์สูงสุด

Govindarajan *et al* (2007) แยกเชื้อ endophyte diazotroph จากรากและลำต้นของอ้อย พบเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญของอ้อยและข้าว คือ *Pseudomonas*, *Burkholderia* และ *Klebsiella pneumoniae* และได้ศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยโดยใช้เชื้อ diazotroph ชนิดอื่นด้วย ได้แก่ *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum lipoferum* 4B และ *Burkholderia* พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยเมื่อทดลองในกระถาง

สุวรรณ และคณะ (2553) แยกเชื้อ NFB จากตัวอย่างดินรอบรากอ้อย ตัวอย่างลำต้นและรากอ้อยในจังหวัดขอนแก่น อุดรธานี และนครสวรรค์ พบเชื้อ NFB ที่มีประสิทธิภาพสูงโดยทดสอบเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วยวิธี acetylene reduction assay และพบว่าเชื้อบางไอโซเลตมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นการสร้างสาร indole 3-acetic acid (IAA) และมีคุณสมบัติละลายหินฟอสเฟต (phosphate solubilization) ต่อมา Meesilp and Niamsanit (2011) ศึกษา NFB 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต 5LSO2, 3LSO1, 1LSO1, 1LS6pH7w และ 2LApH7w ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในกระถาง พบว่าเชื้อไอโซเลต 5LSO2 และ 3LSO1 ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดีโดยทำให้อ้อยมีความสูงมากกว่าอ้อยที่ใส่ปุ๋ยยูเรีย นอกจากนี้ยังทำให้อ้อยมีการแตกหน่อเพิ่มขึ้นด้วย (สุวรรณ และคณะ, 2554) ณัฐวุฒิ และคณะ (2555) ได้ทดลองเพิ่มปริมาณเชื้อ NFB สายพันธุ์ 3LSO1 ในวัสดุ

ปลูกทางการเกษตร 2 ชนิด คือพีท (peat) และเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) พบว่าเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในวัสดุปลูกทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำเชื้อในวัสดุปลูกนี้ไปผสมในดินเพื่อใช้ปลูกอ้อยในกระถาง พบว่าหลังจากปลูกอ้อยได้ 4 เดือน อ้อยที่ปลูกโดยไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียแต่ใส่เชื้อแบคทีเรีย 3LSO1 ที่เตรียมในพีทมีการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเทียบเท่ากับอ้อยที่ใส่ปุ๋ยยูเรียแต่ไม่ได้ใส่เชื้อ นอกจากนี้ สุวรรณ และคณะ (2555) ยังพบว่าดินและลำต้นอ้อยที่ปลูกโดยมีการใส่เชื้อ NFB ไอโซเลต 3LSO1 หรือ 5LSO2 มีปริมาณธาตุอาหาร โดยเฉพาะ N ทั้งหมด (total N) และ P ทั้งหมด (total P) มากกว่าอ้อยที่ใส่ปุ๋ยยูเรียแต่ไม่ได้ใส่เชื้อ NFB และยังพบเชื้อ NFB ในปริมาณมากทั้งในดิน ในต้นและรากของอ้อยที่ปลูกโดยมีการใส่เชื้อ NFB เมื่อบ่งเอกลักษณ์เชื้อไอโซเลต 3LSO1 และ 5LSO2 พบว่าเป็นเชื้อ *Enterobacter* sp. และ *Stenotrophomonas maltophilia* ตามลำดับ

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาเชื้อ NFB 2 ไอโซเลต ได้แก่ไอโซเลต 3LSO1 และ 5LSO2 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตหรือเพิ่มผลผลิตของอ้อย โดยเตรียมกล้าเชื้อ NFB ในชอยล์เมต (กากตะกอนในถังวีแนส) ปลอดเชื้อ แล้วนำไปทดลองปลูกอ้อยในสภาพแปลงโดยไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียและหรือใส่ปุ๋ยยูเรียในปริมาณครึ่งอัตราและเต็มอัตราเปรียบเทียบกับการปลูกอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อ NFB โดยไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียและหรือใส่ปุ๋ยยูเรียในปริมาณครึ่งอัตราและเต็มอัตรา

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ผลผลิตกล้าเชื้อ NFB ด้วยชอยล์เมตเพื่อใช้เพิ่มปริมาณและเป็นวัสดุยัดเกาะของเชื้อ
- 1.2.2 ศึกษาผลของเชื้อ NFB ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลอง
- 1.2.3 ติดตามการเปลี่ยนแปลงเชื้อ NFB ที่ใส่ลงไปดิน และต้นอ้อย ในสภาพแปลงทดลอง
- 1.2.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดินทางเคมีและจุลชีววิทยา

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับเมื่อการดำเนินงานเสร็จสิ้นที่เป็นรูปธรรม และตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการ

1.3.1 เป้าหมายของผลผลิต (output) และตัวชี้วัด

ได้กล้าเชื้อ NFB ในวัสดุปลูกชอยล์เมตเพื่อใช้เพิ่มปริมาณและเป็นวัสดุยัดเกาะของเชื้อ ได้ชนิดของเชื้อ NFB ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลอง ติดตามการเปลี่ยนแปลงเชื้อ NFB ที่ใส่ลงไปดิน และต้นอ้อย ในสภาพแปลงทดลอง ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดินทางเคมีและจุลชีววิทยา

ตารางที่ 1.1 แสดงผลผลิตและตัวชี้วัดของแผนงานวิจัย

ผลผลิต	ตัวชี้วัด			
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	เวลา	ต้นทุน
1. NFB ในวัสดุปลูก ขอยล์เมต	กล้าเชื้อบริสุทธิ์อย่างน้อย 4 ลิตร/เชื้อ/วัสดุปลูก	เชื้อแบคทีเรียมีชีวิตรอดและ คงคุณสมบัติในการส่งเสริม การเจริญเติบโตของอ้อยใน ด้านน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง จำนวนกอ และอื่นๆ	สามารถผลิต ได้ภายในเวลา 1 เดือน	10,000
2. ได้อ้อยมีทั้งปริมาณ และคุณภาพเพิ่มขึ้น	ผลผลิตอ้อยในสภาพไร่ เพิ่มขึ้นจากเดิมอย่างมี นัยสำคัญ ไม่น้อยกว่า 15%	อ้อยมีน้ำหนักสด น้ำหนัก แห้ง จำนวนกอ ความหวาน และอื่นๆ มากขึ้น	12 เดือน	300,000
3. คุณสมบัติทางเคมีและ ชีววิทยาของดินดีขึ้น	ปริมาณจุลินทรีย์ในดิน เพิ่มขึ้น	ปริมาณธาตุอาหาร N และ เชื้อ NFB ในดินเพิ่มขึ้น	12 เดือน	400,000

1.3.2 เป้าหมายของผลลัพธ์ (outcome) และตัวชี้วัด

ตารางที่ 1.2 แสดงผลลัพธ์และตัวชี้วัดของแผนงานวิจัย

ผลลัพธ์	ตัวชี้วัด			
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	เวลา	ต้นทุน
1. กรรมวิธีในการเตรียม กล้าเชื้อ NFB ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในสภาพไร่	1. ได้กรรมวิธีการเตรียมกล้า เชื้อที่เหมาะสมกับการใช้ใน สภาพไร่ 3-4 ไร่ 2. จดสิทธิบัตร และ/หรืออนุ สิทธิบัตรจากผลการวิจัยใน ขั้นตอนการผลิตเชื้อ	1. กล้าเชื้อ NFB ที่มี คุณสมบัติเหมาะสมที่ ใช้กับดินสภาพไร่ซึ่งมี จุลินทรีย์เจ้าถิ่น 2. สามารถจด สิทธิบัตร หรือ อนุ สิทธิบัตรได้	หลังจากการ วิจัยเสร็จสิ้น	10,000
2. ได้ผลผลิตอ้อยทั้งปริมาณ และคุณสมบัติเพิ่มขึ้น	น้ำหนักอ้อยต่อไร่สูงเพิ่มขึ้น อย่างน้อย 10 เปอร์เซ็นต์	เพิ่ม ปริมาณ ธาตุ อาหารพืช	หลังจากการ วิจัยเสร็จสิ้น	-
3. บทความวิชาการ	ตีพิมพ์บทความทางวิชาการ ระดับชาติ และ/หรือ นานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง	ตีพิมพ์ในวารสารที่มี ระบบ Peer review และเป็นที่ยอมรับ	ระหว่างทำวิจัย และ/หรือ หลังจากการ วิจัยเสร็จสิ้น	-
4. นักวิจัยรุ่นใหม่	สามารถผลิตนักวิจัย ซึ่งเป็น นักศึกษาในระดับ บัณฑิตศึกษาอย่างน้อย 1 คน	นักศึกษามีความรู้ ความชำนาญในการ ผลิตและการใช้ปุ๋ย ชีวภาพ	หลังจากการ วิจัยเสร็จสิ้น	-

ผลลัพธ์	ตัวชี้วัด			
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	เวลา	ต้นทุน
5. การสร้างเครือข่ายกับเกษตรกร	สร้างเครือข่ายกับเกษตรกร 1 ราย	เกษตรกรเรียนรู้การใช้ NFB กับการเพาะปลูก อ้อย	หลังจากการวิจัยเสร็จสิ้น	
6. การประชุมสัมมนา	เข้าร่วมประชุม สัมมนา และนำเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการ ในรูปแบบโปสเตอร์ หรือปากเปล่าอย่างน้อย 1 เรื่อง	เป็นการประชุมวิชาการในระดับชาติ และ/หรือระดับนานาชาติ	ระหว่างทำวิจัย และ/หรือ หลังจากการวิจัยเสร็จสิ้น	-

1.4 กระบวนการผลิตต้นผลงานดังกล่าวออกสู่การใช้ประโยชน์

กระบวนการผลิตต้นผลงานดังกล่าวออกสู่การใช้ประโยชน์ โดยมุ่งเน้นกลุ่มเกษตรกร นักวิชาการ และบริษัทเอกชนที่สนใจการผลิตอ้อยโดยใช้เชื้อ NFB ซึ่งอาจทำได้หลายอย่าง เช่น การจัดทำ website เพื่อเผยแพร่ จัดอบรมเชิงปฏิบัติการ ในเรื่องการผลิตเชื้อ NFB โดยมุ่งเน้นแก่นักวิชาการ และ/หรือ กลุ่มเกษตรกรที่มีระบบการเพาะปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ซึ่งเชื้อ NFB สามารถผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้บำรุงดินได้ ตลอดจนจัดอบรมแนะนำวิธีการจัดการทางการเกษตรเพื่อการนำเชื้อ NFB นี้ไปใช้ประโยชน์ โดยเข้าไปจัดอบรมในองค์การบริหารส่วนตำบล และ/หรือ อบรมในมหาวิทยาลัยขอนแก่น นอกจากนี้ยังมีการนำเสนอผลงานโดยการตีพิมพ์ลงในวารสารระดับชาติ และ/หรือระดับนานาชาติ นอกจากนี้ยังมีการนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมทางวิชาการระดับชาติ และ/หรือระดับนานาชาติ

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของอ้อย

อ้อยเป็นพืชเขตร้อนชื้น (tropical) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียใต้/ตะวันออกเฉียงใต้ เชื่อกันว่าชาวอินเดียเป็นชาติแรกที่ปลูกเพื่อเก็บเกี่ยว ชาวโพลินีเซียนนำไปปลูกที่ฮาวาย ต่อมาชาวยุโรปได้นำเข้าไปปลูกในทวีปอเมริกาและทวีปอื่นๆ

อ้อย (*Saccharum officinarum* Linn.) เป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า ลำต้นแข็งแรง มีข้อปล้องเห็นได้ชัดเจน สูง 2-4 m เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 cm ไม่แตกกิ่งก้าน ผิวนอกสีเขียวออกเหลือง หรือสีแดงเข้มออกม่วง มีขี้ผึ้งเป็นผ้าขาวๆ เคลือบอยู่ ใบแคบ ผิวใบมีขนสั้นๆ ทั้ง 2 ด้าน เมื่อลูบรู้สึกสากมือ เส้นกลางใบใหญ่สีขาวมีขน ดอกออกที่ยอดเป็นช่อ ดอกสีขาว ก้านช่อดอกไม่มีขน แตกแขนงเป็นช่อดอกย่อยมากมาย ออกดอกในฤดูหนาว เป็นพืชที่ชอบอากาศอบอุ่นและร้อนชื้น พบปลูกเป็นไร่เพื่อตัดส่งโรงงานผลิตน้ำตาล และปลูกตามบ้านเรือนไว้ใช้เป็นยาหรือในพิธีกรรมต่างๆ เป็นพืชที่มีความสำคัญต่อมนุษย์มากในแง่ของการใช้เป็นอาหาร โดยเป็นพืชที่มีความสำคัญอันดับ 4 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด และข้าว

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยทั่วไปหมายถึงอ้อยโรงงาน ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล ผลผลิตอ้อยในปี 2555/56 รวมประมาณ 100 ล้านตัน สามารถผลิตน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายดิบประมาณ 36.7 และ 62.7 ล้านกระสอบ ตามลำดับ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2556) นอกจากนี้ยังมีผลผลิตอื่นอีกมากมายจากอุตสาหกรรมน้ำตาล เช่น กากน้ำตาลในปริมาณ 4.55 ล้านตัน ซึ่งกากน้ำตาลเป็นผลพลตรงที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ด้วย เช่น อุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ เป็นต้น จากการที่น้ำมันในตลาดโลกมีราคาสูงขึ้น ทำให้รัฐบาลส่งเสริมให้มีการผลิตเอทานอลเพื่อผสมในน้ำมันเบนซิน อันเป็นการลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงได้ทางหนึ่ง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มผลผลิตอ้อย

2.2 ความสำคัญของปุ๋ยไนโตรเจนต่อการเพาะปลูกอ้อย

ไนโตรเจน (N) เป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและส่งผลต่อคุณภาพของอ้อย โดยไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก หรือนิวคลีโอไทด์ คลอโรฟิลล์ และเอนไซม์ หรือน้ำย่อยต่าง ๆ มีความสำคัญมากต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืช ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของส่วนอ่อนในพืช เช่น ยอดอ่อน ใบอ่อน กิ่ง ก้านอ่อน รากอ่อน ปมอ่อน ซึ่งเป็นส่วนที่กำลังเจริญเติบโตทั้งหลาย ก็คือการเจริญเติบโตของเซลล์พืชหรือการเพิ่มเซลล์ ในเซลล์มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ซึ่งโปรตีนจำเป็นที่จะต้องมี N เป็นองค์ประกอบและเป็นส่วนสำคัญในการแบ่งเซลล์

หรือเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ช่วยให้ย่อยเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบ ทำให้อ้อยแตกกอ มีจำนวนลำและน้ำหนักอ้อยมาก ถ้าอ้อยขาด N จะทำให้ใบเหลือง แคระแกร็น แตกหน่อช้า หน่อไม่เจริญ อ้อยจะแก่เร็วกว่าปกติและคุณภาพอ้อยจะต่ำ ในช่วงแรกที่ปลูก อ้อยจะเจริญเติบโตช้า จึงต้องการ N น้อย และในท่อนพันธุ์มี N ติดมาบ้าง พออ้อยมีรากจึงเริ่มดูดอาหารเพื่อใช้สร้างหน่ออ้อย ช่วงนี้อ้อยจะดูด N จากดิน ดินที่มี N น้อยจึงต้องมีการใส่ปุ๋ย N ให้แก่ดิน โดยทั่วไปธาตุ N จะเป็นธาตุอาหารพืชตัวแรกที่จำกัดผลผลิตของพืช ทั้งนี้เนื่องจากพืชต้องการธาตุ N ปริมาณมาก แต่ N มีการเปลี่ยนรูปอยู่ตลอดเวลา การทำการเกษตร ในเขตร้อนทั่วไปในปัจจุบันจำเป็นต้องใช้ปุ๋ย N ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณ N ในธรรมชาติที่ได้จากอินทรีย์วัตถุนั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช การจัดการการใช้ปุ๋ย N ให้กับพืชนั้นต้องคำนึงถึงอัตรา ชนิด เวลาใส่ และวิธีใส่ เพื่อให้ได้มาซึ่งประสิทธิภาพสูงสุด รูปของปุ๋ย N ที่นิยมใช้ในเขตร้อน คือ ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งปุ๋ยทั้งสองชนิดมีข้อดีข้อเสียต่างกัน ดังนี้

1. ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อหว่านลงไปดิน จะไม่สูญเสีย N อย่างเหมือนปุ๋ยยูเรีย โดยเฉพาะในสภาพพื้นที่ที่เกิดการระเหิด (การสูญเสียจากดินในรูปของก๊าซ, Volatilization) ของแอมโมเนียมสูง

2. ปุ๋ยยูเรีย ดีกว่าปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต คือ มีเนื้อธาตุ N สูงจึงใส่ในอัตราที่น้อยกว่า

แต่ผลตกค้างของปุ๋ย N ในดินหลังฤดูเก็บเกี่ยว ไม่ว่าจะเป็นปุ๋ยยูเรียหรือแอมโมเนียมซัลเฟตคือก่อให้เกิดความเป็นกรดในดิน แต่ผลตกค้างของปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต ก่อให้เกิดความเป็นกรดสูงกว่าปุ๋ยยูเรียสองเท่า

ส่วนปุ๋ยไนโตรเจน นิยมใช้น้อยเนื่องจากมีประสิทธิภาพต่ำในเขตร้อน ในระยะสัปดาห์แรก ๆ ของการเจริญเติบโตอ้อยจะดูดธาตุ N ในปริมาณมากกว่าที่ต้องการใช้จริง ๆ ความเข้มข้นของ N ในอ้อยทั้งส่วนบนดินและใต้ดินเพิ่มขึ้นถึงขีดสูงสุดเมื่ออ้อยอายุ 1 เดือน และหลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว การลดลงของ N อาจเนื่องมาจากอัตราการเติบโตของอ้อยเพิ่มขึ้น ซึ่งต้องใช้ N เพิ่มขึ้น เมื่อใส่ปุ๋ย N ในปริมาณมากอัตราการดูดซึมน้ำก็จะเพิ่มขึ้น ขณะที่อ้อยอายุ 6 เดือน ส่วนยอดกำลังเติบโตเต็มที่ การดูดซึม N จะเป็นไปอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นอัตราการดูดซึมน้ำจะลดลง

ปริมาณ N ในอ้อยจะแตกต่างกันตามแหล่งปลูกอ้อยและการเก็บเกี่ยว อ้อยที่เก็บเกี่ยวเร็วจะมีปริมาณ N สูงกว่าอ้อยที่มีอายุมากกว่าเสมอ ทั้งนี้เพราะประสิทธิภาพของการใช้ปุ๋ย N มักจะต่ำ เนื่องจาก N ส่วนหนึ่งจะถูกจุลินทรีย์ดินนำไปใช้ ส่วนหนึ่งอาจถูกเปลี่ยนรูปเป็นไนเตรท และอาจสูญหายไปโดยการชะล้างหรือบางส่วนอาจจะเหว่สูญหายไปในบรรยากาศ ซึ่งหมายความว่าต้องใส่ N จำนวนมากกว่าที่พืชดูดมาใช้จริงๆ อ้อยปลูกจะสามารถใช้ปุ๋ย N ได้มากกว่าอ้อยต่อ เพราะอ้อยปลูกมีระบบรากดีกว่าจึงมีประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยสูงกว่า ส่วนอ้อยต่อนั้นเนื่องจากโครงสร้างของดินเสื่อม การระบายอากาศไม่ดี ระบบรากจึงมีประสิทธิภาพต่ำกว่าอ้อยปลูก โดยทั่วไปการตรึง N จากอากาศสู่ดินมี 2 กระบวนการ คือ

1. กระบวนการทางชีวภาพ (Biological fixation) ซึ่งจำแนกเป็น 2 พวกคือ

- 1.1 การตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (Free living nitrogen fixation หรือ Non-symbiotic nitrogen fixation)

1.2 การตรึงไนโตรเจนแบบภาวะอยู่ร่วมกัน (symbiotic nitrogen fixation)

2. กระบวนการทางปฏิกิริยาเคมี (Electrochemical and Photochemical fixation) ได้แก่ ฟัลแบ ฟาร์ริง ฟัลฟา และการตกของอุกกาบาต เมื่อเกิดฟัลแบอุณหภูมิจากอากาศสูงขึ้น เกิดการรวมตัวของออกซิเจนและไนโตรเจน เมื่อฝนตกลงมาออกไซด์ของ N จะละลายน้ำ ได้เป็นสารละลายกรดอ่อน ๆ เกิดเป็นสารประกอบไนเตรตในดิน

เมื่อเทียบปริมาณ N ที่ตรึงได้พบว่า การตรึง N โดยกระบวนการทางชีววิทยาเกิดโดยการกระทำของสิ่งมีชีวิตซึ่งจะได้ไนเตรตถึงปีละ 54×10^6 เมตริกตันและกระบวนการโดยปฏิกิริยาจากฟัลแบ ฟัลฟาสามารถตรึง N เป็นไนเตรตได้ 7.6×10^6 เมตริกตัน/ปี

ด้วยเหตุนี้จึงมีนักวิจัยได้หาทางเลือกทางชีวภาพที่จะใช้ N ที่มีอยู่ในปริมาณมากจากชั้นบรรยากาศโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อรักษาสภาพแวดล้อมและลดการใช้ปุ๋ยเคมี N

จักรินทร์ และคณะ (2535) ทดสอบปุ๋ย N ในอ้อย 3 พันธุ์ (อู่ทอง 1, อู่ทอง 2 และ 80-1-128) พบว่าการใส่ปุ๋ย N 0, 12, 24 และ 36 kgN/ไร่ (กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่) ไม่ทำให้ผลผลิตอ้อย ซีซีเอส จำนวนลำ และน้ำหนักลำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการใส่ปุ๋ย N ในอัตราที่สูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้ผลผลิตอ้อยสูงขึ้น

2.3 แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับการเพาะปลูกอ้อย

Cavalcante and Dobereiner (1988) รายงานว่าดินที่มีการเติม N ต่ำจะพบ NFB ได้มาก และพบ NFB ชนิดใหม่ที่ทนกรด คือ *Acetobacter nitrocapta*n ซึ่งจะมีความสำคัญในดินที่มีการใส่ปุ๋ยร่วมด้วย เพราะเชื้อ *A. nitrocapta*n จะช่วยตรึง N จากอากาศร่วมด้วยแม้ว่าดินนั้นจะมีไนเตรตปน

NFB ที่พบในอ้อยมีทั้งชนิดที่อยู่เป็นอิสระ ได้แก่ *Beijerinckia*, *Azospillirum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Dexia*, *Enterobacter* และชนิดที่อยู่เป็น endophyte ภายในรากหรือลำต้นอ้อย ได้แก่ *Acetobacter*, *Azospillirum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Pantoea* (Boddey and Dobereiner, 1988; Reis *et al*, 1994; Mirza *et al*, 2001; Sevilla *et al*, 2001; Loiret *et al*, 2004; Reis *et al*, 2004; Govindarajan *et al*, 2007;) นอกจากนี้ยังพบว่า NFB บางชนิดมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ด้วย เช่นการสร้างสารเหนียวน้ำให้สร้างฮอร์โมนพืช เช่น การสร้างสาร auxin ที่เป็น indole-3-acetic acid (IAA) (Govindarajan *et al*, 2007)

Plant growth promoting bacteria (PGPB) เป็นแบคทีเรียตามธรรมชาติที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบได้ทั้งในดินบริเวณรอบๆ รากพืช (rhizosphere) นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่อาศัยอยู่ภายในรากและลำต้นของพืชเป็น endophyte ด้วย (Reis *et al*, 1994; Sevilla *et al*, 2001; Loiret *et al*, 2004; Reis *et al*, 2004) โดยจุลินทรีย์ที่เป็น PGPB ต้องมีบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยมีความสามารถในการตรึง N มีความสามารถในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช เช่น ละลาย P และ K เป็นต้น มีความสามารถในการสร้างสารฮอร์โมนพืช (phytohormone) เช่น

auxin, cytokinin มีความสามารถในการสร้างสาร indole-3-acetic acid (IAA) มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อราก่อโรค มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรค มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช เป็นต้น (หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ, 2548; Compant *et al*, 2005)

กลไกของ PGPB ในการเข้าสู่ระบบรากพืช โดยแบคทีเรียจะใช้ระบบส่งสัญญาณเพื่อสื่อสารกันที่เรียกว่า quorum sensing โดยจะต้องมีปริมาณของแบคทีเรียถึงระดับหนึ่งจึงจะเกิดเหตุการณ์นี้ได้ จากนั้นแบคทีเรียจะเคลื่อนเข้าสู่บริเวณผิวของราก ซึ่งกลไกนี้จะคล้ายกับการสร้าง biofilm ในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ในขณะที่เซลล์ของ PGPB เพิ่มจำนวนและจับกลุ่มบริเวณรากมากขึ้น พืชจะมีการตอบสนองต่อสารบางชนิดที่ PGPB ปลดปล่อยออกมาโดยผ่านระบบที่เรียกว่า systemic acquired resistance (SAR) ซึ่งเป็นระบบหนึ่งในการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอม ซึ่งได้แก่ ethylene, jasmonic acid และ salicylic acid ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช

PGPB ที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืชสามารถใช้กรดอะมิโน เช่น tryptophan แล้วเปลี่ยนเป็นสาร IAA ซึ่งเปรียบเสมือนฮอร์โมนของพืชส่งผลให้เซลล์ของพืชเจริญเติบโตและยืดยาวออกไป นอกจากนี้ PGPB ยังสามารถสร้าง ACC deaminase เพื่อย่อย 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) เนื่องจาก ACC เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ethylene ดังนั้นเมื่อ ACC ถูก deaminase จึงส่งผลให้ปริมาณ ACC ในเซลล์ของพืชลดลง ทำให้ปริมาณ ethylene ลดลงด้วย เซลล์ของพืชจึงเจริญยืดยาว (หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ, 2548) นอกจากนี้ PGPB บางชนิดยังสามารถสร้างสาร siderophore ซึ่งจะมีผลไปแย่งจับธาตุเหล็กที่อยู่ในดิน ซึ่งเป็นธาตุที่เชื้อก่อโรคพืชมักจะต้องการใช้ในการเจริญ ในขณะที่พืชต้องการธาตุเหล็กน้อยมาก ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืชจึงไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ (หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ, 2548; Compant *et al*, 2005)

ตัวอย่างการศึกษา PGPB และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในพืชต่างๆ เช่น

Cattelan *et al* (1999) แยกเชื้อ PGPB จากดินบริเวณรากถั่วเหลือง พบเชื้อ PGPB 23 ไอโซเลต ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองที่เลี้ยงในดินที่ไม่ปลอดเชื้อ โดย PGPB 6 ใน 8 ไอโซเลต สร้างสาร ACC deaminase, 4 ใน 7 ไอโซเลต สร้างสาร siderophore, 3 ใน 4 ไอโซเลต สร้างสาร β -1,3-glucanase, และ 2 ใน 5 ไอโซเลต สามารถละลายฟอสเฟตได้

Khalid *et al* (2004) แยกเชื้อ PGPB จากดินบริเวณรากข้าวสาลี พบเชื้อที่สร้าง auxin เป็น IAA และ IAM (indole acetamide) จากดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ เมื่อนำเชื้อที่ได้ไปทดลองกับข้าวสาลีที่เพาะเลี้ยงในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ในกระถางพบว่า ทำให้อายุของข้าวสาลีที่ปลูกเชื้อ PGPB รวมด้วยยาวขึ้น 17.3% น้ำหนักรากเพิ่มขึ้น 13.5% ลำต้นยาวขึ้น 37.7% น้ำหนักแห้งลำต้นเพิ่มขึ้น 36.3% เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ PGPB นอกจากนี้ยังทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 14.7% และ 27.5% เมื่อทดลองในกระถางและในสภาพไร่ ตามลำดับ

Reis *et al* (2004) แยกเชื้อ NFB จากดินบริเวณรากพืชและรากของอ้อย ข้าวโพด และหญ้าในบราซิล เม็กซิโก และแอฟริกาใต้ เมื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง บ่งเอกลักษณะจากปฏิกิริยาชีวเคมีและการศึกษา 16S rRNA พบว่าเป็นเชื้อ *Burkholderia tropica*

Kumar *et al* (2005) แยกเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จากดินบริเวณรากข้าว ซึ่งมีฤทธิ์กว้างขวางในการป้องกันเชื้อราก่อโรคหลายชนิด นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสาร siderophore, IAA, phosphatase และ protease ซึ่งเหมาะที่จะนำมาทำเป็นปุ๋ยชีวภาพ

Idris *et al* (2007) แยกเชื้อ PGPB ที่สามารถควบคุมเชื้อ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรครากเน่าในข้าวฟ่าง พบว่าเชื้อ *Bacillus* หลายสายพันธุ์รวมทั้ง *Chromobacteria* สามารถป้องกันโรครากเน่าได้

ตัวอย่างการศึกษา PGPB และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อย เช่น

Reis *et al* (1994) พบเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter* (ชื่อพ้อง *Gluconacetobacter*) *diazotrophicus* ซึ่งเป็น endophyte ที่สามารถตรึง N ในอ้อย

Sevilla *et al* (2001) พบว่า *A. diazotrophicus* สายพันธุ์ PA15 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยสายพันธุ์ SP70-1143 ทั้งในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ โดยพบว่าในสภาพที่ไม่มี N อ้อยที่มีการปลูกเชื้อ *A. diazotrophicus* จะเจริญเติบโตได้ดีกว่าและมีปริมาณ N ทั้งหมดมากกว่าอ้อยที่ไม่ได้ปลูกเชื้อหลังจาก 60 วันของการปลูกเชื้อ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงกลไกการตรึง N ของเชื้อแล้วเปลี่ยนถ่ายไปยังต้นอ้อย เมื่อปลูกอ้อยในสภาวะที่ไม่จำกัด N ก็พบว่าอ้อยที่มีการปลูกเชื้อ *A. diazotrophicus* ทั้งในสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย *Nif⁻* มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าอ้อยที่ไม่มีการปลูกเชื้อ *A. diazotrophicus* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย

Oliveira *et al* (2006) ศึกษา NFB ชนิดต่าง ๆ เช่น *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia* ทั้งที่เป็นเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมกับอ้อย 2 สายพันธุ์ในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ อุดมสมบูรณ์ปานกลาง และอุดมสมบูรณ์มาก โดยศึกษาเปรียบเทียบกับปลูกอ้อยตามปกติในไร่ พบว่า NFB สามารถเพิ่มผลให้อ้อยในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ดินที่อุดมสมบูรณ์ปานกลาง ผลผลิตจะเพิ่มขึ้นไม่มากนัก แต่ในดินที่อุดมสมบูรณ์มาก ผลผลิตจะลดลงเล็กน้อย การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเชื้อ พันธุ์อ้อย และดิน ซึ่งจะต้องเหมาะสมกัน จึงจะเกิดประโยชน์สูงสุด

Govindarajan *et al* (2007) แยกเชื้อ endophyte diazotroph จากรากและลำต้นของอ้อย พบเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยและข้าว คือ *Pseudomonas*, *Burkholderia* และ *Klebsiella pneumoniae* และได้ศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยโดยใช้เชื้อ diazotroph ชนิดอื่นด้วย ได้แก่ *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum lipoferum* 4B และ *Burkholderia* พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยเมื่อทดลองในกระถาง

2.4 ซอยล์เมต (Soil mate)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากน้ำวีเนสเข้มข้น น้ำวีเนส คือน้ำที่ผ่านกระบวนการกลั่นเอทานอล มีส่วนปุ๋ยยูเรีย ยีสต์ ปูนขาว น้ำตาล กรดซัลฟูริก โซดาไฟ น้ำอ้อย สารเอนไซม์ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล จึงมีส่วนผสมของยูเรีย ได้มีรายงานการใช้วีเนสเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยและพืชอื่นๆ ซึ่งสามารถลดการใช้ปุ๋ยลงได้ ดังนั้นกลุ่มบริษัทน้ำตาลมิตรผลจึงได้พัฒนาน้ำวีเนสเข้มข้นในรูปแบบที่เรียกว่า “ซอยล์เมต สมาร์ท ชนิดเม็ด” เพื่อให้เหมาะต่อการใช้งานมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ยังได้มีการนำจุลินทรีย์ชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมาช่วยตรึงธาตุอาหารไนโตรเจนจากอากาศ ช่วยละลายฟอสเฟตและปลดปล่อยโพแทสเซียมในดินให้กับพืชปลูกอีกด้วย

2.5 เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

เทคนิค DGGE เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้เพื่อการวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเป็นเทคนิคที่ใช้แยกดีเอ็นเอสายคู่ซึ่งมีความยาวเท่ากันแต่มีลำดับเบสต่างกันโดยใช้การเคลื่อนที่ของความเข้มข้นของสารเคมี เช่น ยูเรียและฟอร์มาไมด์ ทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ (Muyzer et al., 1993) ความแตกต่างของลำดับเบสส่งผลให้การสลายพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นไม่พร้อมกันในขณะที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่อยู่ภายในเจล ทำให้แยกขนาดดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่ลำดับเบสต่างกันออกจากกันได้ โดยเมื่อดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำลายพันธะไปบางส่วนจะหยุดการเคลื่อนที่เนื่องจาก GC clamp ซึ่งเป็นส่วนที่มีเบส GC อยู่มาก เมื่อสายดีเอ็นเอหยุดการเคลื่อนที่จึงเห็นเป็นแถบดีเอ็นเออยู่ภายในเจล โดยความหลากหลายของจำนวนจุลินทรีย์สามารถสังเกตได้จากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ยีนอนุรักษ์ที่บ่งบอกชนิดของจุลินทรีย์นิยมใช้ยีนของ 16s rRNA ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้กับเทคนิคนี้มักจะมีขนาดไม่ใหญ่นัก นิยมใช้ส่วนของ V3 ซึ่งเป็นส่วน variable region ของยีน 16s rRNA (Myer et al., 1985) ในงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิค Nested PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ V3 จากยีน 16s rRNA และแยกส่วน V3 ของเชื้อชนิดต่างๆ โดยใช้ DGGE เพื่อศึกษาเชื้อ NFB 2 ไอโซเลท ได้แก่ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 ว่ามีการกระจายลงไปในดินแต่ละตำรับทดลองอย่างไร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้วัสดุทางการเกษตร

3.1.1 การเตรียมวัสดุทางการเกษตร

การทดลองนี้ใช้วัสดุเพาะปลูกทางการเกษตร คือ ซอยล์เมต (soilmate) ซึ่งเป็นกากตะกอนหมักกรองโรงงานน้ำตาลที่เหลือจากการผลิตเอธานอลหรือกากตะกอนจากบ่อวินเนส (vinasses) ซึ่งมีสารอาหารต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นวัสดุพาหะ (Carrier material) สำหรับผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรีย โดยนำวัสดุมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารต่างๆ ก่อนทดลอง ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) และสารอินทรีย์ต่างๆ (Organic matter, OM) แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) จากนั้นชั่งวัสดุแต่ละชนิดปริมาตร 2.5 kg บรรจุลงในถุงพลาสติกที่มีคอขวดแล้วปิดด้วยจุกสำลี ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งอบไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 Pounds/square inch เป็นเวลา 30 นาที นานติดต่อกันเป็นเวลา 2 วัน

3.1.2 การเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

เตรียมกล้าเชื้อ NFB 2 ไอโซเลต ได้แก่ *Stenotrophomonas* sp. ไอโซเลต 5LSO2 และ *Enterobacter* sp. ไอโซเลต 3LSO1 ซึ่งผ่านการคัดเลือกและทดสอบแล้วว่าเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพเรือนทดลองในกระถาง (Meesilp and Niamsanit, 2011) โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อ NFB จำนวน 2-3 โคโลนี เลี้ยงเชื้อในอาหาร LB broth บ่มที่ 30°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นผสมเชื้อ 1 l (ซึ่งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^8 cfu/ml) โดยใช้วัสดุปลูกทางการเกษตรคือซอยล์เมตที่นึ่งฆ่าเชื้อและบรรจุในถุงพลาสติกที่มีคอขวดละ 4 kg บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือเก็บรักษาเชื้อไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำไปใช้ โดยจะตรวจนับปริมาณเชื้อที่ยังมีชีวิตและทดสอบคุณสมบัติการตรึงไนโตรเจนในอาหาร LGIP (N-free medium) ก่อนใช้ในแปลงปลูกทดลอง

3.1.3 การตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างจากถุงชีวภัณฑ์เชื้อเพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียหลังจากใส่เชื้อเป็นเวลา 0 และ 5 วัน (day after formulation, DAF) โดยทำเป็นสารแขวนลอยและเจือจางทีละ 10 เท่า ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปิเปตสารแขวนลอยแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 ml เกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ดังนี้ LB agar เพื่อตรวจนับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total count) และ LGIP agar เพื่อตรวจนับเชื้อ NFB บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับปริมาณแบคทีเรีย แล้วคำนวณจำนวนแบคทีเรีย

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยภายใต้สภาวะแปลงทดลอง

3.2.1 การเตรียมท่อนพันธุ์อ้อย

การทดลองใช้อ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 จากไร่อ้อยพุลสวัสดิ์ถาวร จังหวัดขอนแก่น โดยท่อนพันธุ์อ้อยที่ใช้จะเป็นท่อนยาว (ด้านซ้ายของภาพที่ 3.1) แล้วใส่ในรถปลูก โดยใช้แรงงานคนในการเตรียมท่อนพันธุ์ ซึ่งท่อนพันธุ์แต่ละท่อนจะมีความยาวประมาณ 15-20 cm ให้มีตาอ้อย 1 ตา

3.2.2 การเตรียมแปลงเพาะปลูกอ้อย

เลือกแปลงทดลองที่ดินมีคุณภาพต่ำ โดยตรวจสอบลักษณะทางเคมีกายภาพของดินก่อนปลูก โดยเก็บดินในระดับความลึกจากผิวดินถึงระดับความลึก 30 cm นำไปวิเคราะห์ organic matter, Total N, Total P เป็นต้น เมื่อได้แปลงทดลองที่เหมาะสมแล้วจึงเตรียมแปลงปลูก การเตรียมแปลงปลูกทำโดยคนงานและเจ้าหน้าที่ของไร่อ้อยพุลสวัสดิ์ถาวร โดยใช้รถไถชุดร่องอ้อยให้มีระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 1.65 เมตร ซึ่งเป็นวิธีการเตรียมแปลงเช่นเดียวกับที่ปฏิบัติในไร่ และใส่ท่อนพันธุ์อ้อยในร่องให้ห่างกันท่อนละประมาณ 30 cm ในลักษณะเป็นร่องคู่ ทำในพื้นที่ 6 ไร่ (การเตรียมแปลงได้เพิ่มขนาดจาก 3 ไร่ เป็น 6 ไร่ เนื่องจากมีการวางแผนที่จะทดสอบในอ้อยต่อไป และได้นำเสนอในการนำเสนอรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 12 ธันวาคม 2556 ไว้แล้ว (ดังแสดงในตารางที่ 3.1) แต่การปลูกอ้อยจริงมีการแก้ไขลักษณะแปลงเล็กน้อยดังแสดงในภาพที่ 3.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in randomized complete block design (RCBD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยเชื้อ NFB 4 ระดับ ได้แก่ 1) ไม่ใส่เชื้อ NFB (ตัวควบคุมใส่ซอฮอล์เมตที่หนึ่งฆ่าเชื้อ) 2) เชื้อ 3LSO1 3) เชื้อ 5LSO2 4) เชื้อผสม 3LSO1 + 5LSO2 ส่วนปัจจัยปุ๋ยเคมี 3 ระดับ ได้แก่ 1) PK 2) ½N-PK 3) N-PK รวมทั้งหมด 12 ตำรับทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ขนาดแปลงแต่ละตำรับทดลองประมาณ 8.5x8.5 ตารางเมตร โดยให้มีระยะขอบแต่ละตำรับทดลองห่างกันอย่างน้อย 1.5 เมตร (ตามแนวขวางกับร่องอ้อย) ดังนั้นแต่ละแปลงทดลองจะปลูกอ้อย 5 แถว เว้น 1 แถว (ตามแนวยาวขนานกับร่องอ้อย) รูปแปลงที่ปลูกอ้อย ดังแสดงในภาพที่ 3.2 และ 3.3

3.2.3 การใส่เชื้อ NFB และแม่ปุ๋ยในแปลงเพาะปลูกอ้อย

ปุ๋ยเคมีที่ไร่นี้โดยปกติจะใช้สูตร 15-15-15 ในอัตรา 50 kg/ไร่ แต่ในตำรับทดลองต้องการดูผลของเชื้อ NFB ต่อการเพาะปลูกอ้อย ดังนั้นในตำรับทดลองจึงจำเป็นต้องใส่ปุ๋ยที่เป็นแม่ปุ๋ย และคำนวณปริมาณการใส่ปุ๋ยให้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ โดยแม่ปุ๋ย NPK ที่ใช้คือ 46-0-0, 0-42-0 และ 0-0-60 ตามลำดับ ในรูปของปุ๋ยยูเรีย (urea) ดับเบิ้ลซูเปอร์ฟอสเฟต (double super phosphate) และ โพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate) ตามลำดับ

การใส่เชื้อ NFB จะใส่พร้อมการใส่ปุ๋ยในครั้งแรกหลังจากปลูกอ้อยประมาณ 15 วัน หลังจากปลูกอ้อยประมาณ 5 เดือน ใส่เฉพาะแม่ปุ๋ยในครั้งที่ 2 (23 พฤษภาคม 2557) ใช้สูตร 21-7-14 ในอัตรา 60 kg/ไร่

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดดำรับทดลอง

อ้อยปลูก (ปีแรก)			อ้อยตอ (ปีสอง)		
	ดำรับทดลอง	ขนาดรวม (m ²)		ดำรับทดลอง (+เพิ่มเติม)	ขนาด (m ²)
T1	No NFB, PK	(8.5+1.5)	T1-1	No NFB, PK (No NFB)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T1-2	No NFB, PK (+ NFB)	8.5x8.5
T2	No NFB, ½N-PK	(8.5+1.5)	T2-1	No NFB, ½N--PK (No NFB)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T2-2	No NFB, ½N-PK (+ NFB)	8.5x8.5
T3	No NFB, N-PK	(8.5+1.5)	T3-1	No NFB, N-PK (No NFB)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T3-2	No NFB, N-PK (+ NFB)	8.5x8.5
T4	3LSO1, PK	(8.5+1.5)	T4-1	3LSO1, PK (No N)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T4-2	3LSO1, PK (+ N)	8.5x8.5
T5	3LSO1, ½N-PK	(8.5+1.5)	T5-1	3LSO1, ½N-PK (No N)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T5-2	3LSO1, ½N-PK (+ N)	8.5x8.5
T6	3LSO1, N-PK	(8.5+1.5)	T6-1	3LSO1, N-PK (No N)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T6-2	3LSO1, N-PK (+ N)	8.5x8.5
T7	5LSO2, PK	(8.5+1.5)	T7-1	5LSO2, PK (No N)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T7-2	5LSO2, PK (+ N)	8.5x8.5
T8	5LSO2, ½N-PK	(8.5+1.5)	T8-1	5LSO2, ½N-PK (No N)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T8-2	5LSO2, ½N-PK (+ N)	8.5x8.5
T9	5LSO2, N-PK	(8.5+1.5)	T9-1	5LSO2, N-PK (No N)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T9-2	5LSO2, N-PK (+ N)	8.5x8.5
T10	3LSO1&5LSO2, PK	(8.5+1.5)	T10-1	3LSO1&5LSO2, PK (No N)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T10-2	3LSO1&5LSO2, PK (+ N)	8.5x8.5
T11	3LSO1&5LSO2, ½N-PK	(8.5+1.5)	T11-1	3LSO1&5LSO2, ½N-PK(No N)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T11-2	3LSO1&5LSO2, ½N-PK (+ N)	8.5x8.5
T12	3LSO1&5LSO2, N-PK	(8.5+1.5)	T12-1	3LSO1&5LSO2, N-PK (No N)	8.5x8.5
		x2(8.5+1.5)	T12-2	3LSO1&5LSO2, N-PK (+ N)	8.5x8.5

T1-T3 ในอ้อยตอ (ปีสอง) แบ่งเป็น การไม่ใส่เชื้อ NFB และใส่เชื้อ NFB เพื่อทดสอบว่าเชื้อ NFB สามารถเข้าไปในอ้อยที่เจียนตอและช่วยตรึงไนโตรเจนได้หรือไม่

T4-T12 ในอ้อยตอ (ปีสอง) แบ่งเป็น การไม่ใส่ปุ๋ย N และใส่ปุ๋ย N เพื่อทดสอบว่าเชื้อ NFB ที่ใส่ในอ้อยปลูกสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยตอได้หรือไม่

NFB = nitrogen fixing bacteria,

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

(8.5+1.5) x2(8.5+1.5) = แปลงทดลองประกอบด้วย 2 แปลงย่อย โดยแต่ละแปลงย่อยมีขนาดจริงดังนี้ความ

ยาว 8.5 m ทางเดิน 1.5 m x ความกว้าง 8.5 m ทางเดิน 1.5 m



ภาพที่ 3.3 แสดงการปลูกอ้อยโดยใช้รถและคนงานควบคุมในแปลงทดลอง



ภาพที่ 3.4 แสดงร่องการปลูกอ้อย และช่องว่างทางเดินตามแนวยาวในแปลงทดลอง

3.3 การตรวจวิเคราะห์ผลของชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย

การตรวจวิเคราะห์ผลของเชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลอง จะตรวจสอบเมื่ออ้อยมีอายุ 3, 6 และ 11 เดือน โดยนับจำนวนกอ วัดความสูง หาน้ำหนักแห้งต้น โดยการอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 วัน นอกจากนี้ยังเก็บข้อมูลการสะสมปริมาณธาตุอาหารหลักในส่วน ของลำต้นอ้อย ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total P) และ โพแทสเซียมทั้งหมด (Total K) โดยส่งไปวิเคราะห์ที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.4 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ NFB ในดิน และต้นอ้อยในแปลงปลูกทดลอง

3.4.1 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเชื้อ NFB

จะตรวจวิเคราะห์เมื่ออ้อยมีอายุ 0, 3, 6 และ 12 เดือน ในดินและต้นอ้อย การหาปริมาณ เชื้อ NFB ในดินทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LGIP ที่ปราศจากไนโตรเจน (N) ตามวิธีที่กล่าว แล้วในข้อ 3.1.3 ส่วนการหาปริมาณเชื้อในลำต้น ทำโดยตัดชิ้นส่วนของลำต้นมาล้างทำความสะอาดด้วย น้ำประปา แล้วฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณผิวนอกของตัวอย่าง (surface sterile) ด้วยสารเคมี ดังนี้ แช่ใน 5% chloramines T เป็นเวลา 5 นาที และ 70% ethanol เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ตรวจสอบความปลอดเชื้อของตัวอย่างรากด้วยการขีดลาก (streak) บนอาหาร LB medium และ LGIP medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นตัวอย่างให้ ละเอียดด้วย Blender แล้วทำเป็นสารแขวนลอยด้วย 5% sucrose ปริมาตร 5 ml และเจือจางทีละ 10 เท่า ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 9 ml แบ่งสารละลายแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 ml เกลี่ยบน ผิวน้ำอาหาร LB medium และ LGIP medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงชนิดของเชื้อ NFB

การติดตามการเปลี่ยนแปลงเชื้อไอโซเลต 3LSO1 และ 5LSO2 ในตัวอย่างที่เวลาต่างๆ จะ ใช้วิธีการติดตามยีนบางส่วน (Variable region, V3) ของ 16S RNA gene โดยใช้เทคนิค polymerized chain reaction (PCR) ร่วมกับ Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Muyzer et. al., 1993) โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ คือ

3.4.2.1 สกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียจากตัวอย่าง

ก) ตัวอย่างดิน นำตัวอย่างดินมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ ZR Soil Microbe DNA MiniPrep (Zymo Research, USA) โดยชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงใน ZR BashingBead Lysis Tube เติม lysis solution ปริมาตร 750 μ l เขย่าด้วยเครื่อง Vortex GENIE2 เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนใส่ลงใน Zymo-Spin IV Spin Filter นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000xg เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายที่ผ่านลงมาจาก Spin Filter มาเติม Soil DNA Binding Buffer ปริมาตร 1,200 μ l จากนั้นถ่ายสารละลายปริมาตร 800 μ l สู่ Zymo-Spin IIC Column ที่วางบน collection tube แล้วจึงนำ column ไปปั่นเหวี่ยง 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที

เทสารละลายที่ผ่าน spin filter ที่ ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติม DNA Pre-Wash Buffer ปริมาตร 200 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน spin filter ที่ แล้วเติม Soil DNA wash Buffer ปริมาตร 500 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที จึงย้าย spin filter ไปวางในหลอด 1.5 ml (micro tube) จากนั้นเติม DNA Elution Buffer ปริมาตร 50 μ l ตั้งหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที ที่ spin filter เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ในขั้นตอนต่อไป

ข) ตัวอย่างรากและลำต้นอ้อย นำสารละลายที่ได้จากการสกัด 3 ml (ตามวิธีการศึกษาในส่วนการหาปริมาณจุลินทรีย์) มาปั่นตกตะกอน จากนั้นจึงนำตะกอนที่ได้มาเติม lysis solution ปริมาตร 750 μ l และสกัดดีเอ็นเอจากรากและลำต้นด้วยวิธีเดียวกันกับตัวอย่างดิน

นำสารแขวนลอยเชื้อที่สกัดได้จากอ้อยมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNA ZR Soil Microbe DNA MiniPrep (Zymo Research, USA) โดยนำ 3 ml ของสารแขวนลอยเชื้อไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม lysis solution ปริมาตร 750 μ l ย้ายสารละลายลงใน ZR BashingBead Lysis Tube เขย่าด้วยเครื่อง Vortex GENIE2 เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดสารส่วนบนใส่ลงใน Zymo-Spin IV Spin Filter ปั่นเหวี่ยงที่ 7,000xg เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายที่ผ่านลงมาจาก Spin Filter มาเติม Soil DNA Binding Buffer ปริมาตร 1,200 μ l จากนั้นถ่ายสารละลายปริมาตร 800 μ l สู่ Zymo-Spin IIC Column ที่วางบน collection tube แล้วจึงนำ column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน spin filter ที่ ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติม DNA Pre-Wash Buffer ปริมาตร 200 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน spin filter ที่ แล้วเติม Soil DNA wash Buffer ปริมาตร 500 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที จึงย้าย spin filter ไปวางในหลอด 1.5 ml (micro tube) จากนั้นเติม DNA Elution Buffer ปริมาตร 50 μ l ตั้งหลอดที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที ที่ spin filter เก็บสารละลาย DNA ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ในขั้นตอนต่อไป

3.4.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดโดยเทคนิค PCR

เมื่อสกัดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์แล้ว ขั้นตอนต่อไปเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงที่สนใจด้วยเทคนิค Nested PCR ในขั้นแรกใช้ไพรเมอร์ (universal primer) ที่ออกแบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ V3 ของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย โดยที่ปลาย 5' ของสาย forward จะติดด้วย 40 bp GC เพื่อทำให้เกิด melting domain เวลาแยกบนโพลีอะครีลาไมด์เจล

ก) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งช่วงสาย (full length) ของยีน 16s rRNA ด้วย 16s Universal-8F primer (Weisburg et al, 1991) และ 16s Universal-1512R primer (Kane et al., 1993) โดยองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR สำหรับ full length ในปริมาตรรวม 20 μl

ส่วนประกอบ	ปริมาตรต่อหลอด (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	6	-
Hot Start PCR Master Mix	10	1x
10 μM 16s Universal-8F primer	0.5	0.25 μM
10 μM 16s Universal-1512R primer	0.5	0.25 μM
DNA template	3	≥ 10 ng
รวม	20	

สภาวะในปฏิกิริยา PCR มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 1 นาที

อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1.30 นาที จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 โดยใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

ข) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน V3 region โดยใช้ forward primer 338F (GC-clamp) (Lane, 1991) และ reverse primer 518R (Muyzer et al., 1993) โดยใช้ดีเอ็นเอจาก PCR product ของยีน 16s rRNA เป็น DNA template องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR สำหรับ V3 region ในปริมาตรรวม 50 μl

ส่วนประกอบ	ปริมาตรต่อหลอด (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	10	-
Hot Start PCR Master Mix	15	1x
10 μM PRBA338F-GC primer	1	0.25 μM
10 μM PRUN518R primer	1	0.25 μM
genomic DNA	3	≥ 10 ng
รวม	30	

สภาวะในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที

อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 30 รอบ

ขั้นที่ 3 โดยใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ

ค) การแยกดีเอ็นเอบน 1% agarose gel electrophoresis การเตรียม 1% agarose gel โดยชั่ง agarose powder 0.5 g เติม 1x TAE buffer ให้ได้ปริมาตร 50 ml นำไปหลอม

ด้วย microwave จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น อุณหภูมิประมาณ 45-50°C วาง comb ลงไปใน chamber เพื่อให้เกิดช่อง (wells) ทำการเท agarose gel ลงใน chamber รอจนเจลแข็งตัว นำถาดรองเจลไปวางในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสให้ด้านที่มีหลุมอยู่ใกล้ขั้วลบ เท 0.5x TAE buffer ลงในอ่างให้ท่วมเจล นำดีเอ็นเอจากการสกัดปริมาตร 5 ml ผสมกับ loading dye 1 μ l ลงในหลุมและใช้ standard DNA marker จากนั้นปล่อยกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวกโดยเครื่อง gel electrophoresis เมื่อเห็นแถบ bromophenol blue เคลื่อนไปเกือบสุดเจล (ห่างประมาณ 1-2 cm) ใช้เวลาประมาณ 30 นาที จึงหยุดปล่อยกระแสไฟฟ้า

3.4.2.3 การเตรียม gradient gel สำหรับทำ DGGE

ก) ขั้นตอนการเตรียมกระจก นำกระจกขนาด 16X18 เซนติเมตร มาล้างด้วยสารซักฟอกและล้างด้วยน้ำจนสะอาด เช็ดกระจกด้วยน้ำปลอดประจุและ 95% (v/v) ethanol ให้ทั่วแผ่น ปล่อยให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที นำมาประกบกับกระจกแผ่นที่เช็ดด้วยน้ำยาเช็ดกระจก โดยมี spacer คั่นระหว่างกระจกทั้งสองแผ่น เพื่อใช้สำหรับเตรียมพอลิอะคริลาไมด์

ข) การเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ เตรียม DGGE solution และ denaturant gel โดยมีส่วนผสมดังตารางที่ 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบของ DGGE solution

Component	Volume		Final concentration
	0% denaturant	100% denaturant	
40% acrylamide:bis-acrylamide	10 ml	10 ml	8%
50x TAE buffer solution	0.5 ml	0.5 ml	0.5x
100% formamide	-	20 ml	40%
urea	-	21 g	7 M
Deionized water	Bring to 50 ml	Bring to 50 ml	-

ตารางที่ 3.5 องค์ประกอบของ denaturant gel 15 ml

% Final denaturant	0% denaturant	100% denaturant
40	9 ml	6 ml
60	6 ml	9 ml
ค่อยๆ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม 10% APS และ TEMED		
10% APS	150 μ l	150 μ l
TEMED	7.5 μ l	7.5 μ l

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นเทสารละลาย low denaturant solution ลงใน inner chamber และเทสารละลาย high denaturant solution ลงใน outflow chamber เปิด port เพื่อให้ denaturant solution ผสมกันเป็น gradient ลงในกระบอกที่เตรียมไว้ (ใช้ stirrer ช่วยในการผสมเจล) ตั้งเจลทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 3 ชั่วโมง หรือเก็บไว้ที่ 4°C ช้ามคืนเพื่อให้เจลเกิด complete polymerization

ค) การแยกดีเอ็นเอโดยเทคนิค DGGE

เทสารละลาย 0.5x TAE Buffer ปริมาตร 5 L ลงใน tank นำขึ้นวางบน stirrer จัดวางเจลที่ complete polymerization แล้วลงใน tank จากนั้นเปิด heater โดยตั้งอุณหภูมิที่ 65 °C (เพื่อให้บัฟเฟอร์ได้อุณหภูมิที่ 60 °C) ปิเปิด PCR product 30 µl ของการเพิ่มปริมาณ Variable V3 region (ติด GC-clamp) load ลงในแต่ละ well ให้กระแสไฟฟ้าที่ 20 โวลต์ เป็นเวลา 10 นาที (เพื่อให้ DNA ออกจากจุดเริ่มต้นเท่ากัน) จากนั้นจึง run gel ที่ 70 โวลต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แกะเจลออกจากกระบอก แล้วนำไปย้อมด้วย EtBr (10 µg/ml) เป็นเวลา 15 นาที ล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น นำแผ่นเจลไปอ่านผลด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation) เปรียบเทียบแบบแผน DNA

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินและขอยล์เมต

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะเลือกแปลงที่มีปริมาณ N ต่ำ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย จึงได้เก็บตัวอย่างดินจากไร่อ้อยพลสวัสดิ์ถาวรหลายสถานที่ โดยเริ่มเก็บตัวอย่างดินครั้งแรกในเดือนกรกฎาคม 2556 จากไร่ที่บ้านขามเปี้ยและบ้านพาดบ่อแดง ซึ่งช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างดินนั้น เป็นช่วงเวลาที่เพิ่งมีการไถกลบปอเทือง สำหรับการเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำไปวิเคราะห์ในครั้งที่สองช่วงเดือนพฤศจิกายน 2556 นั้น เป็นช่วงที่มีการไถกลบดินอีกครั้งหนึ่งเพื่อเตรียมดินก่อนเริ่มปลูกอ้อยจึงได้เก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ผลอีกครั้งหนึ่ง ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จะเห็นว่าปริมาณ organic matter, Total NPK รวมทั้ง available P มีค่าลดลงจากครั้งแรก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายของปอเทืองที่ถูกไถกลบนั่น ไม่ทำให้ organic matter, Total NPK รวมทั้ง available P เพิ่มขึ้นเลย แต่อย่างไรก็ตามการปลูกปอเทืองก่อนปลูกอ้อยก็อาจจะมีข้อดีในการตัดวงจรชีวิตของเชื้อก่อโรคอ้อยหรือเพิ่มความชื้นให้กับดินได้ เนื่องจากการปลูกอ้อยจากทั้ง 2 สถานที่นี้เป็น การปลูกโดยใช้รถปลูกที่มีการใส่ท่อนพันธุ์อ้อยที่ตัดเรียบร้อยแล้วในรถปลูก ดังนั้นหากงานวิจัยนี้ใช้วิธีการปลูกอ้อยโดยใช้รถปลูกแบบนี้จะทำให้ผลการศึกษาเกิดความแปรปรวนอย่างมากจากการที่ปริมาณท่อนพันธุ์อ้อยที่ตกลงไปในร่องปลูกอ้อยแต่ละร่องจะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันอย่างมาก โดยช่วงที่มีจำนวนท่อนพันธุ์อ้อยอยู่ในรถปลูกเป็นปริมาณมากก็จะทำให้มีจำนวนท่อนพันธุ์ในร่องอ้อยมากตามไปด้วย เมื่อจำนวนท่อนพันธุ์อ้อยที่มีอยู่ในรถมีปริมาณลดน้อยลงก็จะทำให้มีจำนวนท่อนพันธุ์ในร่องอ้อยลดลงตามไปด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงต้องหาแหล่งปลูกอ้อยใหม่และจะต้องปลูกอ้อยโดยใช้คนช่วยในการปลูกดังภาพที่ 3.3 เพื่อให้จำนวนหรือปริมาณท่อนพันธุ์อ้อยในแต่ละแปลงทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งสถานที่ปลูกอ้อยใหม่คือไร่อ้อยที่บ้านแฮด ซึ่งผลการวิเคราะห์ดินดังแสดงในตารางที่ 4.1 จะเห็นว่าค่าวิเคราะห์ดินที่ได้ใกล้เคียงกับค่าวิเคราะห์ดินที่บ้านขามเปี้ย แต่มีปริมาณ Total N มากกว่าที่บ้านขามเปี้ยเล็กน้อย

ขอยล์เมต ลักษณะเป็นเม็ดแข็งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 55-65 mm เนื้อสัมผัสแข็งกระด้าง เตรียมได้จากวีแอสเข้มข้นที่ได้จากโรงงานผลิตเอทานอล ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ขอยล์เมตเป็นวัสดุตัวพา (carrier material) สำหรับเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อ NFB เนื่องจากมีคำแนะนำให้ใช้ขอยล์เมตเป็นปุ๋ย จึงมีการวิเคราะห์ธาตุอาหารในขอยล์เมต สุวรรณ (2555) ได้ใช้พีทและเวอร์มิคูไลท์เพื่อเป็นวัสดุตัวพา เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ธาตุอาหาร (ตารางที่ 4.1) จะเห็นได้ว่าพีทและเวอร์มิคูไลท์มีความอุดมสมบูรณ์มากกว่าขอยล์เมตอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบในด้านราคาแล้ว ขอยล์เมตมีราคาถูกใกล้เคียงกับพีท แต่ราคาถูกกว่าเวอร์มิคูไลท์มาก ราคาโดยประมาณของขอยล์เมต พีทและเวอร์มิคูไลท์ คือ 450, 340

และ 1,500 บาทต่อกระสอบ ตามลำดับ จากราคาและค่าวิเคราะห์ธาตุอาหาร ผู้วิจัยคิดว่าฟิทน่าจะเป็นวัสดุตัวพาที่เหมาะสมมากกว่า

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินและซอຍล์เมตก่อนปลูกอ้อย

สถานที่เก็บ ตัวอย่าง (วตป)	Ca (%)	Organic matter (%)	Total N (mg/kg)	Total P (mg/kg)	Available P (mg/kg)	Total K (mg/kg)
ดิน บ้านขามเปี้ย (8 ก.ค. 56)	ND	0.372	99.97	77.35	22.98	293.41
(6 พ.ย. 56)	ND	0.355	91.62	65.93	17.36	343.39
ดิน บ้านพาดปอแดง (8 ก.ค. 56)	ND	0.315	71.12	81.90	29.01	437.71
(6 พ.ย. 56)	ND	0.221	32.44	43.60	13.70	303.58
ดิน บ้านแฮด	ND	0.241	110	56.21	22.98	223.95
วัสดุ ซอຍล์เมต	2.58	ND	4.75	5.43	ND	25.88
วัสดุ ฟิท	1.17	47.5	6700	500	ND	4200
วัสดุ เวอร์มิคูไลท์	0.93	ND	ND	4410	ND	50200

ND = not determined

4.2 การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้วัสดุทางการเกษตร

ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในซอຍล์เมต ฟิทและเวอร์มิคูไลท์ (ตารางที่ 4.1) และการเตรียมซอຍล์เมตเพื่อใช้เป็นวัสดุตัวพา พบว่าแม้จะมีการบ่มเชื้อมานานถึง 45 วันแล้ว ซอຍล์เมตยังคงมีลักษณะเป็นเม็ดแข็ง ดังนั้นเชื้อจึงอาจเพิ่มปริมาณได้ไม่มากนักเมื่อเทียบกับฟิทและเวอร์มิคูไลท์ โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ NFB ในซอຍล์เมตหลังจากใส่เชื้อ NFB ในซอຍล์เมตปลอดเชื้อแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องได้ผลดังตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าปริมาณเชื้อที่ได้ไม่แตกต่างจากวันเริ่มต้นที่ใส่เชื้อเท่าใดนัก แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อก็ไม่ลดลง ในขณะที่การใช้ฟิทหรือเวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุตัวพานั้นจะทำให้เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้น้อย 1 log no. หรือประมาณ 10 เท่า แม้ว่าจะบ่มชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 วันก็ตาม ทั้งนี้จะเป็นเพราะปริมาณธาตุอาหารที่ตรวจพบในฟิทหรือเวอร์มิคูไลท์ที่มีปริมาณมากกว่า นอกจากนี้การที่เนื้อสัมผัสของฟิทหรือเวอร์มิคูไลท์มีลักษณะร่วนซุย ยังทำให้เชื้อมีการกระจายตัวได้สม่ำเสมอ (สุวรรณา, 2555)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเชื้อ NFB ที่ตรวจนับได้จากวัสดุปลูกขอยล์เมต

Condition	ปริมาณเชื้อ (log cfu/g)		
	0 วัน	5 วัน	45 วัน
control (soilmate+broth)	0	0	0
3LSO1 (soilmate)	7.09	7.67	7.5
5LSO2 (soilmate)	7.14	7.74	7.9
3LSO1 + 5LSO2 (soilmate)	7.35	7.77	7.4

4.3 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

ภาพรวมแปลงทดลองที่ไร่อ้อยพุลสวัสดิ์ถาวร อ.บ้านแฮด จ.ขอนแก่น หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน แสดงในภาพที่ 4.1 โดยมีผลการวิเคราะห์อื่นๆ ดังนี้



ภาพที่ 4.1 ภาพรวมแปลงทดลองที่ไร่อ้อยพุลสวัสดิ์ถาวร อ.บ้านแฮด จ.ขอนแก่น หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน

4.3.1 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และการนำไฟฟ้าของดินหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

การวิเคราะห์ค่าความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และการนำไฟฟ้า ของดินหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน พบว่าค่าความชื้นของดินที่ 3 เดือนจะมีค่ามากกว่าที่ 11 เดือน อย่างเห็นได้ชัด อันเนื่องมาจากในช่วงก่อนที่เก็บตัวอย่างดินในช่วงเดือนที่ 3 นั้นมีฝนตกลงมาบ้างเล็กน้อย แต่ในช่วงที่เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนที่ 11 นั้นเป็นช่วงที่ไม่มีฝนตกมานานอย่างน้อย 2 เดือนติดต่อกัน สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง จะเห็นว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัด ส่วนค่าการนำไฟฟ้าของดินให้ผลสอดคล้องกันกับค่าความชื้นของดิน ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และค่าการนำไฟฟ้า ของดินหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

ตำรับทดลอง	คุณลักษณะทางเคมี-กายภาพของดิน								
	ความชื้น (%)			ความเป็นกรด-ด่าง (pH)			การนำไฟฟ้า (dS/m)		
	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT
Control, PK	2.45 ^{ab}	ND	1.87 ^a	6.72 ^{ab}	6.33 ^a	6.27 ^{ab}	44.50 ^b	47.93 ^{ab}	35.88 ^a
Control, ½N-PK	2.42 ^{ab}	ND	0.90 ^a	6.64 ^{ab}	6.15 ^a	6.12 ^{ab}	48.25 ^{ab}	44.75 ^b	36.88 ^a
Control, N-PK	2.64 ^{ab}	ND	1.17 ^a	6.55 ^b	6.18 ^a	5.93 ^b	54.50 ^a	46.23 ^{ab}	35.53 ^a
3LSO1, PK	2.36 ^{ab}	ND	1.40 ^a	6.69 ^{ab}	6.13 ^a	5.86 ^b	42.25 ^{ab}	47.33 ^{ab}	36.80 ^a
3LSO1, ½N-PK	2.33 ^{ab}	ND	1.18 ^a	6.67 ^{ab}	6.10 ^a	6.44 ^a	47.75 ^{ab}	47.78 ^{ab}	37.28 ^a
3LSO1, N-PK	2.57 ^{ab}	ND	2.13 ^a	6.60 ^{ab}	6.33 ^a	6.35 ^{ab}	49.50 ^{ab}	44.38 ^b	34.28 ^a
5LSO2, PK	2.48 ^{ab}	ND	1.37 ^a	6.81 ^a	6.20 ^a	5.69 ^b	42.75 ^b	52.75 ^a	36.55 ^a
5LSO2, ½N-PK	2.17 ^b	ND	1.74 ^a	6.76 ^{ab}	6.04 ^a	5.86 ^b	45.25 ^{ab}	45.70 ^{ab}	35.93 ^a
5LSO2, N-PK	2.62 ^a	ND	0.76 ^a	6.74 ^{ab}	6.14 ^a	6.33 ^{ab}	46.25 ^{ab}	46.45 ^{ab}	39.10 ^a
Mixed, PK	2.33 ^{ab}	ND	2.03 ^a	6.81 ^a	6.16 ^a	6.01 ^{ab}	41.75 ^b	45.78 ^{ab}	33.95 ^a
Mixed, ½N-PK	2.43 ^{ab}	ND	1.59 ^a	6.71 ^{ab}	6.10 ^a	6.26 ^{ab}	50.00 ^{ab}	52.40 ^a	32.48 ^a
Mixed, N-PK	2.71 ^a	ND	1.27 ^a	6.68 ^a	6.09 ^a	6.04 ^{ab}	51.75 ^{ab}	46.98 ^{ab}	34.35 ^a
ค่าเฉลี่ยรวม	2.46	ND	1.45	6.70	6.16	6.10	47.04	47.37	35.75

control = No NFB

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

* = ตัวอักษร^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่

$P=0.05$

4.3.2 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อปริมาณเชื้อ NFB ในดิน ในราก และต้นอ้อย หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และเชื้อ NFB ในดิน หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ NFB ที่ 3 เดือน มีค่าเฉลี่ยเป็น log 6.83 cfu/g และ log 5.05 cfu/g ตามลำดับ จากนั้นปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ 6 เดือน จะมีปริมาณลดลงอย่างเด่นชัดโดยมีค่าเฉลี่ยเป็น log 5.05 cfu/g ซึ่งอาจเนื่องจากเป็นช่วงฤดูฝนทำให้เชื้อถูกชะหายไปบ้าง หลังจากนั้นปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ NFB ที่ 11 เดือน จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกตำรับทดลองโดยมีค่าเฉลี่ยเป็น log 7.16 cfu/g และ log 7.11 cfu/g ตามลำดับ จะสังเกตว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และเชื้อ NFB ในทุกตำรับทดลองที่ 3, 6 และ 11 เดือน มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกตำรับทดลอง ซึ่งอาจเกิดจากพื้นที่ปลูกมีความลาดเอียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงทำให้เชื้อไหลมาปะปนกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน หลังจากปลูกอ้อยได้ 3, 6 และ 11 เดือน

Treatment	Total count (log cfu/g)			NFB count (log cfu/g)		
	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT
Control, PK	6.80 ^{ab}	4.98 ^a	8.25 ^a	5.53 ^a	ND	6.94 ^c
Control, ½N-PK	7.13 ^{ab}	5.18 ^a	7.59 ^{ab}	5.51 ^a	ND	7.10 ^{ab}
Control, N-PK	6.76 ^{ab}	5.08 ^a	7.21 ^{ab}	5.14 ^{ab}	ND	7.19 ^{ab}
3LSO1, PK	6.81 ^{ab}	5.25 ^a	7.27 ^{ab}	5.33 ^{ab}	ND	7.03 ^b
3LSO1, ½N-PK	6.79 ^{ab}	5.22 ^a	7.11 ^{ab}	4.95 ^b	ND	7.23 ^a
3LSO1, N-PK	6.82 ^{ab}	5.04 ^a	6.95 ^{ab}	5.07 ^{ab}	ND	7.21 ^a
5LSO2, PK	6.58 ^b	4.89 ^a	6.69 ^b	5.05 ^{ab}	ND	7.32 ^a
5LSO2, ½N-PK	6.58 ^b	4.93 ^a	7.07 ^{ab}	4.96 ^b	ND	7.09 ^{ab}
5LSO2, N-PK	7.32 ^a	4.96 ^a	6.85 ^b	5.70 ^a	ND	7.13 ^{ab}
Mixed, PK	6.65 ^{ab}	5.04 ^a	7.26 ^{ab}	5.04 ^{ab}	ND	6.98 ^c
Mixed, ½N-PK	6.64 ^{ab}	4.78 ^a	6.93 ^{ab}	4.78 ^b	ND	7.15 ^{ab}
Mixed, N-PK	7.03 ^{ab}	5.21 ^a	6.70 ^b	5.21 ^{ab}	ND	6.98 ^c
ค่าเฉลี่ยรวม	6.83	5.05	7.16	5.19	ND	7.11

control = No NFB

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

* = ตัวอักษร ^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่

$P=0.05$

การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในรากที่ 3 เดือน และในลำต้นอ้อย หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในรากที่ 3 เดือน มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าในลำต้นอ้อยเล็กน้อย โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น $\log 4.83 \text{ cfu/g}$ ในรากและ $\log 4.02 \text{ cfu/g}$ ในลำต้นอ้อย โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 6 เดือนและเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยที่ 11 เดือน โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเป็น $\log 4.34 \text{ cfu/g}$ และเพิ่มเป็น $\log 5.58 \text{ cfu/g}$ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในดินที่เชื้อจะลดลงในช่วงฤดูฝนเนื่องจากการชะล้างของน้ำฝน ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ที่ตรวจพบในรากและลำต้นอ้อย หลังจากปลูกอ้อยได้ 3, 6 และ 11 เดือน

Treatment	Total count (log cfu/g)			
	Root 3 MAT	Shoot		
		3 MAT	6 MAT	11 MAT
Control, PK	4.59 ^b	3.93 ^a	5.24 ^a	5.42 ^{ab}
Control, ½N-PK	4.80 ^{ab}	4.11 ^a	4.09 ^d	5.99 ^a
Control, N-PK	5.50 ^a	3.82 ^a	4.38 ^{abcd}	5.33 ^{ab}
3LSO1, PK	4.54 ^b	4.23 ^a	4.12 ^{abcd}	6.22 ^a
3LSO1, ½N-PK	4.66 ^a	2.92 ^a	4.40 ^{abcd}	6.00 ^a
3LSO1, N-PK	5.04 ^{ab}	3.92 ^a	4.76 ^{ab}	5.44 ^{ab}
5LSO2, PK	4.54 ^{ab}	3.73 ^a	4.38 ^{abcd}	5.38 ^{ab}
5LSO2, ½N-PK	4.66 ^{ab}	4.88 ^a	4.41 ^{abcd}	5.70 ^{ab}
5LSO2, N-PK	5.04 ^{ab}	4.31 ^a	4.27 ^{abc}	5.92
Mixed, PK	4.60 ^{ab}	4.16 ^a	4.34 ^{abc}	4.59 ^b
Mixed, ½N-PK	4.70 ^{ab}	3.99 ^a	3.79 ^{cd}	5.65 ^{ab}
Mixed, N-PK	5.27 ^{ab}	4.19 ^a	3.94 ^{bcd}	5.33 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยรวม	4.83	4.02	4.34	5.58

control = No NFB

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

* = ตัวอักษร ^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่

$P=0.05$

4.3.3 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อความหวาน Polarity, Fiber, CCS และ Purity ของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 11 เดือน

การวัดปริมาณความหวานของอ้อยได้เริ่มวัดเมื่ออ้อยอายุ 10 เดือน โดยใช้ hand refractometer เปรียบเทียบระหว่างโคนและกลางลำต้น พบว่าค่าที่วัดได้ส่วนใหญ่ในทุกตำรับทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยค่าความหวาน ($^{\circ}$ Brix) ของโคนลำต้นจะมีค่ามากกว่าของกลางลำต้นเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.6

การวัดปริมาณความหวาน Polarity, Fiber, CCS และ Purity ของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 11 เดือน โดยส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ พบว่าค่าที่วัดได้ส่วนใหญ่ในทุกตำรับทดลองมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกัน โดยค่าความหวานเฉลี่ย ($^{\circ}$ Brix) โพลาริตี ไฟเบอร์ ซีซีเอส และความบริสุทธิ์ ของทุกตำรับทดลอง มีค่าเท่ากับ 19.37, 16.38, 11.84, 12.19 และ 84.50 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยความหวานของอ้อยบริเวณโคนและกลางลำต้นอ้อย หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 10 เดือน (วัดโดยใช้ hand refractometer)

ตำรับทดลอง	ค่าความหวาน ($^{\circ}$ Brix)	
	โคนลำต้น	กลางลำต้น
Control, PK	21.6 ^a	20.1 ^a
Control, ½N-PK	21.3 ^a	18.8 ^a
Control, N-PK	21.8 ^a	19.5 ^a
3LSO1, PK	22.5 ^a	19.3 ^a
3LSO1, ½N-PK	22.0 ^a	18.8 ^a
3LSO1, N-PK	22.6 ^a	19.6 ^a
5LSO2, PK	22.8 ^a	20.5 ^a
5LSO2, ½N-PK	21.1 ^a	19.0 ^a
5LSO2, N-PK	20.9 ^a	18.7 ^a
Mixed, PK	22.5 ^a	19.8 ^a
Mixed, ½N-PK	22.1 ^a	18.3 ^a
Mixed, N-PK	21.4 ^a	19.3 ^a
ค่าเฉลี่ยรวม	21.9	19.3

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

* = ตัวอักษร ^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยความหวาน Polarity, Fiber, CCS และ Purity ของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 11 เดือน

ตำรับทดลอง	ความหวาน (°Brix)	Pol (%)	Fiber (%)	CCS (%)	Purity (%)
Control, PK	19.6 ^a	16.9 ^a	11.2 ^b	12.8 ^a	86.1 ^a
Control, ½N-PK	18.8 ^a	15.8 ^a	12.2 ^{ab}	11.6 ^a	83.8 ^a
Control, N-PK	19.9 ^a	16.9 ^a	11.9 ^{ab}	12.5 ^a	84.5 ^a
3LSO1, PK	19.2 ^a	16.2 ^a	11.6 ^{ab}	12.0 ^a	84.0 ^a
3LSO1, ½N-PK	19.7 ^a	16.8 ^a	11.4 ^b	12.6 ^a	85.0 ^a
3LSO1, N-PK	19.3 ^a	16.1 ^a	11.8 ^{ab}	11.9 ^a	83.4 ^a
5LSO2, PK	19.6 ^a	16.7 ^a	12.0 ^{ab}	12.4 ^a	85.0 ^a
5LSO2, ½N-PK	19.7 ^a	16.8 ^a	11.4 ^{ab}	12.6 ^a	85.3 ^a
5LSO2, N-PK	18.9 ^a	15.6 ^a	12.1 ^{ab}	11.4 ^a	82.7 ^a
Mixed, PK	19.3 ^a	16.5 ^a	12.7 ^a	12.2 ^a	85.0 ^a
Mixed, ½N-PK	19.2 ^a	16.3 ^a	12.2 ^{ab}	12.1 ^a	84.9 ^a
Mixed, N-PK	19.2 ^a	16.2 ^a	11.6 ^{ab}	12.0 ^a	84.3 ^a
ค่าเฉลี่ยรวม	19.37	16.38	11.84	12.19	84.50

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

Pol = polarity

* = ตัวอักษร^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.3.4 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อผลผลิตอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

การวัดการเจริญเติบโตของอ้อยโดยนับจำนวนต้น/ไร่ หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าอ้อยที่ไม่ใส่หรือใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งอัตราส่วนกับการใส่เชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสมของ *Enterobacter* sp. 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 จะมีจำนวนต้น/ไร่มากกว่าตำรับทดลองอื่นเล็กน้อย และต่อเนื่องถึงผลในเดือนที่ 6 และ 11 โดยตำรับทดลองที่ไม่ใส่หรือใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งอัตราส่วนกับการใส่เชื้อ NFB จะมีจำนวนต้นและน้ำหนักแห้งใกล้เคียงหรือมากกว่าตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ยยูเรียเต็มอัตรา ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sevilla *et al* (2001) ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการที่เชื้อสร้างสาร 3-indole acetic acid (IAA) (สุวรรณ และคณะ, 2553) ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยทำให้อ้อยแตกกอเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติของทุกตำรับทดลองจะมีค่าไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.8 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใส่เชื้อ NFB จะทำให้ลดการใส่ปุ๋ย N ลงได้ถึงครึ่งหนึ่งโดยผลผลิตคงเดิมหรือมากกว่า

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยจำนวนต้น/ไร่ และน้ำหนักแห้งต้น/ไร่ หลังจากปลูกอ้อยได้ 3, 6 และ 11 เดือน

Treatment	จำนวนต้น (ต้น/ ไร่)			น้ำหนักแห้งต้น (ตัน/ ไร่)		
	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT
Control, PK	4,099.2 ^a	7,713.50 ^a	6,993.57 ^a	ND	0.18 ^a	0.26 ^a
Control, ½N-PK	4,407.7 ^a	9,079.89 ^a	5,700.64 ^a	ND	0.20 ^a	0.20 ^a
Control, N-PK	4,804.4 ^a	8,396.69 ^a	6,640.96 ^a	ND	0.17 ^a	0.25 ^a
3LSO1, PK	5,024.8 ^a	8,154.27 ^a	7,140.50 ^a	ND	0.23 ^a	0.26 ^a
3LSO1, ½N-PK	5,774.1 ^a	8,110.19 ^a	7,875.11 ^a	ND	0.20 ^a	0.29 ^a
3LSO1, N-PK	4,275.5 ^a	8,506.89 ^a	6,993.57 ^a	ND	0.20 ^a	0.26 ^a
5LSO2, PK	6,126.7 ^a	8,506.89 ^a	6,699.72 ^a	ND	0.26 ^a	0.25 ^a
5LSO2, ½N-PK	5,201.1 ^a	9,719.01 ^a	7,522.50 ^a	ND	0.26 ^a	0.27 ^a
5LSO2, N-PK	5,774.1 ^a	8,969.70 ^a	6,876.03 ^a	ND	0.22 ^a	0.25 ^a
Mixed, PK	5,950.4 ^a	8,484.85 ^a	7,375.57 ^a	ND	0.21 ^a	0.28 ^a
Mixed, ½N-PK	5,509.6 ^a	8,639.12 ^a	6,905.42 ^a	ND	0.22 ^a	0.25 ^a
Mixed, N-PK	4,760.3 ^a	9,212.12 ^a	6,993.57 ^a	ND	0.23 ^a	0.25 ^a
ค่าเฉลี่ยรวม	5,142.3	8,624.43	6,976.43	ND	0.22	0.26

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

* = ตัวอักษร ^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

ผลการวัดการเจริญเติบโตของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็น เวลา 11 เดือน โดยวัดความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อย และน้ำหนักสดอ้อย (ตารางที่ 4.9) พบว่าความสูงและน้ำหนักสดของอ้อยในทุกตำรับทดลองที่ไม่ใส่หรือใส่ปุ๋ยยูเรียร่วมกับการใส่เชื้อ NFB ที่เป็นเชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสม จะมีความสูงและน้ำหนักสดมากกว่าตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อแต่ใส่ปุ๋ยยูเรียเต็มอัตรา และพบว่าอ้อยที่ใส่เชื้อและใส่ปุ๋ยยูเรียเต็มอัตราจะมีความสูงมากที่สุดเมื่อเทียบในแต่ละกลุ่มที่ใส่เชื้อ โดยพบว่าตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB มีค่าเฉลี่ยผลผลิต 7.17 ตัน/ไร่ มีความสูงเฉลี่ย 157.5 เซนติเมตร ในขณะที่ตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB ค่าเฉลี่ยผลผลิต 5.93 ตัน/ไร่ ความสูงเฉลี่ย 141.9 เซนติเมตร ซึ่งน่าจะเป็นเพราะเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้เป็นเชื้อที่ผลิตสาร IAA ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นในตารางที่ 4.8 การที่ผลผลิต/ไร่มีปริมาณค่อนข้างต่ำนั้นอาจเป็นเพราะดินที่ปลูกนี้มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำมากและปริมาณน้ำฝนที่ตกในเขตพื้นที่นี้ตลอดทั้งปีค่อนข้างต่ำ รวมทั้งการเก็บเกี่ยวผลผลิตนั้นทำเมื่ออ้อยมีอายุเพียง 11 เดือน นอกจากนี้การวิเคราะห์ผลผลิตจะเก็บจากต้นอ้อยที่อยู่ในแถวที่ 3 ที่เป็นแถวกลางที่อาจทำให้ผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำ โดยการปลูกครั้งนี้จะสังเกตได้ว่าทุกตำรับทดลองอ้อยแถวที่ 1 และ 5 จะมีการเจริญมากกว่าแถวที่ 2 และ 4

และเจริญมากกว่าแถวที่ 3 ตามลำดับ ทั้งนี้ น่าจะเป็นเพราะอ้อยแถวที่ 1 และ 5 อยู่ริมสุดจึงได้รับสารอาหารมากกว่าแถวอื่นเพราะรากด้านหนึ่งไม่ต้องแย่งอาหารกับแถวอื่น รวมทั้งได้รับแสงแดดมากกว่าแถวที่ 2 และ 4; และแถวที่ 3 ตามลำดับ ซึ่งสามารถสังเกตเห็นความแตกต่างด้านคามสูงได้อย่างชัดเจนด้วยตาเปล่า

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อย และน้ำหนักสดอ้อย หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 11 เดือน

Treatment	ความสูง (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อยบริเวณ			น้ำหนักสด (ตัน/ไร่)
		โคนต้น (มม.)	กลางต้น (มม.)	ยอด (มม.)	
Control, PK	144.38 ^{ab}	30.99 ^a	25.85 ^c	25.63 ^a	6.6 ^{abc}
Control, ½N-PK	138.11 ^a	30.52 ^a	26.35 ^{bc}	21.60 ^b	4.9 ^c
Control, N-PK	143.34 ^{ab}	31.70 ^a	28.83 ^{abc}	28.35 ^a	6.3 ^{bc}
3LSO1, PK	145.64 ^{ab}	30.58 ^a	26.68 ^{bc}	26.36 ^a	6.5 ^{abc}
3LSO1, ½N-PK	152.73 ^{ab}	30.46 ^a	28.34 ^{abc}	26.14 ^a	8.2 ^a
3LSO1, N-PK	161.58 ^{ab}	31.62 ^a	29.17 ^{abc}	25.51 ^a	7.2 ^{ab}
5LSO2, PK	150.92 ^{ab}	30.66 ^a	27.37 ^{abc}	25.25 ^a	6.5 ^{abc}
5LSO2, ½N-PK	153.90 ^{ab}	29.97 ^a	26.98 ^{abc}	26.28 ^a	7.5 ^{ab}
5LSO2, N-PK	163.62 ^{ab}	31.14 ^a	28.32 ^{abc}	26.79 ^a	7.1 ^{ab}
Mixed, PK	156.13 ^{ab}	31.24 ^a	27.06 ^{abc}	26.64 ^a	6.8 ^{ab}
Mixed, ½N-PK	159.15 ^{ab}	30.74 ^a	26.97 ^{abc}	25.10 ^a	6.6 ^{ab}
Mixed, N-PK	174.19 ^a	31.84 ^a	29.83 ^a	26.97 ^a	8.1 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยรวม	153.64	30.96	27.65	25.89	6.86

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

* = ตัวอักษร ^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.3.5 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อการสะสมธาตุ NPK ในอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

การสะสมปริมาณ Total NPK ในอ้อย (ตารางที่ 4.10) หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าการใส่เชื้อ NFB ที่เป็นเชื้อ 3LSO1 มีการสะสมปริมาณ Total N ในอ้อยในตำรับทดลองที่ไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียมากกว่าตำรับทดลองที่ใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งและเต็มอัตรา ตามลำดับ โดยพบว่าปริมาณ Total N และ Total K ในอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 6 เดือน มีแนวโน้มลดลงจากเดือนที่ 3 ประมาณกึ่งหนึ่ง และลดลงอีกกึ่งหนึ่งในเดือนที่ 11 อย่างไรก็ตามเมื่อดูปริมาณ N ที่ 6 และ 11 เดือน ในกลุ่มที่ใส่เชื้อแต่ไม่ใส่หรือใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งอัตราจะมีค่า Total N สูงกว่าในกลุ่ม Control ที่ไม่ใส่หรือใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งอัตรา

ในขณะที่การใส่เชื้อและใส่ปุ๋ยเรียเต็มอัตรามีค่า Total N ไม่แตกต่างจากกลุ่ม Control ที่ใส่ปุ๋ยยูเรีย นัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sevilla *et al* (2001)

ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยปริมาณ Total NPK ของต้นอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

Treatment	ค่าเฉลี่ยปริมาณธาตุอาหารในต้นอ้อย								
	Total N (%)			Total P (%)			Total K (%)		
	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT
Control, PK	1.33 ^a	0.58 ^{de}	0.20 ^c	0.21 ^a	0.14 ^a	0.08 ^{ab}	3.13 ^a	1.90 ^a	0.82 ^{abc}
Control, ½N-PK	1.13 ^{abcd}	0.52 ^{de}	0.27 ^{bc}	0.22 ^a	0.11 ^a	0.08 ^{ab}	2.35 ^c	0.84 ^a	0.63 ^{bc}
Control, N-PK	1.19 ^{abcd}	0.91 ^b	0.43 ^a	0.23 ^a	0.15 ^a	0.10 ^a	3.07 ^{ab}	1.85 ^a	0.82 ^{abc}
3LSO1, PK	1.22 ^d	0.67 ^{cd}	0.32 ^{abc}	0.22 ^a	0.18 ^a	0.12 ^a	2.60 ^{abc}	1.92 ^a	1.17 ^a
3LSO1, ½N-PK	0.85 ^{bcd}	0.86 ^{bc}	0.36 ^{ab}	0.23 ^a	0.14 ^a	0.08 ^{ab}	2.71 ^{abc}	2.11 ^a	0.84 ^{abc}
3LSO1, N-PK	0.50 ^{cd}	0.84 ^{bc}	0.36 ^{ab}	0.22 ^a	0.12 ^a	0.05 ^b	2.60 ^{abc}	1.49 ^a	0.51 ^c
5LSO2, PK	1.01 ^d	0.58 ^{de}	0.25 ^{bc}	0.22 ^a	0.12 ^a	0.09 ^{ab}	2.58 ^{abc}	1.38 ^a	0.82 ^{abc}
5LSO2, ½N-PK	1.16 ^{abcd}	0.74 ^{bcd}	0.34 ^{abc}	0.23 ^a	0.14 ^a	0.12 ^a	2.46 ^c	1.28 ^a	1.12 ^a
5LSO2, N-PK	1.10 ^{abcd}	1.12 ^a	0.45 ^a	0.24 ^a	0.14 ^a	0.09 ^{ab}	2.66 ^{abc}	1.65 ^a	0.89 ^{abc}
Mixed, PK	1.06 ^{bcd}	0.58 ^{de}	0.24 ^{bc}	0.21 ^a	0.12 ^a	0.09 ^{ab}	2.54 ^{abc}	1.63 ^a	0.90 ^{abc}
Mixed, ½N-PK	1.28 ^{ab}	0.44 ^f	0.25 ^{bc}	0.20 ^a	0.10 ^a	0.08 ^{ab}	2.73 ^{abc}	1.03 ^a	0.84 ^{abc}
Mixed, N-PK	1.28 ^{abc}	0.75 ^{bcd}	0.35 ^{abc}	0.22 ^a	0.12 ^a	0.09	2.66 ^{abc}	1.31 ^a	0.93 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยรวม	1.09	0.72	0.32	0.22	0.13	0.09^{ab}	2.67	1.53	0.86

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

Total N = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

Total P = ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด

Total K = ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด

* = ตัวอักษร ^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.3.6 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อการสะสมธาตุ NPK ในดินหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

การวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินในช่วงเดือนที่ 3, 6 และ 11 เดือน พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันในแต่ละตำรับทดลองและแต่ละช่วงเวลา ส่วนค่าปริมาณ Total N ในเดือนที่ 6 ที่มีค่าสูงโดยรวมสูงขึ้นนั้น อาจเป็นเพราะได้มีการใส่ปุ๋ยในครั้งที่ 2 ช่วง 5 เดือน อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าตำรับทดลองที่ใส่/หรือไม่ใส่เชื้อ และไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียก็มีปริมาณ Total N สูงใกล้เคียงกับตำรับทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่ง (½N) หรือเต็มอัตรา (N) ทั้ง 3 ช่วงเวลาที่ 3, 6 และ 11 เดือน สำหรับค่า available N ในดินทั้งในรูป NH_4^+ และในรูป NO_3^- นั้น

พบว่าปริมาณสูงสุดในเดือนที่ 3 และลดลงในเดือนที่ 6 และลดลงอีกจนเหลือปริมาณใกล้เคียงกันในทุกตำรับ ทดลองในเดือนที่ 11 โดยค่า available N ในดินในรูป NH_4^+ นั้นพบว่าหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน ใน ตำรับทดลองที่ไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียจะมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่ง (1/2N) และเต็มอัตรา (N) ตามลำดับ แต่ หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 6 และ 11 เดือน พบว่าเกือบทุกตำรับทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน ยกเว้นกลุ่มที่ใส่ เชื้อผสมและใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งอัตรา (1/2N) จะมีค่าสูงที่สุดคือ 9.71 และ 0.61 mg/kg ในเดือนที่ 6 และ 11 ตามลำดับ ซึ่งค่า N ในรูป NH_4^+ นี้สัมพันธ์กับค่าในเดือนที่ 3 ที่มีค่าสูงที่สุดคือ 23.22 mg/kg สำหรับค่า available N ในดินในรูป NO_3^- พบว่าให้ผลในการทำงานเดียวกับค่า available N ในดินในรูป NH_4^+ โดยตำรับ ทดลองที่ใส่เชื้อผสมและใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งอัตราให้ค่า NO_3^- สูงที่สุดคือ 5.09, 1.57 และ 2.22 mg/kg ในเดือนที่ 3, 6 และ 11 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

สำหรับค่าการวิเคราะห์ Total P นั้นพบว่ามีค่าสูงสุดในเดือนที่ 3 และลดลงเกือบครึ่งหนึ่ง ในเดือนที่ 6 จากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงเดือนที่ 11 โดยค่าเฉลี่ยรวมของ Total P ในเดือนที่ 3, 6 และ 11 คือ 92.59, 50.08 และ 69.04 mg/kg ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12)

สำหรับค่าการวิเคราะห์ available P และ Total K นั้นพบว่ามีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันในทุก ตำรับทดลองและทุกช่วงเวลา ได้แก่ 3, 6 และ 11 เดือน (ตารางที่ 4.12) ที่เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์

การที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อ NFB ที่ตรวจพบจากทุกตำรับทดลองมีค่าไม่ แตกต่างกันทั้งในดิน และในราก ลำต้นอ้อย อันเนื่องมาจากเชื้ออาจไหลมาปะปนกันซึ่งสามารถยืนยันผลจาก การติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของเชื้อแบคทีเรียทั้งในดินที่เพาะปลูกและในรากและลำต้นอ้อย โดยวิธี DGGE (ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไปในหัวข้อที่ 4.4 นั้น) นอกจากนี้ยังเกิดจากความผิดพลาดในการใส่เชื้อ NFB หากใส่พร้อมการปลูกจะทำให้เชื้อสามารถเข้าไปอยู่ในดินและรากได้มากกว่า ดังนั้นจึงทำให้ผลการทดลองใน ครั้งนี้ไม่สามารถสรุปได้อย่างเด่นชัดว่าเชื้อ *Enterobacter* sp. 3LSO1 และเชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 จะ สามารถเพิ่มผลผลิตหรือลดการใช้ปุ๋ยยูเรียลงได้ แต่จากการศึกษาก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตนี้ที่บ้านพาดบอแดง อ.บ้านแฮด จ.ขอนแก่น โดยเริ่มปลูกเมื่อเดือนธันวาคม 2555 และเก็บเกี่ยว ผลผลิตเมื่ออ้อยอายุ 14 เดือน (กุมภาพันธ์ 2557) โดยพื้นที่แต่ละตำรับทดลอง 8.5x10 ตารางเมตร ปลูกโดย ไม่มีช่องว่างระหว่างแถว เก็บเกี่ยวผลผลิตแถวที่ 3 (แถวกลาง) พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตนี้เมื่อใส่ในแปลงโดยให้ ปุ๋ยยูเรียเพียง 1 ใน 3 (1/3N) ของอัตราแนะนำ ไม่ว่าจะเตรียมชีวภัณฑ์โดยใช้เวอร์มิคูไลท์หรือขอยล์เมตเป็น วัสดุพาหะจะให้ผลผลิตเทียบเท่ากับตำรับทดลองที่ใส่ปุ๋ยยูเรียเต็มอัตรา แต่ตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการใส่ปุ๋ยยูเรียเพียง 1 ใน 3 (1/3N) ของอัตราแนะนำทำให้ปริมาณการสะสมธาตุอาหารในอ้อย ได้แก่ Total N และ Ca มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับตำรับทดลองควบคุม โดย Total P และ K พบในปริมาณที่สูงกว่าตำรับทดลอง ควบคุม สำหรับปริมาณการสะสมธาตุอาหารในดินในส่วนของ Total P และธาตุอาหารในรูปแบบที่พืช สามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ NH_3^+ , NO_3^- และ Available P โดยกรรมวิธีทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์เชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุตัวพา ใส่ปุ๋ย N เพียง 1 ใน 3 ของอัตรา แนะนำ (1/3NPK) ให้ผลผลิตเป็นต้นต่อไร่สูงสุด (สุวรรณ และคณะ, 2557)

ตารางที่ 4.11 ค่าเฉลี่ยปริมาณอินทรีย์วัตถุ Total N และ available N ในรูป NH_4^+ และ NO_3^- ของดินที่ปลูกอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

Treatment	Soil chemical characteristics											
	Organic matter (%)			Total N (mg/ kg)			Available NH_4^+ (mg/ kg)			Available NO_3^- (mg/ kg)		
	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT
Control, PK	0.30 ^a	0.29 ^a	0.27 ^a	127.49 ^a	143.57 ^a	128.12 ^a	4.21 ^c	4.76 ^b	0.36 ^a	0.96 ^c	0.53 ^b	1.78 ^b
Control, ½N-PK	0.29 ^a	0.31 ^a	0.30 ^a	125.59 ^a	151.93 ^a	143.82 ^a	19.28 ^{bc}	5.31 ^{ab}	0.34 ^a	1.77 ^{bc}	1.05 ^{ab}	1.96 ^{ab}
Control, N-PK	0.31 ^a	0.26 ^a	0.27 ^a	132.25 ^a	127.52 ^a	131.33 ^a	14.62 ^{bc}	6.64 ^{ab}	0.37 ^a	3.55 ^{abc}	1.73 ^{ab}	2.54 ^{ab}
3LSO1, PK	0.31 ^a	0.32 ^a	0.27 ^a	132.11 ^a	156.44 ^a	129.53 ^a	7.05 ^{bc}	4.01 ^b	0.38 ^a	1.70 ^{bc}	0.68 ^b	2.07 ^{ab}
3LSO1, ½N-PK	0.29 ^a	0.29 ^a	0.28 ^a	121.65 ^a	144.37 ^a	134.42 ^a	15.66 ^{bc}	4.38 ^b	0.37 ^a	3.33 ^{abc}	1.01 ^{ab}	2.37 ^{ab}
3LSO1, N-PK	0.30 ^a	0.30 ^a	0.27 ^a	127.90 ^a	147.95 ^a	131.59 ^a	20.59 ^{bc}	5.45 ^{ab}	0.37 ^a	6.32 ^{ab}	2.96 ^a	2.86 ^a
5LSO2, PK	0.28 ^a	0.31 ^a	0.24 ^a	120.83 ^a	149.80 ^a	113.31 ^a	5.49 ^c	3.31 ^b	0.76 ^a	1.28 ^c	0.62 ^b	1.84 ^{ab}
5LSO2, ½N-PK	0.29 ^a	0.32 ^a	0.26 ^a	123.41 ^a	157.90 ^a	126.83 ^a	15.68 ^{bc}	4.37 ^b	0.32 ^a	2.57 ^{abc}	0.89 ^b	2.24 ^{ab}
5LSO2, N-PK	0.25 ^a	0.28 ^a	0.24 ^a	123.37 ^a	135.87 ^a	115.50 ^a	18.02 ^{bc}	5.21 ^{ab}	0.37 ^a	6.39 ^{ab}	1.73 ^{ab}	2.33 ^{ab}
Mixed, PK	0.27 ^a	0.30 ^a	0.25 ^a	114.70 ^a	144.50 ^a	120.26 ^a	6.88 ^{bc}	5.60 ^{ab}	0.35 ^a	2.29 ^{abc}	1.07 ^{ab}	1.93 ^{ab}
Mixed, ½N-PK	0.28 ^a	0.31 ^a	0.28 ^a	118.79 ^a	151.00 ^a	135.07 ^a	23.22 ^{ab}	9.71 ^a	0.61 ^a	5.09 ^{abc}	1.57 ^{ab}	2.22 ^{ab}
Mixed, N-PK	0.34 ^a	0.32 ^a	0.26 ^a	147.88 ^a	158.69 ^a	122.45 ^a	36.83 ^a	7.23 ^{ab}	0.30 ^a	6.88 ^a	1.99 ^{ab}	2.22 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยรวม	0.29	0.30	0.27	126.33	147.46	127.69	15.63	5.50	0.41	3.51	1.32	2.20

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

* = ตัวอักษร^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

ตารางที่ 4.12 ค่าเฉลี่ยปริมาณอินทรีย์วัตถุ Total P, available P และ Total K ของดินที่ปลูกอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 11 เดือน

Treatment	Soil chemical characteristics								
	Total P (mg/ kg)			Available P (mg/ kg)			Total K (mg/ kg)		
	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT	3 MAT	6 MAT	11 MAT
Control, PK	90.35 ^a	54.86 ^a	74.81 ^{ab}	28.64 ^{ab}	42.84 ^{ab}	41.24 ^{ab}	163.27 ^a	153.20 ^a	179.37 ^a
Control, ½N-PK	108.30 ^a	54.86 ^a	78.11 ^a	43.80 ^a	40.00 ^{abc}	47.24 ^a	190.90 ^a	160.27 ^a	174.52 ^{ab}
Control, N-PK	86.76 ^a	48.08 ^a	72.03 ^{ab}	34.94 ^{ab}	37.42 ^{abc}	36.74 ^{ab}	140.66 ^a	139.14 ^a	157.55 ^{ab}
3LSO1, PK	98.73 ^a	61.02 ^a	73.80 ^{ab}	45.95 ^{ab}	46.72 ^a	39.68 ^{ab}	158.24 ^a	162.63 ^a	174.52 ^{ab}
3LSO1, ½N-PK	81.37 ^a	44.38 ^a	66.95 ^{ab}	41.59 ^{ab}	32.42 ^{abc}	34.74 ^{ab}	125.59 ^a	155.56 ^a	159.98 ^{ab}
3LSO1, N-PK	92.74 ^a	44.38 ^a	73.80 ^{ab}	34.16 ^{ab}	28.18 ^{bc}	38.18 ^{ab}	120.57 ^a	139.06 ^a	150.28 ^{ab}
5LSO2, PK	86.16 ^a	40.68 ^a	66.70 ^{ab}	27.05 ^b	24.10 ^c	32.99 ^{ab}	145.69 ^a	155.56 ^a	152.71 ^{ab}
5LSO2, ½N-PK	85.56 ^a	45.61 ^a	63.15 ^{ab}	29.14 ^{ab}	32.85 ^{abc}	30.99 ^b	130.61 ^a	141.42 ^a	128.47 ^b
5LSO2, N-PK	93.94 ^a	47.46 ^a	71.01 ^{ab}	34.52 ^{ab}	36.00 ^{abc}	36.74 ^{ab}	155.73 ^a	136.70 ^a	169.68 ^{ab}
Mixed, PK	101.72 ^a	54.86 ^a	58.33 ^b	35.60 ^{ab}	35.63 ^{abc}	32.06 ^{ab}	140.66 ^a	153.20 ^a	138.68 ^{ab}
Mixed, ½N-PK	97.53 ^a	51.16 ^a	62.64 ^{ab}	32.49 ^{ab}	40.50 ^{abc}	35.37 ^{ab}	148.20 ^a	164.99 ^a	130.89 ^b
Mixed, N-PK	87.95 ^a	53.63 ^a	67.20 ^{ab}	33.45 ^{ab}	38.90 ^{abc}	36.99 ^{ab}	153.22 ^a	167.34 ^a	130.89 ^b
ค่าเฉลี่ยรวม	92.59	50.08	69.04	35.11	36.30	36.91	147.78	152.42	153.96

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter* sp. 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

* = ตัวอักษร ^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.4 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงชนิดของเชื้อ NFB

4.4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 ด้วยเทคนิค DGGE

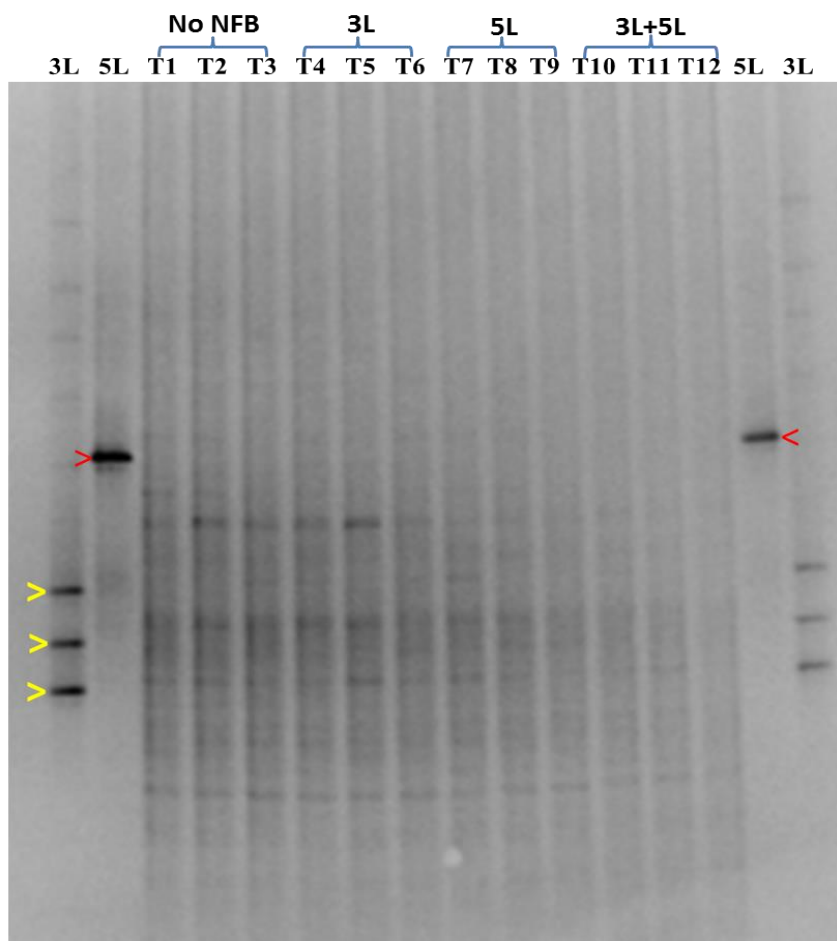
ผลการศึกษาการแยกดีเอ็นเอส่วน V3 ของเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 โดยใช้ DGGE ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าที่เปอร์เซ็นต์ denaturing gradients ในช่วง 40-60% สามารถแยกแถบ V3 ของเชื้อทั้งสองชนิดออกจากกันได้ชัดเจน และพบ V3 ของ *S. maltophilia*, 5LSO2 มีแถบเดียวตามปกติของเชื้อแบคทีเรียทั่วไปที่มักจะพบแถบเดียว แต่พบว่า V3 ของ *Enterobacter* sp., 3LSO1 มี 3 แถบ ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่มีรายงานในเรื่องนี้ว่าอาจเป็นเพราะเชื้อมี heterogeneity ของยีน 16s rRNA (Nubel *et al*, 1996) ดัง Lane 3L สำหรับเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ Lane 5L สำหรับเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างศึกษา

4.4.2 การกระจายของเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นในดินเริ่มต้นของแปลงเพาะปลูกอ้อย

การศึกษากการกระจายของเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นในดินเริ่มต้นของแปลงเพาะปลูกอ้อยด้วยวิธี DGGE ในตัวอย่างดินตัวแทนของซ้ำที่ 3 ผลการศึกษาไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ซึ่งแสดงว่าดินในแปลงปลูกไม่มีเชื้อดังกล่าวอยู่ก่อนทำการทดลองหรืออาจมีแต่น้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบพบได้ด้วยเทคนิค DGGE ดังแสดงในภาพที่ 4.2

4.4.3 การกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในดิน

ผลการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่มีเชื้อ 2×10^7 cfu/g ในปริมาณ 5 kg ต่อแปลงทดลองขนาด 8.5 X 8.5 ตารางเมตร เพื่อตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่ลงไปดินและสามารถติดตามได้ด้วยเทคนิค DGGE จากการศึกษาเชื้อจากตัวอย่างดิน (1 g) ที่เวลาเริ่มต้น (0 เดือน) หลังจากใส่เชื้อทันที จากผลการทดลอง DGGE ในตำรับทดลอง T1, T2 และ T3 ที่ไม่มีการใส่เชื้อทั้ง 2 ชนิด ก็ไม่ปรากฏแถบ V3 ของเชื้อทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างดิน 2 ซ้ำ ดังแสดงในภาพที่ 4.3 (ซ้ำที่3) และภาพที่ 4.4 (ซ้ำที่4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดินบริเวณที่ทำการทดลองไม่มีเชื้อดังกล่าวหรืออีกประการหนึ่งเชื้ออาจมีน้อยมากจึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เห็น แต่สำหรับตำรับทดลอง T4, T5 และ T6 ที่มีการใส่เชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 ผลการทดลองปรากฏแถบ V3 จำนวน 3 แถบในตัวอย่างดินที่ตรงกับเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และตำรับทดลอง T7, T8 และ T9 มีการใส่เชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ผลการทดลองปรากฏแถบ V3 หนึ่งแถบในตัวอย่างดินที่ตรงกับเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 สำหรับการทดลองในตำรับทดลองที่ใส่เชื้อผสมทั้งสองชนิด ได้แก่ ตำรับทดลอง T10, T11 และ T12 ก็ปรากฏแถบ V3 ของเชื้อทั้งสองชนิด ผลการติดตามเชื้อที่ใส่ที่เวลา 0 เดือน ด้วยเทคนิค DGGE สามารถติดตามเชื้อที่ใส่ลงไปได้



ภาพที่ 4.2 DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in 40-60 % denaturing gradients of background of soil sample.

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

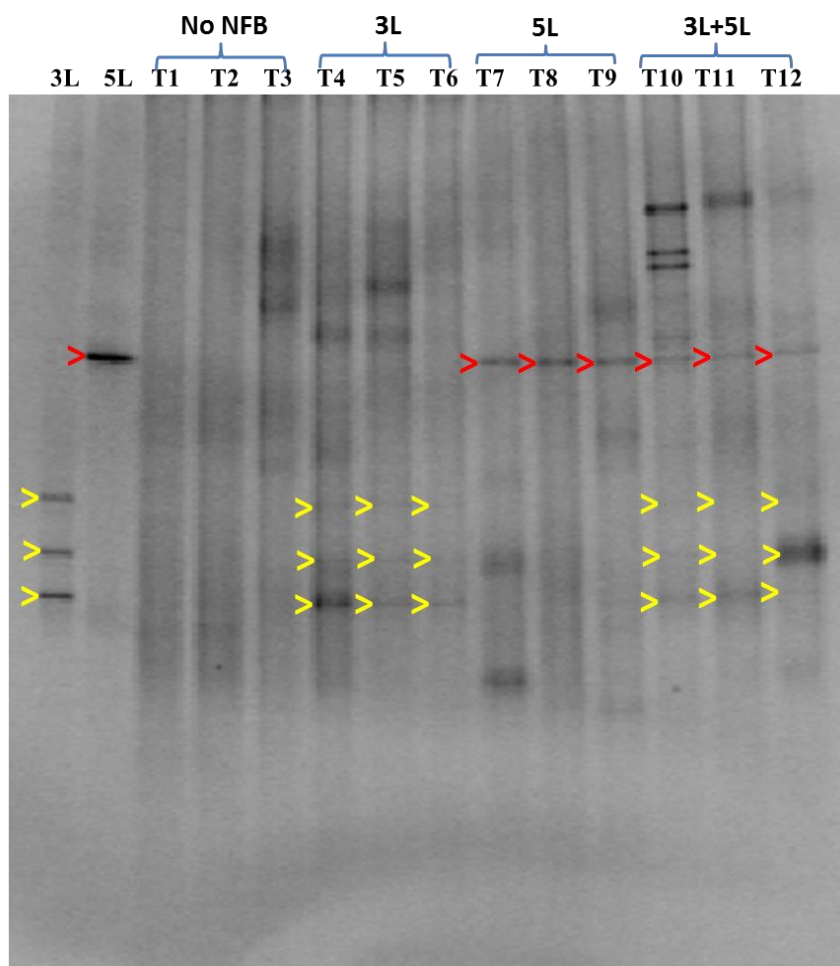
T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene



ภาพที่ 4.3 DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in replication 3 (denaturing gradients from 40 to 60 %)

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

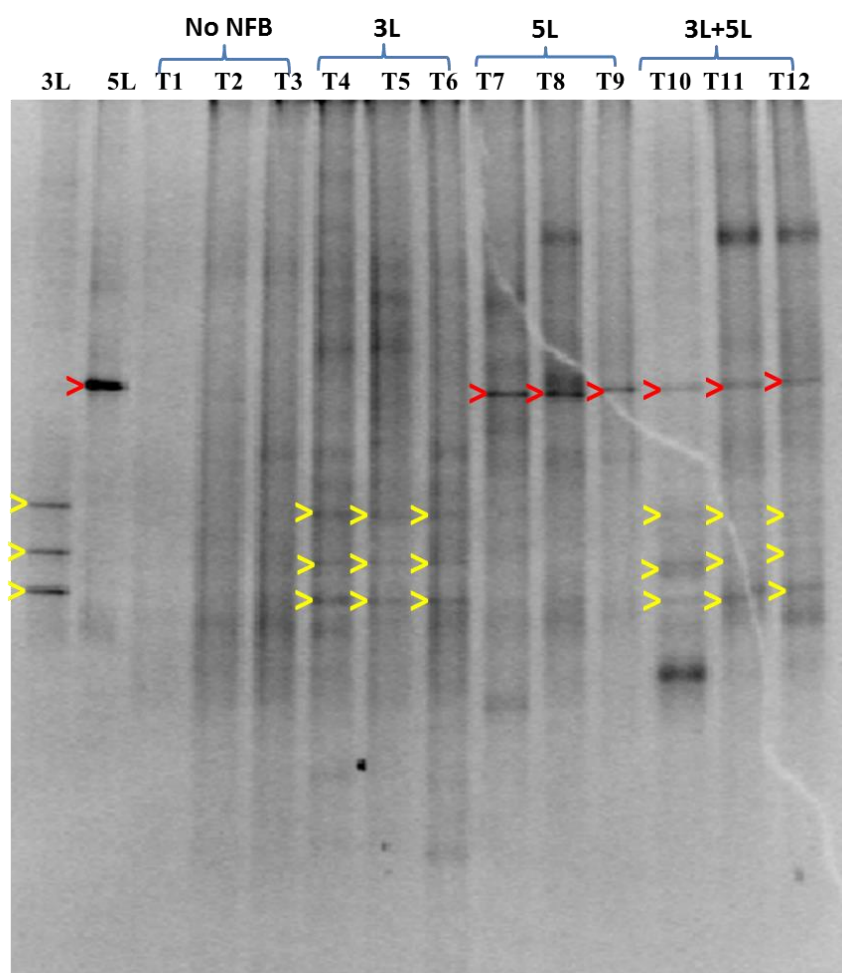
T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene



ภาพที่ 4.4 DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in replication 4 (denaturing gradients from 40 to 60 %)

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

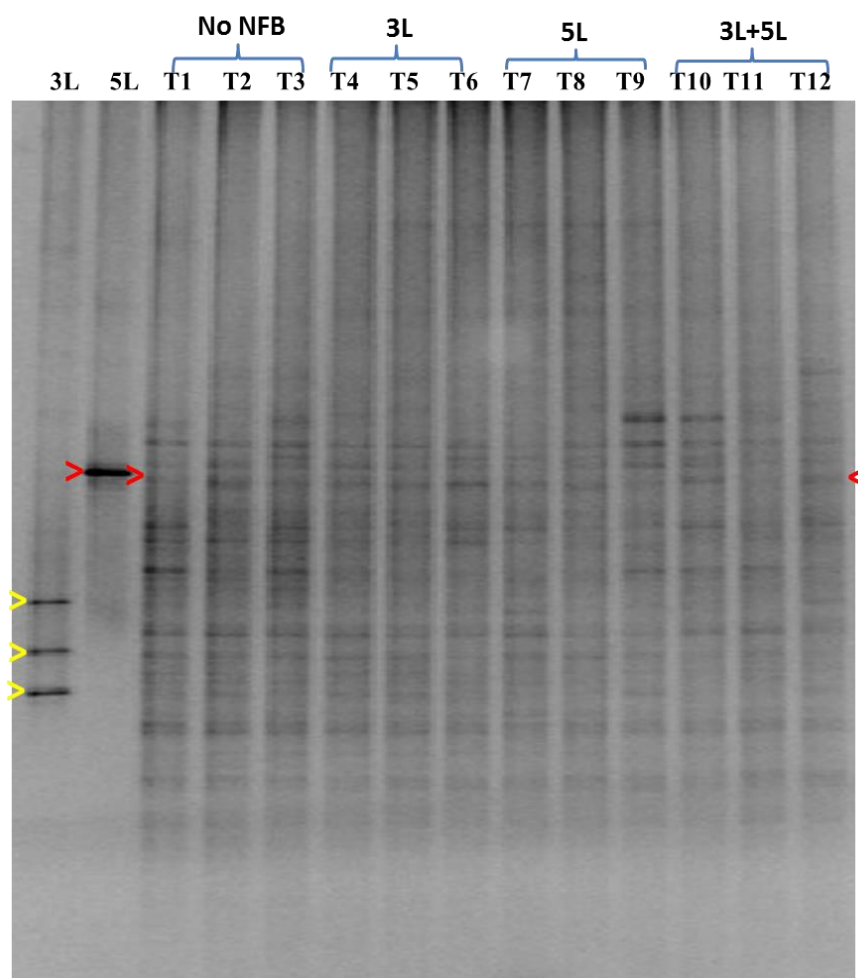
Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene

ผลการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ใส่ลงในแปลงทดลองเมื่ออ้อยมีอายุ 3 เดือน จากการศึกษาในตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์มีความเข้มและจำนวนแถบเพิ่มขึ้นจากที่เวลาเริ่มต้น ซึ่งแสดงว่าสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสมทำให้มีปริมาณและความหลากหลายของจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืชมากขึ้น พบตำแหน่งแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 กระจายอยู่ทุกตำแหน่งการทดลอง แต่ไม่พบแถบ V3 จากตัวอย่างดินที่ตรงกับลักษณะ 3 แถบของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 (ภาพที่ 4.5, ซ้ายที่ 3 และภาพที่ 4.6, ซ้ายที่ 4) ผลการทดลองบ่งชี้ว่า *S. maltophilia*, 5LSO2 สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในสิ่งแวดล้อมของแปลงทดลองได้ แต่ *Enterobacter* sp., 3LSO1 ไม่สามารถรอดชีวิตได้ในสิ่งแวดล้อมดังกล่าวเมื่อเทียบกับตัวอย่างดินที่ใส่เชื้อตอนเริ่มต้นและพบแถบ V3 ของ *S. maltophilia*, 5LSO2 กระจายไปในแปลงทดลองอื่นๆ บางแปลงด้วย

ผลการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ใส่ลงในแปลงทดลองเมื่ออ้อยมีอายุ 6 เดือน จากการศึกษาในตัวอย่างดินบริเวณรอบโคนต้นอ้อย พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์มีความเข้มและจำนวนแถบน้อยลงจากที่เวลา 3 เดือน ไม่พบตำแหน่งแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และ *Enterobacter* sp., 3LSO1 (ภาพที่ 4.7, ซ้ายที่ 3) ผลการทดลองบ่งชี้ว่า เชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และ *Enterobacter* sp., 3LSO1 อาจไม่มีชีวิตรอดหรือมีการเจริญน้อยลงจนไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน

ผลการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ใส่ลงในแปลงทดลองเมื่ออ้อยมีอายุ 11 เดือน ไม่พบตำแหน่งแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และ *Enterobacter* sp., 3LSO1 (ภาพที่ 4.8, ซ้ายที่ 3 และภาพที่ 4.9, ซ้ายที่ 4) และพบว่าชนิดและปริมาณเชื้อในดินน้อยลงใกล้เคียงกับดินเริ่มต้น

สรุปผลการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในดินแปลงเพาะปลูกอ้อย ด้วยเทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) พบว่าสามารถใช้เทคนิค DGGE ติดตามเชื้อแบคทีเรียที่ใส่ลงไป在地ได้ ผลการติดตามเชื้อที่เวลา 3 เดือนพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ทั้งชนิดและปริมาณเพิ่มขึ้นในดินบริเวณรอบรากพืช แต่จะมีปริมาณลดลงที่ 6 และ 11 เดือนใกล้เคียงกับดินเริ่มต้น ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ใส่ลงไปพบว่า *S. maltophilia*, 5LSO2 สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ที่เวลา 3 เดือน และลดลงที่เวลา 6 และ 11 เดือน ส่วน *Enterobacter* sp., 3LSO1 ไม่สามารถรอดชีวิตได้ในสิ่งแวดล้อมดังกล่าว ซึ่งแสดงว่า *S. maltophilia*, 5LSO2 มีชีวิตอยู่ในดินได้ดีกว่า *Enterobacter* sp., 3LSO1 ซึ่งเป็นลักษณะของ free living nitrogen fixing bacteria และจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการปนเปื้อนไปยังแปลงทดลองอื่นได้ด้วย



ภาพที่ 4.5 DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in 40-60 % denaturing gradients of replication 3 for 3 months of plantation

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

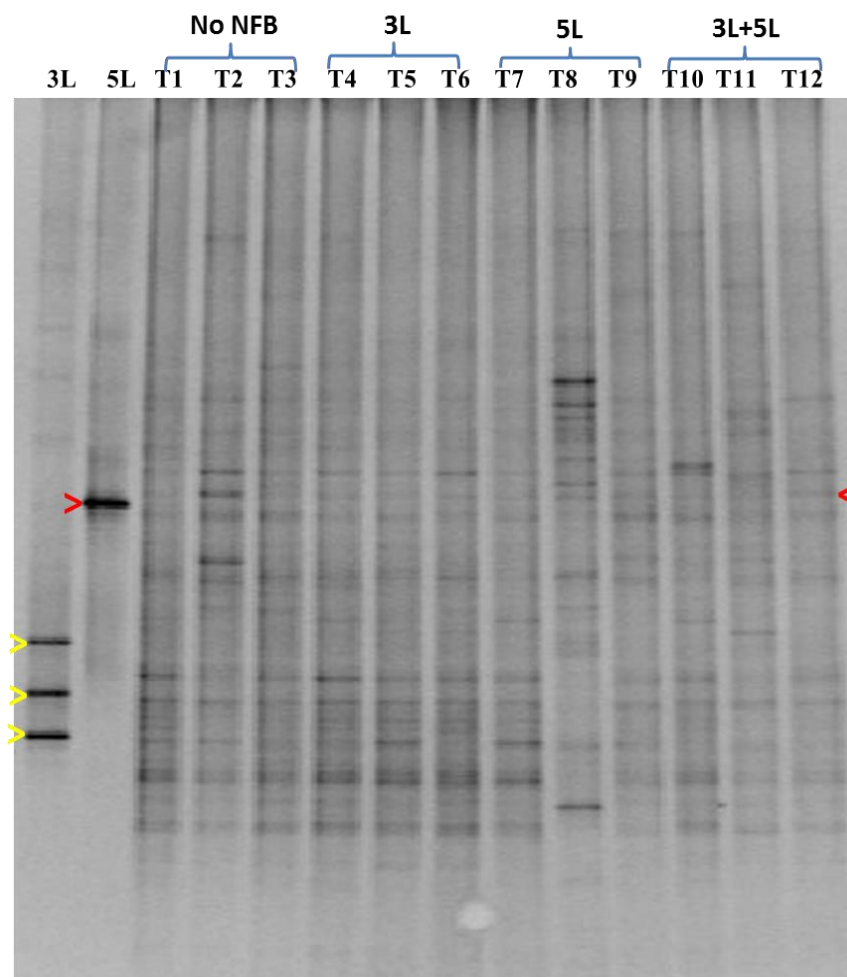
T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene



ภาพที่ 4.6. DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in 40-60 % denaturing gradients of replication 4 for 3 months of plantation

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

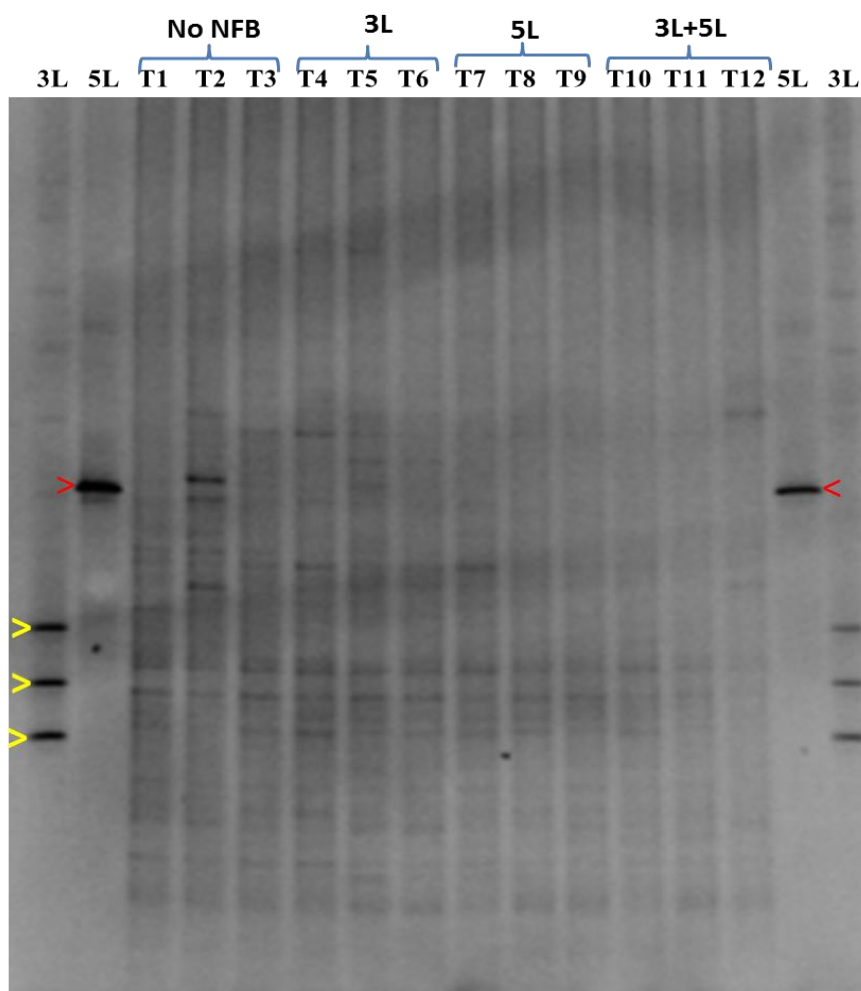
T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene



ภาพที่ 4.7. DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and soil sample in 40-60 % denaturing gradients of replication 3 for 6 months of plantation

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene

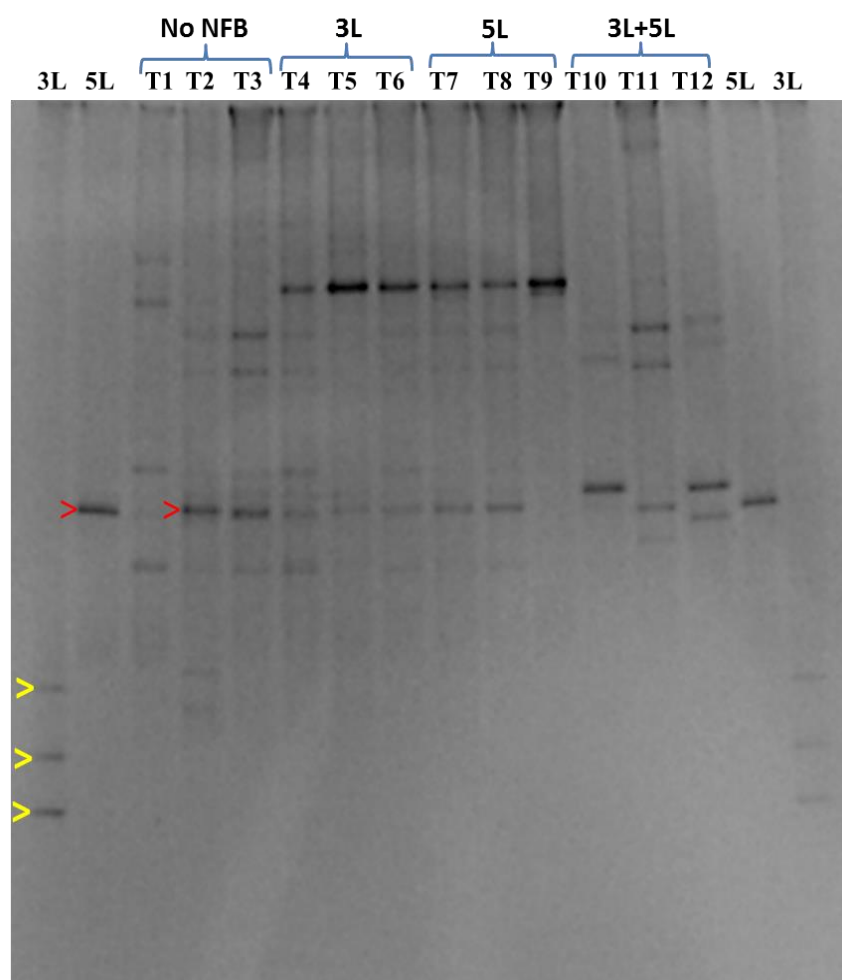
4.4.4 การกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในรากอ้อย

ผลการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ใส่ลงในแปลงทดลองในตัวอย่างราก (ภาพที่ 4.8) อายุ 3 เดือน พบแถบดีเอ็นเอในส่วน V3 ของเชื้อจากตัวอย่างรากที่ตรงกับตำแหน่งของแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 กระจายอยู่เกือบทุกตำรับการทดลอง แต่ไม่พบแถบ V3 จากตัวอย่างที่ตรงกับลักษณะ 3 แถบของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในรากได้ ส่วนเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 ไม่สามารถมีชีวิตอยู่และเข้าไปอยู่ในรากได้ และผลการศึกษายังพบเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 กระจายอยู่ในรากในตำรับการทดลองอื่นอีกด้วย แสดงว่าเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 มีการกระจายไปยังแปลงข้างเคียงได้สอดคล้องกับที่พบการกระจายในดินในแปลงทดลองอื่นด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ารากอ้อยแต่ละแปลงทดลองมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ (endophyte) ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยที่ดินแต่ละบริเวณมีจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่ต่างกันไปบ้างรวมถึงท่อนพันธุ์อ้อยที่อาจไม่ได้มาจากแหล่งเดียวกัน

4.4.5 การกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในลำต้นอ้อย

ผลการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ใส่ลงในแปลงทดลองในตัวอย่างต้น (ภาพที่ 4.9) อายุ 3 เดือน พบแถบดีเอ็นเอในส่วน V3 ของเชื้อจากตัวอย่างต้นที่ตรงกับตำแหน่งของแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 กระจายอยู่เกือบทุกตำรับการทดลอง แต่ไม่พบแถบ V3 จากตัวอย่างที่ตรงกับลักษณะ 3 แถบของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า 5LSO2 สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในต้นได้ ส่วน 3LSO1 ไม่สามารถมีชีวิตอยู่และเข้าไปอยู่ในต้นได้ สอดคล้องกับที่ไม่พบในตัวอย่างดิน และผลการศึกษายังพบ 5LSO2 กระจายอยู่ในต้นในตำรับการทดลองอื่นอีกด้วย แสดงว่าเชื้อ 5LSO2 มีการกระจายไปยังแปลงข้างเคียงได้สอดคล้องกับที่พบการกระจายในดินในแปลงทดลองอื่นด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าลำต้นอ้อยแต่ละแปลงทดลองมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ (endophyte) ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยที่ดินแต่ละบริเวณมีจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่ต่างกันไปบ้างรวมถึงท่อนพันธุ์อ้อยที่อาจไม่ได้มาจากแหล่งเดียวกัน

ผลการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ใส่ลงในแปลงทดลองในตัวอย่างต้น เมื่ออ้อยมีอายุ 6 เดือน พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์มีความเข้มและจำนวนแถบน้อยลงจากที่เวลา 3 เดือน และไม่พบตำแหน่งแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และ *Enterobacter* sp., 3LSO1 (ภาพที่ 4.10) ผลการทดลองบ่งชี้ว่า เชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และ *Enterobacter* sp., 3LSO1 อาจไม่มีชีวิตรอดหรือมีการเจริญน้อยลงจนไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน



ภาพที่ 4.8 DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane root in 40-60 % denaturing gradients of replication 1 for 3 months of plantation

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

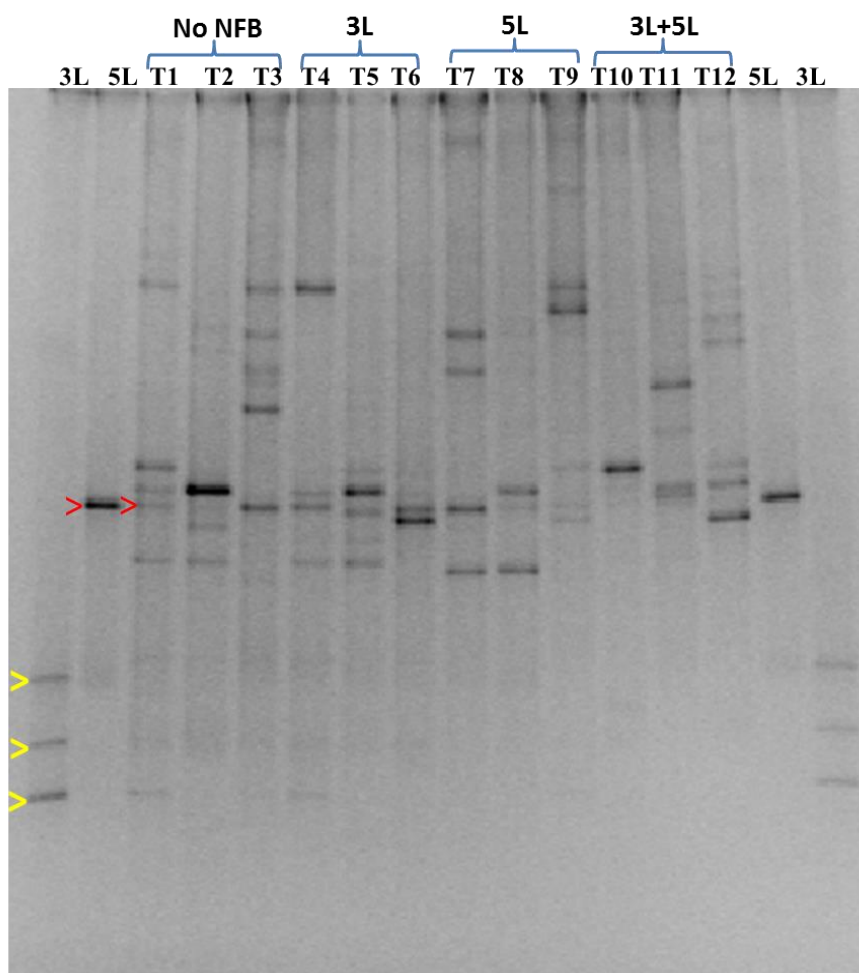
T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene



ภาพที่ 4.9. DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane stalk in 40-60 % denaturing gradients of replication 1 for 3 months of plantation

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

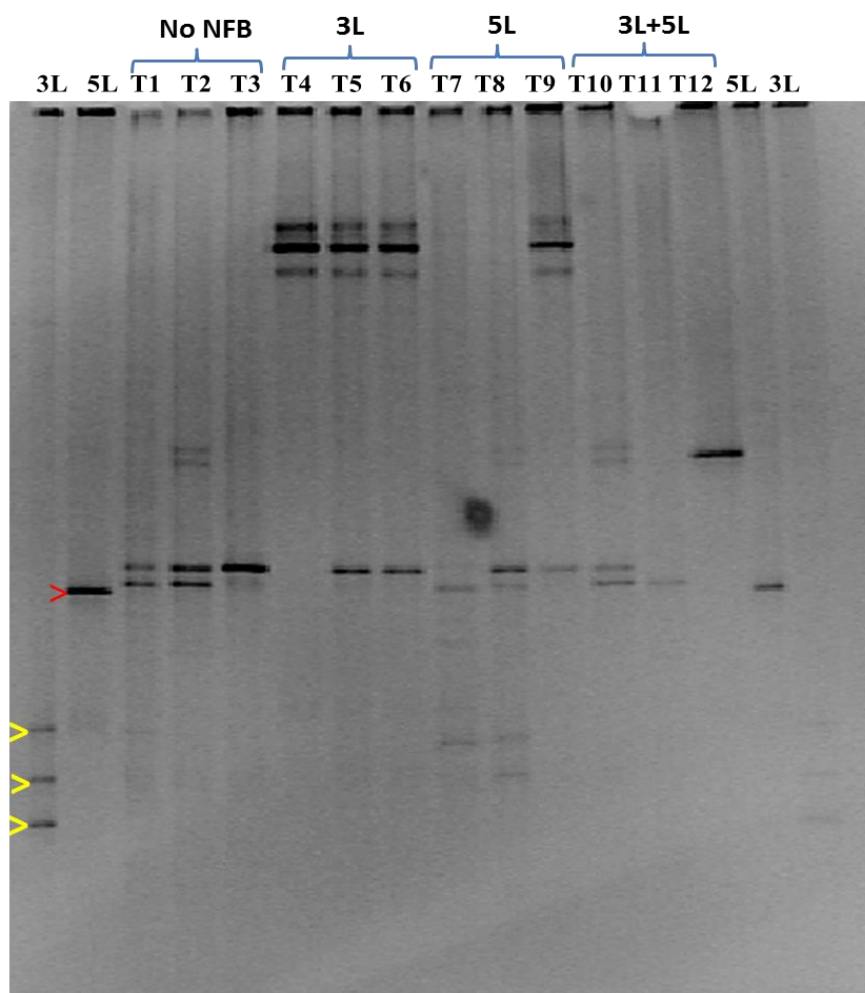
T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene



ภาพที่ 4.10 DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane stalk in 40-60 % denaturing gradients of replication 1 for 6 months of plantation

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

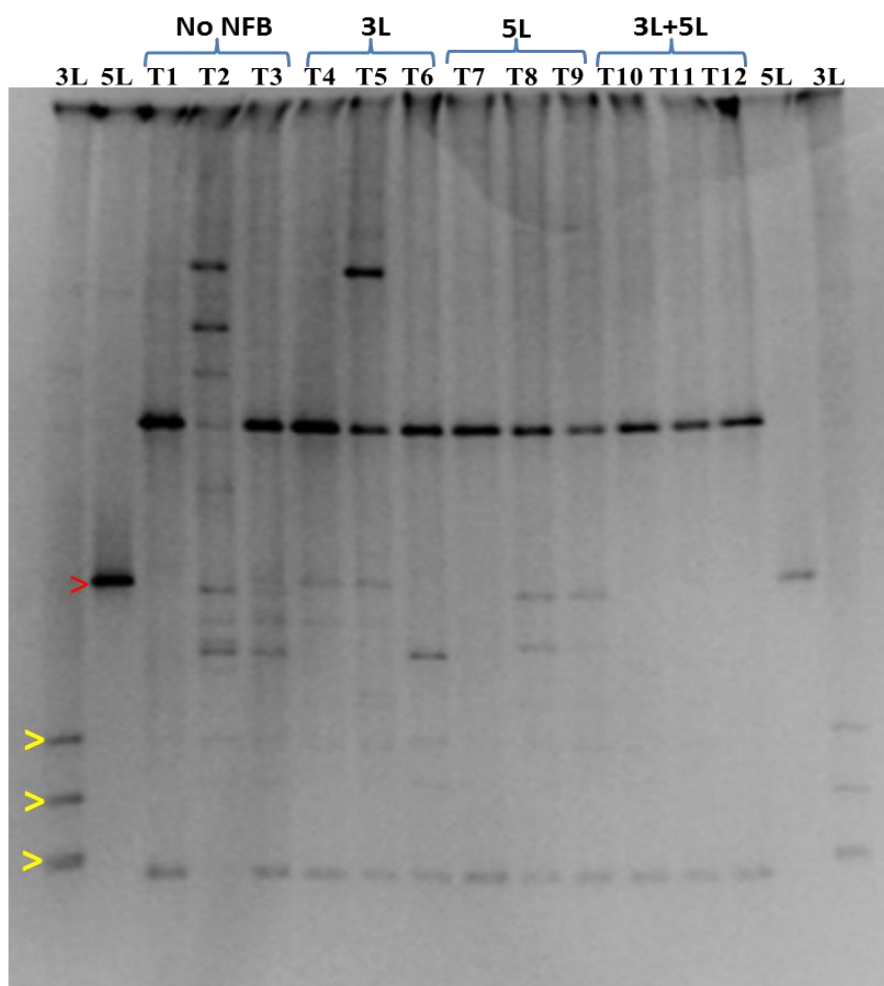
T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene

ผลการศึกษาการกระจายของเชื้อ *Enterobacter* sp., 3LSO1 และเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ใส่ลงในแปลงทดลองในตัวอย่างต้น เมื่ออ้อยมีอายุ 11 เดือน ไม่พบตำแหน่งแถบ V3 ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และ *Enterobacter* sp., 3LSO1 (ภาพที่ 4.11, ซ้ำที่ 1 และภาพที่ 4.12, ซ้ำที่ 2) และพบว่าชนิดและปริมาณเชื้อในต้นน้อยลง ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในตัวอย่างดิน

Govindarajan *et al* (2007) ก็มีการรายงาน เชื้อ endophyte diazotroph จากรากและลำต้นของอ้อย ที่ส่งเสริมการเจริญของอ้อยและข้าว คือ *Pseudomonas*, *Burkholderia* และ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งรายงานนี้เป็นครั้งแรกที่แสดงว่า *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ศึกษาทั้งในรากและต้นอ้อย มีความสามารถตรึงไนโตรเจน เป็นทั้ง free living และ endophyte ในอ้อย



ภาพที่ 4.11. DGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane stalk in 40-60 % denaturing gradients of replication 1 for 12 months of plantation

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

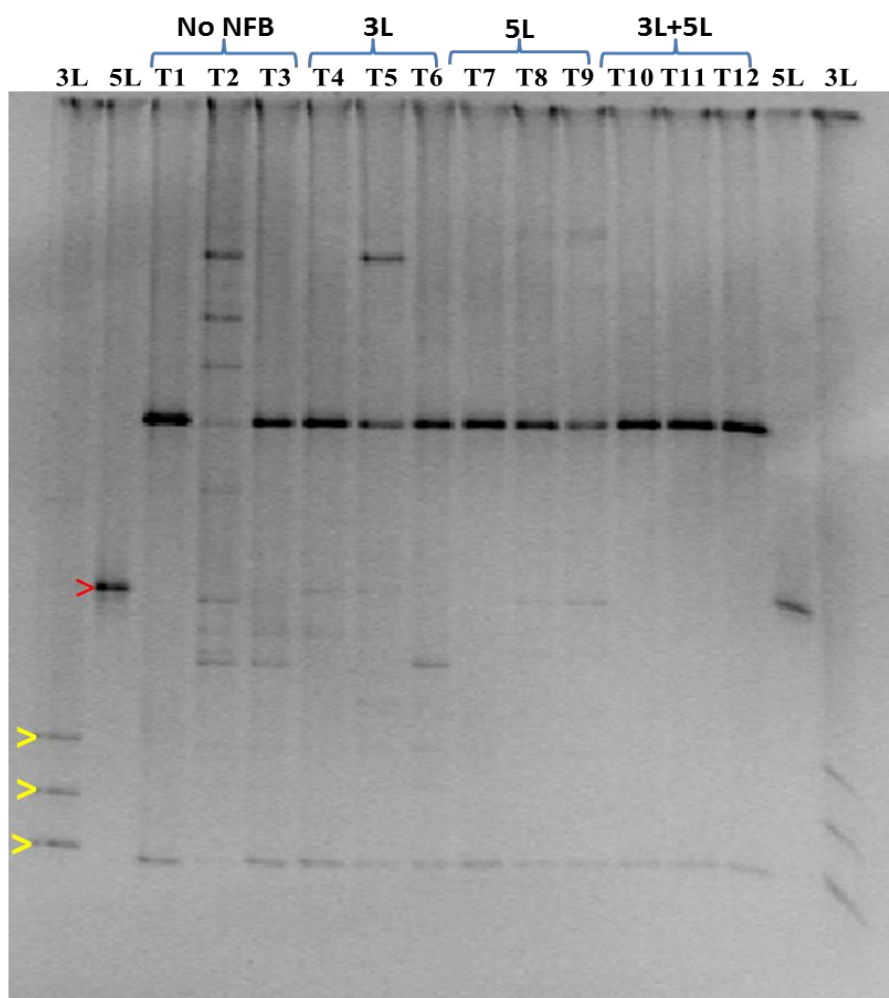
T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene



ภาพที่ 4.12 DGGE separation pattern of V3 of 16S rRNA gene derived from pure culture and sugarcane stalk in 40-60 % denaturing gradients of replication 2 for 12 months of plantation

3L= *Enterobacter* sp., 3LSO1 (pure culture)

5L = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 (pure culture)

T1-T3 = Control, no NFB

T4-T6 = *Enterobacter* sp., 3LSO1

T7-T9 = *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

T10-T11= Mixed; *Enterobacter* sp., 3LSO1 mixed with *S. maltophilia*, 5LSO2

Arrows indicate V3 region of 16s rRNA gene

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารถสรุปผลได้เป็นข้อๆ ดังนี้

1. การเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนด้วยการใช้ซอล์เมตเป็นวัสดุตัวพาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเป็นเวลา 45 วัน เชื้อยังคงมีชีวิตอยู่ในปริมาณเท่าเดิมไม่เปลี่ยนแปลง
2. ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใส่ในแปลงทดลองไม่มีผลต่อค่าความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และค่าการนำไฟฟ้าของดินที่ใช้ปลูก
3. ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใส่ในแปลงทดลองทำให้เชื้อสามารถเข้าไปอยู่ในรากและลำต้นอ้อยได้ พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามลำดับ จากเดือนที่ 3 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในเดือนที่ 6 และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในเดือนที่ 11
4. ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใส่ในแปลงทดลองทำให้ผลผลิตอ้อยที่ได้มีค่าความหวาน Polarity, Fiber, CCS และ Purity ของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 11 เดือนใกล้เคียงกัน
5. ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใส่ในแปลงทดลองทำให้ผลผลิตอ้อย (ต้น/ไร่) ในตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB มีค่าเฉลี่ยมากกว่าตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB
6. ตำรับทดลองที่ไม่ใส่หรือใส่ปุ๋ยยูเรียครึ่งอัตรา ร่วมกับการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน จะมีจำนวนต้นและน้ำหนักแห้งใกล้เคียงหรือมากกว่าตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ยยูเรียเต็มอัตรา
7. เทคนิค DGGE สามารถใช้ติดตามเชื้อแบคทีเรียที่ใส่ลงไปบนดินได้ โดยเปอร์เซ็นต์ denaturing gradients ในช่วง 40-60% สามารถแยกแถบ V3 ของเชื้อทั้งสองชนิดออกจากกันได้ชัดเจน และพบ V3 ของ *S. maltophilia*, 5LSO2 มีแถบเดียวตามปกติของเชื้อแบคทีเรียทั่วไปที่มักจะพบแถบเดียว แต่พบว่า V3 ของ *Enterobacter* sp., 3LSO1 มี 3 แถบ ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษซึ่งมีรายงานในเรื่องนี้ว่าอาจเป็นเพราะเชื้อมี heterogeneity ของยีน 16s rRNA
8. ผลการติดตามเชื้อในดินที่เวลาต่างๆ พบว่า *S. maltophilia*, 5LSO2 มีชีวิตอยู่ในดินได้ดีกว่า *Enterobacter* sp., 3LSO1 โดยพบปริมาณเชื้อที่ 3 เดือน มากกว่าที่ 6 และ 11 เดือน
9. ผลการศึกษาการกระจายของเชื้อในดิน ราก และต้นอ้อย แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการปนเปื้อนไปยังตำรับทดลองหรือแปลงทดลองอื่นด้วย
10. พบความหลากหลายของจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันใน ดิน ราก และต้นอ้อย รวมทั้งระยะเวลา
11. รายงานนี้เป็นครั้งแรกที่แสดงว่า *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ศึกษาทั้งใน ดิน รากและต้นอ้อย มีความสามารถตรึงไนโตรเจน เป็นทั้ง free living และ endophyte ในอ้อย

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยนี้

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของอ้อยทุกแปลงในแต่ละดำรับทดลองพบว่าการปลูกอ้อยจำนวน 5 แถวและมีการเว้นร่องรอบแปลงทดลองทำให้อ้อยที่อยู่แถวริมสุดทั้ง 2 ด้านมีการเจริญเติบโตมากที่สุด และแถวที่อยู่ตรงกลางมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด ดังนั้นจึงควรทำการทดลองแบบ split plot โดยให้ main plot เป็นชุดของเชื้อ และ sub plot เป็นชุดของการใส่ปุ๋ย และควรชุดร่อนน้ำรอบแปลงที่เป็น main plot เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อในแต่ละแปลงของ main plot นอกจากนี้ควรเพิ่มแถวการปลูกอ้อยที่เป็นแถวป้องกัน (guard row) ซึ่งจะมีการเจริญเติบโตของอ้อยมากกว่าแถวด้านใน โดยแปลงทดลองต้องไม่มีความลาดเอียงเลย ประการสุดท้ายคือ ควรใส่เชื้อ NFB พร้อมกับการปลูกอ้อยในแปลง เพื่อให้เชื้อสามารถเข้าสู่อ้อยได้ทันทีที่ปลูก หรือให้เชื้ออยู่ใกล้ตาอ้อยมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- จักรินทร์ ศรัทธาพร, ปรีชา พราหมณีย์, สุรวิทย์ สุริยพันธุ์ และประสงค์ สิทธิไทย. 2535. ศึกษาผลตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยพันธุ์ 81-1-026 และ 80-1-128, น. 305-313. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2535 อ้อย ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี, สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร
- สุวรรณา เนียมสนิท, นิภา มลิณทวิสมัย และ ประสิทธิ์ ใจศีล. (2553). การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร้อ้อย. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (35 หน้า).
- สุวรรณา เนียมสนิท, นิภา มลิณทวิสมัย และ ประสิทธิ์ ใจศีล. (2554). การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร้อ้อย. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (33 หน้า).
- สุวรรณา เนียมสนิท, นิภา มลิณทวิสมัย และ ประสิทธิ์ ใจศีล. (2555). การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร้อ้อย. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (78 หน้า).
- สุวรรณา เนียมสนิท, นิภา มลิณทวิสมัย และ ประสิทธิ์ ใจศีล. (2557). ผลของผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเพาะปลูกอ้อยในสภาพแปลงทดลอง. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (36 หน้า).
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2555. รายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศ ประจำปีการผลิต 2553/54 (ฉบับปิดหีบ)
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2556. รายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศ ประจำปีการผลิต 2555/56 (ฉบับปิดหีบ).
- หนึ่ง เตียอำรุง, กมลลักษณ์ เทียมไธสง และ นันทกร บุญเกิด. 2548. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) ว. เทคโนโลยีสุรนารี. 12: 252-261.
- Boddey, R. M. and J. Döbereiner 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. Plant and Soil 108: 53-65.
- Cattelan, A. J., P. G. Hartel and J. J. Fuhrmann. 1999. Screening for plant-growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J. 63: 1670-1680.
- Cavalcante, V. A. and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil 108: 23-31.

- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement and E.A. Barka. 2005. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959.
- Govindarajan, M., S. W. Kwon and H. Y. Weon. 2007. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 997-1006.
- Idris, H. A., N. Labuschagne and L. Korsten. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control.* 40: 97-106.
- Kane, M. D., Poulsen, L. K. and Stahl, D. A. 1993. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. **App Environ Microbiol.** 59: 682-686.
- Khalid, A., M. Arshad and Z. A. Zahir. 2004. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96: 473-480.
- Kumar, R. S., N. Ayyadural, P. Pandiaraja, A. V. Reddy, Y. Venkateswarlu, O. Prakash and N. Sakthivel. 2005. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizer traits. *J. Appl. Microbiol.* 98: 145-154.
- Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.* Stackebrandt, E. and Goodfellow M, eds. J. Wiley & Sons, Chichester, 115-175.
- Loiret, F., G. E. Ortega, D. Kleiner, P. Ortega-Rodés, R. Rodés and Z. Dong. 2004. A putative endophyte nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J. Appl. Microbiol.* 97: 504-511.
- Meesilp, N. and S. Niamsanit. 2011. Efficiency studies of nitrogen fixing bacteria on sugarcane growth under greenhouse conditions. Poster presented at the 6th Conference on Science and Technology for Youths. Bitec Conference and Convention Center, Bangna. March 18-19, 2011.
- Mirza, M. S., W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand and K. A. Malik. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting

- bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. Plant and Soil. 237: 47–54.
- Muyzer, G., E. C. de Waal and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. App Environ Micribiol. 59:695-700.
- Myers, R. M., S. G. Fischer, L. S. Lerman and T. Maniatis. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 13: 3131–3145.
- Nakatsu, C. H., V. Torsvik and L. Øvreås. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. Soil Sci. Soc. Am. J. 64: 1382– 88.
- Oliveira, A. L. M., E. L. Canuto, S. Urquiaga, V. M. Reis and J. I. Baldani. 2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. Plant Soil. 284: 23-32.
- Reis, V. M., F. L. Olivares and J. Döbereiner. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 401-405.
- Reis, V. M., P. Estrada-de los Santos, S. Tenorio-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, S. Guyon,...,and J. Caballero-Mellado. 2004. Burkholderia tropica sp. Nov., a novel nitrogen-fixing, plant associated bacterium. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 54: 2155-2162.
- Sevilla, M., R. H. Burris, N. Gunapala and C. Kennedy. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plant with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. Molec. Plant-Microbe Interactions. 14: 358-366.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns., D. A. Pelletier and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173, 697-703.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB (Luria-Bertani) broth (1 L)

Tryptone	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
Sodium chloride	10.0	g

pH 7.0 ± 0.2

2. LGIP medium (1 L)

K ₂ HPO ₄	0.2	g
KH ₂ PO ₄	0.6	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02	g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.002	g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.01	g
0.5% Bromothymol blue in 0.2 M KOH	5	ml
Agar	15	g
Carbon substrate (sucrose)	100	g

pH 5.5 หรือ 7.0

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้เตรียม DGGE

1. 1% agarose gel

ชั่ง agarose powder 0.5 g เติม 1x TAE buffer ให้ได้ปริมาตร 50 ml

2. 40% acrylamide/bis-acrylamide

ใช้น้ำยาสำเร็จรูป 40% (w/v) Acrylamide/bis-acrylamide 37.5:1 solution ของบริษัท Amresco® (USA)

3. 10% APS

ชั่ง Ammonium persulfate (APS) 0.035 g ละลายในน้ำกลั่น 350 µl

4. 100% formamide

ใช้น้ำยาสำเร็จรูป formamide 100% ของบริษัท Amresco® (USA)

5. 7 M Urea

ชั่ง Urea 21g ลงในส่วนผสมที่ประกอบด้วย 10 ml ของ 40% acrylamide/bis-acrylamide และ 20 ml ของ 100% formamide ปรับปริมาตรด้วย Deionized water ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml

6. 50x TAE buffer solution

Tris base	242	g
Glacial acetic acid	57.1	ml
0.5 M EDT A, pH8.0	100	ml

ละลาย Tris-base และ 0.5 M EDTA ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม Glacial acetic acid คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย

4. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อควบคุมโรคกุ้งแห้งของพริก.โปสเตอร์และเนื้อหาใน (ทุนโครงการ IRPUS ประจำปี 2551, นักวิจัยหน้าใหม่ มข.ประจำปี 2550)

5. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสและการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ (ทุน IPUS2 ประจำปีการศึกษา 2550)

7.3 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว :

Niamsanit, S., Milintawisamai, N. and Lanwonk, P. (2015). Feasibility Study of Dextranase from *Aspergillus* sp. X26 to Degrade Dextran in Sugarcane Juice. In: International Conference on Life Science and Biological Engineering; 2015 November 4-6; ANA Crowne Plaza Grand Court, Nagoya, Japan. P. 145-151.

Nonyong, P. and Niamsanit, S. (2015). Screening and Optimization of Extracellular Thermo-stable Dextranase Producing Fungi. In: International Conference on Life Science and Biological Engineering; 2015 November 4-6; ANA Crowne Plaza Grand Court, Nagoya, Japan. P. 126-132.

Meesilp, N., Jaisil, P., Milintawisamai, N., **Niamsanit, S.*** (2015). Effects of a formulated bio-product containing the nitrogen fixing bacterial strain *Enterobacter oryzae* 3LSO1 on sugar cane growth. Sugar Tech. DOI 10.1007/s12355-015-0386-x.

Meesilp N, Jaisil P, Militawisamai N, and **Niamsanit S.*** (2014) Isolation, Partial Characterization, and the Effect of Nitrogen Fixation on Sugarcane Growth. In: Soul International on Biological Engineering and Natural Science; 2014 August 29-30; Seoul, South Korea. Taipei, Taiwan; Higher Education Forum. p. 124-132. The Best Paper Award Winner.

Meesilp N, Jaisil P, Militawisamai N, and **Niamsanit S.*** (2014) Development of Nitrogen Fixing Bacteria as Bio-Product for Enhancing Sugarcane Growth. In: The Institute for the promotion teaching science and technology, faculty of science Chulalongkorn University, The office of the higher education commission, Office of the basic education commission, National science and technology development agency, editors. The 9 th Conference on Science and Technology for Youths; 2014 May 30-June 1; Bangkok, Thailand. Bangkok: The Institute for the promotion teaching science and technology; 2014. p. 59.

Meesilp N, Jaisil P, Militawisamai N, and **Niamsanit S.*** (2014) Efficiency of formulated *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 and *Enterobacter oryzae* 3LSO1 for enhancing sugarcane growth in field. Paper present at the memorandum of

- understanding between Korn Buri sugar factory and Khon Kaen University; 2014 August; Khon Kaen, Thailand.
- Nonpanya, N. and **Niamsanit, S.*** (2013) Isolation and screening of carboxymethyl cellulose producing actinomycetes from soil samples. In: The Institute for the Promotion Teaching Science and Technology, Silpakorn University, Editors, The Office of the Higher Education Commission, The Office of the Basic Education Commission and The National Science and Technology Development Agency. Proceeding to the 8th Conference on Science and Technology for Youths Held at the Bangkok International Trade and Exhibition Centre, Bangkok, Thailand; 22-23 March 2013.
- Meesilp N, Jaisil P, Militawisamai N, and **Niamsanit S.*** (2012) Formulation of Nitrogen Fixing Bacteria for Enhancing Sugarcane Growth. In: Department of Microbiology, Faculty of Science Khon Kaen University, editor. International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology; 2012 October 4-6; Khon Kaen, Thailand. Khon Kaen: Khon Kaen print. p. 65.
- Meesilp N, Jaisil P, Militawisamai N, and **Niamsanit S.*** (2012) Comparisons of formulated nitrogen fixing bacteria produce with agricultural materials. Paper present at the Cane and Sugar Conference; 2012 August 2012; Khon Kaen, Thailand.
- Nonpanya, N., Katekaew, S. and Niamsanit, S. (2012) Isolation and screening of actinomycetes from rhizosphere soils, fruits and leaves of *Dipterocarpus alatus* Roxb. for cellulase production. In: The Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University. Poster presentation at the International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology. 4-6 October 2012.
- Srisaphoom, T., Saksirirat, W. and **Niamsanit, S.*** (2012) Differential Pathogenicity of *Colletotrichum capsici* and *C. acutatum* on Chilli fruit and Seed. In: The Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University. Oral presentation at the International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology. 4-6 October 2012.
- Meesilp, N. and **Niamsanit, S. *** (2011) Screening of nitrogen fixing bacteria from sugarcane rhizosphere for their multiple plant growth promoting activities. Poster presented at the Second International Conference on Applied Science and the

- Third International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region. Souphanouvong University, Luang Prabang. Lao People's Democratic Republic. March 24-25, 2011.
- Meesilp, N. and **Niamsanit, S.*** (2011) Efficiency studies of nitrogen fixing bacteria on sugarcane growth under greenhouse conditions. Poster presented at the 6th Conference on Science and Technology for Youths. Bitec Conference and Convention Center, Bangna. March 18-19, 2011.
- Milintawisamai, N., **Niamsanit, S.**, Ngasan, C., Maungmontri, R., Buttapeng, W., Kotrsri, R., Pliansinchai A. and Weerathaworn P. 2006. The Efficiency of dimethyl benzyl Ammonium Chloride and Microbial Contamination Studies in the Modern Milling Process of Mittr Phueing Sugar Factory. *Proc. Internl. Symp. On Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Countries, Guilin, P.R. Chin.*: 430-434.
- Milintawisamai, N., **Niamsanit, S.**, Ngasan, C., Pliansinchai A. and Weerathaworn P. 2006. Isolation of Dextran Producing Microorganisms from Mittr Phueing Sugar Factory and the Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride Effect. *Proc. Internl. Symp. On Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Countries, Guilin, P.R. Chi.*: 426-429.
- Lattmann, E., Sattayasai, N., Schwalbe, C.S., **Niamsanit S.**, Billington, D.C., Lattmann, P., Langley, C.A., Singh, H, and Dunn, S. 2006. Novel antibacterials against MRSA: synthesis of focused combinatorial libraries of tri-substituted 2(5H)-furanones. *Current Drug Discovery Technologies*. 3(2): 125-134.
- นิภา มิลินทวิสมัย และ สุวรรณ เนียมสนิท. 2549. แบคทีเรียที่ใช้ toluene เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และสามารถสลาย trichloroethylene (TCE) ได้ที่แยกได้จากธรรมชาติและแหล่งปนเปื้อนและความสามารถในการใช้สารต้นตอคาร์บอนตัวอื่น. ว. วิทย. มข. 34(1): 59-71.
- ชัยวัฒน์ งามสาร, สุวรรณ เนียมสนิท, รัตนา เมืองมนตรี, อัปสร เปลี่ยนสินไชย และ นิภา มิลินทวิสมัย. 2549. การศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมประชากรของจุลินทรีย์ในน้ำอ้อยโดยใช้สารยับยั้ง M-QUAT-3080 และ H₂O₂ ในหลอดทดลอง. การประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ณ โรงแรมเบเวอร์ลี ฮิลล์ ปาร์ค นครสวรรค์ 17-19 สิงหาคม 2549. บทคัดย่อหน้า 38.
- Promptta S, **Niamsanit S.**, and Milintawisamai, N. 2006. Isolation of Microorganisms containing high Invertase Activity. Poster presentation on The First International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region, Khon Kaen, Thailand, 15-16 August 2006.

- Lattmann, E., Dunn, S., **Niamsanit S.**, and Sattayasai, N. 2005. Synthesis and antibacterial activities of 5-hydroxy-4-amino-2(5H)-furanones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15: 919-921.
- Eric Lattmann**, Simon Dunn, Suwanna Niamsanit and Nison Sattayasai (2005). Antibacterial pyrrols, UK patent application 0520368.2, 06-Oct-2005, Aston University
- ชิตชนก อนุตระกูลชัย, ยานี ครอบพาณิชย์, สุวรรณ เนียมสนธิ และ สุภาพร พิมพ์วาปี (2005) การคัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนจากดินที่ผลิตวิตามินบีหก งานแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 4 ณ ห้อง MCC Hall ห้างสรรพสินค้าเดอะมอลล์ สาขางามวงศ์วาน. 31 มีนาคม -2 เมษายน, หน้า 350-351.
- Phimwapi S, Trongpanich Y, **Niamsanit S** and Pannate P (2005) **Isolation and characterization of vitamin B₆ biosynthesis *Rhizobium* sp. from Thailand.** 10th Biological Sciences Graduate Congress, 30th Nov – 2nd Dec 2005, Department of Biological Sciences, National University of Singapore, Singapore. P41.
- Anutrakunchai C, Phimwapi S, Trongpanich Y and **Niamsanit S** (2005) **Isolation of thermophilic bacteria producing vitamin B₆.** 31st Congress on science and technology of Thailand. 18-20 October, Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. P109
- Phimwapi S, Trongpanich Y, Niamsanit S, Pannate P and Tankrathok A (2005) **Studies on vitamin B₆ biosynthesis by bacteria isolates from soils.** The 1st international conference on fermentation technology for value added agricultural products. 22-25 March, Kosa hotel, Khon Kaen, Thailand.
- Trongpanich, Y., **Niamsanit, S.** and Siri, S. 2005. Vitamin B-6 degradation by pyridoxamine-pyruvate transaminase and pyridoxine 4-oxidase from *Ochrobactrum anthropi* and *Enterobacter cloacae*-like Bacteria. *Science Asia*. 31: 307-311.
- Phimwapi S, Trongpanich Y, Tankrathok A, **Niamsanit S** and Pannate P (2004) **Simple determination of total vitamin B-6 by microbiological assay in solid media.** The 16th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Innovative Biotechnology: The opportunity for kitchen of the world”. 12-15 December, Topland hotel, Pitsanulok, Thailand.

- Trongpanich Y and **Niamsanit S** (2003) **Degradation of pyridoxine (vitamin B-6) to pyridoxal by bacteria isolated from soil sample**. Bio Thailand 2003: Technology for life. 17-20 July, Pattaya, Thailand.
- Milintawisamai, N., **Niamsanit, S.**, Ponglikitmongkol, M., Choanahee, Y., Sripakdee, N., Sangchumpol, P., Bunsaup, S. and Milintawisamai, M. (2001) Thai strains of toluene-utilizing *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from contaminated water can degrade trichloroethylene (TCE). Bio Thailand 2001: From Research to Market. Bangkok, Thailand, Nov 7-10. Poster session P-waste Treatment-11.
- Milintawisamai, N. and **Niamsanit, S.** (2002). Isolation of Tolnene-Utilizing/Trichloracthylene Degrading Bacteria from Natural Environment. Biotechnology for better living in the New Economy. Khonkaen, Thailand. Nov.12-15. P-BE07, p91.(Abstract)
- Niamsanit S.**, Notaso, N., Phonomdaeng, P., Mahakhan, P., Siripornadulsil, S. and Kumlungdee, N. 1997. Screening for high efficiency lipase producing microorganisms from waste water. *KKU Res. J.* **2(1)**: 1-9.
- Sattayasai, N., **Niamsanit, S.** and Sattayasai, J. 1994. Anti-Staphulococcal activity of snail mucin. *Achatina fulica* Bowdich 1822. The 12th International Congress of Pharmacology, Montreal, Canada, July 24-29 1994.
- Sattayasai, N., **Niamsanit, S.** and Sattayasai, J. 1994. Anti-Staphulococcal activity of snail mucin. *Achatina fulica* Bowdich 1822. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72** (supplement 1): 193.
- Sattayasai N., **Niamsanit, S.**, Sattayasai, J. and Riddech, N. 1991. Antibacterial activity of mucus mucin excreted from snail "*Achatina fulica* Bowdich 1822". *J. Pharmacol.* **13**: 16.
- Niamsanit, S.**, Nunthapisud, P. and Limpongsanurak, S. 1988. Prevalence of Chlamydia trachomatis among women attending antenatal clinic in Bangkok. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* **19(4)**: 609-613.
- Lolekha S., S. Sirinavin, D. Charoenpipop, S. Doencham, and **S. Boonrumlcktanom.** A comperative in-vitro antibacterial activity of cetazidime and nine other cephalosporins. *Ramathibodi Medical J.* **8(2)**:74-80, 1985.

- Sirinavin S., S. Lolekha, **S. Boonrumlcktanom**, D. Charoenpipop and P. Vannakrirotj. In vitro comparison of netilmicin and five other aminoglycoside antibiotics. Ramathibodi Medical J. 8(1):11-18, 1985.
- Lolekha, S., **Boonrumlcktanom, S.** and Charoenpipop, D. 1983. In vitro activity of ceftriaxone. In: Proceeding in therapy of bacterial infections. A new cephalosporin: Ceftriaxon, Bangkok, Thailand, March 24-26, 1983.