บทคัดย่อ

เป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (NFB) เป็นหนึ่งในวิธีการเพิ่มปุ๋ยไนโตรเจนซึ่งนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรที่ยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (NFB) เพื่อให้เก็บเชื้อได้ยาวนานและเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในกระถางภายใต้สภาวะเรือนทดลอง โดยเตรียมเชื้อ NFB ที่มีประสิทธิภาพ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Stenotrophomonas* sp., 5LSO2 และ *Citrobacter* sp., 3LSO1 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LB หรือ LGIP ผสมให้เข้ากันกับพีทหรือเวอร์มิคูไลท์ เก็บรักษาที่ห้องเย็น (10°C) หรืออุณหภูมิห้อง (25-30 °C) เป็นเวลา 60 วัน พบว่าแต่ละตำรับวิธีการมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นโดยวันที่ 60 ของการเก็บ (60 DAF) มีเชื้อมากกว่าวันที่ 30 (30 DAF) และวันที่ 0 (0 DAF) ตามลำดับ นำแต่ละตำรับกล้าเชื้อซึ่งมีอายุ 30 DAF และ 60 DAF ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^7 cfu/ml มาทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 โดยปลูกในช่วงวันที่ 23 ธันวาคม 2554 ถึงวันที่ 23 เมษายน 2555 และช่วงวันที่ 14 มกราคม 2555 ถึงวันที่ 14 พฤษภาคม 2555 ตามลำดับ โดยปลูกในดินที่มีคุณภาพต่ำร่วมกับการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส (P) ในรูปแม่ปุ๋ยฟอสเฟต, 0-16-0 และปุ๋ยโปแทสเซียม (K) ในรูปโปแทสเซียมคลอไรด์, 0-0-64 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอ้อยที่ใส่เชื้อทุกตำรับกล้าเชื้อช่วยเพิ่มผลิตโดยเพิ่มจำนวนกอ ความสูง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากไม่ว่าการปลูกอ้อยนั้นจะมีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (N) ในรูปของยูเรียหรือไม่ก็ตาม นอกจากนี้ยังแยกเชื้อ NFB ได้ในปริมาณสูงจากดินที่ปลูก จากต้นและรากของอ้อย และยังพบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด และโปแทสเซียมทั้งหมดในลำต้น ราก และดินของอ้อยที่ใส่เชื้อสูงกว่าอ้อยที่ไม่ใส่กล้าเชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ย N ในรูปของยูเรียอีกด้วย ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของทุกตำรับการเตรียมเชื้อแบคทีเรียและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย

Abstract

It is well known that nitrogen fixing bacteria (NFB) is one of the possible biological alternatives nitrogen fertilizers and could lead to more productive and sustainable agriculture without harming the environment. The present works aim to formulate NFB for sustaining the population of these strains in storage and evaluate their efficient for enhancing growth of sugarcane in pots within the greenhouse. Two strains of effective NFB isolated from rhizosphere of sugarcane, *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 and *Citrobacter* sp., 3LSO1, were prepared in LB or LGIP medium, mixed thoroughly with peat or vermiculite then stored at cold room (10°C) or at room temperature (25-30°C) for 60 days. All individual treatments exhibited more cell numbers at day 60 after formulation (60 DAF) than at 30 DAF and 0 DAF, respectively. These formulations about 10^7 cfu/ml of 30 DAF and 60 DAF were assessed for their plant growth promoting with sugarcane sett variety, Khon Kaen 3, on December 23, 2011 to April 23, 2012 and January 14, 2012 to May 14, 2012, respectively. The low organic contents soil was supplemented with phosphorus (P) as single super phosphate (SSP), 0-16-0; and potassium (K) as potassium chloride, 0-0-64. The results showed sugarcane inoculated with all formulations increased in the productivity as more tiller numbers, height, shoot and root fresh and dried weight were observed even nitrogen (N) as urea were added or not. In addition, NFB could be reisolated in high numbers from the rhizomes, shoot and root of the inoculated plants. Moreover, total N, total P and total K in the shoot, root and soil of inoculated plants were higher than control of uninoculated plant with urea as N fertilizer. These results suggested the establishment of the all formulated bacteria and their enhancing growth of sugarcane.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 จาก มหาวิทยาลัยขอนแก่น จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณณัฐวุฒิ มีศิลป์ ผู้ช่วยวิจัยและขอขอบคุณ ผศ.วิรัช ว่องพัฒนากุล ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับ Gas Chromatography จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณทักษิณา ศันสยะวิชัย นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ ศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดขอนแก่น ที่ให้คำปรึกษาด้านการปลูกอ้อย จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกสำหรับสถานที่การทดลองและการวิเคราะห์ธาตุ

สารบัญเรื่อง

เรื่อง		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ii
กิตติกรรมประกาศ		iii
สารบัญเรื่อง		iv
สารบัญตาราง		vi
สารบัญรูปภาพ		viii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ		xi
บทที่ 1	บทนำ	1
1.1	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3	ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4	วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี	2
1.5	แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในโครงการวิจัย	3
1.6	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.7	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 2	วิธีดำเนินการศึกษา	7
2.1	การบ่งเอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน	7
2.2	การผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้วัสดุทางการเกษตร	7
2.3	การทดสอบประสิทธิภาพตำรับกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยภายใต้สภาวะเรือนทดลอง	8
2.4	การตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนหลังการปลูกอ้อย	11
2.5	การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในตัวอย่างอ้อยและดิน	11
2.6	การวิเคราะห์ข้อมูล	12
บทที่ 3	ผลการทดลอง	13
3.1	การบ่งเอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน	13
3.2	การผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (NFB inoculums) ด้วยวัสดุการเกษตร	14
3.3	ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย	15
บทที่ 4	อภิปรายผลการทดลอง	47

เรื่อง	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	55
ภาคผนวก 2 สารเคมีในการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรีย	58
ภาคผนวก 3 สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร N, P, K	60
ภาคผนวก 4 วิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	62
ภาคผนวก 5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยชุดการทดสอบ API 20E และ 20NE	65
ภาคผนวก 6 ตารางข้อมูล	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	รายละเอียดการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และเชื้อไอโซเลท 3LSO1 ด้วยวัสดุการเกษตร	8
2.2	รายละเอียดตำรับการทดสอบประสิทธิภาพกล้าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และเชื้อไอโซเลท 3LSO1 ที่มีอายุ 30 DAF หรือ 60 DAF เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย	9
3.1	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อ NFB ไอโซเลท 3LSO1	13
3.2	ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารในวัสดุการเกษตร (Carrier Materials)	14
3.3	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 และเชื้อ ***Citrobacter* sp.** 3LSO1 เมื่อเก็บในวัสดุการเกษตรด้วยตำรับวิธีต่างๆ	14
3.4	ผลการวิเคราะห์สภาพดินก่อนการปลูกอ้อย	15

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
1	การอ่านผลการทดสอบคุณชีวเคมีด้วย API 20	65
2	การเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือนจากการใส่เชื้อ *Stenotrophomonas* sp., 5LSO2, 30 DAF	68
3	ปริมาณเชื้อ NFB จากการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp., 5LSO2 และ *Citrobacter* sp., 3LSO1, 30 DAF	69
4	การเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือนจากการใส่เชื้อ *Citrobacter* sp., 3LSO1, 30 DAF	70
5	การเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือนจากการใส่เชื้อ *Stenotrophomonas* sp., 5LSO2, 60 DAF	71
6	ปริมาณเชื้อ NFB จากการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp., 5LSO2, 60 DAF	72
7	การสะสมธาตุ N P K ในอ้อยจากการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp., 5LSO2, 60 DAF	73

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
8	การสะสมอินทรียวัตถุ (Organic Matter, OM) และไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ในดินปลูกอ้อยจากการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp., 5LSO2, 60 DAF	74
9	การเจริญเติบโตของอ้อยจากการใส่กล้าเชื้อ ไอโซเลท *Citrobacter* sp., 3LSO1, 60 DAF	75
10	ปริมาณเชื้อ NFB จากการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp., 3LSO1, 60 DAF	76
11	การสะสมธาตุ N P K ในอ้อยจากการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp., 3LSO1, 60 DAF	77
12	การสะสมอินทรียวัตถุ (Organic Matter, OM) และธาตุไนโตรเจนทั้งหมด (Total N, %) ในดินปลูกอ้อยจากการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp., 3LSO1, 60 DAF	78

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 3.1 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 30 วัน (30 DAF) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือน 18

รูปที่ 3.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน ลำต้นและรากอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบระหว่างอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อและที่ใส่เชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะอายุ 30 วัน (30 DAF) 19

รูปที่ 3.3 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 30 วัน (30 DAF) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือน 20

รูปที่ 3.4 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน ลำต้นและรากอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบระหว่างอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อและที่ใส่เชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะอายุ 30 วัน (30 DAF) 21

รูปที่ 3.5 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 30 วัน (30 DAF) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือน 23

รูปที่ 3.6 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน ลำต้นและรากอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบระหว่างอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อและที่ใส่เชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะอายุ 30 วัน (30 DAF) 24

รูปที่ 3.7 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 30 วัน (30 DAF) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือน 25

รูปที่ 3.8 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน ลำต้นและรากอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบระหว่างอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อและที่ใส่เชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะอายุ 30 วัน (30 DAF) 26

รูปที่ 3.9 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือน 28

รูปที่ 3.10 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน ลำต้นและรากอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบระหว่างอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อและที่ใส่เชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะอายุ 60 วัน 29

หน้า

รูปที่ 3.11 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการสะสมปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียมที่มีต่อลำต้นและรากอ้อยอายุ 4 เดือน 30

รูปที่ 3.12 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการสะสมปริมาณอินทรีย์วัตถุและไนโตรเจนในดินที่ตรวจพบในอ้อยอายุ 4 เดือน 31

รูปที่ 3.13 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือน 33

รูปที่ 3.14 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน ลำต้นและรากอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบระหว่างอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อและที่ใส่เชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) 34

รูปที่ 3.15 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการสะสมปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียมที่มีต่อลำต้นและรากอ้อยอายุ 4 เดือน 35

รูปที่ 3.16 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการสะสมปริมาณอินทรีย์วัตถุและไนโตรเจนในดินที่ตรวจพบในอ้อยอายุ 4 เดือน 36

รูปที่ 3.17 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือน 38

รูปที่ 3.18 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน ลำต้นและรากอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบระหว่างอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อและที่ใส่เชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะอายุ 60 วัน (60 DAF) 39

รูปที่ 3.19 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการสะสมปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียมที่มีต่อลำต้นและรากอ้อยอายุ 4 เดือน 40

รูปที่ 3.20 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้พีทเป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการสะสมปริมาณอินทรีย์วัตถุและไนโตรเจนในดินที่ตรวจพบในอ้อยอายุ 4 เดือน 41

หน้า

รูปที่ 3.21 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยอายุ 4 เดือน 43

รูปที่ 3.22 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน ลำต้นและรากอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบระหว่างอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อและที่ใส่เชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะอายุ 60 วัน (60 DAF) 44

รูปที่ 3.23 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการสะสมปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียมที่มีต่อลำต้นและรากอ้อยอายุ 4 เดือน 45

รูปที่ 3.24 ผลของการใส่กล้าเชื้อ *Citrobacter* sp. 3LSO1 ที่เตรียมโดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุยึดเกาะ อายุ 60 วัน (60 DAF) ต่อการสะสมปริมาณอินทรีย์วัตถุและไนโตรเจนในดินที่ตรวจพบในอ้อยอายุ 4 เดือน 46

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ARA	acetylene reduction assay
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
cfu	colony forming unit
^{o}C	degree Celsius
g	gram
GC	gas chromatography
IAA	indole-3-acetic acid
IAM	indole acetamide
kg	kilogram
kgN	kilogram nitrogen
l	liter
µl	microliter
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
nm	nanometer
N	nitrogen
%	percent
PGPB	plant growth promoting bacteria
ppm	parts per million
rpm	round per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
SAR	systemic acquired resistance