# บทที่ 2

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 2.1 การบ่งเอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

การบ่งเอกลักษณ์โดยศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีที่นิยมใช้ตามแบบแผน โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร LB medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวๆ ที่บริสุทธิ์มาตรวจสอบการติดสีแกรม (Gram's reaction) จากนั้นทดสอบการเจริญบนอาหาร MacConkey agar การเคลื่อนที่บนอาหารกึ่งแข็ง (Motility test) การใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโทส และซูโครส ด้วยอาหาร Triple Sugar Iron agar (TSI) ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสทั้งแบบที่ใช้ออกซิเจนและแบบเฟอร์เมนท์ (O-F test) ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการแยก indole group ออกจาก Tryptophan (Indole test) ทดสอบการใช้ซิเตรทด้วยอาหาร Simmon Citrate Agar ทดสอบการสร้างเอนไซม์ urease ด้วยอาหาร Urea agar และยืนยันผลการด้วยชุดทดสอบ API 20 E strip (Biomérieux) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม apiweb stand alone V 1.2.1

## 2.2 การผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้วัสดุทางการเกษตร

### 2.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (NFB) *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และเชื้อไอโซเลท 3LSO1จำนวน 2-3 โคโลนี เลี้ยงในอาหาร LB broth ปริมาตร 250 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยกเก็บส่วนเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วละลายตะกอนเซลล์ในอาหาร LB broth และ LGIP broth (ไม่มี bromothymol blue) ที่เตรียมใหม่ปริมาตร 600 ml โดยปรับให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.08 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียประมาณ $10^8$ cfu/ml

### 2.2.2 การเตรียมวัสดุทางการเกษตร

การทดลองนี้ใช้วัสดุเพาะปลูกทางการเกษตร 2 ชนิด คือ พีท (Peat) และ เวอร์มิคูไลท์ (Vermiculite) เป็นวัสดุพาหะ (Carrier material) สำหรับผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรีย โดยนำวัสดุแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารต่างๆ ก่อนทดลอง ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซียม (K) และสารอินทรีย์ต่างๆ (Organic matter, OM) แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) จากนั้นตวงวัสดุแต่ละชนิดปริมาตร 2.5 l บรรจุลงในถุงพลาสติกที่มีคอขวดแล้วปิดด้วยจุกสำลี ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งอบไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 Pounds/square inch เป็นเวลา 30 นาที นานติดต่อกันเป็นเวลา 2 วัน

**2.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน**

นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่เตรียมในอาหาร LB broth หรือ LGIP broth ปริมาตร 600 ml ซึ่งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย $10^8$ cfu/ml ใส่ในวัสดุทางการเกษตรแต่ละถุงในสภาวะปลอดเชื้อ ผสมให้เชื้อกระจายทั่ววัสดุการเกษตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (Room Temperature) ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25-30°C และตู้เย็น (Cold Room) ที่มีอุณหภูมิ 10°C โดยเก็บเป็นระยะเวลา 60 วัน และตรวจหาปริมาณเชื้อหลังจากเก็บไว้ 0, 30 และ 60 วัน

**2.2.4 การตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย**

เก็บตัวอย่างจากถุงกล้าเชื้อเพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียหลังจากใส่เชื้อเป็นเวลา 0, 30 และ 60 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 โดยให้สัญลักษณ์แต่ละตำรับการทดลองดังตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** รายละเอียดการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และเชื้อไอโซเลท 3LSO1 ด้วยวัสดุการเกษตร

| ตำรับการทดลอง | วัสดุการเกษตร | อาหารเลี้ยงเชื้อ | บ่มที่ | สัญลักษณ์ย่อ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Peat (P) | LB broth (B) | Cold room (C) | P-B-C |
| 2 | Peat (P) | LGIP broth (G) | Cold room (C) | P-G-C |
| 3 | Peat (P) | LB broth (B) | Room temp (RT) | P-B-RT |
| 4 | Peat (P) | LGIP broth (G) | Room temp (RT) | P-G-RT |
| 5 | Vermiculite (V) | LB broth (B) | Cold room (C) | V-B-C |
| 6 | Vermiculite (V) | LGIP broth (G) | Cold room (C) | V-G-C |
| 7 | Vermiculite (V) | LB broth (B) | Room temp (RT) | V-B-RT |
| 8 | Vermiculite (V) | LGIP broth (G) | Room temp (RT) | V-G-RT |

**หมายเหตุ** : P = Peat, V = Vermiculite, C = Cold Room, RT = Room Temperature, L = LB broth, G = LGIP broth

**2.3 การทดสอบประสิทธิภาพตำรับกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยภายใต้สภาวะเรือนทดลอง**

**2.3.1 การเตรียมท่อนพันธุ์อ้อย**

การทดลองใช้อ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 จากศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดขอนแก่นที่มีความสมบูรณ์ไม่มีลักษณะอาการของโรคอ้อย โดยตัดท่อนพันธุ์ 1 ท่อน (ยาว 5-6 cm) ให้มี 1 ตาอ้อย

**2.3.2 การเตรียมดินเพาะปลูกอ้อย**

การทดลองใช้ดินชุดยโสธรจากหมวดพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำดินผึ่งลมให้แห้ง (air dry) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นผสมและเก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารต่างๆ ก่อนการทดลองปลูกอ้อย ได้แก่ ธาตุไนโตรเจน (N) ธาตุฟอสฟอรัส (P) ธาตุโพแทสเซียม (K) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และสารอินทรีย์ต่างๆ (Organic matter, OM) แล้วอบดินด้วย Formalin ที่มีความเข้มข้น 25% เพื่อทำให้ดินปลอดเชื้อ อบทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วัน ชั่งน้ำหนักดิน 10.5 kg บรรจุลงในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 cm

**2.3.3 การปลูกอ้อยและการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน**

จัดเตรียมกระถางสำหรับปลูกอ้อยที่บรรจุดินแล้วโดยขุดหลุมขนาด 10 x 10 x 5 cm (กว้าง x ยาว x ลึก) จากนั้นวางท่อนพันธุ์อ้อยจำนวน 1 ท่อน/กระถาง โดยหงายตาอ้อยให้อยู่ด้านบนแล้วกลบด้วยดิน รดน้ำปริมาตร 1.5 l หลังจากนั้น 15 วัน เมื่ออ้อยเริ่มงอกหรือแทงหน่อ จึงใส่กล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากแต่ละตำรับวิธีการปริมาตร 3 ml บริเวณรอบๆ รากอ้อย แล้วพรวนดินอย่างระมัดระวัง รดน้ำปริมาตร 2 l หลังจากใส่กล้าเชื้อเป็นเวลา 7 วัน จึงใส่ปุ๋ยเคมี ได้แก่ ปุ๋ยไนโตรเจน (N) ในรูปแบบของปุ๋ยยูเรีย ปริมาณ 0 หรือ 0.75 g/kg soil (ขึ้นกับตำรับการทดลอง) เมื่ออ้อยอายุ 30 วัน จึงใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส (P) ในรูป single super phosphate, SSP ตราหัววัวคันไถ สูตร 0-16-0 ปริมาณ 0.3 g/kg soil และปุ๋ยโพแทสเซียม (K) ในรูป potassium chloride, KCl ตราหัววัวคันไถ สูตร 0-0-60 ปริมาณ 1.6 g/kg soil โดยใส่บริเวณรอบๆ รากอ้อย แล้วพรวนดินอย่างระมัดระวัง รดน้ำให้ชื้น

**2.3.4 รายละเอียดการทดลอง**

การปลูกอ้อยทำ 2 ครั้ง ครั้งแรกใช้เชื้อที่เก็บในวัสดุปลูก 30 วัน (30 DAF) โดยปลูกอ้อยช่วงวันที่ 23 ธันวาคม 2554 เก็บเกี่ยววันที่ 23 เมษายน 2555 ครั้งที่สองใช้เชื้อที่เก็บในวัสดุปลูก 60 วัน (60 DAF) โดยปลูกอ้อยช่วงวันที่ 14 มกราคม 2555 เก็บเกี่ยว วันที่ 14 พฤษภาคม 2555 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 20 หน่วยการทดลอง โดยใช้กล้าเชื้อ NFB 2 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และเชื้อไอโซเลท 3LSO1 ในรูปแบบของตำรับกล้าเชื้อในวัสดุการเกษตรดังตารางที่ 2.1 และตำรับควบคุม 4 ตำรับ แต่ละการทดลองมี 3 ซ้ำ รวมทั้งหมด 120 หน่วยการทดลอง ซึ่งมีรายละเอียดดังตารางที่ 2.2

**2.3.5 การตรวจการเจริญเติบโตของอ้อย**

ตรวจสอบการเจริญเติบโตของอ้อยเมื่ออ้อยอายุ 120 วันหลังจากปลูก ดังนี้ เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยโดยนับจำนวนกอ วัดความสูง หาน้ำหนักสดต้นและราก น้ำหนักแห้งต้นและราก โดยการอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 วัน นอกจากนี้ยังเก็บข้อมูลการสะสมปริมาณธาตุอาหารหลักในส่วนของลำต้นและรากอ้อย ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total P) และโปแทสเซียมทั้งหมด (Total K)

นอกจากนี้ยังเก็บข้อมูลคุณสมบัติดินที่ปลูกอ้อยในแต่ละกระถางด้วย ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) และปริมาณอินทรียวัตถุในดินปลูก (Soil organic matter)

**ตารางที่ 2.2** รายละเอียดตำรับการทดสอบประสิทธิภาพกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และเชื้อไอโซเลท 3LSO1 ที่มีอายุ 30 DAF หรือ 60 DAF เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย

| ตำรับวิธีทดลอง | เชื้อจุลินทรีย์* | ตำรับการเตรียมเชื้อ | Urea (kg N/kg soil) |
|---|---|---|---|
| 1 | - | P | 0.00 (N0) |
| 2 | - | P | 0.75 (N) |
| 3 | 5LSO2/3LSO1 | P-B-C | 0.00 (N0) |
| 4 | 5LSO2/3LSO1 | P-B-C | 0.75 (N) |
| 5 | 5LSO2/3LSO1 | P-G-C | 0.00 (N0) |
| 6 | 5LSO2/3LSO1 | P-G-C | 0.75 (N) |
| 7 | 5LSO2/3LSO1 | P-B-RT | 0.00 (N0) |
| 8 | 5LSO2/3LSO1 | P-B-RT | 0.75 (N) |
| 9 | 5LSO2/3LSO1 | P-G-RT | 0.00 (N0) |
| 10 | 5LSO2/3LSO1 | P-G-RT | 0.75 (N) |
| 11 | - | V | 0.00 (N0) |
| 12 | - | V | 0.75 (N) |
| 13 | 5LSO2/3LSO1 | V-B-C | 0.00 (N0) |
| 14 | 5LSO2/3LSO1 | V-B-C | 0.75 (N) |
| 15 | 5LSO2/3LSO1 | V-G-C | 0.00 (N0) |
| 16 | 5LSO2/3LSO1 | V-G-C | 0.75 (N) |
| 17 | 5LSO2/3LSO1 | V-B-RT | 0.00 (N0) |
| 18 | 5LSO2/3LSO1 | V-B-RT | 0.75 (N) |
| 19 | 5LSO2/3LSO1 | V-G-RT | 0.00 (N0) |
| 20 | 5LSO2/3LSO1 | V-G-RT | 0.75 (N) |

**หมายเหตุ** : P = Peat, V = Vermiculite, C = Cold Room, RT = Room Temperature, L = LB broth, G = LGIP broth

* - = ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์, 5LSO2/3LSO1 = ใส่เชื้อ 5LSO2 หรือ 3LSO1

**2.4 การตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนหลังการปลูกอ้อย**

**2.4.1 ตัวอย่างดิน**

เก็บตัวอย่างดินรอบรากอ้อยจากกระถางหลังจากปลูกเป็นเวลา 120 วัน จากนั้นชั่งตัวอย่างดิน 1 g ทำเป็นสารแขวนลอยและเจือจางทีละ 10 เท่า ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำสารแขวนลอยดินแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 ml เกลี่ย (spread) บนผิวหน้าอาหาร LB medium และ LGIP medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**2.4.2 การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากอ้อย**

เก็บตัวอย่างอ้อยจากกระถางหลังปลูกเป็นเวลา 120 วัน จากนั้นแบ่งตัวอย่างอ้อยออกเป็นส่วนต่างๆ คือ ลำต้น และราก นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณผิวนอกของตัวอย่าง (surface sterile) ด้วยสารเคมี ดังนี้ แช่ใน 5% chloramines T เป็นเวลา 5 นาที และ 70% ethanol เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ตรวจสอบความปลอดเชื้อของตัวอย่างรากด้วยการขีดลาก (streak) บนอาหาร LB medium และ LGIP medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับตัวอย่างลำต้นอ้อยที่เปลือกนอกปลอดเชื้อแล้วจะนำมาปลอกเปลือกอีกครั้งด้วยมีดปลอดเชื้อ แล้วจุ่ม 95% ethanol ผ่านเปลวไฟและตรวจสอบความปลอดเชื้อเช่นเดียวกับตัวอย่างรากอ้อย หลังจากนั้นนำรากอ้อยบดในโกร่งและส่วนของลำต้นจะปั่นให้ละเอียดด้วย Blender แล้วทำเป็นสารแขวนลอยด้วย 5% sucrose ปริมาตร 5 ml และเจือจางทีละ 10 เท่า ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 9 ml แบ่งสารละลายแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 ml เกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร LB medium และ LGIP medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**2.5 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในตัวอย่างอ้อยและดิน**

**2.5.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ทางเคมี**

**ก. ตัวอย่างดิน**

เก็บตัวอย่างดินจากกระถางปลูกอ้อยผึ่งให้แห้งในอากาศ (air dry) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นบดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 mm

**ข. ตัวอย่างพืช**

นำตัวอย่างลำต้นและรากอ้อยอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นบดให้ละเอียด

**2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) โดยวิธี Kjedahl nitrogen method**

ชั่งตัวอย่างดินและตัวอย่างพืช 3 และ 0.3 g ตามลำดับ ใส่ลงในหลอดย่อยตัวอย่าง (Kjeldahl digestion tube) จากนั้นเติมสารเร่งปฏิกิริยา $K_2SO_4$ และ $CuSO_4$ ในอัตราส่วน 10:1 ปริมาณ 2 g จากนั้นเติมกรด $H_2SO_4$ เข้มข้นปริมาตร 5 ml เขย่าให้เข้ากันทันทีและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 265°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 380°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตรครึ่ง

หลอด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 75 ml ปิดด้วยจุกยางเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอน เก็บส่วนใส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุไนโตรเจนด้วยเครื่อง Flow Injection Analyzer (FIA)

**2.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสและโปแทสเซียมทั้งหมด (Total P, K) โดยวิธี Wet Oxidation method**

**ก. การเตรียมตัวอย่าง**

ชั่งตัวอย่างพืช 0.5 g จากนั้นเติมกรดไนตริกเข้มข้น (Nitric acid: 65% w/w $HNO_3$) ปริมาตร 10 ml เติมกรดเปอร์คลอลิกเข้มข้น (Perchloric acid: 70% w/w, $HCLO_4$) ปริมาตร 5 ml จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 200°C จนเกิดกลุ่มควันสีขาวซึ่งจะเป็นการย่อยตัวพืชอย่างสมบูรณ์ ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman N0. 1) โดยสารละลายที่ได้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ธาตุฟอสฟอรัส (P) และโปแทสเซียม (K) ต่อไปได้

**ข. การวิเคราะห์ฟอสฟอรัส (P) ในพืช**

แบ่งสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างพืชปริมาตร 5 ml ใส่ในขวดปรับปริมาตรแล้วเติมสารละลาย Vanado molybdate reagent ปริมาตร 5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 ml เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 nm โดยเปรียบเทียบปริมาณของฟอสฟอรัสกับกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ppm P

**ค. การวิเคราะห์โปแทสเซียม (K) ในพืช**

เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard K) ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm ในกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น (Perchloric acid 70%) จากนั้นปรับเครื่อง Flame photometer ให้มีค่าเท่ากับ 0 ด้วยสารละลายมาตรฐาน 0 ppm K และอ่านค่าของสารละลายมาตรฐาน 50 ppm K ให้มีค่าเท่ากับ 50 แล้วนำตัวอย่างสารละลายวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flame photometer

**ง. การวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุในดินด้วยวิธี Walkley and Black**

ชั่งตัวอย่างดิน 3 g แล้วเติม $K_2Cr_2O_7$ ความเข้มข้น 1N ปริมาตร 5 ml เติม $H_2SO_4$ ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 ml แล้วเติม O-phenanthroline sulfate indicator 3 หยด จากนั้นไตเตรตด้วยสารละลาย $FeSO_4$ จนกระทั่งสารแขวนลอยดินเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลปนแดง (End point) บันทึกปริมาตรของสารละลาย $FeSO_4$ ที่ใช้

**2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยการหาค่าความแตกต่างกันทางสถิติ ($p$ = 0.05, Duncan)