

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 ต่อการลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยปลูกในสภาพแปลงทดลอง ผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิดโดยวิธี dual culture technique พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดนี้สามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่ขัดขวางกัน แปลงทดลองที่ใช้ทดสอบมีธาตุอาหารในดินต่ำ อินทรีย์วัตถุน้อยกว่า 1% ตั้งอยู่ที่บ้านหนองแขว ตำบลหนองแขว อำเภอพระยืน จังหวัดขอนแก่น วางแผนการทดลองแบบ Factorial in randomized complete block design (RCBD) split plot ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยหลักคือ ปัจจัยเชื้อ 4 ระดับเป็น main plot ได้แก่ 1) ไม่ใส่เชื้อ (ตัวควบคุม) 2) ใส่เชื้อ 3LSO1 3) ใส่เชื้อ 5LSO2 4) ใส่เชื้อผสม 3LSO1 + 5LSO2 ส่วนปัจจัยรองเป็น sub-plot คือ ปุ๋ยเคมี 3 ระดับ ได้แก่ 1) PK 2) $\frac{1}{2}$ N-PK 3) N-PK รวมทั้งหมด 12 ตำรับทดลองๆ ละ 4 ซ้ำ ขนาดแปลงทดลองแต่ละ sub-plot ประมาณ $15 \times 9 \text{ m}^2$ ดังนั้นแต่ละ main plot มีขนาด $15 \times 27 \text{ m}^2$ และแต่ละ main plot มีร่องน้ำล้อมรอบขนาด 0.7 m การเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อสายพันธุ์ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ใช้วัสดุปลูกทางการเกษตร คือ ขอยล์เมต (soilmate) เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ผสมให้เข้ากันกับขอยล์เมตในอัตราส่วน 1:10 (v/w) เก็บที่อุณหภูมิประมาณ 10°C ได้เป็นชีวภัณฑ์เชื้อ NFB มีเชื้อไม่น้อยกว่า 10^6 cfu/g ใช้ทดสอบกับอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 ในสภาพไร่ในพื้นที่ประมาณ 4.4 ไร่ โดยใส่เชื้อ 10 kg/แปลงย่อย ($15 \times 9 \text{ m}^2$) การปลูกอ้อยมีระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 1.5 m และใส่ท่อนพันธุ์อ้อย 2 ท่อนพันธุ์ที่มี 3 ตา ต่อ 1 หลุม แต่ละหลุมห่างกันประมาณ 50 cm ทั้งหมด $18 \times 2 \times 3 = 108$ ตา/แปลงย่อย (subplot) ปลูกอ้อย 9 แถว/subplot ใส่เชื้อ NFB พร้อมกับการปลูกอ้อย โดยใส่เฉพาะในแถวที่ 3 ถึงแถวที่ 7 ในแต่ละ subplot ใส่ปุ๋ย N 2 ครั้ง ที่ 5 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ย N เพียงครั้งหนึ่งของอัตราแนะนำในอ้อยปลูกเขตอาศัยน้ำฝนใช้ 18 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ และใส่ส่วนที่เหลืออีกครั้งในช่วงที่อ้อยอายุประมาณ 3 เดือน ส่วนปุ๋ย P และ K ใส่ครั้งเดียวที่ 5 สัปดาห์ โดยสูตรปุ๋ยเคมีที่ใช้ขึ้นกับค่าวิเคราะห์ดินที่ได้ และอ้างอิงการใส่ปุ๋ยตามเอกสารวิชาการลำดับที่ 001/2553 คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ ของกรมวิชาการเกษตร ทำการตรวจวิเคราะห์ผลของชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลองระหว่างการเจริญและช่วงเก็บเกี่ยว โดยนับจำนวนกอ วัดความสูง น้ำหนักและผลผลิต ข้อมูลการสะสมปริมาณธาตุอาหารหลักในส่วนของลำต้นอ้อย ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total P) และโปแตสเซียมทั้งหมด (Total K) รวมทั้งค่า N ในรูปที่นำไปใช้ได้ (available N) และค่า P ในรูปที่นำไปใช้ได้ (available P) การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ NFB ในดิน รากและต้นอ้อยในแปลงปลูกทดลองระหว่างการเจริญและช่วงเก็บเกี่ยว โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์อุดมและสูตรปรับต่ำที่ปราศจากไนโตรเจน (N) และติดตามปริมาณ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ด้วยเทคนิค Real-Time PCR (TagMan Probe)

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน คือไม่ส่งเสริมหรือขัดขวางการเจริญของกันและกัน การเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนด้วยการใช้ขอยล์เมตเป็นวัสดุตัวพานั้น ใช้สัดส่วนของสารแขวนลอยเชื้อต่อขอยล์เมตในอัตราส่วน 1:10 (v/w) เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10°C โดยเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณในขอยล์เมตได้ประมาณ 1-2 log cfu/g หลังจากบ่มไว้ 17 วัน และเชื้อยังคงมีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์เชื้อ NFB หลังจากบ่มไว้ 30 วัน การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในแปลงทดลองไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อคุณสมบัติดินทั้งด้านกายภาพและธาตุอาหาร แต่มีแนวโน้มทำให้ค่าธาตุอาหารในดินเพิ่มขึ้น ได้แก่ organic matter, total N, total P, total NO_3^- , และ available P ผลการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดินและ/หรือในอ้อยโดยใช้อาหารสังเคราะห์ LB และ LGIP ที่เวลา 0, 3, 12 เดือน มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีข้อสังเกตว่าในตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 จะตรวจพบโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนโคโลนีของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 บนอาหาร LB ส่วนตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 จะตรวจพบโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนโคโลนีของเชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 สำหรับตำรับทดลองที่ใส่เชื้อผสมก็ตรวจพบลักษณะโคโลนีของเชื้อ NFB ทั้ง 2 ชนิดนี้ การตรวจพบเชื้อทั้งสองชนิดทั้งในดิน รากและลำต้นแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถอยู่แบบเป็นอิสระในดินและยังมีคุณสมบัติของการเป็นเชื้อที่อาศัยในพืชที่เรียกว่า endophyte ด้วย การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในแปลงทดลองทำให้ผลผลิตอ้อยที่ได้หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือนมีแนวโน้มทำให้ความหวานของอ้อยเพิ่มขึ้นได้แก่ค่าบrix โพลาริตี และซีซีเอส ซึ่งมีค่าสูงสุดในตำรับที่ใส่เชื้อผสม *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 เท่ากับ 23.26, 20.42 และ 15.05 ตามลำดับ และทำให้เกิดการสะสมปริมาณ Total N และ P ในอ้อยเพิ่มขึ้น ผลของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยทำให้อัตราการงอก จำนวนหน่อต่อต้น ความสูง และน้ำหนักแห้งที่ 3 เดือน จำนวนลำต้ออกที่ 6 เดือน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อย และน้ำหนักสดเป็นต้นต่อไร่ที่ 12 เดือน เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดการใช้ปุ๋ย N ได้ทั้งหมดตามอัตราแนะนำ ในการศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ด้วยเทคนิค Real-Time PCR (TagMan Probe) ซึ่งสามารถออกแบบ probe ที่จำเพาะในการติดตาม nitrogenase reductase ของ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ได้ คือ AlnP-P = 5'-FAM-CTTCGGATCGTACTCAATC-3'BHQ1 และ Aln5L- 5' Hex-GTGCAGGTCTTGTCGGTCAC-3'BHQ1 ตามลำดับ ผลของชีวภัณฑ์เชื้อทั้งสองชนิดที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยซึ่งรวมถึงผลผลิตอ้อย และความหวานของอ้อยที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการตรวจพบปริมาณ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophili* α5LSO2 ในดิน ราก และลำต้นอ้อยได้โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR ซึ่งก็ตรวจพบเฉพาะในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อเหล่านั้น จากเทคนิคการศึกษา

ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ทำให้พบว่าการเจริญของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 เพิ่มขึ้นทั้งในดินและอ้อยช่วงที่อ้อยมีการเจริญเติบโตที่ 3 เดือน และลดลงในช่วงเก็บเกี่ยวที่ 12 เดือน สอดคล้องกับการตรวจพบลักษณะโคโลนีดังกล่าว เป็นการสนับสนุนว่าเชื้อทั้งสองชนิดเป็นทั้ง free living และ endophyte และการมีชีวิตรอดของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ในแปลงทดลองบ่งชี้ว่าจะมีประโยชน์ต่อไปกับอ้อยต่อไป ปัจจัยของปุ๋ยไม่มีอิทธิพลต่อความหวานของอ้อยและการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ผลการศึกษานี้ บ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 สามารถลดการใช้ปุ๋ย N ได้ทั้งหมดตามอัตราแนะนำซึ่งเป็นผลโดยตรงจากเชื้อทั้งสองชนิด