



รายงานฉบับสมบูรณ์

ผลของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และ
Stenotrophomonas maltophilia 5LSO2 ต่อการลด
การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยปลูกในสภาพแปลงทดลอง
Effect of nitrogen fixing bacteria, *Enterobacter oryzae* 3LSO1
and *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 for
decreasing nitrogen fertilizer utilization of
sugarcane plantation in the field

โดย

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.นิภา มลิณทวิสมัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผศ.ดร.สุวรรณา เนียมสนิท

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

รศ.ดร.ประสิทธิ์ ใจศีล

ตุลาคม พ.ศ. 2560

สัญญาเลขที่ RDG5750038

รายงานฉบับสมบูรณ์

ผลของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และ
Stenotrophomonas maltophilia 5LSO2 ต่อการลด
การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยปลูกในสภาพแปลงทดลอง
Effect of nitrogen fixing bacteria, *Enterobacter oryzae* 3LSO1
and *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 for
decreasing nitrogen fertilizer utilization of
sugarcane plantation in the field

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|----------------------------|--|
| 1. ผศ.ดร.นิภา มลิณทวิสมัย | ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 2. ผศ.ดร.สุวรรณา เนียมสนิท | ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 3. รศ.ดร.ประสิทธิ์ ใจศีล | ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

แบบสรุปผู้บริหาร	ข
กิตติกรรมประกาศ	ช
บทคัดย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	71
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก	76
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย	78
ผลลัพธ์ (outcome) ของงานวิจัย	89
รายงานการถ่ายทอดเทคโนโลยี	91
คู่มือการอบรมเชิงปฏิบัติการ	92
เรื่อง การใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในการเพาะปลูกอ้อย	

แบบสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัยที่ 1

1.1 ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) ผลของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 ต่อการลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยปลูกในสภาพแปลงทดลอง

(ภาษาอังกฤษ) Effect of nitrogen fixing bacteria, *Enterobacter oryzae* 3LSO1 and *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 for decreasing nitrogen fertilizer utilization of sugarcane plantation in the field

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย (1) นางนิภา มลิณทวิสมัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

หมายเลขโทรศัพท์/โทรสาร 043-342911 e-mail: nipmil@kku.ac.th

(2) นางสาวรรณา เนียมสนธิ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

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

1.3 ชื่อที่ปรึกษาโครงการวิจัย

รศ.ดร. ประสิทธิ์ ใจศีล

ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

หมายเลขโทรศัพท์ 043-202360 โทรสาร 043-202361

1.4 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 งบประมาณที่ได้รับ 942,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ ตั้งแต่ 15 กันยายน 2556 ถึง กรกฎาคม 2558

2. บทสรุปงานวิจัย

2.1 ความสำคัญ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล การปลูกอ้อยเพื่อให้ได้ผลผลิตของน้ำตาลสูง จำเป็นต้องมีการใส่ปุ๋ยบำรุงดิน ที่สำคัญคือปุ๋ยไนโตรเจน (nitrogen, N) ฟอสฟอรัส (phosphorus, P) และโปแตสเซียม (potassium, K) โดยไนโตรเจนเป็นธาตุที่ช่วยให้อ้อยเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบ ทำให้อ้อยแตกกอดีมีจำนวนลำต้นมากทำให้น้ำหนัก

อ้อยมาก ถ้าอ้อยขาดไนโตรเจน จะทำให้ใบเหลืองแคระแกร็น แตกหน่อช้า หน่อไม่เจริญ อ้อยจะแก่เร็วกว่าปกติและคุณภาพอ้อยจะต่ำ ก๊าซไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่มีปริมาณมากในอากาศถึง 78 เปอร์เซ็นต์ การใส่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixing bacteria, NFB) จากอากาศในแปลงปลูกอ้อยจะช่วยลดต้นทุนในการซื้อปุ๋ยไนโตรเจน ลดการใช้ปุ๋ยเคมี เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพราะลดการชะล้างหน้าดินที่มีไนเตรทหรือแอมโมเนียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลทางอ้อมในการลดภาวะโลกร้อน สุวรรณ และคณะ (2552-2554) แยกเชื้อ NFB จากดินและอ้อยและพบว่าเชื้อ *Enterobacter* sp. 3LSO1 และ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 ให้ประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในกระถาง เมื่อนำเชื้อไปเพิ่มปริมาณในวัสดุปลูก 2 ชนิด คือพีท (peat) และเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) แล้วนำไปผสมในดินเพื่อใช้ปลูกอ้อยในกระถาง พบว่าหลังจากปลูกอ้อยได้ 4 เดือน อ้อยที่ปลูกโดยไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียหรือใส่ยูเรียเพียงครึ่งหนึ่ง ($\frac{1}{2}$ N) ของอัตราแนะนำร่วมกับการใส่เชื้อ *Enterobacter* sp. 3LSO1 หรือเชื้อ *Stenotrophomonas* sp. 5LSO2 มีการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเทียบเท่ากับอ้อยที่ใส่ปุ๋ยยูเรียแต่ไม่ได้ใส่เชื้อ NFB ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาความสามารถของเชื้อ NFB ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ในแปลงทดลองในไร่

2.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษามูลของเชื้อ NFB ได้แก่ *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 ต่อการลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยปลูกในสภาพแปลงทดลอง
- 2) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดินทางเคมีและจุลชีววิทยา
- 3) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณและการกระจายของเชื้อ NFB ที่ใส่ลงไปในดิน และต้นอ้อยในสภาพแปลงทดลองด้วยเทคนิค Real-Time PCR

2.3 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

ในเบื้องต้นได้ทำการทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิดว่าสามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่ขัดขวางกันโดยวิธี dual culture technique ตรวจวิเคราะห์ธาตุอาหารของดินที่จะใช้เตรียมแปลงทดลองโดยเลือกแปลงที่มีธาตุอาหารในดินต่ำ ในการวิจัยครั้งนี้เป็นแปลงของ นางสาวรณิ จันทรเพ็ง ตั้งอยู่ที่บ้านหนองแขง ตำบลหนองแขงอำเภอพระยืน จังหวัดขอนแก่นวางแผนการทดลองแบบ Factorial in randomized complete block design (RCBD) split plot ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยหลักคือ ปัจจัยเชื้อ NFB 4 ระดับเป็น main plot ได้แก่ 1) ไม่ใส่เชื้อ NFB (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 ดำรับทดลองๆ ละ 4 ซ้ำ ขนาดแปลงทดลองแต่ละ sub-plot ประมาณ $15 \times 9 \text{ m}^2$ ดังนั้นแต่ละ main plot จะมีขนาด

15x27 m² และแต่ละ main plot มีร่องน้ำล้อมรอบขนาด 0.7 m การเตรียมผลิตภัณฑ์เชื้อ NFB สายพันธุ์ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 โดยใช้วัสดุปลูกทางการเกษตร คือขอยล์เมต (soilmate) นึ่งฆ่าเชื้ออย่างน้อย 2 ครั้ง 2 วันต่อเนื่องกัน เลี้ยงเชื้อ NFB ในอาหารเหลว LB ผสมให้เข้ากันกับขอยล์เมตในอัตราส่วน 1:10 (v/w) เก็บที่อุณหภูมิประมาณ 10°C นำชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ที่มีเชื้อไม่น้อยกว่า 10⁶ cfu/g ไปทดลองกับอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 ในสภาพไร่ในพื้นที่ประมาณ 4.4 ไร่ โดยใส่เชื้อ 10 kg/แปลงย่อย (15 x 9 m²) การเตรียมแปลงปลูกจะเริ่มต้นโดยการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของดินด้วยโดโลไมท์ก่อนปลูกอ้อยประมาณ 2 สัปดาห์ และดำเนินการปลูกอ้อยในวันที่ 21-22 มีนาคม 2558 โดยใช้รถไถชุดร่องอ้อยให้มีระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 1.5 m และใส่ท่อนพันธุ์อ้อย (2 ท่อนพันธุ์) ในร่อง (คิดเป็น 1 หลุม) ให้แต่ละหลุมห่างกันประมาณ 50 cm เนื่องจากแต่ละ subplot มีความยาว 9 m ดังนั้นแต่ละ subplot จะมีร่องอ้อยทั้งหมด 18 หลุม เนื่องจากแต่ละหลุมมี 2 ท่อนพันธุ์ แต่ละท่อนพันธุ์มี 3 ตา ดังนั้นจะมีตาอ้อยทั้งหมด 18x2x3 = 108 ตา/แปลงย่อย (subplot) ปลูกอ้อย 9 แถว/subplot โดยให้มีระยะห่างของแต่ละแถวประมาณ 1.5 m การใส่เชื้อ NFB จะใส่พร้อมกับการปลูกอ้อย โดยใส่เฉพาะในแถวที่ 3 ถึงแถวที่ 7 ในแต่ละ subplot ส่วนการใส่ปุ๋ยจะใส่ 2 ครั้ง ครั้งแรกหลังจากปลูกอ้อยได้ 5 สัปดาห์ โดยปุ๋ย N จะใส่เพียงครึ่ง (½) ของอัตราแนะนำในอ้อยปลูกเขตอาศัยน้ำฝนใช้ 18 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ และใส่ส่วนที่เหลือ (ครึ่งอัตรา) จะใส่อีกครั้งช่วงที่อ้อยอายุประมาณ 3 เดือน ส่วนปุ๋ย P และ K จะใส่ครั้งเดียว โดยสูตรปุ๋ยเคมีที่ใช้ขึ้นกับค่าวิเคราะห์ดินที่ได้ และอ้างอิงการใส่ปุ๋ยตามเอกสารวิชาการลำดับที่ 001/2553 คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ ของกรมวิชาการเกษตร การตรวจวิเคราะห์ผลของชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลองจะตรวจสอบเมื่ออ้อยมีอายุ 3 และ 6 เดือน โดยนับจำนวนกอ วัดความสูง หาน้ำหนักแห้งต้น และวัดผลผลิตในช่วงเก็บเกี่ยวที่ 12 เดือน ได้แก่ น้ำหนักอ้อย ธาตุอาหารหลักในดินและในส่วนของลำต้นอ้อย ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total P) และโปแตสเซียมทั้งหมด (Total K) รวมทั้งค่า N ในรูปที่นำไปใช้ได้ (available N) และค่า P ในรูปที่นำไปใช้ได้ (available P) ในดิน เป็นต้น โดยส่งไปวิเคราะห์ที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ NFB ในดิน รากและต้นอ้อยที่อายุ 0, 3 และ 12 เดือน โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ LB และ/หรือ LGIP ที่ปราศจากไนโตรเจน (N) และติดตามปริมาณ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 วิธี Real-Time PCR ร่วมด้วย

2.4 ผลการวิจัยโดยย่อ

เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 ไม่มีปฏิกริยาต่อกัน คือไม่ส่งเสริมหรือขัดขวางการเจริญของกันและกัน การเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนด้วยการใช้ขอยล์เมตเป็นวัสดุตัวพาควรเตรียมโดยใช้สัดส่วนของสารแขวนลอยเชื้อต่อขอยล์เมตในอัตราส่วน 1:10 (v/w) แล้วเก็บไว้ที่

อุณหภูมิเย็นประมาณ 10°C โดยเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณในซอเยล์เมตได้ประมาณ 1-2 log cfu/g หลังจากบ่มไว้ 17 วันและเชื้อยังคงมีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์เชื้อ NFB หลังจากบ่มไว้ 30 วัน การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในแปลงทดลองไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อคุณสมบัติดินทั้งด้านกายภาพและธาตุอาหาร แต่มีแนวโน้มทำให้ค่าธาตุอาหารในดินเพิ่มขึ้นได้แก่ organic matter, total N, total P, total NO₃⁻, และ available P ผลการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดินและ/หรือในอ้อยในอาหารสังเคราะห์ที่เวลาต่างๆ มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับในรากในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อพบแนวโน้มปริมาณเชื้อสูงกว่าที่ไม่ได้ใส่แต่เห็นไม่ชัดเจนในลำต้น 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 สายพันธุ์นี้สามารถอยู่แบบเป็นอิสระในดินและยังมีความสามารถในการเป็นเชื้อที่อาศัยในพืชที่เรียกว่า 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 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นอ้อยและน้ำหนักสดเป็นต้นต่อไร่ที่ 12 เดือน เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดการใช้ปุ๋ย N ได้ทั้งหมดตามอัตราแนะนำ ในการศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ด้วยเทคนิค Real-Time PCR (TagMan Probe) สามารถออกแบบ 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 และสามารถโคลนยีนบางส่วนของ nitrogenase reductase ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ด้วย pGEM-T Easy vector ใน *E. coli* DH5 α เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค Real-Time PCR ได้ผลของชีวภัณฑ์เชื้อทั้งสองชนิดที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยซึ่งรวมถึงผลผลิตอ้อยและความหวานของอ้อยที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการตรวจพบปริมาณ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ในดิน ราก และลำต้นอ้อยได้โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR ซึ่งก็ตรวจพบเฉพาะในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อเหล่านั้น จากเทคนิคการศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *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 ปัจจัยของปุ๋ยไม่มีอิทธิพลต่อความหวานของ อ้อยและการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 สามารถลดการใช้ ปุ๋ย N ได้ทั้งหมดตามอัตราแนะนำซึ่งเป็นผลโดยตรงจากเชื้อทั้งสองชนิด

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้ ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประสิทธิ์ ใจศีลที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์หลายๆ ด้านทั้งด้านการปลูก เก็บเกี่ยวผลผลิตและสถิติ

ขอขอบคุณ สุวรรณิ จันทรเพ็ง ที่ให้สถานที่ทดลองซึ่งตั้งอยู่ที่บ้านหนองแขว ตำบลหนองแขว อำเภอพระยืน และให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในเรื่องการปลูกอ้อยรวมทั้งการช่วยจัดหาคนงานมาช่วยในการจัดการไร่อ้อยในช่วงเวลาต่างๆ

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาผู้ช่วยวิจัยได้แก่นายธนพงศ์ ศุภฤกษ์ นางสาวรัตนกร กริมขุนทด ภาควิชาจุลชีววิทยา นางสาวอลิษา นาลาดทา ภาควิชาชีวเคมี และนักศึกษาอีกหลายท่านทั้งภาควิชาจุลชีววิทยาและชีวเคมี ที่มาช่วยงาน ทั้งในการเตรียมเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เตรียมอุปกรณ์ดูแลความเรียบร้อย และงานในแปลงทดลองหลายครั้ง

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 สอดคล้องกับการตรวจพบลักษณะโคโรนียดังกล่าว 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

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 ได้มากและยังพบ 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 นี้บางชนิดมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการ

เจริญเติบโตของอ้อยได้ด้วย 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 ของเชื้อแล้วเปลี่ยนถ่ายไปยังต้นอ้อย เมื่อปลูกอ้อยในสภาวะที่ไม่จำกัด 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 โดยศึกษาเปรียบเทียบกับ การปลูกอ้อยตามปกติในไร่ พบว่า NFB สามารถเพิ่มผลให้อ้อยในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 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 อุตรธานี และนครสวรรค์ พบเชื้อ NFB ที่มีประสิทธิภาพสูงโดยทดสอบเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วยวิธี acetylene reduction assay และพบว่าเชื้อบางไอโซเลตมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นการสร้างสาร indole 3-acetic acid (IAA) และมีคุณสมบัติละลายหินฟอสเฟต (phosphate solubilization) ต่อมา Meesilpand 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 ในวัสดุปลูกทางการเกษตร 2 ชนิด คือพีท (peat) และเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) พบว่าเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในวัสดุปลูกทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำเชื้อในวัสดุปลูกนี้ไปผสมในดินเพื่อใช้ปลูกอ้อยในกระถาง พบว่าหลังจากปลูกอ้อย

ได้ 4 เดือน อ้อยที่ปลูกโดยไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียแต่ใส่เชื้อแบคทีเรีย 3LSO1 ที่เตรียมในพีทมมีการเจริญเติบโตมากกว่าหรือเทียบเท่ากับอ้อยที่ใส่ปุ๋ยยูเรียแต่ไม่ได้ใส่เชื้อ 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 เมื่อแบ่งเอกลักษณ์เชื้อไอโซเลต 3LSO1 และ 5LSO2 พบว่าเป็นเชื้อ *Enterobacter oryzae* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ตามลำดับ

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาเชื้อ NFB2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต 3LSO1 และ 5LSO2 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตหรือเพิ่มผลผลิตของอ้อย โดยเตรียมกล้าเชื้อ NFB ในชอยล์เมต (กากตะกอนในถังวีแนส) ปลอดเชื้อ แล้วนำไปทดลองปลูกอ้อยในสภาพแปลงโดยไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียและหรือใส่ปุ๋ยยูเรียในปริมาณครึ่งอัตราและเต็มอัตราเปรียบเทียบกับการปลูกอ้อยที่ไม่ใส่เชื้อ NFB โดยไม่ใส่ปุ๋ยยูเรียและหรือใส่ปุ๋ยยูเรียในปริมาณครึ่งอัตราและเต็มอัตรา

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดินทางเคมีและจุลชีววิทยาเพื่อศึกษาผลของเชื้อ NFB ได้แก่ *Enterobacter oryzae*, 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 ต่อการลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยปลูกในสภาพแปลงทดลอง

1.2.2 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดินทางเคมีและจุลชีววิทยา

1.2.3 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณและการกระจายของเชื้อ NFB ที่ใส่ลงไปดิน และต้นอ้อยในสภาพแปลงทดลองด้วยเทคนิค Real-Time PCR

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับเมื่อการดำเนินงานเสร็จสิ้นที่เป็นรูปธรรม และตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการ

1.3.1 เป้าหมายของผลผลิต (output) และตัวชี้วัด

ได้กล้าเชื้อ NFB ในในวัสดุปลูกชอยล์เมตเพื่อใช้เพิ่มปริมาณและเป็นวัสดุยึดเกาะของเชื้อทราบผลของเชื้อ NFB ต่อการลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยปลูกในสภาพแปลงทดลอง ทราบปริมาณและการเปลี่ยนแปลงเชื้อ NFB ที่ใส่ลงไปดินและต้นอ้อยทราบการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดินทางเคมี

ตารางที่ 1.1 แสดงผลผลิตและตัวชี้วัดของแผนงานวิจัย

ผลผลิต	ตัวชี้วัด			
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	เวลา	ต้นทุน
1. NFB ในวัสดุปลูก ซอຍล์เมต	กล้าเชื้อบริสุทธิ์อย่างน้อย 5 ลิตร/เชื้อ/วัสดุปลูก	เชื้อแบคทีเรียมีชีวิตรอดและ คงคุณสมบัติในการส่งเสริม การเจริญเติบโตของอ้อยใน ด้านน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง จำนวนกอ และอื่นๆ	สามารถผลิต ได้ภายในเวลา 1 เดือน	20,000
2. ได้อ้อยมีทั้งปริมาณ และคุณภาพเพิ่มขึ้น	ผลผลิตอ้อยในสภาพไร่ เพิ่มขึ้นจากเดิมอย่างมี นัยสำคัญ	อ้อยมีน้ำหนักสด น้ำหนัก แห้ง จำนวนกอ ความหวาน และอื่นๆ มากขึ้น	12 เดือน	300,000
3. คุณสมบัติทางเคมีและ ชีววิทยาของดินดีขึ้น	สามารถลดการใส่ปุ๋ย ไนโตรเจนลงได้อย่างน้อย ครึ่งหนึ่ง ($\frac{1}{2}N$) ปริมาณ จุลินทรีย์ในดินเพิ่มขึ้น	ปริมาณธาตุอาหารN 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. ได้ผลผลิตอ้อยปลูกที่มีคุณภาพทั้งปริมาณและคุณสมบัติเพิ่มขึ้น	น้ำหนักอ้อยต่อไร่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และลดต้นทุนปุ๋ยไนโตรเจนอย่างน้อยครึ่งหนึ่ง ($\frac{1}{2}N$)	เพิ่ม ปริมาณ ธาตุอาหารในพืชและดิน รวมถึงจุลินทรีย์ NFB	หลังจากการวิจัยเสร็จสิ้น	20,000
2. ผลิตรัณฑ์ปุ๋ยจุลินทรีย์ (formulation)	ผลิตรัณฑ์ปุ๋ยจุลินทรีย์ (formulation) ปริมาณที่สามารถผลิตใช้กับแปลงทดลองพื้นที่ประมาณ 4.5 ไร่ได้	ผลิตรัณฑ์ปุ๋ยจุลินทรีย์ (formulation) ที่มีคุณภาพใช้ได้จริงในสภาพแปลงทดลอง	ระหว่างการวิจัยเสร็จสิ้น	-
3. บทความวิชาการ	ตีพิมพ์บทความทางวิชาการ ระดับชาติ และ/หรือนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง	ตีพิมพ์ในวารสารที่มีระบบ Peer review และเป็นที่ยอมรับ	ระหว่างทำวิจัย และ/หรือหลังจากการวิจัยเสร็จสิ้น	
4. นักวิจัยรุ่นใหม่	สามารถผลิตนักวิจัย ซึ่งเป็นนักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาอย่างน้อย 1 คน	นักศึกษามีความรู้ความชำนาญในการผลิตและการใช้ปุ๋ยชีวภาพ	หลังจากการวิจัยเสร็จสิ้น	-
5. การสร้างเครือข่ายกับเกษตรกร	สร้างเครือข่ายกับเกษตรกรอย่างน้อย 1 ราย	เกษตรกรเรียนรู้การใช้ NFB กับการเพาะปลูกอ้อยปลูก	ระหว่างทำวิจัย และ/หรือหลังจากการวิจัยเสร็จสิ้น	
6. การประชุมสัมมนา	เข้าร่วมประชุม สัมมนา และนำเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการ ในรูปแบบโปสเตอร์ หรือปากเปล่าอย่างน้อย 1 เรื่อง	เป็นการประชุมวิชาการในระดับชาติ และ หรือ ระดับนานาชาติ	ระหว่างทำวิจัย และ/หรือหลังจากการวิจัยเสร็จสิ้น	-
7. คู่มือการใช้ผลิตรัณฑ์	ตามความเหมาะสม	เกษตรกรสามารถเข้าใจวิธีการใช้จากคู่มือ	หลังจากการวิจัยเสร็จสิ้น	

1.4 กระบวนการผลักดันผลงานดังกล่าวออกสู่การใช้ประโยชน์

กระบวนการผลักดันผลงานดังกล่าวออกสู่การใช้ประโยชน์ โดยมุ่งเน้นกลุ่มเกษตรกร นักวิชาการ และบริษัทเอกชนที่สนใจการผลิตอ้อยโดยใช้เชื้อ NFB ซึ่งอาจทำได้หลายอย่าง เช่น การจัดทำ website เพื่อเผยแพร่ จัดอบรมเชิงปฏิบัติการ ในเรื่องการผลิตเชื้อ NFB โดยมุ่งเน้นแก่นักวิชาการ และ/หรือ กลุ่มเกษตรกรที่มีระบบการเพาะปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ซึ่งเชื้อ NFB สามารถผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้บำรุงดินได้ ตลอดจนจัดอบรมแนะนำวิธีการจัดการทางการเกษตรเพื่อการนำเชื้อ NFB นี้ไปใช้ประโยชน์ โดยเข้าไปจัดอบรมในองค์การบริหารส่วนตำบล และ/หรืออบรมในมหาวิทยาลัยขอนแก่น 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 มีซี่ฝักเป็นฝ้าขาวๆ 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 ซึ่งกากน้ำตาลเป็นผลพลตรงที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ ด้วย เช่น อุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ เป็นต้น จากการที่น้ำมันในตลาดโลกมีราคาสูงขึ้น ทำให้รัฐบาลส่งเสริมให้มีการผลิตเอทานอลเพื่อผสมในน้ำมันเบนซิน อันเป็นการลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงได้ทางหนึ่ง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มผลผลิตอ้อย

2.2 ความสำคัญของปุ๋ยไนโตรเจนต่อการเพาะปลูกอ้อย

ไนโตรเจน (N) เป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและส่งผลต่อคุณภาพของอ้อย โดยไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิกหรือนิวคลีโอไทด์ คลอโรฟิลล์ และเอนไซม์ หรือน้ำย่อยต่างๆ มีความสำคัญมากต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืชช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของส่วนอ่อนในพืช เช่น ยอดอ่อน ใบอ่อน กิ่ง ก้านอ่อนรากอ่อน ปมอ่อน ซึ่งเป็นส่วนที่กำลังเจริญเติบโตทั้งหลายก็คือการเจริญเติบโตของเซลล์พืชหรือการเพิ่มเซลล์ในเซลล์มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญซึ่งโปรตีนจำเป็นที่จะต้องมี N เป็นองค์ประกอบและเป็นส่วนสำคัญในการแบ่งเซลล์

หรือเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ช่วยให้อ้อยเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบ ทำให้อ้อยแตกกอมีจำนวนลำและน้ำหนักอ้อยมาก ถ้าอ้อยขาด N จะทำให้ใบเหลือง แคร่แกร็นแตกหน่อช้า หน่อไม่เจริญ อ้อยจะแก่เร็วกว่าปกติและคุณภาพอ้อยจะต่ำ ในช่วงแรกที่ปลูกอ้อยจะเจริญเติบโตช้า จึงต้องการ N น้อย และในท่อนพันธุ์มี N ติดมาบ้าง พออ้อยมีรากจึงเริ่มดูดอาหารเพื่อใช้สร้างหน่ออ้อยช่วงนี้อ้อยจะดูด N จากดิน ดินที่มี N น้อยจึงต้องมีการใส่ปุ๋ย N ให้แก่ดิน โดยทั่วไปธาตุ N จะเป็นธาตุอาหารพืชตัวแรกที่ยากที่สุดของพืชทั้งนี้เนื่องจากพืชต้องการธาตุ N ปริมาณมากแต่ N มีการเปลี่ยนรูปอยู่ตลอดเวลา การทำการเกษตรในเขตร้อนทั่วไปในปัจจุบันจำเป็นต้องใช้ปุ๋ย N ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณ N ในธรรมชาติที่ได้จากอินทรีย์วัตถุนั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืชการจัดการใช้ปุ๋ย N ให้กับพืชนั้นต้องคำนึงถึงอัตรา ชนิด เวลาใส่ และวิธีใส่ เพื่อให้ได้มาซึ่งประสิทธิภาพสูงสุด รูปของปุ๋ย N ที่นิยมใช้ในเขตร้อน คือ ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งปุ๋ยทั้งสองชนิดมีข้อดีข้อเสียต่างกัน ดังนี้

1. ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อหว่านลงไปในดินจะไม่สูญเสีย N ง่ายเหมือนปุ๋ยยูเรีย โดยเฉพาะในสภาพพื้นที่ที่เกิดการระเหิด (การสูญเสียจากดินในรูปของก๊าซ, Volatilization) ของแอมโมเนียมสูง

2. ปุ๋ยยูเรียดีกว่าปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต คือมีเนื้อธาตุ N สูงจึงใส่ในอัตราที่น้อยกว่า

แต่ผลตกค้างของปุ๋ย N ในดินหลังฤดูเก็บเกี่ยวไม่ว่าจะเป็นปุ๋ยยูเรียหรือแอมโมเนียมซัลเฟตคือก่อให้เกิดความเป็นกรดในดินแต่ผลตกค้างของปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต ก่อให้เกิดความเป็นกรดสูงกว่าปุ๋ยยูเรียสองเท่า

ส่วนปุ๋ยไนเตรท นิยมน้อยเนื่องจากมีประสิทธิภาพต่ำในเขตร้อนในระยะสัปดาห์แรกๆของการเจริญเติบโตอ้อยจะดูดธาตุ N ในปริมาณมากกว่าที่ต้องการใช้จริงๆความเข้มข้นของ N ในอ้อย ทั้งส่วนบนดินและใต้ดินเพิ่มขึ้นถึงขีดสูงสุดเมื่ออ้อยอายุ 1 เดือน และหลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว การลดลงของ N อาจเนื่องมาจากอัตราการเจริญเติบโตของอ้อยเพิ่มขึ้นซึ่งต้องใช้ N เพิ่มขึ้น เมื่อใส่ปุ๋ย N ในปริมาณมากอัตราการดูดซึมน้ำก็จะเพิ่มขึ้นขณะที่อ้อยอายุ 6 เดือน ส่วนยอดกำลังเจริญเติบโตเต็มที่การดูดซึมน้ำจะเป็นไปอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นอัตราการดูดซึมน้ำจะลดลง

ปริมาณ N ในอ้อยจะแตกต่างกันตามแหล่งปลูกอ้อยและการเก็บเกี่ยวอ้อยที่เก็บเกี่ยวเร็วจะมีปริมาณ N สูงกว่าอ้อยที่มีอายุมากกว่าเสมอทั้งนี้เพราะประสิทธิภาพของการใช้ปุ๋ย N มักจะต่ำเนื่องจาก N ส่วนหนึ่งจะถูกจุลินทรีย์ดินนำไปใช้ส่วนหนึ่งอาจถูกเปลี่ยนรูปเป็นไนเตรทและอาจสูญหายไปโดยการชะล้างหรือบางส่วนอาจจะเหว่สูญหายไปในบรรยากาศซึ่งหมายความว่าต้องใส่ N จำนวนมากกว่าที่พืชดูดมาใช้จริงๆอ้อยปลูกจะสามารถใช้ปุ๋ย N ได้มากกว่าอ้อยต่อเพราะอ้อยปลูกมีระบบรากดีกว่าจึงมีประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยสูงกว่าส่วนอ้อยต่อนั้นเนื่องจากโครงสร้างของดินเสื่อม การระบายอากาศไม่ดีระบบรากจึงมีประสิทธิภาพต่ำกว่าอ้อยปลูกโดยทั่วไปการตรึง N จากอากาศสู่ดินมี 2 กระบวนการ คือ

1. กระบวนการทางชีวภาพ (Biological fixation) ซึ่งจำแนกเป็น 2 พวกคือ

1.1 การตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (Free living nitrogen fixation หรือ Nonsymbiotic nitrogen fixation)

1.2 การตรึงไนโตรเจนแบบภาวะอยู่ร่วมกัน (symbiotic nitrogen fixation)

2. กระบวนการทางปฏิกิริยาเคมี (Electrochemical & Photochemical fixation) ได้แก่ ฟาแลบ ฟาร์ริง ฟาผ่า และการตกของอุกกาบาตเมื่อเกิดฟ้าแลบอุณหภูมิของอากาศสูงขึ้น เกิดการรวมตัวของออกซิเจนและไนโตรเจนเมื่อฝนตกลงมาออกไซด์ของ N จะละลายน้ำ ได้เป็นสารละลายกรดอ่อนๆ เกิดเป็นสารประกอบไนเตรตในดิน

เมื่อเทียบปริมาณ N ที่ตรึงได้พบว่าการตรึง N โดยกระบวนการทางชีววิทยาเกิดโดยการกระทำของสิ่งมีชีวิตซึ่งจะได้ไนเตรตถึงปีละ 54×10^6 เมตริกตันและกระบวนการโดยปฏิกิริยาจากฟาแลบ ฟาผ่าสามารถตรึง N เป็นไนเตรตได้ 7.6×10^6 เมตริกตัน/ปี

ด้วยเหตุนี้จึงมีนักวิจัยได้หากลไกทางชีวภาพที่จะใช้ 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) ไม่ทำให้ผลผลิตอ้อยซีซีเอส จำนวนลำ และน้ำหนักลำ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 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; Reiset *et al*, 2004; Govindarajan *et al*, 2007;) นอกจากนี้ยังพบว่า NFB บางชนิดมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ด้วย เช่นการสร้างสารเหนียวนำไปสร้างฮอร์โมนพืช 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 ต้องมีบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตของ

พืชโดยมีความสามารถในการตรึง 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 ผลิตปล่อยออกมาโดยผ่านระบบที่เรียกว่า 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 ลดลงด้วยเซลล์ของพืชจึงเจริญยืดยาว (หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ, 2548) นอกจากนี้ PGPB บางชนิดยังสามารถสร้างสาร siderophore ซึ่งจะมีผลไปแย่งจับธาตุเหล็กที่อยู่ในดิน ซึ่งเป็นธาตุที่เชื้อก่อโรคพืชมักจะต้องการเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ในขณะที่พืชต้องการธาตุเหล็กน้อยมาก ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืชจึงไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ (หนึ่ง เตียอำรุง และคณะ, 2548; Compant *et al*, 2005)

ตัวอย่างการศึกษา PGPB และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในพืชต่างๆ เช่น

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

Khalid *et al* (2004) แยกเชื้อ PGPB จากดินบริเวณรากข้าวสาลี พบเชื้อที่สร้าง auxin เป็น IAA และ IAM (indole acetamide) จากดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ เมื่อนำเชื้อที่ได้ไปทดลองกับข้าวสาลีที่เพาะเลี้ยงในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ในกระถางพบว่า ทำให้อายุข้าวสาลีที่ปลูกเชื้อ PGPB รวมด้วยยาวขึ้น 17.3% น้ำหนักรากเพิ่มขึ้น 13.5% ลำต้นยาวขึ้น 37.7% น้ำหนักแห้งลำต้นเพิ่มขึ้น 36.3% เมื่อ

เปรียบเทียบกับต้นกล้าที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ PGPB นอกจากนี้ยังทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 14.7% และ 27.5% เมื่อทดลองในกระถางและในสภาพไร่ ตามลำดับ

Reis *et al* (2004) แยกเชื้อ NFB จากดินบริเวณรากพืชและรากของอ้อย ข้าวโพด และหญ้าในบราซิล เม็กซิโก และแอฟริกาใต้ เมื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง บ่งเอกลักษณ์จากปฏิกิริยาชีวเคมีและการศึกษา 16S rRNA พบว่าเป็นเชื้อ *Burkholderiatropica*

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 ทั้งในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่โดยพบว่าในสภาพที่ไม่มี 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 ชนิดต่างๆ เช่น *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia* ทั้งที่เป็นเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมกับอ้อย 2 สายพันธุ์ในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ อุดมสมบูรณ์ปานกลาง และอุดมสมบูรณ์มาก โดยศึกษาเปรียบเทียบกับ การปลูกอ้อยตามปกติในไร่ 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 pneumonia* และได้ศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยโดยใช้เชื้อ diazotroph

ชนิดอื่นด้วยได้แก่ *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum lipoferum* 4B และ *Burkholderia* พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยเมื่อทดลองในกระถาง

2.4 การศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

เทคนิค Real-Time Polymerase Chain reaction (Real-Time PCR) หรือ Quantitative Real-Time polymerase Chain reaction (Q-PCR/qPCR) หรือ kinetics PCR เกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1992 โดยกลุ่มของ Russell Higushi ที่ Roche Molecular Systems เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยาพื้นฐานแบบ PCR ที่มีการเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะและสามารถตรวจสอบและวัดปริมาณยีนที่จำเพาะนั้นได้โดยใช้สารเรืองแสง (Fluorescent) ในรูป Fluorescence dye หรือ Fluorescence probes แบบต่างๆ ทำให้สามารถตรวจหาผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งต่างจาก conventional PCR ที่มีการตรวจวัด PCR product หลังจากปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสิ้นสุดลงแล้วตรวจสอบผลใน agarose gel electrophoresis ในช่วงเริ่มต้นของเทคนิค Real-Time PCR มีการใช้ Fluorescence dye เช่น ethidium bromide (EtBr) ซึ่งสามารถจับกับดีเอ็นเอได้สามารถตรวจวัดปริมาณแสง Fluorescence ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง ultraviolet โดยเป็นการวัดขณะที่ผลผลิต PCR ยังอยู่ใน PCR tube ต่อมาในปี ค.ศ. 1995-1996 มีการผลิตเครื่องมือสำหรับทำ Real-Time PCR ชนิดแรกได้แก่ Perkin-Elmer ABI Prism 7700 Sequence Detection System และตามมาด้วย LightCycler ของบริษัท Idaho Technology (ปัจจุบันผลิตและจำหน่ายโดย Roche Molecular Biochemicals) ในการวัดปริมาณ PCR product ใช้ Fluorescence dye คือ SYBR Green I ซึ่งสามารถจับกับดีเอ็นเอเส้นคู่ (double strand DNA, ds-DNA) ได้เท่านั้นเมื่อมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผ่านไปแล้วแต่ละ cycle ของ PCR จะได้ผลผลิต PCR ที่เป็น ds-DNA เพิ่มขึ้นทำให้วัดปริมาณสัญญาณของ Fluorescence ได้เพิ่มขึ้นด้วย ในปัจจุบันมีการพัฒนา Fluorescence probes ชนิดต่างๆ โดยอาศัยหลักการของ FRET: Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer เช่น Hybridization Probes, Hydrolysis Probes (TaqMan), Molecular Beacons เป็นต้น มีความจำเพาะมากกว่า Fluorescence dye ดังนั้นการทำ Real-Time PCR จึงสามารถตรวจสอบและวัดปริมาณยีนที่จำเพาะแสดงเป็น gene copy numbers หรือเปรียบเทียบปริมาณสัมพันธ์กับยีนเจ้าบ้าน

ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

มีการใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และรา ได้แก่งานวิจัยของ Valera et al (2013) สามารถตรวจวัดปริมาณแบคทีเรีย *Acetobacter malorum* และ *Acetobacter cerevisiae* ใน wine และ vinegar โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR (RT-PCR) ที่ใช้ TaqMan-MGB probes ซึ่งออกแบบมาจากยีนบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ที่อยู่ใน

16S-23S rRNA genes มีความจำเพาะสูง มีความไว (detection limit) อยู่ที่ 10^2 cells/ml ประสิทธิภาพของเทคนิคมากกว่า 80% เป็นเทคนิคที่มีความถูกต้อง จำเพาะ และรวดเร็ว

Kao *et al* (2014) ประยุกต์ใช้เทคนิค TaqMan Fluorescent probe-based quantitative real-time PCR assay สำหรับการตรวจวัดปริมาณเชื้อก่อโรค *Legionella* spp. และ *Legionella pneumophila* ในแหล่งเก็บน้ำดื่มใน Taiwan พบว่าในจำนวนตัวอย่างน้ำ 19 แหล่ง พบเชื้อเหล่านี้ถึง 12 แหล่ง คิดเป็น 63.2%

Korimbocuse *et al* (2002) ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อไวรัสก่อโรค Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) ในอ้อยที่เป็นโรคที่เรียกว่า Yellow leaf syndrome (YLS) ในอ้อยที่ใช้ทำพันธุ์โดยใช้เทคนิค Real-Time Fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay โดยเมื่อเทียบกับเทคนิค enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่า RT-PCR มีประสิทธิภาพและความไวมากกว่า มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้อไม่ให้แพร่กระจาย

นิภา (2552) ได้ใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการศึกษากิจกรรมจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ระเหยในดิน ในโครงการบำบัดฟื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารอินทรีย์ระเหย (เช่น benzene, trichloroethane, Perchloroethylene) แบบ on-situ remediation โดยใช้พืชสีเขียวได้แก่ Vetiver grass, Horse tamarind, Acacia man five, Guinea grass, Napier grass, Sun flower, และ Physic nut เป็นเวลา 272 วัน ณ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยติดตามยีน toluene/benzene dioxygenase ด้วยเทคนิค Real-Time PCR และใช้สารเรืองแสง SYBER green พบว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับปริมาณสารอินทรีย์ระเหยที่ลดลงเมื่อวัดด้วย soil gas monitoring (EcoProbe-5)

ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจน ยังไม่มีรายงานการศึกษาการใช้เทคนิค Real-Time PCR

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิด

เพื่อให้มั่นใจว่าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่ขัดขวางการเจริญของกันและกัน จึงได้ทำการทดลองนี้เพิ่มเติมโดยการทำ dual culture technique โดยใช้เชื้อ *Enterobacter oryzae*, 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2 ขีดลากบนจานอาหาร LB การศึกษาทำ 2 จาน โดยจานที่ 1 จะใช้เชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 จานที่ 2 ใช้เชื้อ *Enterobacter oryzae* 3LSO1 ขีดลากลงมาตรงๆ จากด้านบนลงล่างบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจะขีดลากเชื้อแต่ละชนิดออกไปด้านข้างจากกลางจานบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 1-2 วันตรวจดูการเจริญของเชื้อ

3.2 การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้วัสดุทางการเกษตร

3.2.1 แนวทางการปรับปรุงการใช้ขอยล์เมตเป็นวัสดุตัวพาในการเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

เตรียมเชื้อ NFB ทั้ง 2 ไอโซเลตโดยขีดลากเชื้อบนจานอาหาร LB บ่ม 30°C เป็นเวลา 24-48 hr จากนั้นเจือเชื้อโคโลนีเดี่ยว 8-10 โคโลนีใส่ในอาหารเหลว LB 10 ml บ่มแบบเขย่าที่ 30°C เป็นเวลา 4 hr เพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นใส่เชื้อทั้งหมดลงในอาหารเหลว LB 90 ml ผสมให้เข้ากัน เพื่อใช้ formulate ในขอยล์เมต 2 สภาวะ

- สภาวะแรก ใช้สารแขวนลอยเชื้อ 5 ml ใส่ในถุงที่มีขอยล์เมตปลอดเชื้อ 45 g บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับปริมาณเชื้อที่เวลา 0 วัน และตรวจนับปริมาณเชื้อที่ 5 วัน เพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อ

- สภาวะที่สอง ใช้เชื้อ 90 ml บ่มแบบเขย่าที่ 30°C เป็นเวลา 16 hr หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างเซลล์ แล้วปรับความขุ่นของเชื้อด้วยอาหารเหลว LB ให้มีความขุ่น $OD_{600} = 0.18$ แบ่งใส่ในถุงที่มีขอยล์เมตปลอดเชื้อ 45 g โดยใส่สารแขวนลอยเชื้อถุงละ 5 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับปริมาณเชื้อที่เวลา 0 วัน และตรวจนับปริมาณเชื้อที่ 5 วัน เพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อ

3.2.2 การเตรียมวัสดุทางการเกษตรเพื่อผลิตชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

การทดลองนี้ใช้วัสดุเพาะปลูกทางการเกษตร คือ ขอยล์เมต (soilmate) ซึ่งเป็นกากตะกอนหมักกรองของโรงงานน้ำตาลที่เหลือจากการผลิตเอทานอลหรือกากตะกอนจากบ่อวินาส (vinasse) ซึ่งมีสารอาหารต่างๆ เพื่อใช้เป็นวัสดุพาหะ (Carrier material) สำหรับผลิตชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย โดยนำวัสดุมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารต่างๆ ก่อนทดลอง ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส

(P) โปแตสเซียม (K) และสารอินทรีย์ต่างๆ (Organic matter, OM) จากนั้นซึ่งวัสดุแต่ละชนิด 4.5 kg บรรจุลงในถุงพลาสติกที่มีคอขวดแล้วปิดด้วยจุกสำลี ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งอบไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 Pounds/square inch เป็นเวลา 30 นาที นานติดต่อกันเป็นเวลา 2 วัน

3.2.3 การเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

เตรียมกล้าเชื้อ *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB broth บ่มที่ 30°C, 24 hr เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ จากนั้นผสมเชื้อ 500 ml (ซึ่งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^6 cfu/ml) โดยใช้วัสดุปลูกทางการเกษตรคือ ซอยล์เมต (soil mate) ที่นึ่งฆ่าเชื้อบรรจุในถุงพลาสติกที่มีคอขวดถุงละ 4.5 kg บ่มเชื้อและเก็บที่อุณหภูมิห้องเย็นประมาณ 10°C, 7 วัน เพื่อให้เชื้อยึดเกาะบนวัสดุตัวพา (carrier) ที่เชื้อจะคงอยู่และเข้าไปในพืชได้ ในส่วนของการทดลองควบคุมจะใช้ LB broth ที่ไม่มีเชื้อมาผสมกับวัสดุซอยล์เมต เก็บรักษาเชื้อไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำไปใช้ โดยใช้ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB 2 ถุงต่อแปลงทดลอง (10 kg/แปลง) ตรวจนับปริมาณเชื้อก่อนใช้ในแปลงปลูกทดลอง

3.2.4 การตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างจากถุงชีวภัณฑ์เชื้อเพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียหลังจากใส่เชื้อ NFB เพื่อทำเป็นชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ที่เวลา 0 และ 5 วัน (day after formulation, DAF) โดยทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อและเจือจางที่ละ 10 เท่า ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปิเปตสารแขวนลอยเชื้อแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 ml ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar เกลี่ย (spread) เชื้อให้ทั่วจาน บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับปริมาณแบคทีเรีย แล้วคำนวณจำนวนแบคทีเรีย

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยภายใต้สภาวะแปลงทดลอง

3.3.1 การเตรียมท่อนพันธุ์อ้อย

การเพาะปลูกอ้อยใช้ท่อนพันธุ์อ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 (KK3) โดยใช้แรงงานคนในการเตรียมท่อนพันธุ์ ซึ่งท่อนพันธุ์ที่ใช้จะเป็นท่อนพันธุ์ที่มีความยาวประมาณ 10-25 cm จำนวน 3 ตา/ท่อน

3.3.2 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in randomized complete block design (RCBD) split plot ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยหลักคือ ปัจจัยเชื้อ NFB 4 ระดับเป็น main plot ได้แก่ 1) M1 คือไม่ใส่เชื้อ NFB (ตัวควบคุม) 2) M2 คือใส่เชื้อ 3LSO1 3) M3 คือใส่เชื้อ 5LSO2 4) M4 คือใส่เชื้อผสม 3LSO1 + 5LSO2 ส่วนปัจจัยรองเป็น sub-plot คือปุ๋ยเคมี 3 ระดับ ได้แก่ 1) S1 คือไม่ใส่ N (PK) 2) S2 คือใส่ N ครึ่งอัตรา ($\frac{1}{2}$ N-PK) 3) S3 คือใส่ N เต็มอัตรา (N-PK) รวมทั้งหมด 12 ดำรับทดลองๆ ละ 4 ซ้ำ ชื่อดำรับการทดลองทั้ง 12 ดำรับการทดลองเป็นดังนี้

- 1) M1S1 คือ ไม่ใส่เชื้อ NFB (ตัวควบคุม) และ ไม่ใส่ N (PK)

- 2) M1S2 คือ ไม่ใส่เชื้อ NFB (ตัวควบคุม) และ ใส่ N ครึ่งอัตรา ($\frac{1}{2}$ N-PK)
- 3) M1S3 คือ ไม่ใส่เชื้อ NFB (ตัวควบคุม) และ ใส่ N เต็มอัตรา (N-PK)
- 4) M2S1 คือ ใส่เชื้อ 3LSO1 และ ไม่ใส่ N (PK)
- 5) M2S2 คือ ใส่เชื้อ 3LSO1 และ ใส่ N ครึ่งอัตรา ($\frac{1}{2}$ N-PK)
- 6) M2S3 คือ ใส่เชื้อ 3LSO1 และ ใส่ N เต็มอัตรา (N-PK)
- 7) M3S1 คือ ใส่เชื้อ 5LSO2 และ ไม่ใส่ N (PK)
- 8) M3S2 คือ ใส่เชื้อ 5LSO2 และ ใส่ N ครึ่งอัตรา ($\frac{1}{2}$ N-PK)
- 9) M3S3 คือ ใส่เชื้อ 5LSO2 และ ใส่ N เต็มอัตรา (N-PK)
- 10) M4S1 คือ ใส่เชื้อ 3LSO1 และ 5LSO2 และ ไม่ใส่ N (PK)
- 11) M4S2 คือ ใส่เชื้อ 3LSO1 และ 5LSO2 และ ใส่ N ครึ่งอัตรา ($\frac{1}{2}$ N-PK)
- 12) M4S3 คือ ใส่เชื้อ 3LSO1 และ 5LSO2 และ ใส่ N เต็มอัตรา (N-PK)

ขนาดแปลงทดลองแต่ละ sub-plot ประมาณ $15 \times 9 \text{ m}^2$ ดังนั้นแต่ละ main plot จะมีขนาด $15 \times 27 \text{ m}^2$ และแต่ละ main plot มีร่องน้ำล้อมรอบขนาด 0.7 m (ภาพที่ 3.1 และ 3.2)

3.3.3 การเตรียมแปลงเพาะปลูกอ้อยและการใส่ท่อนพันธุ์

เลือกแปลงทดลองที่ดินมีคุณภาพต่ำ โดยตรวจสอบลักษณะทางเคมีกายภาพของดินก่อนปลูก โดยเก็บดินในระดับความลึกจากผิวดินถึงระดับความลึกประมาณ 30 cm นำไปวิเคราะห์ organic matter, Total N, Total P ความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น เมื่อได้แปลงทดลองที่เหมาะสมซึ่งมีค่า organic matter และ Total N ต่ำ แล้วจึงเตรียมแปลงปลูก ในที่นี้เป็นแปลงของ นางสาวรณิ จันทรเพ็ง ตั้งอยู่ที่บ้านหนองแขว ตำบลหนองแขวอำเภอยะยี่ จังหวัดขอนแก่น จากผลการวิเคราะห์ดินที่ได้จึงได้ดำเนินการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของดินด้วยโดโลไมท์ก่อนปลูกอ้อยประมาณ 2 สัปดาห์ และดำเนินการปลูกอ้อยในวันที่ 21-22 มีนาคม 2558 โดยจ้างนักศึกษาและคนงาน (ภาพที่ 3.3) วัดพื้นที่และใช้รถไถชุดร่องอ้อยให้มีระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 1.5 m (ภาพที่ 3.4) และใส่ท่อนพันธุ์อ้อย (2 ท่อนพันธุ์) ในร่อง (คิดเป็น 1 หลุม) ให้แต่ละหลุมห่างกันประมาณ 50 cm (ภาพที่ 3.5) เนื่องจากแต่ละ subplot มีความยาว 9 m ดังนั้นแต่ละ subplot จะมีร่องอ้อยทั้งหมด 18 หลุม เนื่องจากแต่ละหลุมมี 2 ท่อนพันธุ์ แต่ละท่อนพันธุ์มี 3 ตา ดังนั้นจะมีตาอ้อยทั้งหมด $18 \times 2 \times 3 = 108$ ตา/แปลงย่อย (subplot) ทำในพื้นที่ประมาณ 4.5 ไร่ โดยปลูกอ้อยตามแนวยาวของแปลงในทิศตะวันออก-ตก แต่ละตำรับทดลอง (แปลงย่อย) มีความกว้าง 15 m ยกเว้นซ้ำที่ 2 (R2) ที่มีความกว้าง 14 m ดังนั้นจะปลูกอ้อยได้ 9 แถว โดยให้มีระยะห่างของแต่ละแถวประมาณ 1.5 m ยกเว้นซ้ำที่ 2 (R2) ซึ่งแถวริมทั้ง 2 ด้าน (แถวที่ 1 และ 9) จะปลูกห่างจากขอบเพียง 1 m ดังแสดงในภาพที่ 3.6



ภาพที่ 3.1 รูปวาดแปลงทดลอง 12 ดำรับทดลอง 4 ซ้ำ (R1-R4) แต่ละซ้ำประกอบด้วย 4 main plot (M1-M4) แต่ละ main plot ประกอบด้วย 3 subplot (S1-S3) บริเวณสีเขียวเข้มเป็นต้นไม้ใหญ่ขนาดประมาณ 10x10 m²



ภาพที่ 3.2 แสดงการทำร่องน้ำระหว่าง main plot



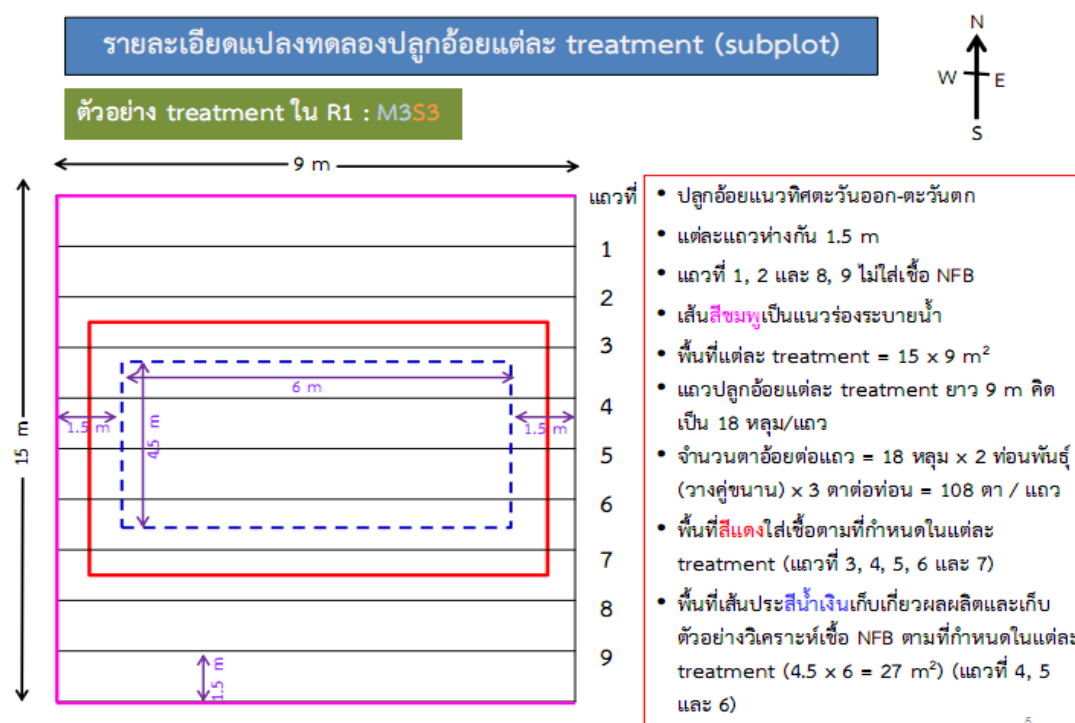
ภาพที่ 3.3 นักศึกษา อาจารย์และคนงานที่ร่วมกันปลูกอ้อยในวันที่ 21-22 มีนาคม 2558
ที่บ้านหนองแวง อ.พระยืน จ.ขอนแก่น



ภาพที่ 3.4 การวัดพื้นที่แปลงปลูกแบ่งเป็นการทำ mainplot และ subplot และใช้รถไถชุดร่อง
อ้อยให้มีระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 1.5 m



ภาพที่ 3.5 การวางท่อนพันธุ์อ้อยจะวาง 2 ท่อนพันธุ์ทุก ๆ 50 cm ในแต่ละ subplot ในร่องอ้อยที่มีระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 1.5



ภาพที่ 3.6 รูปวาดแต่ละแปลงย่อยในซ้ำที่ 1, 2 และ 4 แต่ละแถวจะห่างกัน 1.5 m และห่างจากขอบหรือร่องน้ำ 1.5 m ยกเว้นในซ้ำที่ 2 (R2) แถวที่ 1 และแถวที่ 9 จะปลูกห่างจากร่องน้ำ 1

3.3.4 การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและการใส่ปุ๋ย

การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB (ภาพที่ 3.7) ในวันที่ปลูกอ้อยโดยโรยเชื้อลงไปบริเวณท่อนอ้อย จะใส่ตามตำรับทดลองโดยจะใส่เชื้อเฉพาะในแถวที่ 3-7 และเริ่มใส่เชื้อในหลุมที่ 2-17 ของแต่ละแถว หรือประมาณ 0.5 m จากหัวและท้ายแถว สำหรับอ้อยแถวที่ 1, 2, 8 และ 9 จะปลูกอ้อยโดยไม่ใส่ชีวภัณฑ์เชื้อแต่ใส่ปุ๋ยตามตำรับทดลอง (ภาพที่ 3.6) ปริมาณเชื้อ NFB แต่ละถุงประมาณ 10^7 cfu/g และใส่เพียงครั้งเดียวในปริมาณ 9 kg (2 ถุง $\times$ 4.5 kg) (15X9 ตรม. หรือ 0.084 ไร่) เท่ากับปริมาณเชื้อ 1×10^{10} cfu/0.084 ไร่ หรือใส่ชีวภัณฑ์เชื้ออัตรา 45 kg/ไร่ ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1×10^{12} cfu/ไร่ หลังจากนั้นใช้จอบเกลี่ยดินข้างๆ เพื่อกลบท่อนพันธุ์อ้อยดังภาพที่ 3.8

การใส่ปุ๋ยเคมีครั้งแรกจะใส่หลังจากอ้อยงอกที่อายุประมาณ 5 สัปดาห์ เพื่อไม่ให้ปุ๋ยเคมีมีผลต่อเชื้อที่ใส่ โดยใส่ปุ๋ย N ครั้งอัตรา ($\frac{1}{2}$ N) ของอัตราแนะนำในอ้อยปลูกเขตอาศัยน้ำฝนใช้ 18 กิโลกรัม ไนโตรเจนต่อไร่ และใส่ครั้งที่สองส่วนที่เหลือ อีกครั้งอัตรา ห่างจากการใส่ปุ๋ยครั้งแรกประมาณ 3 เดือน เนื่องจากเป็นดินที่มีอินทรีย์วัตถุต่ำกว่า 1% และเป็นดินร่วนทราย ส่วนปุ๋ย P และ K จะใส่ครั้งเดียวในครั้งแรก โดยสูตรปุ๋ยเคมีที่ใช้ขึ้นกับค่าวิเคราะห์ดินที่ได้ และอ้างอิงการใส่ปุ๋ยตามเอกสารวิชาการลำดับที่ 001/2553 คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ ของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งการใส่ปุ๋ยนั้นจะ ใช้แม่ปุ๋ย และคำนวณปริมาณการใส่ปุ๋ยให้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ โดยแม่ปุ๋ย NPK ที่ใช้คือ 46-0-0, 0-42-0, 0-0-60 ตามลำดับ ในรูปของปุ๋ยยูเรีย (urea) ดับเบิ้ลซูเปอร์ฟอสเฟต (double super phosphate) และ โพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate) โดยตำรับการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB และการใส่ปุ๋ยดังแสดงในภาพที่ 3.1 และ 3.6

เนื่องจากการปลูกอ้อยนอกรอบเขตชลประทานและเป็นช่วงฤดูแล้ง ดังนั้นจึงมีการให้น้ำบาดาลบ้างเป็นครั้งคราวเพื่อให้ดินชุ่มพอที่อ้อยจะงอก



ภาพที่ 3.7 การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB บนท่อนอ้อย



ภาพที่ 3.8 การเกลี่ยดินเพื่อกลบท่อนพันธุ์อ้อย

3.4 การตรวจวิเคราะห์ผลของชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย

การตรวจวิเคราะห์ผลของเชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพแปลงทดลอง จะตรวจสอบเมื่ออ้อยมีอายุ 3, 6 และ 12 เดือน โดยนับจำนวนกอ ลำ ความสูง น้ำหนักต้น นอกจากนี้ยังเก็บข้อมูลการสะสมปริมาณธาตุอาหารหลักในส่วนของลำต้นอ้อยที่ 12 เดือน ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total P) และโปแตสเซียมทั้งหมด (Total K) รวมทั้งค่า N ในรูปที่นำไปใช้ได้ (available N) และค่า P ในรูปที่นำไปใช้ได้ (available P) เป็นต้น โดยส่งไปวิเคราะห์ที่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นอกจากนี้ยังตรวจหาค่าความหวาน (CCS) โดยส่งไปวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยพืชไร่ จังหวัดขอนแก่น

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ Factorial in randomized complete block design (RCBD) และวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรมSPSS

3.5 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ NFB ในดิน และต้นอ้อยในแปลงปลูกทดลอง

3.5.1 การเก็บตัวอย่างดินและต้นอ้อย

3.5.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

การเก็บตัวอย่างดินที่ 0 เดือน แบ่งเป็นตัวอย่างก่อนใส่เชื้อและหลังใส่เชื้อ ทำโดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินประมาณ 1 กิโลกรัมต่อแปลง โดยสุ่มเก็บ 5 จุดใส่ในถุงซิปล็อค จากนั้นคลุกดินให้เข้ากันและสุ่มแบ่งมาประมาณ 100 กรัม เก็บในตู้เย็น 4 °C ก่อนนำไปศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ต่อไป

การเก็บตัวดินที่ 3 เดือน จะใช้ดินที่อยู่บริเวณรากอ้อย โดยเมื่อขุดต้นอ้อยขึ้นมาแล้วนำมาใส่ในถุงพลาสติก เขย่าดินที่อยู่บริเวณรากของต้นอ้อยจำนวน 5 ต้นรวมกัน แยกดินใส่ถุงซิปล็อกเก็บในตู้เย็น 4 °C ก่อนนำไปศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ต่อไป

การเก็บตัวดินที่ 12 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างดิน 5 จุดต่อแปลง จำนวนโดยรวมประมาณ 1 กิโลกรัม โดยการขุดดินบริเวณรอบๆโคนต้นอ้อยใส่ในถุงซิปล็อก จากนั้นคลุกดินให้เข้ากันและสุ่มแบ่งมาประมาณ 100 กรัม เก็บในตู้เย็น 4 °C ก่อนนำไปศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ต่อไป

3.5.1.2 การเก็บตัวอย่างรากและต้นอ้อย

การเก็บตัวอย่างรากและต้นอ้อยที่อายุ 3 เดือนทำการสุ่มเก็บตัวอย่างต้นอ้อย 5 ต้นต่อแปลง โดยการขุดต้นอ้อยขึ้นมาทั้งต้นและราก จากนั้นใส่ในถุงพลาสติก เก็บในตู้เย็น 4 °C ก่อนนำไปศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ต่อไป

การเก็บต้นอ้อยที่อายุ 12 เดือนทำโดยสุ่มตัดต้นอ้อยเหนือดิน 5 ต้นต่อแปลง จากนั้นตัดเอาเฉพาะบริเวณโคนต้นขึ้นมาประมาณ 1 ฟุต ใส่ในถุงพลาสติก เก็บในตู้เย็น 4 °C ก่อนนำไปศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ต่อไป

3.5.2 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเชื้อ NFB ในอาหารสังเคราะห์

ทำการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเชื้อ NFB ในอาหารสังเคราะห์ เมื่ออ้อยมีอายุ 0, 3 และ 12 เดือน ในดินและต้นอ้อย

3.5.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดิน (Free living bacteria) (Idris *et al*, 2007)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างดินบริเวณรอบรากอ้อย 1 กรัม ละลายใน quarter strength Ringer solution ปริมาตร 9 ml และทำ serial dilution ให้มีความเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-9} นำสารละลายดินแต่ละความเจือจางมา 100 μ l เกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร LB และ/หรือ LGIP medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน นับโคโลนีเดียวที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร LB และ/หรือ LGIP medium สังเกตลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายโคโลนีของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ที่เจริญบนจานอาหาร LB medium

3.5.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยในส่วนของราก และต้นอ้อย (Mirza *et al*, 2001)

นำตัวอย่างราก และต้นอ้อย มาทำความสะอาดผิวนอกด้วยน้ำประปาเพื่อล้างเศษดินออก และทำให้ผิวนอกปลอดเชื้อโดยแช่ตัวอย่างอ้อยใน 5% chloramines T และ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ส่วนของต้นอ้อยจะปลอดเปลือกด้วยมีดปลอดเชื้อ ชั่งน้ำหนักแล้วนำส่วนที่ต้องการจุ่มแอลกอฮอล์และผ่านเปลวไฟ นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดโดยใช้โกลบที่ปลอดเชื้อ แล้วทำให้เป็นสารแขวนลอยของตัวอย่างด้วย 5% sucrose ให้ความเข้มข้นเป็น 10^{-1} ทำ

serial dilution ใน quarter strength Ringer solution ให้มีความเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-3} นำสารแขวนลอยแต่ละความเจือจางมา 100 μ l เกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร LB และ/หรือ LGIP medium แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

3.5.3 การตรวจติดตาม *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ด้วยเทคนิค

Real-Time PCR

การตรวจติดตาม NFB ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ใช้ Fluorescence Probes ที่เรียกว่า Hydrolysis Probes (TagMan Probes) โดยออกแบบ probes จากยีนบริเวณที่จำเพาะของ nitrogenase reductase วิธีการเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะบางส่วนของเอนไซม์ชนิดดังกล่าวก่อน แล้ววิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนเพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์และ probes อีกครั้งหนึ่ง

1) การออกแบบไพรเมอร์และ probe สำหรับเชื้อ *Enterobacter oryzae*, 3LSO1

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนของเอนไซม์ nitrogenase reductase สำหรับเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยลำดับเบสของ *nifH* nitrogenase reductase ของเชื้อ *Enterobacter sp.* R4-368 (NC_021500.1) และ *Pseudomonas stutzeri* A1501 (NC_009434.1) จากฐานข้อมูลของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) จากนั้นจึงนำลำดับเบสที่ได้มา alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) หาบริเวณที่ลำดับเบสที่มีความเหมือนกัน มาออกแบบเป็นไพรเมอร์ โดยพิจารณาจากจำนวนของเบสและค่า GC content ของไพรเมอร์ โดยอาศัยโปรแกรม DNA/RNA GC Content Calculator (<http://www.endmemo.com/bio/gc.php>) จากนั้นจึงนำลำดับเบสที่ได้มาคำนวณซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ทราบค่า Tm ของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo calc: Oligonucleotide properties calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) ซึ่งจะช่วยให้ทราบทั้งจำนวนของเบส ค่า GC content และ Tm ของไพรเมอร์ไปพร้อมๆกัน นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยยังได้ใช้ไพรเมอร์ของ Poly และคณะ (2001) ซึ่งเป็น specific primers สำหรับ *nifH* gene เพื่อเปรียบเทียบผลของ PCR product ระหว่างไพรเมอร์ที่มีการรายงานมาก่อนกับไพรเมอร์ที่คณะผู้วิจัยได้ออกแบบเอง

2) การออกแบบไพรเมอร์และ probe สำหรับเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 นั้นได้ทดลองออกแบบจากยีนหลายยีนดังนี้ (1) nitrogenase reductase (*nifH*) ของเชื้อ *Enterobacter sp.* R4-368 (NC_021500.1) และ *Pseudomonas stutzeri* A1501 (NC_009434.1) (2) nitrate reductase subunit alpha ของ *S. maltophilia* K279a (NC_010943.1), *S. maltophilia* R551-3

(NC_011071.1) และ *S. maltophilia* JV3 (NC_015947.1) (3) nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha (*nifD*) ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 (NC_007493.2) , *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (NC_004463.1) และ *Pseudomonas stutzeri* A1501 (NC_009434.1) และ (4) nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta (*nifK*) ของเชื้อ *P. stutzeri* A1501 (NC_009434.1) , *Burkholderia xenovorans* LB400 (NC_007952.1) และ *B. japonicum* USDA 110 (NC_004463.1)

3) การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์, ตัวอย่างอ้อยและตัวอย่างดิน

การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์นำ cell culture ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ ZR Soil Microbe DNA MiniPrep (Zymo Research, USA) โดยนำ 3ml cell culture มาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000xg เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์แบคทีเรีย เติม lysis solution ปริมาตร 750µl แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Vortex GENIE 2 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 µl จากนั้นถ่ายสารละลายปริมาตร 800 µl สู่ Zymo-Spin IIC Column ที่วางบน collection tube แล้วจึงนำ column ไปปั่นเหวี่ยง 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน spin filter ทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติม DNA Pre-Wash Buffer ปริมาตร 200 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน spin filter ทิ้ง แล้วเติม Soil DNA wash Buffer ปริมาตร 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที จึงย้าย spin filter ไปวางในหลอด 1.5 ml (micro tube) จากนั้นเติม DNA Elution Buffer ปริมาตร 50 µl ตั้งหลอดทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง spin filter เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากอ้อยนำสารแขวนลอยของอ้อยใน 5% sucrose ปริมาตร 3-4ml มาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์ จากนั้นเติม lysis solution ปริมาตร 750µl ส่วนการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของตัวอย่างดินจะใช้ดิน 1 กรัมต่อตัวอย่าง และมีขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเช่นเดียวกันกับการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อบริสุทธิ์

4) การทดสอบความจำเพาะไพรเมอร์ต่อการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยา PCR

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อการเพิ่มจำนวนยีนของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ด้วยปฏิกิริยา PCR ทำโดยนำไพรเมอร์มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 2 ชนิด โดยมีองค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 10 µl ของ Maxima Hot Start PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 0.5 µl ของ 10 µM ของไพรเมอร์แต่ละเส้น, 2 µl ของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เติมน้ำให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl และใช้สภาวะในปฏิกิริยา PCR ดังนี้

1)pre-denature ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5นาที่ จำนวน 1 รอบ 2)denaturationที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา30วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา45วินาที จำนวน40 รอบและ 3)final extensionที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา5นาที่ จำนวน 1 รอบ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR แล้วจึงนำสารละลายดีเอ็นเอที่ ไปแยกดูแถบดีเอ็นเอด้วย 1 % agarose gelelectrophoresis

5) การหาลำดับเบสของ PCR product

ส่งชิ้น PCR product ของเชื้อทั้งสองชนิดที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบไปหาลำดับเบสที่บริษัท BIOBASIC ประเทศมาเลเซีย และที่บริษัท 1st base ประเทศมาเลเซีย เพื่อยืนยันผลของลำดับเบส

6) การวิเคราะห์ผลของลำดับเบสและออกแบบ probe

นำลำดับเบสที่ได้ของเชื้อทั้งสองชนิดไปวิเคราะห์ด้วยการนำไป blast กับฐานข้อมูลของ NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) จากนั้นนำข้อมูลมาเปรียบเทียบและหาลำดับเบสบริเวณต่างกันระหว่างเชื้อ *E.oryzae*, 3LSO1หรือ *S. maltophilia*, 5LSO2 กับเชื้อที่ได้จากฐานข้อมูลเพื่อออกแบบ probe ที่จำเพาะต่อ *E. oryzae*, 3LSO1และ *S. maltophilia*, 5LSO2 เท่านั้น

7) การสร้างกราฟมาตรฐานและการตรวจติดตาม NFB ด้วยเทคนิค Real time PCR

สร้างกราฟมาตรฐานจากการทำ 10-fold serial dilution ของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยโคลนขึ้นยีนnitrogenase reductase ของเชื้อ*E. oryzae*, 3LSO1และ *S. maltophilia*, 5LSO2ด้วย pGEM-T Easy vector (Promega, USA) จากนั้นจึงนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E.coli* DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณ คัดเลือกโคโลนีที่มีขึ้นยีนด้วยวิธี colonyPCR นำโคโลนีที่มีขึ้นยีนแทรกอยู่มาสกัดพลาสมิดด้วยชุด plasmid purification kit (QIAGEN, USA) แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดหาความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop spectrophotometer (Maestrogen, USA) เมื่อทราบความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอจึงนำมาคำนวณค่าเป็น copy number ตามสมการดังนี้(Whelan et al.,2003)

DNA (copy)

$$= \frac{6.02 \times 10^{23}(\text{copy/mol}) \times \text{DNA amount(g)}}{\text{DNA length(dp)} \times 660(\text{g/mol/dp})}$$

จากนั้นจึงนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทำ10-fold serial dilution (ประมาณ $7.71 \times 10^6 - 7.71 \times 10^1$ copies/ μl) มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์และ Taqman probe ด้วยเครื่อง real time PCR (Roche, Switzerland) โดยมีองค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 10 μl ของ FastStart Essential DNA Probes Master (Roche, Switzerland), 0.5 μl ของ 10 μM ของไพรเมอร์แต่ละเส้น, 0.4 μl ของ Taqman probe, 5 μl ของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)เติมน้ำให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 μl

และใช้สภาวะในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 1) pre-denature ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 50 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 40 รอบ และนำค่า Ct ที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหาปริมาณยีนในตัวอย่างที่ต้องการ

8) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจติดตาม NFB ด้วยเทคนิค Real time PCR มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of Variance; ANOVA) แบบ randomized complete block จากนั้นเปรียบเทียบข้อมูลแบบ all-pairwise comparisons ด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม Statistix 8

9) การหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของการหาปริมาณเชื้อ NFB ในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค Real-Time PCR

นำเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 หรือ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่เจริญในอาหารเหลว (LB broth) จำนวน 1×10^{10} CFU/ml มาเติมลงในดินแล้วทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ ZR Soil Microbe DNA MiniPrep (Zymo Research, USA) จำนวน 5 ซ้ำ เทียบกับการสกัดเชื้อจากอาหารเหลวโดยตรง นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดหาความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop และนำมาเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี real time PCR แล้วหา % recovery ด้วยสมการ

$$\% \text{ DNA recovery} = \frac{\text{DNA amount from soil extraction} \times 100}{\text{DNA amount from cell culture extraction}}$$

$$\% \text{ gene copy number recovery} = \frac{\text{Gene copy number from soil extraction} \times 100}{\text{Gene copy number from cell culture extraction}}$$

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิด

การทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 โดยการทำ dual culture technique บนจานอาหาร LB พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน คือไม่ส่งเสริมหรือขัดขวางการเจริญของกันและกัน ดังภาพที่ 4.1 เชื้อเจริญเป็นอิสระต่อกัน แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อผสมของ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ในไร้สามารถทำได้เพราะเชื้อไม่ขัดขวางการเจริญของกันและกัน



ภาพที่ 4.1 การทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 โดยการทำให้ dual culture technique (A= *S. maltophilia* 5LSO2, B= *E. oryzae* 3LSO1)

4.2 คุณสมบัติของขอยล์เมตและการใช้ขอยล์เมตเป็นวัสดุตัวพาในการเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารต่างๆ ในขอยล์เมตพบว่าไนโตรเจนทั้งหมด (total N) 4.75 mg/kg ฟอสฟอรัสทั้งหมด (total P) 5.43 mg/kg โพแทสเซียมทั้งหมด (total K) 25.88 mg/kg และแคลเซียม 2.58%

สืบเนื่องจากการเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อ NFB โดยใช้ขอยล์เมตเป็นวัสดุตัวพาที่ผ่านมานั้น อาจทำให้เชื้อ NFB เจริญได้ไม่สม่ำเสมอ อันเนื่องมาจากปริมาณสารแขวนลอยเชื้อ NFB ที่ใส่ลงไปนั้นมากเกินไป

เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณซอฮอล์เมต (1 l ต่อซอฮอล์เมต 4 kg) ประกอบกับซอฮอล์เมตมีลักษณะเป็นเม็ดแข็ง ละลายนํ้ายาก จึงได้ศึกษาสภาวะการเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ด้วยซอฮอล์เมตใหม่โดยเปรียบเทียบการศึกษาเป็น 2 สภาวะ ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณในสภาวะแรกที่ใส่เชื้อในปริมาตร 1/10 (v/w) ได้ดีกว่าในสภาวะที่ 2 ที่ใส่เชื้อในปริมาตร 2/10 (v/w) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารแขวนลอยเชื้อในสภาวะที่ 2 มีปริมาตรมากเกินไปดังที่กล่าวแล้ว ทำให้มีบางส่วนของสารแขวนลอยเชื้อที่ยังไม่ผสมเข้ากับซอฮอล์เมตซึ่งจะนอนก้นอยู่ที่ก้นถุง สุวรรณ และคณะ (2554) รายงานการเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 โดยใช้วัสดุปลูก 2 ชนิด ได้แก่ พีทหรือเวอร์มิคูไลท์ โดยใส่เชื้อในปริมาตร 2/10 (v/w) พบว่าเชื้อเพิ่มปริมาณได้ดีจนถึงวันที่ 60 หลังจากเตรียมชีวภัณฑ์ เชื้อก็ยังคงมีปริมาณเพิ่มขึ้นอยู่ นอกจากนี้ยังพบว่าการผสมสารแขวนลอยเชื้อกับวัสดุปลูกทั้ง 2 ชนิดมีความสม่ำเสมอดี ทั้งนี้เพราะเนื้อสัมผัสของพีทและเวอร์มิคูไลท์ที่มีลักษณะร่วนซุยจึงสามารถดูดซับสารแขวนลอยเชื้อได้อย่างทั่วถึงไม่เหลือเป็นสารแขวนลอยอยู่ที่ก้นถุง

ตารางที่ 4.1 ปริมาณเชื้อ NFB ในที่ตรวจพบในซอฮอล์เมตจากการเตรียมเชื้อด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน

สภาวะการเตรียมเซลล์ เชื้อ/ซอฮอล์เมต (v/w)	เชื้อ NFB	OD เริ่มต้น	ปริมาณเซลล์ (cfu/g)	
			0 DAF	5 DAF
สภาวะแรก (1/10)	<i>E. oryzae</i> 3LSO1	0.16	7.57	8.67
	<i>S. maltophilia</i> 5LSO2	0.16	7.50	9.73
สภาวะที่สอง (2/10)	<i>E. oryzae</i> 3LSO1	0.18	8.78	9.14
	<i>S. maltophilia</i> 5LSO2	0.19	9.15	8.15

DAF = day after formulation

จากผลการทดลองจะเห็นว่าเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีหลังจากที่ formulate เชื้อเป็นเวลา 5 วัน โดยในสภาวะแรกเชื้อเพิ่มปริมาณมากกว่าในสภาวะที่สอง (ที่มีการเพิ่มปริมาณเชื้อโดยการบ่มแบบเขย่า) หลังจากนั้นมีการปั่นล้างเซลล์ก่อนที่จะปรับความขุ่นเชื้อในอาหารเหลว LB แล้วจึง formulate ในซอฮอล์เมต) จากผลการทดลองนี้ ผู้วิจัยจะใช้สภาวะแรกในการ formulate เชื้อ ซึ่งไม่ต้องเสียเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ต้องบ่มแบบเขย่าอีก 16 hr และปั่นล้างเซลล์ โดยการ formulate เชื้อที่ปรับปรุงวิธีการในครั้งนี้ สิ่งที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมที่เคยปฏิบัติที่สำคัญคือ ปริมาณเชื้อที่ใช้ในการ formulate ในครั้งนี้ใช้ปริมาณเชื้อต่อซอฮอล์เมตเป็น 1:10 (เชื้อ 5 ml : ซอฮอล์เมต 45 g) ทำให้สารแขวนลอยเชื้อผสมเข้ากับซอฮอล์เมตได้ทั่วถึงและไม่มีสารแขวนลอยของเชื้อตกค้างที่ก้นถุง ในขณะที่การเตรียมเชื้อแบบเดิมจะใช้เชื้อต่อซอฮอล์เมตเป็น 1:5 (เชื้อ 10 ml : ซอฮอล์เมต 40 g) ทำให้เมื่อผสมสารแขวนลอยของเชื้อเข้ากับซอฮอล์เมตแล้ว ยังมีสารแขวนลอยของเชื้อตกค้างที่ก้นถุงซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อเพิ่มปริมาณได้ไม่ดีเท่าที่ควร

4.3 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะเลือกแปลงที่มีปริมาณ N ต่ำเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ NFB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย จึงได้เก็บตัวอย่างดินจากหลายสถานที่ เพื่อเตรียมดินก่อนเริ่มปลูกอ้อย ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าดินที่อำเภอป่าพอง จากทั้ง 2 แหล่งมีความอุดมสมบูรณ์มากที่สุด โดยลักษณะดินเป็นดินร่วนเหนียว ส่วนดินที่อำเภอพระยืนเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ โดยมีอินทรีย์วัตถุน้อยกว่า 1% ประกอบกับมีพื้นที่เพียงพอในการทำแปลงทดลอง ดังนั้นจึงเลือกแปลงอำเภอพระยืนเพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ จากค่าวิเคราะห์ดินที่ได้พบว่าดินค่อนข้างเป็นกรดจึงปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของดินด้วยโดโลไมต์ก่อนปลูกอ้อยเป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ก่อนปลูกอ้อย

สถานที่เก็บตัวอย่าง	pH	Organic matter(%)	Total N (mg/kg)	Total P (mg/kg)	Available P (mg/kg)	Total K (mg/kg)
ดิน ศูนย์วิจัยพืชไร่ ร้อยเอ็ด R1	5.08	0.5	250	23.65	ND	25.25
R2	5.15	0.56	280	21.99	ND	34.41
R3	4.96	0.63	320	25.62	ND	23.21
R4	5.16	0.64	320	20.94	ND	28.2
ดิน อ.ป่าพอง ขอนแก่น S1	5.28	1.586	786.46	357.89	9.76	5424.89
S2	7.12	1.192	580.87	299.53	25.29	4724.87
ดิน อ.พระยืน ขอนแก่น S3	4.73	0.427	209.58	81.69	4.31	349.99
S4	4.68	0.666	326.31	84.29	6.12	354.85

ND = not determined

4.4 การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้ซอฮอล์เมต

จากที่มีการปรับเปลี่ยนวิธีการเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อ NFB โดยใช้สารแขวนลอยเชื้อต่อซอฮอล์เมตเป็น 1:10 (v/w) และเก็บชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ไว้ที่อุณหภูมิ 10°C พบว่าเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณในซอฮอล์เมตได้ประมาณ 1-2 log cfu/g หลังจากบ่มไว้ 17 วันและเชื้อยังคงมีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์เชื้อ NFB หลังจากบ่มไว้ 30 วันผลดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเชื้อ NFB ที่ตรวจนับได้จากวัสดุปลูกขอยล์เมต

Condition	Bacterial count (log cfu/g)				
	0 DAF	17 DAF		30 DAF	
	Total	Total	NFB	Total	NFB
control (soilmate+broth)	0	0	0	0	0
3LSO1 (soilmate)	5.63	6.96	6.51	7.62	5.78
5LSO2 (soilmate)	5.15	7.24	7.23	6.68	6.47
3LSO1 + 5LSO2 (soilmate)	4.84	7.81	6.40	7.95	5.75

DAF = Day after formulation control = No NFB

3LSO1 = *Enterobacter oryzae* 3LSO1 5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

4.5 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 3, 6 และ 12 เดือน

ภาพรวมแปลงทดลองหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าอ้อยเริ่มแทงยอดให้เห็นดังแสดงในภาพที่ 4.2 โดยซ้ำที่ 1, 2, 3 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์การงอกจากน้อยไปหามากตามลำดับ แต่ยังไม่ถึง 50% เนื่องจากมีฝนตกประปรายในช่วงนี้ทำให้อ้อยเริ่มงอกเพิ่มมากขึ้นทุกวัน จึงยังไม่สามารถสรุปอัตราการงอกที่แท้จริงได้ และได้ดำเนินการใส่ปุ๋ยเคมีครั้งแรกเมื่ออายุอ้อยประมาณ 5 สัปดาห์ และในอีกประมาณ 3 เดือน จะใส่ปุ๋ย N ครั้งที่ 2 ตามเอกสารวิชาการลำดับที่ 001/2553 คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ ของกรมวิชาการเกษตร โดยภาพอ้อยที่อายุ 3 เดือน แสดงในภาพที่ 4.3 และภาพอ้อยที่อายุ 12 เดือนแสดงในภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.2 ภาพรวมแปลงอ้อยในซ้ำที่ 3 และ 4 หลังจากปลูกอ้อยได้ 5 สัปดาห์



ภาพที่ 4.3 ภาพแปลงอ้อยในซ้ำที่ 2 หลังจากปลูกอ้อยได้ 3 เดือน



ภาพที่ 4.4 ภาพแปลงอ้อยในซ้ำที่ 3 หลังจากปลูกอ้อยได้ 12 เดือน

4.5.1 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และการนำไฟฟ้าของดินหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน

การวิเคราะห์ค่าความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และการนำไฟฟ้าของดินหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน พบว่าค่าความชื้นของดินและความเป็นกรด-ด่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$ ส่วนค่าการนำไฟฟ้าของดินพบว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ NFB มีค่าการนำไฟฟ้าของดินต่ำกว่ากลุ่มที่มีการใส่เชื้อ NFB เล็กน้อยโดยค่าเฉลี่ยการนำไฟฟ้าของดินที่ไม่ได้รับเชื้อ NFB เท่ากับ 0.0271 dS/m ซึ่งต่ำกว่าค่าเฉลี่ยการนำไฟฟ้าของดินรวมทั้งหมดที่เท่ากับ 0.031 dS/m (ตารางที่ 4.4) เนื่องจากช่วงที่เก็บผลผลิตนั้นคือเดือนมีนาคมฝนไม่ตกมาเป็นระยะเวลานาน (ฝนทิ้งช่วงมาตั้งแต่ต้นเดือนตุลาคม จนเก็บเกี่ยวผลผลิต) ทำให้ความชื้นในดินต่ำมากเฉลี่ย 2.98%

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และค่าการนำไฟฟ้า ของดินหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน

Treatment	Physico-chemical characteristic of soil		
	Humidity (%)	pH	Electrical conductivity(dS/m)
Control, PK	2.83 ^{ab}	6.98 ^{abc}	0.027 ^b
Control, ½N-PK	2.74 ^{ab}	7.25 ^a	0.026 ^b
Control, N-PK	2.95 ^{ab}	7.09 ^{abc}	0.027 ^b
3LSO1, PK	2.52 ^b	6.87 ^c	0.034 ^{ab}
3LSO1, ½N-PK	3.38 ^a	6.91 ^{bc}	0.031 ^{ab}
3LSO1, N-PK	3.04 ^{ab}	7.21 ^{ab}	0.034 ^{ab}
5LSO2, PK	2.96 ^{ab}	7.11 ^{abc}	0.033 ^{ab}
5LSO2, ½N-PK	3.04 ^{ab}	7.06 ^{abc}	0.035 ^a
5LSO2, N-PK	2.85 ^{ab}	7.12 ^{abc}	0.030 ^{ab}
Mixed, PK	3.20 ^{ab}	7.08 ^{abc}	0.033 ^{ab}
Mixed, ½N-PK	3.19 ^{ab}	6.98 ^a	0.035 ^{ab}
Mixed, N-PK	3.02 ^{ab}	7.08 ^{abc}	0.030 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยรวม	2.98	7.06	0.031
CV (%)	9.72	1.58	10.56

Control = No NFB

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *Enterobacter oryzae* 3LSO1 5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

* = ตัวอักษร ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.5.2 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ NFB ในดิน และอ้อย หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 0, 3 และ 12 เดือน

การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ NFB ในดิน หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 0, 3 และ 12 เดือน พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยเป็น $\log$ 6.45, 6.33 และ 5.11 cfu/g และเชื้อ NFB มีค่าเฉลี่ยเป็น $\log$ 5.94, 5.54 และ 4.63 cfu/g ตามลำดับ จะสังเกตว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ NFB มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกตำรับทดลอง และปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ NFB ในดินทั้งก่อนและหลังใส่เชื้อ NFB มีปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก โดยพบว่าที่เวลา 12 เดือนซึ่งตรงกับเดือนมีนาคมนั้นเป็นช่วงที่ฝนไม่ตกมาเป็นระยะเวลานาน (ฝนทั้งช่วงตั้งแต่ต้นเดือนตุลาคมจนเก็บเกี่ยวผลผลิต) ทำให้ความชื้นในดินต่ำมากค่าเฉลี่ย 2.98% (ตารางที่ 4.4) ส่งผลให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในดินในเดือนที่ 12 ลดลง 1-2 $\log$ cfu/g (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดิน ก่อนใส่เชื้อ NFB และหลังจากใส่เชื้อเมื่อปลูกอ้อยได้ 0, 3 และ 12 เดือน

Treatment	Total count (log cfu/g)				NFB count (log cfu/g)			
	0MAT		3	12	0MAT		3	12
	Before	After			Before	After		
Control, PK	6.30 ^a	6.21 ^b	6.21 ^{ab}	4.84 ^b	6.48 ^{ab}	5.93 ^{ab}	5.27 ^d	4.63 ^{abc}
Control, ½N-PK	6.19 ^{ab}	6.26 ^{ab}	6.78 ^a	5.10 ^{ab}	6.14 ^c	5.82 ^{ab}	5.53 ^{abcd}	4.62 ^{abc}
Control, N-PK	6.09 ^{ab}	6.45 ^{ab}	6.45 ^{ab}	5.10 ^{ab}	6.59 ^a	5.76 ^a	5.38 ^{cd}	4.58 ^{bc}
3LSO1, PK	6.10 ^{ab}	6.55 ^{ab}	6.18 ^{ab}	5.12 ^{ab}	6.22 ^{bc}	6.02 ^{ab}	5.44 ^{bcd}	4.80 ^{abc}
3LSO1, ½N-PK	6.02 ^b	6.11 ^{ab}	6.55 ^{ab}	5.15 ^{ab}	6.10 ^c	5.89 ^{ab}	5.42 ^{cd}	4.42 ^c
3LSO1, N-PK	6.17 ^{ab}	6.37 ^{ab}	6.39 ^{ab}	5.14 ^{ab}	6.16 ^c	6.03 ^{ab}	5.67 ^{ab}	4.44 ^c
5LSO2, PK	6.22 ^{ab}	6.97 ^a	6.41 ^{ab}	5.16 ^{ab}	6.31 ^{abc}	6.05 ^{ab}	5.31 ^d	4.46 ^{bc}
5LSO2, ½N-PK	6.18 ^{ab}	6.21 ^{ab}	6.92 ^a	5.12 ^{ab}	6.19 ^{bc}	6.09 ^a	6.00 ^a	4.40 ^c
5LSO2, N-PK	6.07 ^{ab}	6.38 ^{ab}	5.94 ^b	5.10 ^{ab}	6.14 ^c	5.91 ^{ab}	5.48 ^{abcd}	4.64 ^{abc}
Mixed, PK	6.07 ^{ab}	6.82 ^{ab}	5.23 ^b	5.14 ^{ab}	6.05 ^c	6.04 ^{ab}	5.6 ^{acdb}	4.70 ^{abc}
Mixed, ½N-PK	6.11 ^{ab}	6.55 ^{ab}	6.37 ^{ab}	5.20 ^a	6.24 ^{bc}	5.86 ^{ab}	5.58 ^{abcd}	4.87 ^{ab}
Mixed, N-PK	6.09 ^{ab}	6.53 ^{ab}	6.55 ^{ab}	5.20 ^a	6.20 ^{bc}	5.90 ^{ab}	5.86 ^{abc}	4.99 ^a
ค่าเฉลี่ยรวม	6.13	6.45	6.33	5.11	6.24	5.94	5.54	4.63
CV (%)	5.07	6.51	6.97	1.83	4.63	3.69	5.94	4.04

control = No NFB

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *Enterobacter oryzae* 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplanting

* = ตัวอักษร ^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

สำหรับค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และเชื้อ NFB ที่ตรวจพบในรากและลำต้นอ้อย หลังจากปลูกอ้อยได้ 3 และ 12 เดือน (ตารางที่ 4.6) โดยมีข้อสังเกตว่าในตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 จะตรวจพบโคโลนีที่มีลักษณะสีขาว ขอบเรียบ บนอาหาร LB ซึ่งคล้ายโคโลนีของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 ส่วนตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 ตรวจพบโคโลนีลักษณะสีเหลือง ขอบเรียบ ขนาดเล็ก ผิวหนานูน บนอาหาร LB ซึ่งคล้ายโคโลนีของเชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 สำหรับตำรับทดลองที่ใส่เชื้อผสมก็ตรวจพบลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ เช่นกันโดยปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในอ้อยจะต่ำกว่าที่ตรวจพบในดิน การตรวจพบโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ทั้งในดินและในอ้อยทั้งในรากและลำต้นแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถอยู่แบบเป็นอิสระในดิน (free living) และยังมีคุณสมบัติของการเป็นเชื้อที่อาศัยในพืชแบบไม่เป็น

อันตรายต่อพืชที่เรียกว่า endophyte ด้วย ทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพื่อเป็นประโยชน์ต่อพืชดีขึ้น

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในรากและลำต้นอ้อยเมื่อปลูกอ้อยได้ 3 และ 12 เดือน

Treatment	Total count (log cfu/g)			NFB count (log cfu/g)		
	3MAT		12MAT	3MAT		12MAT
	Root	Shoot		Root	Shoot	
Control, PK	1.03 ^c	0.71 ^{abc}	1.24 ^{bc}	0.00 ^d	0 ^b	1.21 ^{ab}
Control, ½N-PK	1.13 ^c	1.58 ^{abc}	1.55 ^{abc}	0.00 ^d	0.02 ^b	1.45 ^{ab}
Control, N-PK	2.01b ^c	0.71 ^{abc}	0.95 ^c	1.25 ^{bcd}	0 ^b	0.73 ^b
3LSO1, PK	2.05b ^c	0.97 ^{abc}	1.28 ^{bc}	0.85 ^{bcd}	0.31 ^a	1.48 ^{ab}
3LSO1, ½N-PK	3.44 ^a	0.62 ^{abc}	1.48 ^{abc}	2.20 ^{abc}	0 ^b	1.00 ^{ab}
3LSO1, N-PK	1.48 ^c	0.63 ^{abc}	1.80 ^{abc}	0.24 ^{cd}	0.03 ^b	1.27 ^{ab}
5LSO2, PK	2.14b ^c	0.52 ^c	1.90 ^{ab}	1.40 ^{bcd}	0 ^b	2.02 ^a
5LSO2, ½N-PK	3.53 ^a	0.54 ^{bc}	1.56 ^{abc}	2.65 ^{ab}	0 ^b	1.40 ^{ab}
5LSO2, N-PK	2.20b ^c	1.69 ^{abc}	2.32 ^a	1.58 ^{abcd}	0 ^b	1.37 ^{ab}
Mixed, PK	1.82 ^c	2.23 ^{ab}	1.90 ^{ab}	0.72 ^{bcd}	0.07 ^b	1.60 ^{ab}
Mixed, ½N-PK	3.29 ^{ab}	2.33 ^a	1.67 ^{abc}	2.40 ^{ab}	0 ^b	1.16 ^{ab}
Mixed, N-PK	3.68 ^a	1.22 ^{abc}	2.06 ^{ab}	3.40 ^a	0.06 ^b	1.53 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยรวม	2.32	1.14	1.64	1.39	0.04	1.35

control = No NFB

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *Enterobacter oryzae* 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplanting

* = ตัวอักษร ^a ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.5.3 ผลของการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อความหวาน Polarity, Fiber, CCS และ Purity ของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน

การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB มีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย โดยพบว่า

1) Brix ในอ้อย ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.788) ส่วนชนิดของเชื้อที่แตกต่างกันมี Brix แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (sig. = 0.002) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันมี Brix แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. = 0.165) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD เชื้อ M1 มีปริมาณ Brix แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M2 มีปริมาณ Brix แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1 และ M3 (sig. < 0.05) เชื้อ M3 มีปริมาณ Brix แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M1 มีปริมาณ Brix

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับเชื้อ M3 (sig.> 0.05) เชื้อ M2 มีปริมาณ Brix แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับเชื้อ M4 (sig.> 0.05) สูตรปุ๋ย S1, S2 และ S3 มีปริมาณ Brix แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีผลต่อการเพิ่มค่า Brix ของอ้อยที่ 12 เดือน

2) Pol ในอ้อย ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันมีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.012) ส่วนชนิดของเชื้อที่ต่างกัน มีค่า Pol แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (sig. = 0.000) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันมี Pol แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. = 0.377) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD เชื้อ M1 มีค่า Pol แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M2 มีค่า Pol แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1 และ M3 (sig. < 0.05) เชื้อ M3 มีค่า Pol แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M4 มีค่า Pol แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1 และ M3 (sig. < 0.05) เชื้อ M1 มีค่า Pol แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับเชื้อ M3 (sig.> 0.05) เชื้อ M2 มีค่า Pol แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับเชื้อ M4 (sig.> 0.05) สูตรปุ๋ย S1, S2 และ S3 มีค่า Pol แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีอิทธิพลต่อการเพิ่มค่า Pol ของอ้อยที่ 12 เดือน

3) Fiber ในอ้อย ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.111) ส่วนชนิดของเชื้อที่ต่างกันและระดับของการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันมี Fiber แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. = 0.960 และ 0.533 ตามลำดับ) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD เชื้อ M1, M2, M3 และ M4 มีค่า Fiber แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) สูตรปุ๋ย S1, S2 และ S3 มีค่า Fiber แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์และสูตรปุ๋ยไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มค่า Fiber ของอ้อยที่ 12 เดือน

4) CCS ในอ้อย ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.587) ส่วนชนิดของเชื้อที่ต่างกันมี CCS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (sig. = 0.000) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันมีผล CCS แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. = 0.247) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD เชื้อ M1 มีปริมาณ CCS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2, M3 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M3 มีปริมาณ CCS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M2 มี CCS แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับเชื้อ M3 และ M4 (sig.> 0.05) สูตรปุ๋ย S1, S2 และ S3 มีค่า CCS แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีผลต่อการเพิ่มค่า CCS ของอ้อยที่ 12 เดือน

5) Purity ในอ้อย ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.270) ส่วนชนิดของเชื้อที่ต่างกันมี Purity แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. = 0.14) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันมี Purity แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. = 0.114 ตามลำดับ) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD เชื้อ M1 มี Purity แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับ

เชื้อ M2 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M3 มี Purity แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับเชื้อ M1, M2 และ M4 (sig. > 0.05) สูตรปุ๋ย S2 มีปริมาณ Total K แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรปุ๋ย S3 (sig. < 0.05) สูตรปุ๋ย S1 มีค่า Purity แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับสูตรปุ๋ย S2 และ S3 (sig. > 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์และสูตรปุ๋ยไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มค่า Purity ของอ้อยที่ 12 เดือน

การวัดปริมาณความหวาน โพลาไรตี ไฟเบอร์ ซีซีเอส และความบริสุทธิ์ของอ้อยหลังปลูกอ้อย 12 เดือนโดยส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ พบว่าเปอร์เซ็นต์ค่าความหวาน โพลาไรตี และซีซีเอสเฉลี่ยที่วัดได้จากตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 เท่ากับ 23.09, 20.19 และ 14.90 และที่ใส่เชื้อผสมของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 เท่ากับ 23.26, 20.42 และ 15.05 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าตำรับทดลองอื่นๆ เล็กน้อย ในขณะที่ตำรับทดลองที่เป็นตัวควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ NFB แต่ใส่ปุ๋ย N-PK ครบจะมีเปอร์เซ็นต์ค่าความหวาน โพลาไรตี และซีซีเอสเฉลี่ยเท่ากับ 22.43, 19.51 และ 14.32 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) แสดงให้เห็นว่าเชื้อเชื้อทั้งสองชนิด น่าจะเพิ่มความหวานได้เล็กน้อย ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการสะสม Total N ที่ส่วนหนึ่งนำไปสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างน้ำตาล และยังไม่พบรายงานเช่นเดียวกันนี้

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความหวาน โพลาไรตี ไฟเบอร์ ซีซีเอส และความบริสุทธิ์ของอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน

Treatment	Sugar Brix(°)	Pol (%)	Fiber (%)	CCS (%)	Purity (%)
Control, PK	21.83 ^b	18.52 ^c	14.23 ^a	13.48 ^c	86.02 ^b
Control, ½N-PK	22.36 ^{ab}	19.76 ^{ab}	14.70 ^a	14.00 ^b	86.78 ^{ab}
Control, N-PK	22.43 ^{ab}	19.51 ^{ab}	14.70 ^a	14.32 ^{abc}	86.99 ^{ab}
3LSO1, PK	22.64 ^{ab}	19.80 ^{ab}	13.90 ^a	14.71 ^{ab}	87.48 ^{ab}
3LSO1, ½N-PK	23.26 ^a	20.39 ^a	13.40 ^a	15.09 ^a	87.65 ^a
3LSO1, N-PK	23.36 ^a	20.38 ^a	13.30 ^a	14.90 ^{ab}	87.48 ^{ab}
5LSO2, PK	22.47 ^{ab}	20.11 ^{ab}	14.23 ^a	14.38 ^{abc}	87.41 ^{ab}
5LSO2, ½N-PK	22.53 ^{ab}	19.24 ^{bc}	14.33 ^a	14.64 ^{ab}	87.84 ^a
5LSO2, N-PK	22.47 ^{ab}	18.57 ^c	13.97 ^a	14.30 ^{abc}	86.03 ^b
Mixed, PK	23.24 ^a	20.47 ^a	14.00 ^a	14.99 ^a	88.09 ^a
Mixed, ½N-PK	23.27 ^a	20.49 ^a	13.10 ^a	15.28 ^a	88.04 ^a
Mixed, N-PK	23.27 ^a	20.29 ^a	13.80 ^a	14.87 ^{ab}	87.19 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยรวม	22.76	19.79	13.97	14.58	87.25
CV (%)	2.20	3.57	3.68	3.50	0.79

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter oryzae* 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant Pol = polarity

* = ตัวอักษร ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.5.4 ผลการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย

4.5.4.1 ผลต่ออัตราการงอกและการเจริญเติบโตของอ้อยที่ 3 และ 6 เดือน

การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB มีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย โดยพบว่า

1) อัตราการงอกของอ้อยในตำรับทดลองกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ยครบสูตรมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 52.08% ในขณะที่ค่าเฉลี่ยรวมของทุกตำรับทดลองเท่ากับ 55.90% โดยกลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการใส่ปุ๋ย N ครึ่งอัตรา มีอัตราการงอกมากที่สุด (ตารางที่ 4.8) พบว่าชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน ($\text{sig} = 0.230$) ส่วนชนิดของเชื้อที่ต่างกันมีผลต่ออัตราการงอกของต้นอ้อย แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 ($\text{sig} = 0.000$) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันมีผลต่ออัตราการงอกของต้นอ้อย ($\text{sig} = 0.014$) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD พบว่าการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB M1 และ M4 มีจำนวนหน่อต่อต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 และ M3 ($\text{sig} < 0.05$) ส่วน M2 และ M3 มีอัตราการงอกของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($\text{sig} > 0.05$) ในส่วนของการใส่ปุ๋ยพบว่า S1 และ S2 มีอัตราการงอกของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($\text{sig} < 0.05$) S1 และ S3 มีอัตราการงอกของต้นอ้อย แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($\text{sig} > 0.05$) และ S3 มีอัตราการงอกของต้นอ้อย แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับปุ๋ย S1 และ S2 ($\text{sig} > 0.05$) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีผลดีต่ออัตราการงอกของต้นอ้อย ในขณะที่ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ไม่มีอิทธิพลต่อความแตกต่างของอัตราการงอกของต้นอ้อย

2. จำนวนหน่อ/ต้น (3 เดือน) ในตำรับทดลองกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ยครบสูตรมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.96 หน่อ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยรวมของทุกตำรับทดลองเท่ากับ 1.52 หน่อ โดยกลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการใส่ปุ๋ย N ครึ่งอัตรา มีจำนวนหน่อ/ต้นมากที่สุด (ตารางที่ 4.8) พบว่าชนิดของเชื้อและระดับของการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน ($\text{sig} = 0.987$) ส่วนชนิดของเชื้อที่ต่างกันมีผลต่อจำนวนหน่อต่อต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($\text{sig} = 0.000$) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันไม่มีผลต่อจำนวนหน่อต่อต้นของต้นอ้อย ($\text{sig} = 0.422$) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยพบว่าการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB M1 มีจำนวนหน่อ/ต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2, M3 และ M4 ($\text{sig} < 0.05$) ในเชื้อ M1 M2 และ M4 มีจำนวนหน่อ/ต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($\text{sig} < 0.05$) และเชื้อ M3 มีจำนวนหน่อ/ต้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 และ M4 ($\text{sig} > 0.05$) ในส่วนของการใส่ปุ๋ยพบว่าปุ๋ย S1, S2 และ S3 มีจำนวนหน่อ/ต้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($\text{sig} > 0.05$) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีผลดีต่อจำนวนหน่อ/ต้นของต้นอ้อย ในขณะที่ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ไม่มีอิทธิพลต่อความแตกต่างของจำนวนหน่อ/ต้นของต้นอ้อย

3) ความสูงที่ 3 เดือน ในตำรับทดลองกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ยครบสูตรมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 78.75 cm ในขณะที่ค่าเฉลี่ยรวมของทุกตำรับทดลองเท่ากับ 90.01 cm โดยกลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการใส่ปุ๋ย N ครึ่งอัตรา มีค่าความสูงมากที่สุด (ตารางที่ 4.8) พบว่าชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่ต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน ($\text{sig} = 0.794$) ส่วนชนิดของเชื้อที่ต่างกันมีผลต่อความสูง

ของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (sig. = 0.000) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อความสูงของต้นอ้อย (sig. = 0.005) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยพบว่าการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB M1 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2, M3 และ M4 (sig. < 0.05) ส่วนเชื้อ M2 และ M4 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) ในส่วนของการใส่ปุ๋ยพบว่าปุ๋ย S2 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับปุ๋ย S1 และ S3 (sig. < 0.05) ส่วนปุ๋ย S3 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญสูตรปุ๋ย S1 (sig.> 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีผลต่อความสูงของต้นอ้อย ในขณะที่ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ไม่มีอิทธิพลต่อความสูงของต้นอ้อย

4) น้ำหนักแห้งที่ 3 เดือนในตำรับทดลองกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ยครบสูตรมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.05 g ในขณะที่ค่าเฉลี่ยรวมของทุกตำรับทดลองเท่ากับ 15.73 g โดยกลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการใส่ปุ๋ย N ครึ่งอัตรามีน้ำหนักแห้งมากที่สุด (ตารางที่ 4.8) พบว่าชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันมีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.013) ส่วนชนิดของเชื้อที่แตกต่างกันมีผลต่อน้ำหนักแห้งของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (sig. = 0.000) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อน้ำหนักแห้งของต้นอ้อย (sig. = 0.123) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยพบว่าการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB M1 มีน้ำหนักแห้งของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 (sig. < 0.05) การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ M2 มีน้ำหนักแห้งของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1 และ M3 (sig. < 0.05) การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ M3 มีน้ำหนักแห้งของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 และ M4 (sig. < 0.05) และ การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ M4 มีน้ำหนักแห้งของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M3 (sig. < 0.05) ในส่วนของการใส่ปุ๋ยพบว่าปุ๋ย S1, S2 และ S3 มีน้ำหนักแห้งของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีผลต่อน้ำหนักแห้งของต้นอ้อย ในขณะที่ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ไม่มีอิทธิพลต่อน้ำหนักแห้งของต้นอ้อย

5) จำนวนลำ/กอที่ 6 เดือน ในตำรับทดลองกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ยครบสูตรมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.32 ลำ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยรวมของทุกตำรับทดลองเท่ากับ 3.15 ลำ โดยกลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการใส่ปุ๋ย N ครึ่งอัตรามีจำนวนลำ/กอมากที่สุดคือตำรับ M2S2 M3S2 และ M4S2 เท่ากับ 3.58 3.65 และ 4.04 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) พบว่าชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.751) ซึ่งชนิดของเชื้อต่างกันมีผลต่อจำนวนลำ/กอของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (sig. = 0.000) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันมีผลต่อจำนวนลำ/กอของต้นอ้อย (sig. = 0.000) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยพบว่าการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB M1 มีจำนวนลำต่อกอของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2, M3 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M2 และ M3 มีจำนวนลำต่อกอของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) เชื้อ M3 และ M4 มีจำนวนลำต่อกอของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) และ เชื้อ M2 มีจำนวนลำต่อกอของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1 และ M4 (sig.> 0.05) ในส่วนของ

การใส่ปุ๋ยพบว่าปุ๋ย S2 มีจำนวนลำตอกของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับปุ๋ย S1 และ S3 ($\text{sig.} < 0.05$) ปุ๋ย S3 มีจำนวนลำตอกของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญสุตปุ๋ย S1 และ S2 ($\text{sig.} > 0.05$) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีผลดีต่อการเพิ่มจำนวนลำ/กอ ในขณะที่ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ไม่มีอิทธิพลต่อความแตกต่างของจำนวนลำ/กอ

6) ความสูงที่ 6 เดือน ในตำรับทดลองกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ยครบสูตรมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 143.22 cm ในขณะที่ค่าเฉลี่ยรวมของทุกตำรับทดลองเท่ากับ 137.9 cm โดยกลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการใส่ปุ๋ย N ครบสูตรมีค่าความสูงมากที่สุด (ตารางที่ 4.8) พบว่าชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันมีอิทธิพลร่วมกัน ($\text{sig} = 0.005$) ซึ่งชนิดของเชื้อต่างกันไม่มีผลต่อความสูงของต้นอ้อย ($\text{sig.} = 0.274$) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันมีผลต่อความสูงของต้นอ้อย ($\text{sig.} = 0.004$) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยพบว่าการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB M2 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1 และ M3 ($\text{sig.} < 0.05$) เชื้อ M1 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 ($\text{sig.} < 0.05$) เชื้อ M3 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2 ($\text{sig.} < 0.05$) เชื้อ M2 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับเชื้อ M4 ($\text{sig.} > 0.05$) เชื้อ M3 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับเชื้อ M1 และ M4 ($\text{sig.} > 0.05$) และเชื้อ M4 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับเชื้อ M1, M2 และ M3 ($\text{sig.} > 0.05$) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีผลต่อความสูงของต้นอ้อย ในขณะที่ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่มีอิทธิพลต่อความสูงของต้นอ้อย

โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีผลดีต่ออัตราการงอกของต้นอ้อย จำนวนหน่อ/ต้น, ความสูง, น้ำหนักแห้งของต้นอ้อยที่ 3 เดือน มีผลดีต่อการเพิ่มจำนวนลำ/กอที่ 6 เดือน แต่ไม่มีผลต่อความสูงของต้นอ้อยที่ 6 เดือน

ในขณะที่ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ไม่มีอิทธิพลต่อความแตกต่างของอัตราการงอก, จำนวนหน่อ/ต้น, ความสูง, น้ำหนักแห้งของต้นอ้อยที่ 3 เดือน, จำนวนลำ/กอที่ 6 เดือน แต่มีอิทธิพลต่อความสูงของต้นอ้อยที่ 6 เดือน

การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB มีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย โดยพบว่าค่าเฉลี่ยอัตราการงอก จำนวนหน่อ/ต้น (3 เดือน) จำนวนลำ/กอ (6 เดือน) ความสูง (3 และ 6 เดือน) น้ำหนักแห้ง (3 เดือน) ของอ้อยในตำรับทดลองกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ยครบสูตรเท่ากับ 52.08%, 0.96 หน่อ, 2.32 ลำ, 78.75 cm, 143.22 cm และ 12.05 g ในขณะที่ค่าเฉลี่ยรวมของทุกตำรับทดลองเท่ากับ 55.90%, 1.52 หน่อ, 3.15 ลำ, 90.01 cm, 137.9 cm และ 15.73 g ตามลำดับ โดยกลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อ NFB ร่วมกับการใส่ปุ๋ย N ครึ่งอัตรา มีอัตราการงอก จำนวนหน่อ/ต้น (3 เดือน) จำนวนลำ/กอ (6 เดือน) และน้ำหนักแห้ง (3 เดือน) มากที่สุด จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ NFB ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ (ตารางที่ 4.8) และช่วยลดการใช้ปุ๋ย N ได้อย่างน้อยครึ่งหนึ่งของอัตราแนะนำ

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยอัตราการงอก จำนวนหน่อ/ต้น จำนวนลำ/กอ ความสูง น้ำหนักแห้งต้น หลังปลูก
อ้อยได้ 3 และ 6 เดือน

Treatment	อัตราการงอก (%)	จำนวนหน่อ/ต้น (3 เดือน)	จำนวนลำ/กอ (6 เดือน)	ความสูง (cm)		น้ำหนักแห้ง(g) (3 เดือน)
				(3 เดือน)	(6 เดือน)	
Control, PK	41.67 ^c	0.91 ^c	1.98 ^d	73.00 ^c	111.15 ^c	10.28 ^f
Control, ½N-PK	45.84 ^{bc}	0.97 ^c	2.09 ^{cd}	84.44 ^{bc}	142.00 ^a	14.41 ^{de}
Control, N-PK	52.08 ^{bc}	0.96 ^{bc}	2.32 ^{bcd}	78.75 ^c	143.22 ^a	12.05 ^{ef}
3LSO1, PK	53.13 ^{bc}	1.94 ^a	3.05 ^{abc}	86.67 ^{bc}	152.50 ^a	12.94 ^{ef}
3LSO1, ½N-PK	60.42 ^{ab}	1.91 ^a	3.58 ^a	96.44 ^{ab}	134.67 ^{ab}	16.62 ^{bcd}
3LSO1, N-PK	51.04 ^{bc}	1.92 ^a	3.06 ^{abc}	87.75 ^{bc}	145.72 ^a	14.27 ^{de}
5LSO2, PK	53.13 ^{bc}	1.49 ^{abc}	3.31 ^{ab}	92.17 ^b	115.68 ^{bc}	15.06 ^{cde}
5LSO2, ½N-PK	60.42 ^{ab}	1.88 ^{ab}	3.65 ^a	109.33 ^a	137.40 ^{ab}	18.18 ^{abc}
5LSO2, N-PK	53.13 ^{bc}	1.71 ^{abc}	3.46 ^a	94.78 ^{ab}	143.87 ^a	19.25 ^{ab}
Mixed, PK	59.38 ^{ab}	1.40 ^{abc}	3.22 ^{ab}	94.00 ^{ab}	145.58 ^a	14.26 ^{de}
Mixed, ½N-PK	70.84 ^a	1.73 ^{abc}	4.04 ^a	92.08 ^b	134.93 ^{ab}	21.62 ^a
Mixed, N-PK	69.79 ^a	1.39 ^{abc}	4.01 ^a	90.75 ^b	142.84 ^a	19.77 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยรวม	55.90	1.52	3.15	90.01	137.46	15.73
CV (%)	9.48	9.63	8.31	9.34	8.57	20.40

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter oryzae* 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

Pol = polarity

* = ตัวอักษร ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.5.4.2 ผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อยที่ 12 เดือน

การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB มีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย โดยพบว่า

1) ความสูงของต้นอ้อย ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.717) ซึ่งชนิดของเชื้อต่างกันและระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีผลความสูงของต้นอ้อย (sig. = 0.897 และ 0.943 ตามลำดับ) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยเชื้อ M1, M2, M3 และ M4 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) และสูตรปุ๋ย S1, S2 และ S3 มีความสูงของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig.> 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์และปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนไม่มีผลต่อความสูงของต้นอ้อยที่ 12 เดือน

2) เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.349) ส่วนชนิดของเชื้อที่แตกต่างกันมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (sig. = 0.000) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันมีผลต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (sig. = 0.008) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยเชื้อ M1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2, M3 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M2, M3 และ M4 มีจำนวนลำตอกของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. > 0.05) สูตรปุ๋ย S1 และ S3 มีจำนวนลำตอกของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (sig. < 0.05) สูตรปุ๋ย S2 และ S3 มีจำนวนลำตอกของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. > 0.05) สูตรปุ๋ย S1 และ S2 มีจำนวนลำตอกของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. > 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์และปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนมีผลต่อการเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อย

3) น้ำหนักต้นอ้อย (ต้น/ไร่) ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig. = 0.258) ซึ่งชนิดของเชื้อต่างกันและระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อน้ำหนักต้นอ้อย (sig. = 0.480 และ 0.532 ตามลำดับ) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยเชื้อ M4 มีน้ำหนักของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1 และ M2 (sig. < 0.05) เชื้อ M1 มีน้ำหนักของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ กับเชื้อ M2 และ M3 (sig. < 0.05) เชื้อ M3 มีน้ำหนักของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ กับเชื้อ M1, M2 และ M4 (sig. < 0.05) และสูตรปุ๋ย S1, S2 และ S3 มีน้ำหนักของต้นอ้อยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญสูตรปุ๋ย (sig. > 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มทำให้น้ำหนักต้นอ้อย (ต้น/ไร่) สูงกว่าที่ไม่ได้ใส่เชื้อ โดยเฉพาะในตำรับเชื้อผสม (M4S1, M4S2, M4S3 = 16.8, 14.8, 14.0 ตามลำดับ) ให้ผลผลิตสูงสุดและต่างกับที่ไม่ใส่เชื้อ (M1S1, M1S2, M1S3 = 7.2, 9.8, 11.1 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ

แม้ว่าความสูงและขนาดของลำต้นอ้อยเฉลี่ยของอ้อยกลุ่มควบคุมที่ได้รับปุ๋ย N เต็มอัตรา และกลุ่มที่ได้รับเชื้อ NFB และจะไม่แตกต่างกันนัก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสด (ต้น/ไร่) จะพบว่าอ้อยที่ได้รับเชื้อ NFB ทุกตำรับทดลองทั้งที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย N หรือใส่ปุ๋ย N ทั้งครึ่งและเต็มอัตรา (โดยเฉพาะกลุ่มที่ใส่ปุ๋ย N ครึ่งอัตรา) มีน้ำหนักสด (ต้น/ไร่) มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับปุ๋ย N เต็มอัตรา แสดงให้เห็นว่าเชื้อ NFB ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อยและสามารถทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีได้ โดยพบว่าผลผลิตของอ้อยจากกลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1, *S. maltophilia* 5LSO2 และเชื้อผสมเพิ่มขึ้นตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) ซึ่งข้อมูลนี้สัมพันธ์กับตารางที่ 4.8 ซึ่งน่าจะเป็นเพราะเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถผลิตสาร IAA (Meesilp et al, 2014) แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตของอ้อยในตำรับการทดลองที่ใส่และไม่ใส่ปุ๋ยเคมี N ทุกตำรับที่ใส่ NFB มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณปุ๋ยไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มผลผลิตอ้อยเมื่อมีเชื้อ NFB อยู่ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่า ปุ๋ยจุลินทรีย์ NFB สามารถทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้

โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์และปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนไม่มีผลต่อความสูงของต้นอ้อยที่ 12 เดือน แต่มีผลต่อการเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อย และการใส่เชื้อ

NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มทำให้น้ำหนักต้นอ้อย (ต้น/ไร่) สูงกว่าที่ไม่ได้ใส่เชื้อ โดยเฉพาะในตำรับเชื้อผสมให้ผลผลิตสูงสุดและต่างกับที่ไม่ใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญ และแสดงให้เห็นว่าปริมาณปุ๋ยไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มผลผลิตอ้อยเมื่อมีเชื้อ NFB อยู่ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่า ปุ๋ยจุลินทรีย์ NFB สามารถทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีในโตรเจนได้ทั้งหมดตามอัตราแนะนำ

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อย และน้ำหนักสดอ้อย หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน

Treatment	ความสูง (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อยบริเวณ			น้ำหนักสด (ต้น/ไร่)
		โคนต้น (มม.)	กลางต้น (มม.)	ยอด (มม.)	
Control, PK	216.9 ^c	30.11 ^{bcd}	26.97 ^d	27.22 ^{cd}	7.2 ^d
Control, ½N-PK	235.7 ^{abc}	30.76 ^{bcd}	28.25 ^{bcd}	28.26 ^{bcd}	9.8 ^{cd}
Control, N-PK	254.1 ^{ab}	31.65 ^{bcd}	29.44 ^{bcd}	29.90 ^{bcd}	11.1 ^{bc}
3LSO1, PK	226.4 ^{bc}	33.10 ^b	31.06 ^{bcd}	30.89 ^{bcd}	11.5 ^{bc}
3LSO1, ½N-PK	245.4 ^{abc}	33.17 ^b	32.42 ^{bc}	30.69 ^{bcd}	12.4 ^{bc}
3LSO1, N-PK	243.8 ^{abc}	32.70 ^b	30.82 ^{bcd}	31.74 ^{bcd}	11.5 ^{bc}
5LSO2, PK	235.8 ^{abc}	31.69 ^{bcd}	28.77 ^{bcd}	29.14 ^{bcd}	11.1 ^{bc}
5LSO2, ½N-PK	248.3 ^{abc}	32.23 ^{bc}	31.55 ^{bcd}	31.77 ^{bcd}	13.9 ^{ab}
5LSO2, N-PK	238.6 ^{abc}	39.49 ^{ab}	31.55 ^{bcd}	31.84 ^{bcd}	11.7 ^{bc}
Mixed, PK	247.6 ^{abc}	32.47 ^b	30.19 ^{bcd}	29.88 ^{bcd}	16.8 ^a
Mixed, ½N-PK	262.3 ^a	32.84 ^b	31.25 ^{bcd}	30.61 ^{bcd}	14.8 ^{ab}
Mixed, N-PK	262.3 ^a	33.17 ^b	31.38 ^{bcd}	31.48 ^{bcd}	14.0 ^{ab}
ค่าเฉลี่ยรวม	243.1	32.78	30.30	30.29	12.15
CV (%)	5.55	5.58			20.58

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter oryzae* 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant Pol = polarity

* = ตัวอักษร ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.5.5 ผลการใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB ต่อการสะสมปริมาณธาตุ NPK หลังจากปลูกอ้อย 12 เดือน

4.5.5.1 ผลต่อการสะสมธาตุ NPK ในอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน

1) Total N ในอ้อย ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.148) ส่วนชนิดของเชื้อที่แตกต่างกันมี Total N แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (sig. = 0.000) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันมีผล Total N แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. = 0.216) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยเชื้อ M1 มี Total N แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M2, M3 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M2, M3 และ M4 มี Total N แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. > 0.05) สูตรปุ๋ย S1, S2 และ S3 มี Total N แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. > 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีอิทธิพลต่อการเพิ่มปริมาณ Total N ในอ้อย ถึงแม้ว่าปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ Total N ในอ้อยอย่างมีนัยสำคัญก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับการที่เชื้อก็มีอิทธิพลต่อการเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอ้อยและน้ำหนักต้นอ้อย (ต้น/ไร่)

2) Total P ในอ้อย ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.224) ส่วนชนิดของเชื้อที่แตกต่างกันมี Total P แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (sig. = 0.000) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันมีผล Total P แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (sig. = 0.005) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยเชื้อ M1 มีปริมาณ Total P แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M3 และ M4 (sig. < 0.05) เชื้อ M2 และ M4 มี Total P แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (sig. < 0.05) เชื้อ M4 มีปริมาณ Total P แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1, M2 และ M3 (sig. < 0.05) สูตรปุ๋ย S1 มีปริมาณ Total P แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับ สูตรปุ๋ย S2 และ S3 (sig. < 0.05) สูตรปุ๋ย S2 และ S3 มีปริมาณ Total P แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. > 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์มีอิทธิพลต่อการเพิ่มปริมาณ Total P ในอ้อย

3) Total K ในอ้อย ชนิดของเชื้อและระดับการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันไม่มีอิทธิพลร่วมกัน (sig = 0.453) ส่วนชนิดของเชื้อที่แตกต่างกันมี Total K แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. = 0.101) และระดับของการใส่ปุ๋ยที่แตกต่างกันมี Total K แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (sig. = 0.011) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี LSD โดยเชื้อ M1 มีปริมาณ Total K แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M3 (sig. < 0.05) เชื้อ M2 มี Total K แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ กับเชื้อ M3 และ M4 (sig. > 0.05) เชื้อ M4 มีปริมาณ Total K แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ M1, M2 และ M3 (sig. > 0.05) สูตรปุ๋ย S1 มีปริมาณ Total K แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับ สูตรปุ๋ย S2 และ S3 (sig. < 0.05) สูตรปุ๋ย S2 และ S3 มีปริมาณ Total K แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (sig. > 0.05) โดยสรุปการใส่เชื้อ NFB ทั้งสองสายพันธุ์และการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มปริมาณ Total K ในอ้อย

การสะสมปริมาณ Total NPK ในอ้อย (ตารางที่ 4.10) หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน พบว่าทุกตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB มีการสะสมปริมาณ Total N และ P ในอ้อยมากกว่าตำรับทดลองที่เป็นกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ย N เต็มอัตรา โดยพบว่าตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ

S.maltophilia 5LSO2 และใส่ปุ๋ย N เพียงครึ่งหนึ่งจะมีค่า Total N มากกว่าตำรับทดลองที่ไม่ใส่หรือใส่ N เต็มอัตรา ซึ่งสัมพันธ์กับผลผลิตที่ได้ (ตารางที่ 4.9) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sevilla *et al* (2001) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อ NFB ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สามารถละลายฟอสเฟตให้ได้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์แก่อ้อยได้ สำหรับค่า Total K ในอ้อยมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ใส่เชื้อ NFB และกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยปริมาณ Total NPK ของต้นอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน

Treatment	ค่าเฉลี่ยปริมาณธาตุอาหารในต้นอ้อย		
	Total N (%)	Total P(%)	Total K(%)
Control, PK	0.070 ^d	0.035 ^{ab}	0.278 ^a
Control, ½N-PK	0.091 ^{cd}	0.023 ^{cd}	0.217 ^{abc}
Control, N-PK	0.093 ^{cd}	0.021 ^d	0.199 ^{abc}
3LSO1, PK	0.147 ^{bc}	0.027 ^{bcd}	0.187 ^{abc}
3LSO1, ½N-PK	0.133 ^{bcd}	0.027 ^{bcd}	0.186 ^{abc}
3LSO1, N-PK	0.217 ^a	0.027 ^{bcd}	0.129 ^{bc}
5LSO2, PK	0.149 ^{abc}	0.038 ^a	0.268 ^a
5LSO2, ½N-PK	0.182 ^{ab}	0.032 ^{abc}	0.150 ^{bc}
5LSO2, N-PK	0.159 ^{abc}	0.025 ^{cd}	0.119 ^{abc}
Mixed, PK	0.154 ^{abc}	0.042 ^a	0.223 ^{ab}
Mixed, ½N-PK	0.163 ^{ab}	0.039 ^a	0.211 ^{abc}
Mixed, N-PK	0.154 ^{abc}	0.037 ^a	0.199 ^{abc}
ค่าเฉลี่ยรวม	0.143	0.031	0.197
CV (%)	28.78	22.74	24.63

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter oryzae* 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

Total N = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

Total P = ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด Total K = ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด

* = ตัวอักษร ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.5.5.2 ผลต่อการสะสมธาตุอาหารในดินหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน

การวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินของทุกตำรับทดลอง หลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน (ตารางที่ 4.11) พบว่าตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 และเชื้อผสมของ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 มีค่ามากกว่าตำรับทดลองควบคุมที่ใส่ปุ๋ย

N เต็มอัตรา แต่อย่างไรก็ตามเมื่อดูค่าทางสถิติแล้วพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ Total N และ Total P ในดิน พบว่าทุกตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB มีปริมาณ Total N และ Total P ในดินมากกว่าตำรับทดลองที่เป็นกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ย N เต็มอัตรา แต่อย่างไรก็ตามเมื่อดูค่าทางสถิติแล้วพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับ available N ในดินในรูป NH_4^+ พบว่าตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB ค่าเฉลี่ยที่ได้ส่วนใหญ่ต่ำกว่าตำรับทดลองควบคุมที่ใส่ปุ๋ย N เต็มอัตรา แต่อย่างไรก็ตามเมื่อดูค่าทางสถิติแล้วพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นบางตำรับทดลอง ได้แก่ตำรับทดลองที่ใส่เชื้อผสมของ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 และไม่ใส่ปุ๋ย N เลย ที่ได้ค่าเฉลี่ย available N ในดินในรูป NH_4^+ ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่า available N ในดินในรูป NO_3^- และ available P โดยรวมจะเห็นว่าทุกตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ NFB มีปริมาณ available N ในดินในรูป NO_3^- และ available P มากกว่าตำรับทดลองที่เป็นกลุ่มควบคุมที่ใส่ปุ๋ย N เต็มอัตรา ซึ่งปริมาณ Total N, Total P, available N ในดินในรูป NO_3^- และ available P ที่ตรวจพบในดินนี้มีความสัมพันธ์กับผลการศึกษาในตารางที่ 4.10 โดยพบว่าตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 และใส่ปุ๋ย N เพียงครั้งหนึ่งจะมีค่า Total N มากกว่าตำรับทดลองที่ไม่ใส่หรือใส่ N เต็มอัตรา นอกจากนี้ยังสัมพันธ์กับผลผลิตที่ได้ (ตารางที่ 4.9) ด้วย สำหรับค่า Total K และ exchangeable K ในดิน พบว่าตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และเชื้อผสมของ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 มีค่าเท่ากับหรือมากกว่าตำรับควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ NFB และตำรับทดลองที่ใส่เชื้อ *S. maltophilia* 5LSO2 เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4.11 ค่าเฉลี่ยปริมาณอินทรีย์วัตถุ ธาตุอาหารที่ตรวจพบในดินที่ปลูกอ้อยหลังจากปลูกอ้อยเป็นเวลา 12 เดือน

Treatment	Soil chemical characteristics							
	Organic matter (%)	Total N (mg/ kg)	Available NH ₄ ⁺ (mg/ kg)	Available NO ₃ ⁻ (mg/ kg)	Total P (mg/kg)	Available P (mg/kg)	Total K (mg/kg)	Exchangeable K (mg/kg)
Control, PK	0.83 ^a	315.38 ^{ab}	2.67 ^{bc}	1.13 ^b	102.97 ^{ab}	19.71 ^{abc}	580.13 ^{abc}	65.43 ^{ab}
Control, ½N-PK	0.61 ^b	228.58 ^b	3.03 ^{bc}	0.92 ^b	80.20 ^b	16.03 ^{abc}	458.33 ^c	44.60 ^b
Control, N-PK	0.67 ^{ab}	273.45 ^{ab}	3.19 ^b	1.26 ^{ab}	83.83 ^b	10.11 ^c	541.67 ^{abc}	56.64 ^{ab}
3LSO1, PK	0.69 ^{ab}	340.92 ^{ab}	2.36 ^{bc}	0.92 ^b	94.39 ^{ab}	13.98 ^{abc}	567.31 ^{abc}	70.42 ^a
3LSO1, ½N-PK	0.69 ^{ab}	331.50 ^{ab}	2.07 ^{bc}	2.49 ^a	106.60 ^{ab}	23.35 ^{abc}	602.57 ^{abc}	64.13 ^{ab}
3LSO1, N-PK	0.73 ^{ab}	339.98 ^{ab}	4.98 ^a	1.24 ^{ab}	101.32 ^{ab}	13.85 ^{abc}	544.87 ^{abc}	60.87 ^{ab}
5LSO2, PK	0.76 ^{ab}	337.96 ^{ab}	2.24 ^{bc}	1.59 ^{ab}	110.56 ^{ab}	25.94 ^{ab}	461.54 ^c	64.13 ^{ab}
5LSO2, ½N-PK	0.71 ^{ab}	333.15 ^{ab}	2.43 ^{bc}	1.59 ^{ab}	90.10 ^{ab}	23.67 ^{abc}	503.21 ^b	58.27 ^{ab}
5LSO2, N-PK	0.68 ^{ab}	317.99 ^{ab}	2.23 ^{bc}	2.07 ^{ab}	101.65 ^{ab}	13.79 ^{abc}	480.77 ^c	57.94 ^{ab}
Mixed, PK	0.74 ^{ab}	345.13 ^{ab}	1.40 ^c	1.49 ^{ab}	119.14 ^{ab}	26.01 ^{ab}	580.13 ^{abc}	65.75 ^{ab}
Mixed, ½N-PK	0.83 ^{ab}	386.93 ^a	2.73 ^{bc}	1.60 ^{ab}	138.28 ^a	12.96 ^{bc}	682.69 ^a	74.55 ^a
Mixed, N-PK	0.75 ^{ab}	355.99 ^{ab}	2.60 ^{bc}	2.08 ^{ab}	124.09 ^{ab}	29.41 ^a	641.02 ^a	67.71 ^a
ค่าเฉลี่ยรวม	0.73	325.58	2.66	1.53	104.43	19.07	553.69	62.54
CV (%)	8.65	12.44	32.57	31.68	16.15	33.55	12.64	12.34

control = No NFB

N-PK = nitrogen, phosphorus, potassium

3LSO1 = *Enterobacter oryzae* 3LSO1

5LSO2 = *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

MAT = month after transplant

* = ตัวอักษร^aที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.6 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงชนิดของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

4.6.1 การออกแบบไพรเมอร์และ probe สำหรับเชื้อ *Enterobacter oryzae*, 3LSO1

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนของเอนไซม์ nitrogenase reductase สำหรับเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ได้ออกแบบโดยอาศัยลำดับเบสของ *nifH* nitrogenase reductase ของ *Enterobacter* sp. R4-368 (NC_021500.1) และ *Pseudomonas stutzeri* A1501 (NC_009434.1) โดยด้าน Forward ออกแบบจากลำดับเบสที่ 9-29 และด้าน reverse ออกแบบจากลำดับเบสที่ 804-826 ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ผลการออกแบบไพรเมอร์พบว่าได้ไพรเมอร์สำหรับ nitrogenase reductase คือ Forward Aln-F 5'-GCGTCAATGCGCYATTTACGG-3' และ Reverse Aln-R 5'-CCATRATSCCGAACTCCATMA GC-3' โดยมี expected size 818 bp และในการทดสอบไพรเมอร์ต่อการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยา PCR นั้น ทางผู้วิจัยยังได้ใช้ไพรเมอร์ของ Poly และ คณะ (2001) ซึ่งเป็น specific primers สำหรับ *nifH* gene คือ PolF 5'-TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC-3' และ PolR 5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3' โดยมี expected size 360 bp มาร่วมทดสอบด้วย ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ทั้ง Aln และ Pol สามารถเพิ่มปริมาณ nitrogenase reductase gene ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ได้และมี expected size ที่ตรงกับที่คาดคะเนไว้คือ ประมาณ 818 และ 360 bp ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.6 จากนั้นจึงได้ส่งขึ้น PCR product ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส ซึ่งพบว่า *E. oryzae*, 3LSO1 มีลำดับเบสจำนวน 797bp ดังแสดงในตารางที่ 4.12

```

NC|009434.1   ATGGCAATSCGTCAATGCGCTATTTACGGGAAGGGTGGGAATCGGCAAATCCACCACGACC 60
NC|021500.1   ATGACCATSCGTCAATGCGCCATTTCACGGCAAAGGTGGGATCGGCAAATCGACCACCACA 60
*** * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   CAGAACCTCGTGGCGGCCCTGGCCGAACCTCGGCAAGAAGGTCATGATCGTCGGCTGCGAC 120
NC|021500.1   CAGAACCTGGTCGCGCGCTGGCGGAGATGGGTAAAAAAGTAATGATTGTCGGCTGCGAT 120
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   CCCAAGGCCGACTCCACTCGCCTGATCCTGCACTCCAAGGCGCAGAACACCATCATGGAA 180
NC|021500.1   CCGAAAGCCGACTCCACGCGTTTGATCCTGCAIGCGAAAGCGCAGAACACCATTATGGAG 180
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   ATGGCCGCCGAGGCCGGTACCGTGGAAGACCTGGAACCTCGAGGACGTGCTCAAGACCGGC 240
NC|021500.1   ATGGCTGCTGAAGTTGGCTCCGTGGAAGACCTGGAATTAGAAGACGTGCTGCAATCGGT 240
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   TACGGCGACATCAAGTGCCTGAGTCGGGCGGTCCGGAGCCGGGCGTGGGCTGCGCCGGT 300
NC|021500.1   TACGGCGGCGTGGCTGCGCAGAAATCCGGCGGTCCGGAGCCAGGCGTGGGTTGTGCCGGT 300
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   CGCGGCGTGATCACC CGCATCAACTTCCTCGAAGAGGAAGGCGCCTACGAGGATGACCTG 360
NC|021500.1   CGTGGGGTGATCACC CGCATTAATTCCTCGAAGAGGAAGGCGCTTACGTGCCGGATCTC 360
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   GACTTCGTCTTCTACGACGTGCTCGGCGACGTGGTCTGTGGCGGCTTCGCCATGCCATC 420
NC|021500.1   GATTTTGTCTTCTACGACGTGCTGGGCGATGTGGTATGCGGTGGTTTCGCCATGCCGATT 420
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   CGCGAGAACAAGGCCCAGGAGATCTACGTGGTCTGCTCCGGCGAGATGATGGCGATGTAT 480
NC|021500.1   CGTGAAAACAAGGCGCAGGAGATCTACATCGTTTGCTCTGGCGAAATGATGGCGATGTAT 480
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   GCCGCCAACACATCTGCAAGGGCATCGTGAAGTACGCCAACTCCGGCAGCGTGCGGCTC 540
NC|021500.1   GCTGCCAATAACATCTCCAAGGCATCGTGAAGTATGCCAAATCCGGCAAAGTGCGCCTC 540
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   GCGGGGCTGATCTGCAACAGCCGCAACACCGACCGCGAGGACGAGCTGATCATGGCCCTG 600
NC|021500.1   GCGGGGCTGATTTGTAACCTCGCGCAGACCGACCGTGAAGATGAGCTCATTCATTCGCTG 600
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   GCCGACAAGCTGGGCTCGCAGATGATCCACTTCGTCCCGCGGACAACGTCGTGCAGCGC 660
NC|021500.1   GCAGAAAACTCGGCACGCAATGATCCACTTTGTTCCCGCGGACAACATTGTGCAGCGT 660
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   GCCGAAATCCGCCGATGACCGTCATCGAGTACGACCCCGCCGCAAGCAGGCCGACGAA 720
NC|021500.1   GCGGAAATCCGCCGATGACCGTTATCGAATATGACCCGACCTGCAATCAGGCAATGAA 720
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

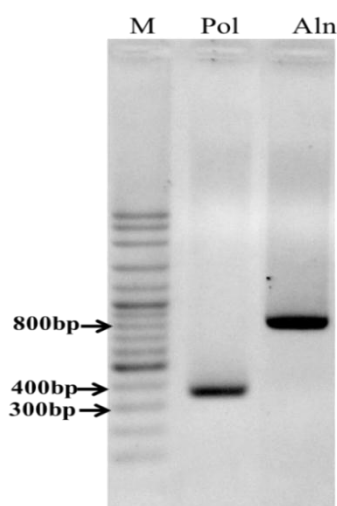
NC|009434.1   TACCGGACCCTGGCGAAGAAGATCGTCGAGAACAAGAACTGGTCATCCCCACCCGATC 780
NC|021500.1   TATCGCAGCCTTGCCAGCAAAATCGTCAACAACACCAAAATGGTGGTGGCCACCCCTGC 780
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   AGCATGGACGAGCTGGAAGCCTTGCTATGGAGTTCGGGATCATGGACGAGGAAGACATG 840
NC|021500.1   ACCATGGATGAGCTGGAAGCGCTGCTGATGGAGTTCGGCATTATGGATGTGAAGACACC 840
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NC|009434.1   ACCATCGTCGGCAAGACCGCCGCCGAGGAAGTCGTTGCCTGA 882
NC|021500.1   AGCATCATTGGTAAACCGCCGCCGAGGAAGTCGTTGCCTGA 882
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

ภาพที่ 4.5 แสดงลำดับเบสของ *nifH* nitrogenase reductase ของ *Enterobacter* sp. R4-368 accession number NC_021500.1 และ *Pseudomonas stutzeri*A1501 accession number NC_009434.1 กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่นำมาออกแบบไพรเมอร์



ภาพที่ 4.6 PCR product profile in 1% agarose gel electrophoresis from nitrogenase reductase primers; Lane M= 100 bp DNA maker, Pol= primer from Poly et al. (2001), Aln= Primer in this study.

ตารางที่ 4.12 แสดงลำดับเบสของยีน nitrogenase reductase ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ Aln-F/Aln-R ของเชื้อ *Enterobacter oryzae*, 3LSO1

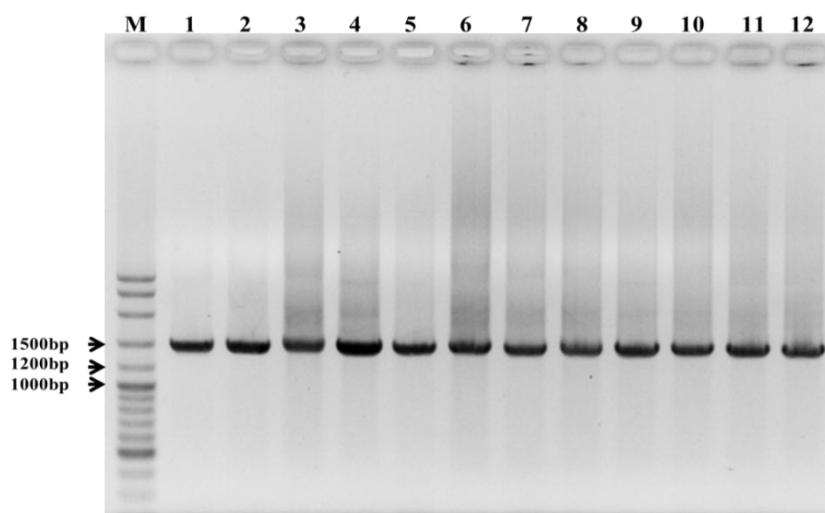
เชื้อ	ลำดับเบส
<i>Enterobacter oryzae</i> , 3LSO1	ATTTACGGCAAAGGTGGTATCGGTAAATCCACCACCACGAAAACCTGGTCGCCG CTCTGGCGGAGATGGGCAAGAAAGTAATGATCGTCGGCTGCGACCCGAAAGCAGA CTCCACCCGTCTGATCCTGCACGCGAAAGCGCAGAACACCATTATGGAGATGGCG GCTGAAGTCGGTCCGTGGAAGACCTGGAAGTGAAGATGTGCTGCAAATCGGTT ACGGCGACGTGCGTTGCGCAGAAATCCGGCGGCCCGGAACAGGCGTTGGCTGTG CCGGTCGCGGGGTGATTACCGCTATCAACTTCCTGGAAGAAGAAGGCGCCTATGT TCCCGACCTCGATTCGTCTTTTACGACGTGCTGGGCGACGTGGTGTGCGGTGGG TTCGCCATGCCGATTGCGGAAAACAAAGCGCAGGAGATCTACATCGTCTGCTCCG GCGAAATGATGGCGATGTACGCTGCCAACACATCTCTAAAGGCATCGTGAAATA CGCCAAATCCGGCAAAGTGCGCCTTGGCGGGCTGATCTGTAACCTCCCGTCAGACA GACCGTGAAGATGAGCTGATCATGGCGCTGGCAGAAAACTCGGCACCCAGATGA TCCACTTCGTTCCGCGCGACAACATTGTACAGCGCGCTGAAATCCGCCGTATGAC GGTGATTGAGTACGATCCGAAGTGCAACCAGGCCAACGAATACCGCTCGCTGGCG AACAAGATCGTCAACAACACCAAAATGGTGGTGCCAACGCCCATCACCATGGACG AACTGGAAGAGTTGCTTATGGAGTTCGG

เมื่อนำลำดับเบสที่ได้ไป blast กับฐานข้อมูลของ NCBI ก็พบว่าลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ Aln-F/Aln-R ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 คล้ายกับลำดับเบส *Enterobacter sp.* R4-368 และ *P. stutzeri* A1501 ซึ่งเป็น nif gene cluster จากนั้นจึงพิจารณาหาบริเวณที่ลำดับเบสของ *E. oryzae*, 3LSO1 แตกต่างจากเชื้อ *Enterobacter sp.* R4-368 และ *P. stutzeri* A1501 มากที่สุด เพื่อออกแบบ probe ที่จำเพาะต่อ *E. oryzae*, 3LSO1 (ภาพที่ 4.7) พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์และ probe ดังนี้คือ ด้าน Forward Aln-P-F = 5'-GCGAAATGATGGCGATGTACGC-3' ด้าน Reverse Aln-R = 5'-CCATRATSCCGAACTCCATMAGC-3' และ probe Aln-P-P = 5'-CTTCGGATCGTACTCAATC-3'

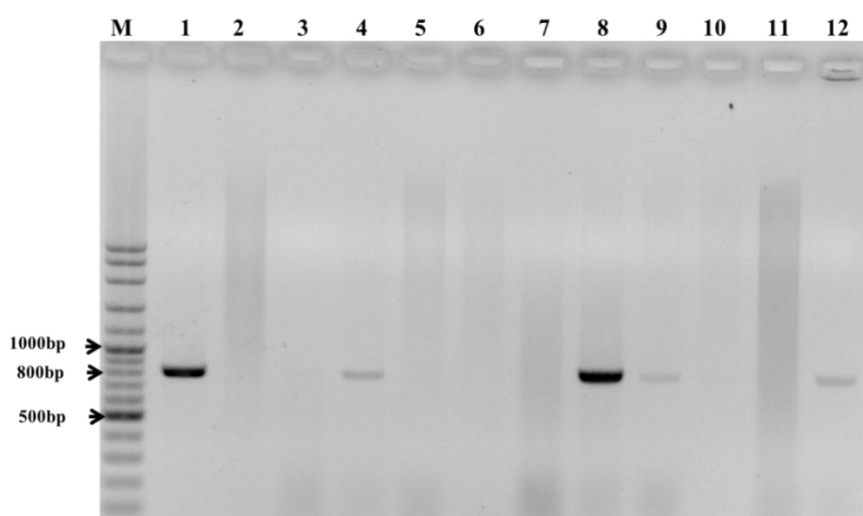
การทดสอบความจำเพาะของ probe ได้นำลำดับเบสที่ออกแบบสำหรับสังเคราะห์ probe ดังที่กล่าวมาข้างต้นคือ probe Aln-P-P = 5'-CTTCGGATCGTACTCAATC-3' มาสังเคราะห์ไพรเมอร์ก่อนแล้วนำไปทดสอบกับเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และเชื้ออื่นๆ อีกจำนวน 10 สายพันธุ์ได้แก่ *Acetobacter diazotrophii*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter amnigenus* subsp. designation, *Enterobacter sakazakii*, *Gluconobacter oxydans*, *Klebsiella oxytoca*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* และ *Xanthomonas* sp. ผลการทดลองเบื้องต้นได้ยืนยันคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย universal primer บริเวณ 16S rDNA (Weisburget al, 1991) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ในเชื้อทุกสายพันธุ์ (ภาพที่ 4.8) จากนั้นจึงทดสอบกับไพรเมอร์ Aln-F/Aln-R เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างระหว่างไพรเมอร์ที่ออกแบบทั่วไปกับไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับเชื้อนั้นๆ ผลการทดสอบด้วยไพรเมอร์ Aln-F/Aln-R พบว่านอกจาก *E. oryzae*, 3LSO1 แล้ว ไพรเมอร์ Aln-F/Aln-R ยังสามารถเพิ่มปริมาณยีน nitrogenase reductase ของเชื้ออื่นบางสายพันธุ์ได้อีกด้วย (ภาพที่ 4.9) แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์ Aln-P-F/Aln-P-P เป็นเส้น reverse แทน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนได้เฉพาะในเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 เท่านั้น (ภาพที่ 4.10) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 เท่านั้นจึงสามารถใช้เป็น probe ในการติดตามปริมาณเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ในแปลงทดลองด้วยเทคนิค Real-Time PCR (TagMan Probes) ได้ โดย probe ที่ออกแบบคือ Aln-P-P = 5'-FAM-CTTCGGATCGTACTCAATC-3'-BHQ1 ซึ่งผลิตโดยบริษัท SIGMA-ALDRICH ประเทศสิงคโปร์

Pseudo	GCCGCCAACACATCTGCAAGGGCATCGTGAAGTACGCCAACTCCGGCAGCGTGC GGCTC	540
3L	GCTGCCAACACATCTCTAAAGGCATCGTGAATACGCCAAATCCGGCAAAGTGC GCCTT	518
Entero	GCTGCCAATAACATCTCCAAGGCATCGTGAAGTATGCCAAATCCGGCAAAGTGC GCCTC	540
	** ** ** ** **	
Pseudo	GGCGGGCTGATCTGCAACAGCCGCAACACCGACCGGAGGACGAGCTGATCATGGCCCTG	600
3L	GGCGGGCTGATCTGTAATCCCCTCAGACAGACCGTGAAGATGAGCTGATCATGGCGCTG	578
Entero	GGCGGGCTGATTTGTAATCGCGCCAGACCGACCGTGAAGATGAGCTATCATTTGCGCTG	600
	** ** ** ** *	
Pseudo	GCCGACAAGCTGGGCTCGCAGATGATCCACTTCGTCCCGCGCGACAACGTCGTGCAGCGC	660
3L	GCAGAAAACTCGGCACCCAGATGATCCACTTCGTTCGCGCGACAACATTGTACAGCGC	638
Entero	GCAGAAAACTCGGCACGCAATGATCCACTTGTTCGCGCGACAACATTGTGCAGCGT	660
	** ** ** ** *	
Pseudo	GCCGAAATCCGCCGATGACCGTTCGAGTACGACCCCGCCGCAAGCAGGCCGACGAA	720
3L	GCTGAAATCCGCCGATGACGGT GATGAGTACGATCCGAG TGCAACCAGGCCAACGAA	698
Entero	GCGGAAATCCGCCGATGACCGTTATCGAATATGACCCGACCTGCAATCAGGCAAATGAA	720
	** ** ** ** *	
Pseudo	TACCGGACCTTGGCGAAGAAGATCGTCGAGAACAAGAACTGGTCAATCCCCACCCGATC	780
3L	TACCGCTCGCTGGCGAACAAGATCGTCAACACACCAAAATGGTGGTGCCACGCCCATC	758
Entero	TATCGCAGCCTTGCCAGCAAAATCGTCAACACACCAAAATGGTGGTGCCACCCCTGC	780
	** ** ** ** *	
Pseudo	AGCATGGACGAGCTGGAAGCCTTGCTTATGGAGTTTCGGGATCATGGACGAGGAAGACATG	840
3L	ACCATG-----	764
Entero	ACCATGGATGAGCTGGAAGCGCTGCTGATGGAGTTTCGGCATTATGGATGTGGAAGACACC	840
	* ** **	
Pseudo	ACCATCGTCGGCAAGACCGCCGCCGAGGAAGTCGTTCCTGA	882
3L	-----	764
Entero	AGCATCATTGGTAAAACCGCCGCCGAGGAAGAACGCCGCTGA	882

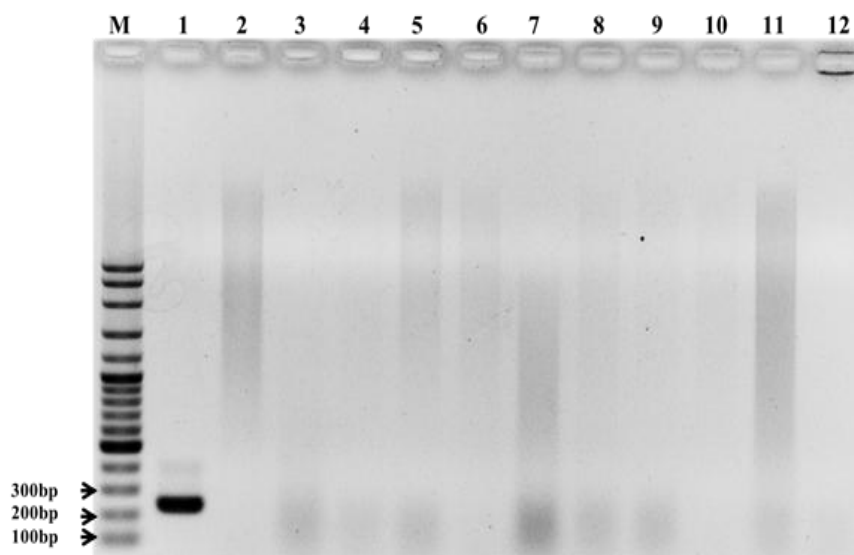
ภาพที่ 4.7 แสดงลำดับเบสของ *nifH* nitrogenase reductase ของ *Enterobacter oryzae*, 3LSO1, *Enterobacter* sp. R4-368 (NC_021500.1) และ *Pseudomonas stutzeri* A1501 (NC_009434.1) กรอบสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงบริเวณที่นำมาออกแบบ probe



ภาพที่ 4.8 PCR product profile in 1% agarose gel electrophoresis from universal 16s rDNA primers.; Lane M= 100bp DNA ladder, 1= *E. oryzae*, 3LSO1, 2= *S. maltophilia*, 5LSO2, 3= *A. diazotrophii*, 4= *B. megaterium*, 5= *E. amnigenus* subsp. designation, 6= *E. sakazakii*, 6= *G. oxydans*, 7= *K. oxytoca*, 8= *R. sphaeroides*, 9= *P. fluorescens*, 10= *P. putida* และ 11= *Xanthomonas* sp.



ภาพที่ 4.9 PCR product profile in 1% agarose gel electrophoresis from Aln-F/Aln-R primers; Lane M= 100bp DNA ladder, 1= *S. maltophilia*, 5LSO2, 2= *E. oryzae*, 3LSO1, 3= *A. diazotrophii*, 4=*B. megaterium*, 5= *E. amnigenus* subsp.designation, 6= *E. sakazakii*, 7= *G. oxydans*, 8= *K. oxytoca*, 9= *R. sphaeroides*,10= *P. fluorescens*, 11= *P. putida* และ 12=*Xanthomonas* sp.



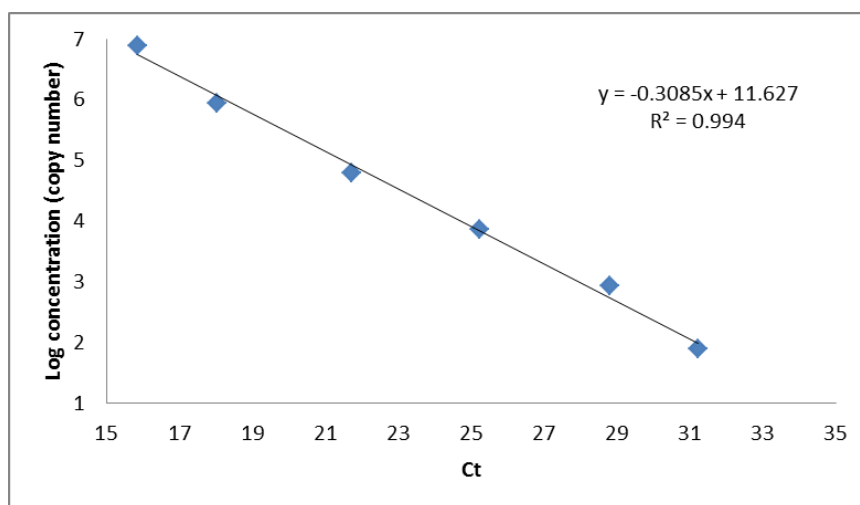
ภาพที่ 4.10 PCR product profile in 1% agarose gel electrophoresis from AlnP-F/AlnP-P primers; Lane M= 100bp DNA ladder, 1= *S. maltophilia*, 5LSO2, 2= *E. oryzae*, 3LSO1, 3= *A. diazotrophii*, 4=*B. megaterium*, 5= *E. amnigenus* subsp.designation, 6= *E. sakazakii*, 7= *G. oxydans*, 8= *K. oxytoca*, 9= *R. sphaeroides*,10= *P. fluorescens*, 11= *P. putida* และ 12=*Xanthomonas* sp.

ผลการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนของเอนไซม์ nitrogenase reductase สำหรับเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้โดยอาศัยลำดับเบสของ *nifH* nitrogenase reductase ของ *Enterobacter sp.* R4-368 (NC_021500.1) และ *Pseudomonas stutzeri* A1501 (NC_009434.1) โดยด้าน Forward ออกแบบจากลำดับเบสที่ 9-29 คือ Forward Aln-F 5'-GCGTCAATGCGCYATTTACGG-3' และด้าน reverse ออกแบบจากลำดับเบสที่ 804-826 คือ Reverse Aln-R 5'-CCATRATSCCGAACTCCATMA GC-3' ได้ PCR product ที่มีความจำเพาะแถบเดียวมีขนาดประมาณ 800 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าคล้ายกับลำดับเบส *Enterobacter sp.* R4-368 และ *P.stutzeri*A1501 ซึ่งเป็น *nif* gene cluster และสามารถออกแบบไพรเมอร์และ probe คือ ด้าน Forward Aln-P-F= 5'-GCGAAATGATGGCGATGTACGC-3' ด้าน Reverse Aln-R= 5'-CCATRATSCCGAACTCCATMAGC-3' และ probe Aln-P-P = 5'-CTTCGGATCGTACTCAATC-3' เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของ probe Aln-P-P = 5'-CTTCGGATCGTACTCAATC-3' กับเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และเชื้ออื่นๆ อีกจำนวน 10 สาย พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนได้เฉพาะในเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 เท่านั้น จึงนำ probe ไปใช้ติดตามปริมาณเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ในแปลงทดลองด้วยเทคนิค Real-Time PCR (TagMan Probes) ได้โดย probe ที่ออกแบบคือ Aln-P-P = 5'-FAM-CTTCGGATCGTACTCAATC-3'-BHQ1

4.6.2 การตรวจติดตามปริมาณ *E. oryzae*, 3LSO1 ในดินและพืชด้วยเทคนิค Real-Time PCR

4.6.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานด้วยเทคนิค Real-Time PCR

สร้างกราฟมาตรฐานจากการทำ 10-fold serial dilution ของพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *E.coli* DH5 α ที่มียีน nitrogenase reductase ขนาดประมาณ 800 bp ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 โดย พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 324 ng/ μ l เมื่อนำมาคำนวณเป็นค่า gene copy number ได้เท่ากับ 7.71×10^{10} copies/ μ l นำค่า gene copy number ในช่วง 7.71×10^1 - 7.71×10^6 copies/ μ l ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Real-Time PCR แล้วนำค่า Ct ที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานพบว่าได้กราฟที่มีสมการเส้นตรงคือ $y = -0.3085x + 11.627$ และมีค่า $R^2 = 0.994$ ดังแสดงในรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 กราฟมาตรฐานของของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ในช่วง 7.71×10^1 - 7.71×10^6 copies/ μ l

4.6.2.2 การตรวจติดตามปริมาณ *E. oryzae*, 3LSO1 ในดิน ราก และลำต้นอ้อย

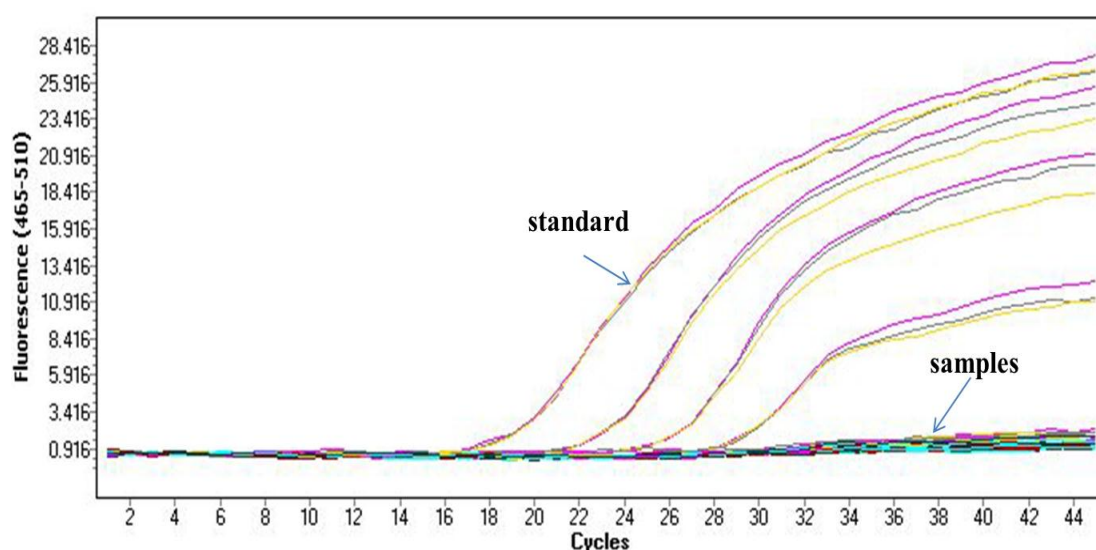
การตรวจติดตามปริมาณ *E. oryzae*, 3LSO1 ในตัวอย่างดินเริ่มต้น ได้แสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ที่ใส่ลงไปแปลงอ้อยผลการทดลองไม่พบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่างดินก่อนใส่เชื้อ แสดงให้เห็นว่าดินบริเวณแปลงอ้อยนั้นไม่มีเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 มาก่อนดังแสดงในภาพที่ 4.12 ในทางกลับกันเมื่อใส่เชื้อลงไปดินและเพิ่มปริมาณยีนจะพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ดังแสดงในภาพที่ 4.13

การตรวจติดตามปริมาณ *E. oryzae*, 3LSO1 ในตัวอย่างดินเมื่อปลูกอ้อยได้ 0, 3 และ 12 เดือน พบว่าเมื่อใส่เชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 เพียงชนิดเดียวที่เวลา 3 เดือนมีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase เพิ่มขึ้นจาก 6.14-6.16 เป็น 6.82-7.55 แต่ลดลงที่เวลา 12 เดือนเป็น 1.77-1.80 และพบว่าในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 น้อยกว่าตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 เพียงชนิดเดียว ดังแสดงในตารางที่ 4.13 เนื่องจากการใส่เชื้อเริ่มต้นต้องเท่ากันดังนั้นเชื้อผสมจึงมีน้อยกว่า และลักษณะการเพิ่มปริมาณเชื้อที่ 3 เดือนและลดลงที่ 12 เดือนก็มีลักษณะคล้ายกันแปลงที่เป็นเชื้อผสมคือที่เวลา 3 เดือนมีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase เพิ่มขึ้นจาก 3.60-3.65 เป็น 4.21-4.81 แต่ลดลงที่เวลา 12 เดือนเป็น 1.60-1.74

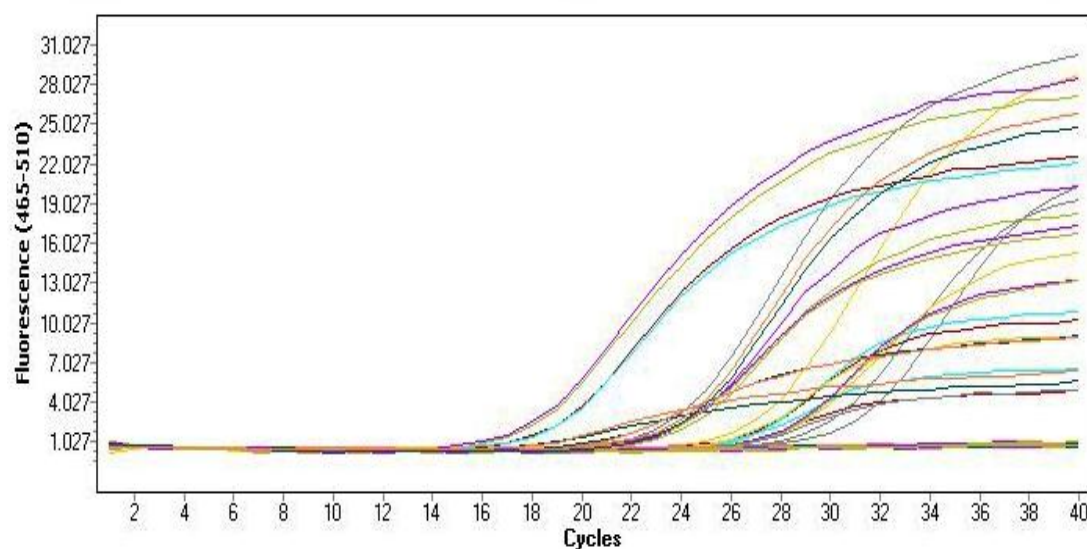
การตรวจติดตามปริมาณ *E. oryzae*, 3LSO1 ในตัวอย่างรากและลำต้นอ้อยเมื่อปลูกอ้อยได้ 3 และ 12 เดือน พบว่าที่เวลา 3 เดือนพบเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 มีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase 3.86-4.23 และ 1.90-2.01 สำหรับรากและลำต้นตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณเชื้อในรากมากกว่าในลำต้น และพบเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ในลำต้นที่เวลา

3 เดือน (1.90-2.01) มากกว่าที่เวลา 12 เดือน (1.48-1.64) ดังแสดงในตารางที่ 4.15 และพบว่าปริมาณเชื้อในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 น้อยกว่าตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 เพียงชนิดเดียวดังแสดงในตารางที่ 4.14 เนื่องจากการใส่เชื้อเริ่มต้นต้องเท่ากันดังนั้นเชื้อผสมจึงมีน้อยกว่า โดยการเพิ่มปริมาณเชื้อในรากที่ 3 เดือนมีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase 2.49-2.84 ส่วนในลำต้นที่ 3 และ 12 เดือนมีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase 1.56-1.65 และ 1.20-1.37 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA แบบ randomized complete block และเปรียบเทียบข้อมูลแบบ all-pairwise comparisons ด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 % พบว่าปัจจัยของปุ๋ยไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อทั้งในดิน ราก และลำต้นที่เวลา 0, 3 และ 12 เดือน



รูปที่ 4.12 ค่า Ct และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจสอบปริมาณยีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ในตัวอย่างดินก่อนใส่สารชีวภัณฑ์



รูปที่ 4.13 ค่า Ct และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจสอบปริมาณยีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ในตัวอย่างดินหลังใส่สารชีวภัณฑ์

ผลการตรวจติดตามปริมาณ *E. oryzae*, 3LSO1 ในดินที่เวลา 0, 3 และ 12 เดือน พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 เฉพาะในแปลงที่ใส่เชื้อนี้ลงไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่า probe มีความจำเพาะ พบว่าเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ที่เวลา 3 เดือนมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่ลดลงที่เวลา 12 เดือน และพบว่าในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 น้อยกว่าตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 เพียงชนิดเดียวซึ่งสอดคล้องกับปริมาณที่ใส่เชื้อเริ่มต้นและสอดคล้องกับผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 พบว่าที่ 3 เดือนปริมาณเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ในดินมากกว่ารากและลำต้นตามลำดับ และพบว่าในรากที่ 3 เดือนมีปริมาณเชื้อเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 มากกว่าในลำต้น และลำต้นที่ 3 เดือนมีมากกว่าที่ 12 เดือนผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA แบบ randomized complete block และเปรียบเทียบข้อมูลแบบ all-pairwise comparisons ด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 % พบว่าปัจจัยของปุ๋ยไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อทั้งในดินที่เวลา 0, 3 และ 12 เดือน

ตารางที่ 4.13 ค่าเฉลี่ยจำนวน log copy number ของยีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 หลังจากใส่เชื้อในดินเมื่อปลูกอ้อยได้ 0, 3 และ 12 เดือน

Treatment	Log copy number/g soil			
	0 เดือน		3 เดือน	12 เดือน
	ก่อนใส่เชื้อ NFB	หลังใส่เชื้อ NFB		
Control, PK	^a -	- ^c	- ^f	- ^c
Control, ½N-PK	-	- ^c	- ^f	- ^c
Control, N-PK	-	- ^c	**0.630 ^e	- ^c
3LSO1, PK	-	6.1625 ^a	6.8203 ^b	1.7735 ^{ab}
3LSO1, ½N-PK	-	6.1375 ^a	7.5491 ^a	1.8059 ^a
3LSO1, N-PK	-	6.1450 ^a	7.2074 ^{ab}	1.8043 ^a
5LSO2, PK	-	- ^c	- ^f	- ^c
5LSO2, ½N-PK	-	- ^c	- ^f	- ^c
5LSO2, N-PK	-	- ^c	- ^f	- ^c
Mixed, PK	-	3.6500 ^b	4.2119 ^d	1.6007 ^b
Mixed, ½N-PK	-	3.6525 ^b	4.8019 ^c	1.7364 ^{ab}
Mixed, N-PK	-	3.5925 ^b	4.3214 ^{cd}	1.6308 ^{ab}
CV	-	3.90	13.06	16.00

Control = No NFB

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *E. oryzae*, 3LSO1

5LSO2 = *S. maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

^a -, no fluorescence above threshold recorded

**พบเฉพาะ replication 3

* = ตัวอักษร ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยจำนวน log copy number ของยีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ในรากและลำต้นอ้อยเมื่อปลูกอ้อยได้ 3 และ 12 เดือน

Treatment	Log copy number/g sugarcane		
	ราก 3เดือน	ลำต้น 3 เดือน	ลำต้น 12 เดือน
Control, PK	^a - ^e	- ^c	- ^g
Control, ½N-PK	- ^e	- ^c	- ^g
Control, N-PK	- ^e	- ^c	- ^g
3LSO1, PK	3.8574 ^b	1.8984 ^a	1.5645 ^b
3LSO1, ½N-PK	4.2369 ^a	2.0133 ^a	1.6439 ^a
3LSO1, N-PK	3.9098 ^b	1.9856 ^a	1.4850 ^c
5LSO2, PK	- ^e	- ^c	- ^g
5LSO2, ½N-PK	- ^e	- ^c	- ^g
5LSO2, N-PK	- ^e	- ^c	- ^g
Mixed, PK	2.2501 ^d	1.5652 ^b	1.1974 ^f
Mixed, ½N-PK	2.8393 ^c	1.6563 ^b	1.3747 ^d
Mixed, N-PK	2.4907 ^d	1.6077 ^b	1.3184 ^e
CV	10.60	11.05	5.11

Control = No NFB

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *E. oryzae*, 3LSO1

5LSO2 = *S. maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

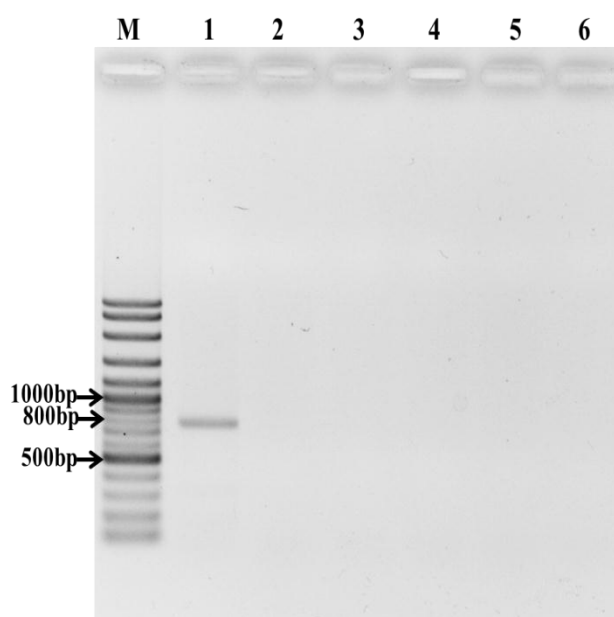
^a -, no fluorescence above threshold recorded

* = ตัวอักษร ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

4.6.3 การออกแบบไพรเมอร์และ probe สำหรับเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia*, 5LSO2

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 นั้น เนื่องจากยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nitrogenase reductase (*nifH*) ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในฐานข้อมูล NCBI ในเบื้องต้นคณะผู้วิจัยจึงได้ใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกับที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน nitrogenase reductase ในเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 แต่พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 คณะผู้วิจัยจึงลองออกแบบจากยีนอื่นที่มีในฐานข้อมูล NCBI ได้แก่ nitrate reductase subunit alpha, nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha (*nifD*) และ nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta (*nifK*) เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนก็พบว่าไม่มีไพรเมอร์ชุดใดสามารถเพิ่มปริมาณยีนของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ได้เลย คณะผู้วิจัยจึงกลับไป

ออกแบบจากยีน nitrogenase reductase (*nifH*) ของเชื้อ *Enterobacter* sp. R4-368 (NC_021500.1) และ *Pseudomonas stutzeri* A1501 (NC_009434.1) อีกครั้ง โดยออกแบบไพรเมอร์จากหลายๆบริเวณ ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีนในเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์หลายๆบริเวณจากยีน nitrogenase reductase (*nifH*) ของเชื้อ *Enterobacter* sp. R4-368 (NC_021500.1) และ *Pseudomonas stutzeri* A1501 (NC_009434.1) ทำให้ได้ไพรเมอร์จำนวน 5 เส้นคือ Aln01-F, Aln02-F, Aln03-F, Aln04-R และ Aln05-R (ดังที่ได้แสดงในตารางที่ 4.15) เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาเพิ่มปริมาณยีนของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 พบว่ามีเพียงไพรเมอร์คู่ Aln01F/Aln04R เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่ชิ้น PCR product ที่ได้ไม่ตรงกับขนาดที่คาดคะเนไว้ (expected size) คือ 377 bp แต่ชิ้น PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 800 bp (รูปที่ 4.14) อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยได้ส่งชิ้น PCR product ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสซึ่งผลการวิเคราะห์ได้ลำดับเบสจำนวน 690 bp ดังแสดงในตารางที่ 4.16 และเมื่อนำลำดับเบสที่ได้มา blast กับข้อมูลในฐานข้อมูลของ NCBI ผลบ่งชี้ว่าชิ้น PCR product ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (identity) 97% (รูปที่ 4.15)



ภาพที่ 4.14 PCR product profile in 1% agarose gel electrophoresis from set of primers of *S. maltophilia*, 5LSO2

Lane M= 100bp DNA ladder, 1=Aln01-F/Aln04-R, 2=Aln01-F/Aln04-R, 3=Aln01-F/Aln04R, 4= Aln01-F/Aln04-R, 5=Aln01-F/Aln04-R, 6=Aln01-F/Aln04-R

ตารางที่ 4.15 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนชนิดต่างๆ ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนในเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2

Primer	Target	Sequeunce	Expected size (bp)
Aln-F Aln-R	Nitrogenase reductase (<i>nifH</i>)	5'-GCGTCAATGCGCYATTTACGG-3' 5'-CCATRATSCCGAACTCCATMAGC-3'	818
5LniAp-F 5LniAp-R	nitrate reductase subunit alpha	5' GACTATTCCGAGCTGGCCAA 3' 5' TCGAGCGCCAGATGAACATC 3'	1297
nifAp-F nifAp-R	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	5'-CCAGGARAAGGAYATCGTMTT-3' 5'-TGRTABGGRCCSGAATART-3'	1007
nifBt-F nifBt-R	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	5'-CAYTTCAAGGARCCBABCT-3' 5'-GARCGCATRTGCCASAGATC-3'	992
Aln01-F (Aln01-F/04-R) (Aln01-F/05-R) Aln02-F (Aln02-F/04-R) (Aln02-F/05-R) Aln03-F (Aln03-F/04-R) (Aln03-F/05-R) Aln04-R Aln05-R	Nitrogenase reductase (<i>nifH</i>)	5'-ATGATYGTGCGCTGCGA-3' 5'-GCGCAGAACACCATYATGGA-3' 5'-CGTGAAGACCTGGAAYTVGA-3' 5'-TACATCGCCATCATYTCGCC-3' 5'-TTGGCRTAYTTCACGATGCC-3'	- 377 419 - 320 362 - 117 321 - -

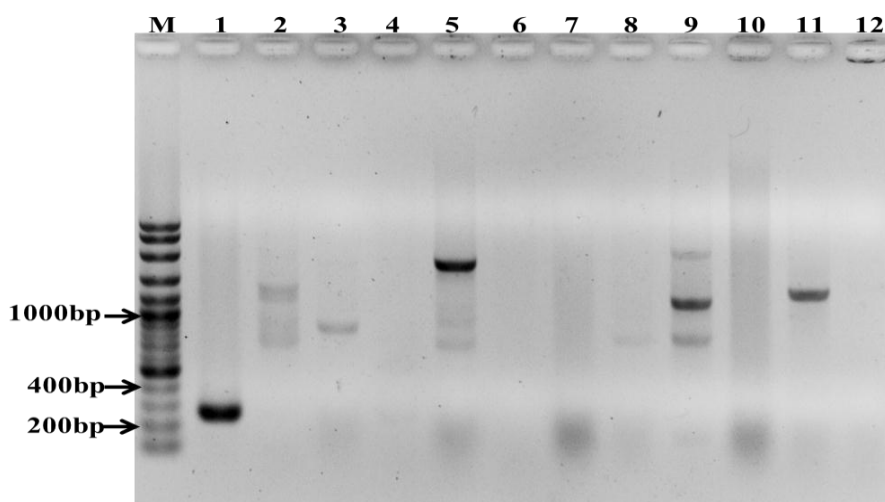
ตารางที่ 4.16 แสดงลำดับเบสของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่ได้จากเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ Aln01-F/Aln04-R ที่ออกแบบจากยีน nitrogenase reductase

เชื้อ	ลำดับเบส
<i>S. maltophilia</i> , 5LSO2	CTTGACGCTGCTGGTGACGTCGCCCCGGGTGGCGGCGGCAGTGGCGTAGT ACTCGGCGTAGTAGTTTCAGGTCGGCCGAGCCGTCGGTGCCGACGGTGACC CACTGCGAGTTGGTCTGGGCCTGGCCAGCGCCTGCAGCCTTGATCGGCAG GACCTGGTTGTTTCGAGCCCAGCAGCTGCAGCTGCACGTTGGTGGCAGCGT TGGCCGAGGCCTGGTTCAGCAGGCGGCCGGTGTGAAGTCAACGGTCGAA CCCGGCTCGAAGTAGGTAGCGACGTTGCCGGCGCTGCACTTGGTTCAGGTT GATCGCGAACGGGGTACGGCCCCGAACGTTGCCGGCGGCGGCCAGCGTGT TCTTCGACACGGTCGGCAGGTTGACGGCGAAGTCCTTGCCGCCCGGGGTC GAGATGGTGCAGGTCTTGTCTGGTCACCTTGCCGGTGAAGGTGATGGTGCC GTCGGCGGCGTTGGCGGCCAGCGGAGCGGCGGCCAGCATCAGAGCGGCGA TGAGGTTGATCTTGTGCATTTCGCTTTTACCTAACCTACTGAAGAGATGGA AGTAGAGGAGGAAGCAAGGAGCACTGCCGGGCGAACAAGACCCATCCTTG CGTCTCACCTGTGGCCGGATTCGGACATACGTTCCCCTGAATCCGTGACGC AAGTATATGCACAAGTGTGATGAAAGTCTCATTATTTT

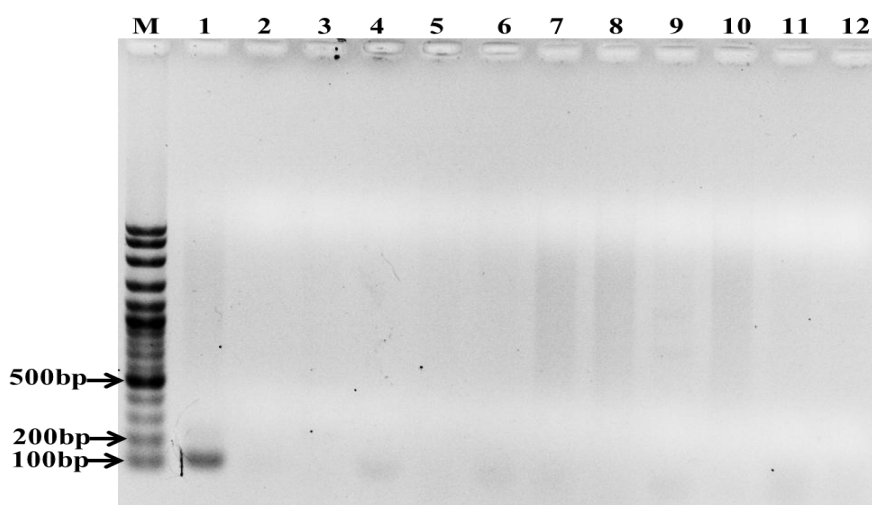
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Stenotrophomonas maltophilia strain 13637 genome	1139	1139	100%	0.0	97%	CP008838.1
☐	Stenotrophomonas maltophilia K279a complete genome, strain K279a	1139	1139	100%	0.0	97%	AM743169.1
☐	Stenotrophomonas maltophilia JV3, complete genome	1121	1121	100%	0.0	96%	CP002986.1
☐	Stenotrophomonas maltophilia strain ISMMS3, complete genome	1112	1156	100%	0.0	96%	CP011010.1
☐	Stenotrophomonas maltophilia R551-3, complete genome	1112	1156	100%	0.0	96%	CP001111.1
☐	Stenotrophomonas maltophilia D457 complete genome	1099	1099	100%	0.0	95%	HE798556.1
☐	Stenotrophomonas maltophilia strain ISMMS2, complete genome	1049	1049	100%	0.0	94%	CP011305.1
☐	Stenotrophomonas maltophilia strain ISMMS2R, complete genome	1049	1049	100%	0.0	94%	CP011306.1

รูปที่ 4.15 ผลของลำดับเบสของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 เมื่อ blast กับข้อมูลในฐานข้อมูลของ NCBI

เมื่อทราบลำดับเบสของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 และคาดว่าน่าจะเป็นยีน nitrogenase reductase จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสดังกล่าวเพื่อใช้เป็น probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 โดยได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 6 เส้นคือ Ste-A1F = AGTAGGTAGCGACGTTGCCG, Ste-A2F = GTGCAGGTCTTGTCGGTCAC, Ste-A3R = GTGACCGACAAGACCTGCAC, Ste-A4F = CTTGTGCATTCGCTTTTACC, Ste-A5R = GGTAAGC GAATGCACAAG, Ste-A6R = GGATTCGGACATACGTTCC เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยเทียบกับเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 และเชื้ออื่นๆ อีกจำนวน 10 สายพันธุ์ได้แก่ *Acetobacter diazotrophii*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter amnigenus* subsp.designation, *Enterobacter sakazakii*, *Gluconobacter oxydans*, *Klebsiella oxytoca*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* และ *Xanthomonas* sp. พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์เส้น Ste-A1F/Ste-A5R สามารถเพิ่มปริมาณยีนของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ได้ แต่ก็พบ PCR product ในเชื้ออื่นด้วยเช่นกัน (รูปที่ 4.16) แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์เส้น Ste-A2F/Ste-A5R ไม่พบ PCR product จากเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ เลย แสดงว่าไพรเมอร์เส้น Ste-A2F มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 (รูปที่ 4.17) จึงได้นำไพรเมอร์เส้นดังกล่าวมาออกแบบเป็น probe คือ Aln5L- 5' Hex-GTGCAGGTCTTGTCGGTCAC-3'BHQ1 ซึ่งผลิตโดยบริษัท SIGMA-ALDRICH ประเทศสิงคโปร์



ภาพที่ 4.16 PCR product profile in 1% agarose gel electrophoresis from Ste-A1F / Ste-A5R primers; Lane M= 100bp DNA ladder, 1= *S. maltophilia*, 5LSO2, 2= *E. oryzae*, 3LSO1, 3= *A. diazotrophii*, 4= *B. megaterium*, 5= *E. amnigenus* subsp.designation, 6= *E. sakazakii*, 7= *G. oxydans*, 8= *K. oxytoca*, 9= *R. sphaeroides*, 10= *P. fluorescens*, 11= *P. putida* และ 12= *Xanthomonas* sp.



ภาพที่ 4.17 PCR product profile in 1% agarose gel electrophoresis from Ste-A2F/Ste-A5R primers.

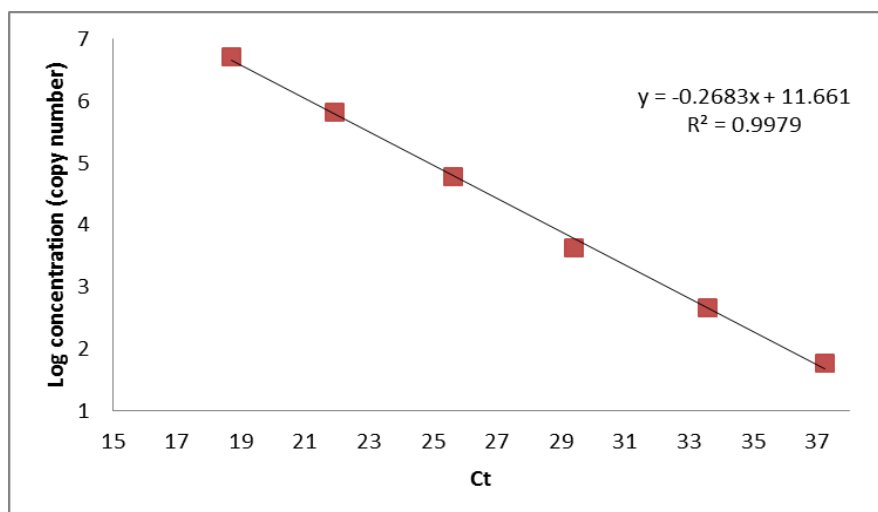
Lane M= 100bp DNA ladder, 1= *S. maltophilia*, 5LSO2, 2= *E. oryzae*, 3LSO1, 3= *A. diazotrophii*, 4= *B. megaterium*, 5= *E. amnigenus* subsp. designation, 6= *E. sakazakii*, 7= *G. oxydans*, 8= *K. oxytoca*, 9= *R. sphaeroides*, 10= *P. fluorescens*, 11= *P. putida* และ 12= *Xanthomonas* sp.

ผลการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนของเอนไซม์ nitrogenase reductase สำหรับเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้โดยอาศัยลำดับเบสของ *nifH* nitrogenase reductase ของ *Enterobacter* sp. R4-368 (NC_021500.1) และ *P. stutzeri* A1501 (NC_009434.1) โดยด้าน Forward ออกแบบจากลำดับเบสที่ 103-119 คือ Forward Aln01-F 5'-GCGTCAATGCGCYATTTACGG-3' และด้าน reverse ออกแบบจากลำดับเบสที่ 460-479 คือ Reverse Aln04-R 5'-CCATRATSCCGAACTCCATMA GC-3' ได้ PCR product ที่มีความจำเพาะแถบเดียวมีขนาดประมาณ 800 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าคล้ายกับลำดับเบสเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (identity) 97% และสามารถออกแบบไพรเมอร์และ probe คือ ด้าน Forward Ste-A1F= AGTAGGTAGCGACGTTGCCG, ด้าน Reverse Ste-A5R= GGTAAGCGAATGCACAAG และ probe Aln5L= 5'-GTGCAGGTCTTGTCG GTCAC -3' เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของ probe Aln5L= 5'-GTGCAGGTCTTGTCGGTCAC -3' กับเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 และเชื้ออื่นๆ อีกจำนวน 10 สายพันธุ์พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนได้เฉพาะในเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 เท่านั้น จึงนำ probe ไปใช้ติดตามปริมาณเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในแปลงทดลองด้วยเทคนิค Real-Time PCR (TagMan Probes) ได้โดย probe ที่ออกแบบคือ Aln5L-5' Hex-GTGCAGGTCTTGTCGGTCAC-3' BHQ1

4.6.4 การตรวจติดตามปริมาณ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในดินและพืชด้วยเทคนิค Real-Time PCR

4.6.4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานด้วยเทคนิค Real-Time PCR

สร้างกราฟมาตรฐานจากการทำ 10-fold serial dilution ของพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มียีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 โดยพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 456.16 ng/ μ l เมื่อนำมาคำนวณเป็นค่า gene copy number ได้เท่ากับ 5.57×10^{10} copies/ μ l นำค่า gene copy number ในช่วง $5.57 \times 10^1 - 5.57 \times 10^6$ copies/ μ l ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Real time PCR แล้วนำค่า Ct ที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานพบว่าได้กราฟที่มีสมการเส้นตรงคือ $y = -0.2683x + 11.661$ และมีค่า $R^2 = 0.9979$ ดังแสดงในรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 กราฟมาตรฐานของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในช่วง $5.57 \times 10^1 - 5.57 \times 10^6$ copies/ μ l

4.6.4.2 การตรวจติดตามปริมาณ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในดิน รากและต้นอ้อย

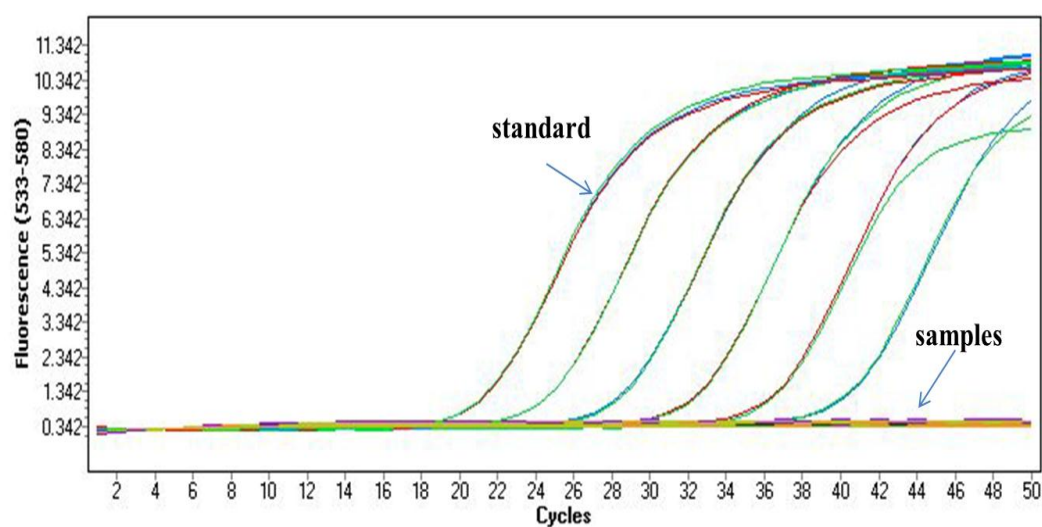
การตรวจสอบดินในแปลงอ้อยดั้งเดิมว่ามีเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 อยู่หรือไม่ หรือมีมากน้อยเพียงใด ได้ทำวิธีเดียวกันกับการทดลองในเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 และผลการทดลองไม่พบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่างดินก่อนใส่เชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 4.19 ในทางกลับกันเมื่อใส่เชื้อลงไปในดินและเพิ่มปริมาณยีนจะพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ดังแสดงในภาพที่ 4.20

การตรวจติดตามปริมาณ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในตัวอย่างดินเมื่อปลูกอ้อยได้ 0, 3 และ 12 เดือน พบว่าเมื่อใส่เชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 เพียงชนิดเดียวที่เวลา 3 เดือนมีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase เพิ่มขึ้นจาก 6.18-6.25 เป็น 7.04-7.60 แต่ลดลงที่

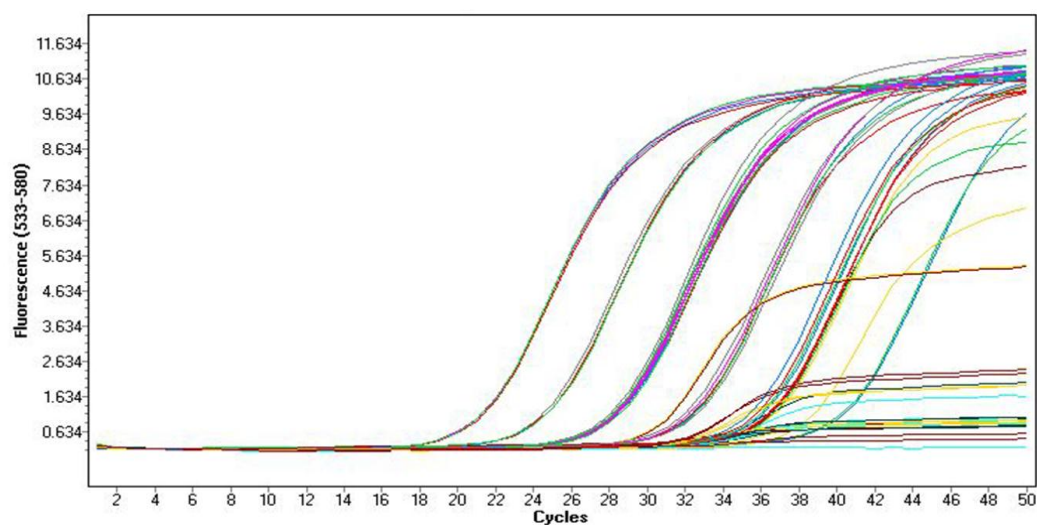
เวลา 12 เดือนเป็น 1.86-2.14 และพบว่าในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 น้อยกว่าตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 เพียงชนิดเดียว ดังแสดงในตารางที่ 4.17 เนื่องจากการใส่เชื้อเริ่มต้นต้องเท่ากันดังนั้นเชื้อผสมจึงมีน้อยกว่า และลักษณะการเพิ่มปริมาณเชื้อที่ 3 เดือนและลดลงที่ 12 เดือนก็มีลักษณะคล้ายกันในแปลงที่เป็นเชื้อผสมคือที่เวลา 3 เดือนมีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase เพิ่มขึ้นจาก 3.53-3.60 เป็น 4.24-4.81 แต่ลดลงที่เวลา 12 เดือนเป็น 1.74-2.09

การตรวจติดตามปริมาณ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในตัวอย่างรากและลำต้นอ้อยเมื่อปลูกอ้อยได้ 3 และ 12 เดือน พบว่าที่เวลา 3 เดือนพบเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 มีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase 3.81-4.51 และ 2.09-2.38 สำหรับรากและลำต้นตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณเชื้อในรากมากกว่าในลำต้น และพบเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในลำต้นที่เวลา 3 เดือน (2.09-2.38) มากกว่าที่เวลา 12 เดือน (1.67-1.89) ดังแสดงในตารางที่ 4.19 และพบว่าปริมาณเชื้อในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 น้อยกว่าตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 เพียงชนิดเดียวดังแสดงในตารางที่ 4.18 เนื่องจากการใส่เชื้อเริ่มต้นต้องเท่ากันดังนั้นเชื้อผสมจึงมีน้อยกว่า โดยการเพิ่มปริมาณเชื้อในรากที่ 3 เดือนมีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase 2.54-2.84 ส่วนในลำต้นที่ 3 และ 12 เดือนมีปริมาณ log copy number ของยีน nitrogenase reductase 1.61-1.87 และ 1.24-1.50 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA แบบ randomized complete block และเปรียบเทียบข้อมูลแบบ all-pairwise comparisons ด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 % พบว่าปัจจัยของปุ๋ยไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อทั้งในดิน ราก และลำต้นที่เวลา 0, 3 และ 12 เดือน



รูปที่ 4.19 ค่า Ct และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจสอบปริมาณยีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในตัวอย่างดินก่อนใส่สารชีวภัณฑ์



รูปที่ 4.20 ค่า Ct และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในการตรวจสอบปริมาณยีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในตัวอย่างดินหลังใส่สารชีวภัณฑ์

ตารางที่ 4.17 ค่าเฉลี่ยจำนวน log copy number ของยีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในดินหลังใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ NFB วันที่ 0, 3 และ 12 เดือน

Treatment	Log copy number/g soil			
	0 เดือน		3 เดือน	12 เดือน
	ก่อนใส่เชื้อ NFB	หลังใส่เชื้อ NFB		
Control, PK	^a -	- ^c	- ^f	- ^c
Control, ½N-PK	-	- ^c	0.5400 ^e	- ^c
Control, N-PK	-	- ^c	- ^f	- ^c
3LSO1, PK	-	- ^c	- ^f	- ^c
3LSO1, ½N-PK	-	- ^c	- ^f	- ^c
3LSO1, N-PK	-	- ^c	- ^f	- ^c
5LSO2, PK	-	6.1923 ^a	7.0448 ^b	1.8661 ^{ab}
5LSO2, ½N-PK	-	6.2500 ^a	7.6686 ^a	2.1405 ^a
5LSO2, N-PK	-	6.1883 ^a	7.2460 ^{ab}	1.9419 ^{ab}
Mixed, PK	-	3.6099 ^b	4.2397 ^d	1.7950 ^{ab}
Mixed, ½N-PK	-	3.5314 ^b	4.8105 ^c	2.0922 ^{ab}
Mixed, N-PK	-	3.6032 ^b	4.4644 ^{cd}	1.7400 ^b
CV	-	5.90	11.78	26.07

Control = No NFB,

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *E. oryzae*, 3LSO1,

5LSO2 = *S. maltophilia* 5LSO2,

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2,

^a —, no fluorescence above threshold recorded,

* = ตัวอักษร ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

**พบเฉพาะ replication 3

ตารางที่ 4.18 ค่าเฉลี่ยจำนวน log copy number ของยีน nitrogenase reductase ของเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในรากและลำต้นอ้อย เมื่อปลูกอ้อยได้ 3 และ 12 เดือน

Treatment	Log copy number/g sugarcane		
	ราก 3 เดือน	ลำต้น 3 เดือน	ลำต้น 12 เดือน
Control, PK	^a - ^e	- ^e	- ^e
Control, ½N-PK	- ^e	- ^e	- ^e
Control, N-PK	- ^e	- ^e	- ^e
3LSO1, PK	- ^e	- ^e	- ^e
3LSO1, ½N-PK	- ^e	- ^e	- ^e
3LSO1, N-PK	- ^e	- ^e	- ^e
5LSO2, PK	3.8136 ^b	2.0911 ^b	1.6932 ^{ab}
5LSO2, ½N-PK	4.5152 ^a	2.3795 ^a	1.8863 ^a
5LSO2, N-PK	3.8994 ^b	2.2387 ^{ab}	1.6663 ^{abc}
Mixed, PK	2.5425 ^d	1.6142 ^d	1.2391 ^d
Mixed, ½N-PK	2.8400 ^c	1.8684 ^c	1.4919 ^{bcd}
Mixed, N-PK	2.6675 ^{cd}	1.7269 ^{cd}	1.3377 ^{cd}
CV	10.82	14.07	29.98

Control = No NFB

N-PK = nitrogen phosphorus potassium

3LSO1 = *E. oryzae*, 3LSO1

5LSO2 = *S. maltophilia* 5LSO2

Mixed = 3LSO1 ร่วมกับ 5LSO2

^a —, no fluorescence above threshold recorded

* = ตัวอักษร ที่เหมือนกันแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P=0.05$

ผลการตรวจติดตามปริมาณ *S. maltophilia*, 5LSO2 พบว่ามีลักษณะคล้ายกับ *E. oryzae*, 3LSO1 โดยพบว่า *S. maltophilia*, 5LSO2 ในดินที่เวลา 0, 3 และ 12 เดือน พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 เฉพาะในแปลงที่ใส่เชื้อนี้ลงไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่า probe มีความจำเพาะ พบว่าเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ที่เวลา 3 เดือนมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่ลดลงที่เวลา 12 เดือน และพบว่าในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณของ *S. maltophilia*, 5LSO2 น้อยกว่าตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 เพียงชนิดเดียวซึ่งสอดคล้องกับปริมาณที่ใส่เชื้อเริ่มต้น และสอดคล้องกับผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 พบว่าที่ 3 เดือนปริมาณเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 ในดินมากกว่ารากและลำต้นตามลำดับ และพบว่าในรากที่ 3 เดือนมีปริมาณเชื้อเชื้อ *S. maltophilia*, 5LSO2 มากกว่าในลำต้น และลำต้นที่ 3 เดือนมีมากกว่าที่ 12 เดือน ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA แบบ randomized

complete block และเปรียบเทียบข้อมูลแบบ all-pairwise comparisons ด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 % พบว่าปัจจัยของปุ๋ยไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อทั้งในดินที่เวลา 0, 3 และ 12 เดือน

การมีชีวิตรอดของเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ในแปลงทดลองบ่งชี้ว่าจะมีประโยชน์ต่อไปกับอ้อยต่อ

4.6.3 การหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของการหาปริมาณเชื้อ NFB ในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค

Real-Time PCR

ได้ทำการทดสอบหา % recovery ของการหาปริมาณเชื้อ NFB ในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค Real-Time PCR โดยใช้ *E. oryzae*, 3LSO1 เป็นตัวแทน โดยนำเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 ที่เจริญในอาหารเหลว (LB broth) จำนวน 1×10^{10} cfu/ml เติมลงในดินปริมาณ แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอจำนวน 5 ซ้ำ เทียบกับการสกัดเชื้อจากอาหารเหลวโดยตรง ไปวัดหาความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop และนำมาเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี Real-Time PCR แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery พบว่าได้ค่าเปอร์เซ็นต์ DNA recovery เท่ากับ 61.08% และเปอร์เซ็นต์ gene recovery เท่ากับ 88.16% ดังแสดงในตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 แสดง % recovery ของความเข้มข้น DNA และ Log copy number ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1

ลำดับซ้ำ	ความเข้มข้น DNA(ng/ul)		Log copy number	
	Pure culture	3L+soil	Pure culture	3L+soil
1	157.88	44.85	7.50	6.56
2	130.39	53.28	7.44	6.57
3	138.91	58.08	7.46	6.58
4	160.57	62.30	7.53	6.64
5	162.10	86.88	7.53	6.68
เฉลี่ย	149.97	61.08	7.49	6.60
% recovery	61.08		88.16	

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารถสรุปผลได้เป็นข้อๆ ดังนี้

1. เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน คือไม่ส่งเสริมหรือขัดขวางการเจริญของกันและกัน

2. การเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนด้วยการใช้ซอเยล์เมตเป็นวัสดุตัวพาควรเตรียมโดยใช้สัดส่วนของสารแขวนลอยเชื้อต่อซอเยล์เมตในอัตราส่วน 1:10 (v/w) แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นประมาณ 10°C โดยเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณในซอเยล์เมตได้ประมาณ 1-2 log cfu/g หลังจากบ่มไว้ 17 วันและเชื้อยังคงมีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์เชื้อ NFB หลังจากบ่มไว้ 30 วัน

3. การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในแปลงทดลองไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อคุณสมบัติดินทั้งด้านกายภาพและธาตุอาหาร แต่มีแนวโน้มทำให้ค่าธาตุอาหารในดินเพิ่มขึ้นได้แก่ organic matter, total N, total P, total NO_3^- , และ available P

4. ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรวจพบในดินและ/หรือในอ้อยในอาหารสังเคราะห์ที่เวลาต่างๆ มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับในรากในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อพบแนวโน้มปริมาณเชื้อสูงกว่าที่ไม่ได้ใส่แต่เห็นไม่ชัดเจนในลำดับ 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

5. 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

6. ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยทำให้อัตราการงอก จำนวนหน่อต่อต้น ความสูง และน้ำหนักแห้งที่ 3 เดือน จำนวนลำต้ออกที่ 6 เดือน ขนาดเส้น

ผ่านศูนย์กลางของลำต้นอ้อยและน้ำหนัสดเป็นต้นต่อไร่ที่ 12 เดือนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดการใช้ปุ๋ย N ได้ทั้งหมดตามอัตราแนะนำในอ้อยปลูกเขตอาศัยน้ำฝนใช้ 18 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่

7. ในการศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ด้วยเทคนิค Real-Time PCR (TagMan Probe) สามารถออกแบบ 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 และสามารถโคลนยีนบางส่วนของ nitrogenase reductase ของเชื้อ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophilia*, 5LSO2 ด้วย pGEM-T Easy vector ใน *E. coli* DH5 α เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค Real-Time PCR ได้

8. ผลของชีวภัณฑ์เชื้อทั้งสองชนิดที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยซึ่งรวมถึงผลผลิตอ้อยและความหวานของอ้อยที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการตรวจพบปริมาณ *E. oryzae*, 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2 ในดิน ราก และลำต้นอ้อยได้โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR (TagMan Probe) ซึ่งก็ตรวจพบเฉพาะในตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อเหล่านั้น

9. การศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *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

10. ปัจจัยของปุ๋ยไม่มีอิทธิพลต่อความหวานของอ้อยและการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ *S. maltophilia* 5LSO2

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยนี้

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของอ้อยพบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *E. oryzae* 3LSO1 และ/หรือ *S. maltophilia* 5LSO2 พร้อมกับการปลูกอ้อย โดยใส่ปุ๋ยตามเอกสารวิชาการลำดับที่ 001/2553 คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ ของกรมวิชาการเกษตร สามารถเพิ่มผลผลิตอ้อยและลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนลงได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังอาจลดการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสได้ด้วย รวมทั้งการตรวจพบเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ในดินและในอ้อยจากตำรับทดลองที่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนนั้นๆ ทำให้มีแนวโน้มว่าอาจช่วยลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนและปุ๋ยฟอสฟอรัสในการปลูกอ้อยต่อได้ ซึ่งจะเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและดีต่อสภาพดิน

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร (2552). 3. อ้อย ใน คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ เอกสารวิชาการลำดับที่ 001/2553, กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.
- จักรินทร์ศรัทธาพร, ปรีชา พราหมณี, สุวิทย์ สุริยพันธุ์และประสงค์ สิทธิไทย. 2535. ศึกษาผลตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจนของอ้อยพันธุ์ 81-1-026 และ 80-1-128, น. 305-313. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2535 อ้อยศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี, สถาบันวิจัยพืชไร่กรมวิชาการเกษตร
- สุวรรณา เนียมสนธิ, นิภา मिलินทวิสสัยและ ประสิทธิ์ ใจศีล. (2553). การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร้อ้อย. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณพ.ศ. 2552. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (35 หน้า).
- สุวรรณา เนียมสนธิ, นิภา मिलินทวิสสัยและ ประสิทธิ์ ใจศีล. (2554). การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร้อ้อย. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณพ.ศ. 2553. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (33 หน้า).
- สุวรรณา เนียมสนธิ, นิภา मिलินทวิสสัยและ ประสิทธิ์ ใจศีล. (2555). การคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงจากไร้อ้อย. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณพ.ศ. 2554. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (78 หน้า).
- สุวรรณา เนียมสนธิ, นิภา मिलินทวิสสัยและ ประสิทธิ์ ใจศีล. (2557). ผลของผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเพาะปลูกอ้อยในสภาพแปลงทดลอง. รายงานการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณพ.ศ. 2557. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (36 หน้า).
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2555. รายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศ ประจำปีการผลิต 2553/54 (ฉบับปิดทึบ)
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2556. รายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศ ประจำปีการผลิต 2555/56 (ฉบับปิดทึบ).
- 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.
- Kao P., B. Hsu, T. Hsu, W. Ji, P. Huang, C. Hsueh, C. Chiang, S. Huang, and Y. Huang. 2014. Application of TaqMan fluorescent probe-based quantitative real-time PCR assay for the environmental survey of *Legionella* spp. and *Legionellapneumophila* in drinking water reservoirs in Taiwan. *Science of the Total Environment* 490: 416–421
- 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.
- Korimbocus J., D. Coates, I. Barker, and N. Boonham. 2002. Improved detection of *Sugarcane yellow leaf virus* using real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 103: 109–120
- 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.
- 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.
- 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 ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plant with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. *Molec.Plant-Microbe Interactions*. 14: 358-366.
- Valera M.J., M. J. Torija, A Mas, and E. Mateo. 2013. *Acetobacter malorum* and *Acetobacter cerevisiae* identification and quantification by Real-Time PCR with TaqMan-MGB probes. [Food Microbiology 36: 30-39](#)
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991).16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.*J. Bacteriol.* 173, 697-703
- Whelan, J.A., Russel, N.B., Whelan, M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. *J. Immunol. Meth.* 278, 261–269.

ภาคผนวก

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

ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย

นางนิภา มลิทธิสมัย

1. ตำแหน่งทางวิชาการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8 อายุ 59 ปี

2 ประวัติการศึกษา

ระดับ	ชื่อปริญญา (สาขาวิชา)	ชื่อสถาบัน, ประเทศ	ปี พ. ศ. ที่จบ
ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2523
ปริญญาโท	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2526
ปริญญาเอก	วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ปฐพีศาสตร์)	พ.ศ. 2540

3. ผลงานทางวิชาการ

3.1 ตำราหนังสือ หรือเอกสารประกอบการสอน

เอกสารประกอบการสอน

นิภา มลิทธิสมัย เอนไซม์และโคเอนไซม์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2542. 37 หน้า ใช้ประกอบการสอนวิชา 318 305 ชีวเคมี

นิภา มลิทธิสมัย. เยื่อหุ้มเซลล์.ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ.

2543. 23 หน้า ใช้ประกอบการสอนวิชา 318 201 โครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์

นิภา มลิทธิสมัย. วิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็น. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2543. 85 หน้า ใช้ประกอบการสอนวิชา 318 434 ชีวเคมี

เชิงโภชนาการ และ 318 701 ชีวเคมีชั้นสูง 1

นิภา มลิทธิสมัย. น้ำและอิเล็กโทรไลต์ในกระบวนการทางชีวเคมี. ภาควิชาชีวเคมี คณะ

วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. พ.ศ. 2547. 28 หน้า เป็นเอกสารคำสอนวิชา

318 402 ชีวเคมีแบบเข้ม 1

นิภา มลิทธิสมัย. เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนและ

ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชัน.ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น. พ.ศ. 2547. 77 หน้า เป็นเอกสารคำสอนวิชา 318 403

ชีวเคมีแบบเข้ม 2

นิภา มลิทธิสมัย. ชีวพลังงานและเมแทบอลิซึมเบื้องต้น.ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น. พ.ศ. 2547. 22 หน้า เป็นเอกสารคำสอนวิชา 318 305

ชีวเคมี

3.2 งานวิจัยตีพิมพ์/นำเสนอ

นิภา มิลินทวิสมัย และสุวรรณา เนียมสนธิ. 2549. แบคทีเรียที่ใช้ toluene เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและสามารถสลาย trichloroethylene (TCE) ได้ ที่แยกได้จากธรรมชาติและแหล่งปนเปื้อน และความสามารถในการใช้สารต้นตอคาร์บอนตัวอื่น. วิทยาศาสตร์มข.34(1) 59 – 71

Milintawisamai, N. S. Niamsanit, M. Ponglikitmongkol, Y. Choanahee, N. Sripakdee, P. Sangchumpol, S. Bunsaup and M. Milintawisamai. 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. P-waste treatment-11, p 337 (Abstract)

Milintawisamai N. and S. Niamsanit. 2002. **Isolation of Toluene-Utilizing/Trichloroethylene Degrading Bacteria from Natural Environment.** Biotechnology for Better Living in the New Economy. Khon Kaen, Thailand. Nov.12-15, 2002.p 91 (Abstract).

Milintawisamai N. and K. Arunchaipong. 2003. **2D-PAGE differential displays of toluene-induced protein pattern of bacterial T1/4.** 29th Congress on Science and Technology of Thailand. Khon Kaen, Thailand. Oct. 20-22, p 249 (Abstract).

Milintawisamai N., M. Ponglikitmongkol, P. Enmark, K. Arunchaipong, and S.Niamsanit. 2006. **PCR with specific primers for detection of toluene-utilizing bacteria.** International Conference Hazardous Waste Management for a Sustainable Future. Bangkok, Thailand. Jan 10 – 12 , p 134 (Abstract).

Milintawisamai N., S. Niamsanit, C. Ngasan, R. Maungnontri, W. Buttapeng, R. Kotrsri, A.Plainsinchai, and P. Weerathaworn. 2009. **Efficacy of dimethyl benzyl ammonium chloride and microbial contamination studies in a modern sugarcane milling unit in Thailand.** Sugar Tech 11(2):208-212

Milintawisamai N., S. Niamsanit, C. Ngasan, A. Plainsinchai, and P. Weerathaworn. 2009. **Dextran producing microorganisms from Miltr Phuving sugar factory, Thailand.** Sugar Tech 11(2):196-199

Milintawisamai N., S. Promputta and S.Niamsanit. 2008. **Isolation of**

- Microorganisms exhibiting high invertase activity.** KKU.Res J 13 (1): 5-14
- Milintawisamai N., N. Taka, M. Yoshida, and T. Araki.** 2007. **Study of Invertase from Yeast Isolated from Sugar Industry.** Proc. Sch. Agric. Kyushu Tokai Univ. 26: 7-14
- Boonlue S., **N. Milintawisamai**, U. Kokaew, and S. Naknil. 2010. **Production and properties of xylanase from thermoalkalophilic fungal *Thermoascus aurantiacus* SCGNF27-2 on solid-state cultivation.**1st Symposium on Biotechnology Applied to Lignocellulose. Reims, France. Mar. 28 – Apr. 1, p69 (Abstract).
- Milintawisamai N., M. Boonmee, O.Cotano, M. Konkchaiyaphum and S. Niamsanit.** 2010.**Laboratory fermentor production and partial purification of invertase from *Candida humicola* 5M2.** International Conference on Biotechnology for Healthy Living. Trung, Thailand. Oct. 20-22, p33 (Abstract).
- Milintawisamai N., S. Netsopa, S. Khueychai, and S. Niamsanit.** 2011. **Dextranase from *Aspergillus* sp. X26.** 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. Luang Prabang, Lao People's Democratic Republic. Mar 24-25, p40 (Abstract).
- Budda W., R. Sarnthima, S. Khammuang, **N. Milintawisamai**, and S. Naknil. 2012. **Ligninolytic Enzymes of *Lentinus polychrous* Grown on Solid Substrates and its Application in Black Liquor Treatment.** Journal of Biological Science 12(1): 25-33
- Ngivprom U. and **N. Milintawisamai.** 2013. **Isolation of Dichloroethane Dechlorinator from Volatile Organic Compounds (VOCs) Contaminated Soil and Groundwater.** The 2nd Thailand National Research University Summit. Bangkok, Thailand. Mar 7-8, p188 (Abstract).
- Milintawisamai N., N. Phanthaphol and U. Ngivprom.** 2013. **Microbial Diversity in a Volatile Organic Compounds (VOCs) – Contaminated Groundwater Site at Rayong.** International Conference on Environmental

and Hazardous Substance Management towards a Green Economy.
Bangkok, Thailand. May 21-23, p 151 (Abstract).

Netsopa S., S. Niamsanit, and N. Milintawisamai. 2013. **Growth Study of Dextran Producing Bacteria.**The RGJ-Ph.D. Congress XIV. Pattaya, Thailand. April 5-7, p 341 (Abstract).

Meesilp N., S. Niamsanit, N. Milintawisamai, and P. Jaisil. 2014. Isolation, Partial Characterization and the Effect of Nitrogen Fixation on Sugarcane Growth.Seoul International Conference on Biological Engineering and Natural Science. Seoul, Korea. August 29-31. pp 124-132. (Proceeding)

3.3 งานวิจัยที่นำไปใช้ประโยชน์/อื่นๆ

1. อนุสิทธิบัตรเลขที่คำขอ 0503001484 (ออกให้ 16 มีนาคม 2552 หมดอายุ 24 พฤศจิกายน 2554) สำหรับการประดิษฐ์ “ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสลายโทลูอีน (toluene) หรือ เบนซีน (benzene) ได้”

2. นิภา มลิณทวิสมัย. 2552. การศึกษากิจกรรมจุลินทรีย์ในโครงการบำบัดพื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนสารอินทรีย์ระเหย โดยใช้พืชสีเขียว ณ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา. เอกสารประกอบการสัมมนาโครงการ การศึกษาเทคโนโลยีพื้นฟูพื้นที่ปนเปื้อนโดยพืชสีเขียว โดยกรมโรงงานอุตสาหกรรมร่วมกับบริษัท Shimizu Corporation Ltd.

3. คำขอขึ้นทะเบียนพันธุ์พืช/สัตว์/จุลชีพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น “ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* KKU-6M4.1” วันที่ 30 พฤษภาคม 2556ผู้ร่วมวิจัย: นิภา มลิณทวิสมัย, สุวรรณ เนียมสนธิ, และ เสกสิทธิ์ พรหมพุดมา

4. สัญญาการถ่ายโอนวัสดุ (Material Transfer Agreement) “เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* KKU-6M4.1 ในการผลิตเอทานอล” ของมหาวิทยาลัยขอนแก่นให้กับบริษัท เอกรัฐพัฒนา จำกัด มีกำหนด 6 เดือน ระหว่างวันที่ 16 มกราคม 2557 ถึง วันที่ 15 กรกฎาคม 2557

5.นันทวัน ฤทธิ์เดช, โสภณ บุญลือ..วิยะดา มงคลธนรักษ์และ นิภา มลิณทวิสมัย. 2558. “การพัฒนาสูตรปุ๋ยน้ำชีวภาพจากน้ำเสียในการผลิตไบโอมีเทนเพื่อการผลิตผัก Hydroponic” รายงานผลการวิจัยเสนอ บริษัทเอส เอฟ ขอนแก่น จำกัดและ ITAP

3.4 บทความทางวิชาการ

นิภา มลิณทวิสมัย. 2542. สารอินทรีย์ระเหยชนิด Chlorinated aliphatic hydrocarbon.วารสารวิทยาศาสตร์ มข. ปีที่ 27 ฉบับที่ 3 หน้า 186-199
มหาวิทยาลัยขอนแก่น. จังหวัดขอนแก่น

3. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. X26 เพื่อย่อยเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย. (ทุนโครงการ IRPUS ประจำปี 2552)

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* sp. 3LS01 on sugar cane growth. Sugar Tech. DOI 10.1007/s12355-015-0386-x.

Meesilp N, Jaisil P, Milintawisamai 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, Milintawisamai 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 KornBuri sugar factory and KhonKaen University; 2014 August; KhonKaen, 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 KhonKaen University, editor. International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology; 2012 October 4-6; KhonKaen, Thailand. KhonKaen: KhonKaen 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; KhonKaen, 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, KhonKaen 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, KhonKaen 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 Makong 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 MitrPhuveing 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 MitrPhuveing 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 มลิณทวิสมัย และ สุวรรณ เนียมสนิท. 2549. แบคทีเรียที่ใช้ toluene เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และสามารถสลาย trichloroethylene (TCE) ได้ที่แยกได้จากธรรมชาติและแหล่งปนเปื้อน และความสามารถในการใช้สารต้นตอคาร์บอนตัวอื่น. ว. วิทย. มข. 34(1): 59-71.
- ชัยวัฒน์ งามสาร, สุวรรณ เนียมสนิท, รัตนา เมืองมนตรี, อัปสร เปลี่ยนสินไชย และนิภา มลิณทวิสมัย. 2549. การศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมประชากรของจุลินทรีย์ในน้ำอ้อยโดยใช้สารยับยั้ง M-QUAT-3080 และ H₂O₂ ในหลอดทดลอง. การประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ณ โรงแรมเบเวอร์ลี ฮิลล์ปาร์ค 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, KhonKaen, 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, SuwannaNiamsanit and NisonSattayasai (2005). Antibacterial pyrrols, UK patent application 0520368.2, 06-Oct-2005, Aston University
- ชิตชนก อนุตระกูลชัย, ยานี ทรองพานิชย์, 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, NakhonRatchasima. 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, KhonKaen, 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., Bunsap, 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 Toluene-Utilizing/Trichloroethylene 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-Staphylococcal 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-Staphylococcal 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 comparative 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.

ผลลัพธ์ (outcome) ของงานวิจัย

ตารางแสดงผลลัพธ์ของงานวิจัย

ผลลัพธ์	เชิงปริมาณ		เชิงคุณภาพ	
	ก่อนวิจัย	หลังวิจัย	ก่อนวิจัย	หลังวิจัย
1. ได้ผลผลิตอ้อยปลูกที่มีคุณภาพทั้งปริมาณและคุณสมบัติเพิ่มขึ้น	น้ำหนักอ้อยต่อไร่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และลดต้นทุนปุ๋ยไนโตรเจนอย่างน้อยครึ่งหนึ่ง (1/2N)	น้ำหนักอ้อยต่อไร่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และลดต้นทุนปุ๋ยไนโตรเจนได้ทั้งหมด	เพิ่มปริมาณธาตุอาหารในพืชและดินรวมถึงจุลินทรีย์ NFB	เพิ่มปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในพืช
2. ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยจุลินทรีย์ (formulation)	ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยจุลินทรีย์ (formulation) ปริมาณที่สามารถผลิตใช้กับแปลงทดลองพื้นที่ประมาณ 4.5 ไร่ได้	ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยจุลินทรีย์ (formulation) ปริมาณที่สามารถผลิตใช้กับแปลงทดลองพื้นที่ประมาณ 4.5 ไร่ได้	ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยจุลินทรีย์ (formulation) ที่มีคุณภาพใช้ได้จริงในสภาพแปลงทดลอง	ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยจุลินทรีย์ (formulation) ที่มีคุณภาพใช้ได้จริงในสภาพแปลงทดลอง
3. บทความวิชาการ	ตีพิมพ์บทความทางวิชาการระดับชาติ และ/หรือนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง	ตีพิมพ์เป็น proceeding งานประชุมอ้อย (รายละเอียดด้านล่าง)	ตีพิมพ์ในวารสารที่มีระบบ Peer review และเป็นที่ยอมรับ	ตีพิมพ์เป็น proceeding งานประชุมอ้อย (รายละเอียดด้านล่าง)
4. นักวิจัยรุ่นเยาว์	สามารถผลิตนักวิจัย ซึ่งเป็นนักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาอย่างน้อย 1 คน	สามารถผลิตนักวิจัย ซึ่งเป็นนักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา 1 คน (เนื่องจากนักศึกษาลาออกระหว่างศึกษา จึงไม่มีจำนวนนักศึกษาสำเร็จ แต่ได้จ้างนักศึกษาหลายคนช่วยกันทำงานทำให้นักศึกษาเหล่านี้มีความรู้ด้านอ้อยเพิ่มเติมหลายคน)	นักศึกษามีความรู้ความชำนาญในการผลิตและการใช้ปุ๋ยชีวภาพ	นักศึกษามีความรู้ความชำนาญในการผลิตและการใช้ปุ๋ยชีวภาพ
5. การสร้างเครือข่าย	สร้างเครือข่ายกับ	สร้างเครือข่ายกับ	เกษตรกรเรียนรู้การ	เกษตรกรเรียนรู้

กับเกษตรกร	เกษตรกรอย่างน้อย 1 ราย	เกษตรกรอย่างน้อย 1 ราย คือนางสุวรรณี จันทร์เพ็ง บ.หนองแขวง ต.พระยืน อ.เมือง จ.ขอนแก่น	ใช้ NFB กับ การเพาะปลูกอ้อยปลูก	การใช้ NFB กับ การเพาะปลูกอ้อยปลูก
6. การประชุมสัมมนา	เข้าร่วมประชุม สัมมนา และนำเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์หรือปากเปล่าอย่างน้อย 1 เรื่อง	ประชุมในงานอ้อยโลก ISSCT 2016	เป็น การ ประชุม วิชาการในระดับชาติ และ หรือ ระดับนานาชาติ	ระดับนานาชาติ
7. คู่มือการใช้ผลิตภัณฑ์	ตามความเหมาะสม	ได้คู่มือและการอบรมเรื่องการใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในการเพาะปลูกอ้อย	เกษตรกรสามารถเข้าใจวิธีการใช้จากคู่มือ	เกษตรกรสามารถเข้าใจวิธีการใช้จากการอบรมและคู่มือในวันที่ 17 กันยายน 2559

Niamsanit S., Milintawisamai N, Krumkhutot R., and Jaisil P. 2016. Assessment of *Enterobacter oryzae* 3LSO1 and *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 for promoting sugarcane growth in the field. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*, volume 29, 1013-1015.

รายงานการถ่ายทอดเทคโนโลยี

เรื่องการใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน เอ็น เอฟ บี (NFB) ในไร่อ้อยเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน

บทสรุปการถ่ายทอดเทคโนโลยี

ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนหรือชีวภัณฑ์เชื้อ NFB เอ็น เอฟ บี (NFB) คือปุ๋ยที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และ/หรือ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มที่สามารถอยู่ได้อิสระทั้งในดินและรากพืช อยู่ในรูปที่ผสมกับวัสดุปลูกทางการเกษตรขอยล์เมต (soilmate) มีเชื้อไม่น้อยกว่า 10^6 โคโลนีต่อกรัม (cfu/g) ทำการแยกเชื้อและผลิตเป็นสูตรปุ๋ยชีวภาพโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวรรณา เนียมสนธิ และคณะ จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยได้รับทุนการศึกษาวิจัยจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยปี 2557 ได้ทำการถ่ายทอดองค์ความรู้และแนวปฏิบัติในการใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในการเพาะปลูกอ้อย ให้แก่เกษตรกรที่สนใจในเขตตำบลหนองแวง อำเภอพะเยา จังหวัดขอนแก่น ในวันเสาร์ที่ 17 กันยายน 2559 เวลา 9:00-12:00 น. โดยมีนางสาวสุวรรณี จันท์เพ็ง เจ้าของพื้นที่ที่คณะผู้วิจัยใช้ดำเนินการศึกษา เป็นผู้ประสานงานกับผู้ใหญ่บ้านฯ เรื่องการประชาสัมพันธ์ผู้เข้าอบรมและสถานที่มีการประชาสัมพันธ์การอบรมดังกล่าวให้แก่ผู้นำชุมชนและเกษตรกรในละแวกใกล้เคียง ณ บ้านหนองแวง โดยจัดให้มีการบรรยาย ณ ศาลาประชาคม บ้านหนองแวง หมู่ที่ 7 และภาคปฏิบัติ ณ แปลงอ้อยของ การอบรมครั้งนี้มีผู้สนใจเข้าอบรมจำนวน 29 คน หัวข้อ “การใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในการเพาะปลูกอ้อย” บรรยายโดย ผศ.สุวรรณา เนียมสนธิ ส่วนภาคปฏิบัติ “วิธีการใส่ปุ๋ยจุลินทรีย์ในการปลูกอ้อย” สาธิตโดย ผศ.นิภา มลิทธิสมัย และนางสาวสุวรรณี จันท์เพ็ง ณ ศาลาประชาคม เนื่องจากพื้นที่จริงมีน้ำท่วมขังอันเกิดจากฝนตก ผลการอบรม ผู้เข้าอบรมประเมินความพึงพอใจในภาพรวมทั้งหมดอยู่ระดับดี-ดีมาก ผู้เข้าอบรมให้ความสนใจซักถาม และมีเกษตรกรบางคนร่วมแลกเปลี่ยนประสบการณ์เนื่องจากเริ่มเปลี่ยนการทำเกษตรจากปลูกข้าวมาเป็นอ้อย หลายคนสนใจที่จะปลูกอ้อยแทนข้าว และสนใจอยากใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนหรือชีวภัณฑ์เชื้อ NFB เอ็น เอฟ บี (NFB)

คู่มือการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง

การใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในการเพาะปลูกอ้อย

โดย

ผศ.สุวรรณา เนียมสนิท

ผศ.นิภา มลิณทวิสมัย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กันยายน 2559

การอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง

การใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในการเพาะปลูกอ้อย

วันเสาร์ที่ 17 กันยายน 2559 ณ บ้านหนองแวง หมู่ที่ 7 ต.พระยืน อ.เมือง จ.ขอนแก่น

เวลา 9:00-10:30 น. ภาคบรรยาย “การใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในการเพาะปลูกอ้อย”

โดย ผศ.สุวรรณา เนียมสนิท คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ณ ศาลาประชาคม บ้านหนองแวง หมู่ที่ 7

เวลา 10:30-11:00 น. ซักถาม และพักรับประทานของว่าง

เวลา 11:00-12:00 น. ภาคปฏิบัติ “วิธีการใส่ปุ๋ยจุลินทรีย์ในการปลูกอ้อย”

ณ แปลงอ้อยของ นางสาวสุวรรณี จันทร์เพ็ง

โดย ผศ.นิภา มิตินทวิสมัย และนางสาวสุวรรณี จันทร์เพ็ง

เวลา 12:30 น. พักรับประทานอาหารกลางวันและปิดการอบรม

การใช้ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในไร่อ้อยเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน

ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนคืออะไร

ปุ๋ยชีวภาพ คือปุ๋ยที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อใส่ลงไปในดินหรือให้กับพืชแล้ว จุลินทรีย์นั้นสามารถสร้างธาตุอาหาร หรือช่วยให้ธาตุอาหารเป็นประโยชน์ต่อพืชได้

ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน คือปุ๋ยที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนเป็นปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืชได้ มีทั้งจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในรากพืชและในดิน

ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน เอ็น เอฟ บี (NFB)

ปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนหรือชีวภัณฑ์เชื้อ NFB เอ็น เอฟ บี (NFB) คือปุ๋ยที่มีเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน *Enterobacter oryzae* 3LSO1 และ/หรือ *Stenotrophomonas maltophilia* 5LSO2 ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มที่สามารถอยู่ได้อิสระทั้งในดินและรากพืช อยู่ในรูปที่ผสมกับวัสดุปลูกทางการเกษตร ซอยล์เมต (soilmate) มีเชื้อไม่น้อยกว่า 10^7 โคโลนีต่อกรัม (cfu/g) แยกได้จากดินที่ปลูกอ้อยโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวรรณา เนียมสนธิ และคณะ จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยได้รับทุนการศึกษาวิจัยจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

จุดเด่นของเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน เอ็น เอฟ บี

- สามารถทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้ โดยเทียบเท่ากับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนตามอ้างอิงการใส่ปุ๋ยตามเอกสารวิชาการลำดับที่ 001/2553 คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ ของกรมวิชาการเกษตร
- ทำให้ผลผลิตอ้อยเพิ่มขึ้น โดยอ้อยมีลักษณะแนวโน้มของการเจริญในช่วงต้นที่ดี มีการแตกกอมากขึ้น ขนาดลำใหญ่ขึ้น มีความสูงเพิ่มขึ้น และในอ้อยตอนเก็บเกี่ยวก็พบว่ามีธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมดเพิ่มขึ้นด้วย
- มีแนวโน้มที่ทำให้มีความหวานมากขึ้น (CCS)
- เพิ่มธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ให้กับดินทั้ง N P K

อัตราการใช้ปุ๋ยชีวภาพ เอ็น เอฟ บี

การใส่ชีวภัณฑ์เชื้อ เอ็น เอฟ บี ที่มีปริมาณเชื้อไม่น้อยกว่า 10^6 โคโลนีต่อกรัม (cfu/g) ใส่ในวันที่ปลูกอ้อยครั้งเดียว โดยโรยเชื้อลงไปบริเวณท่อนอ้อย ในอัตรา 45 กิโลกรัม/ไร่ หลังจากนั้นจะใช้จอบเกลี่ยดินข้างๆ เพื่อกลบท่อนพันธุ์อ้อย

สถานที่ติดต่อ ผศ.ดร.สุวรรณา เนียมสนธิ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
40000 เบอร์โทรศัพท์ 080-5592234