ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ในการปลูกข้าวระบบประณีต

นางสาวอาภากร หล่องทองหลาง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2553

NITROGEN FIXATION EFFICIENCY OF *Azospirillum largimobile* AND *Azotobacter vinelandii* IN SYSTEM OF RICE INTENSIFICATION

Aphakorn Longtonglang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Crop Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2010

ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ในการปลูกข้าวระบบประณีต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(ผศ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา)
ประธานกรรมการ

_____

(ผศ. ดร.สุดชล วุ้นประเสริฐ)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(รศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)
กรรมการ

_____

(ศ. ดร.นันทกร บุญเกิด)
กรรมการ

_____

(อ. ดร.วุฒิ ด่านกิตติกุล)
รักษาการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

_____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อาภากร หล่องทองหลาง : ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ในการปลูกข้าวระบบประณีต (NITROGEN FIXATION EFFICIENCY OF *Azospirillum largimobile* AND *Azotobacter vinelandii* IN SYSTEM OF RICE INTENSIFICATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดชล วุ้นประเสริฐ, 80 หน้า.

จุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจน ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญ ในระบบการเกษตร เพื่อทดแทนปุ๋ยเคมีไนโตรเจน แต่ชาวนาส่วนใหญ่ยังปลูกข้าวแบบระบบดั้งเดิม (Conventional Systems: CS) ที่มีน้ำท่วมขัง จึงทำให้ดินขาดออกซิเจน ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ดังกล่าว จึงถูกจำกัด ระบบการปลูกข้าวแบบประณีต (System of Rice Intensification: SRI) ซึ่งมีการควบคุมการให้น้ำแบบสลับแห้งและเปียก ทำให้มีการถ่ายเทออกซิเจนในดิน อาจช่วยส่งเสริมให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนในดินเพิ่มขึ้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบวิธีการใส่เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ในการปลูกข้าว โดยใช้วิธีแช่เมล็ดข้าว วิธีแช่รากกล้าข้าว และวิธีใส่เชื้อในดินบริเวณราก ข้าว ผลการทดลอง พบว่า วิธีการใส่เชื้อทั้ง 3 วิธี ไม่ทำให้ปริมาณเชื้อแตกต่างกัน แต่ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใส่เชื้อ ซึ่งสามารถยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธี Fluorescent Antibody (FA) เมื่อทำการวัดการเจริญเติบโตของข้าว และปริมาณไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ของข้าว พบว่า การใส่เชื้อ ทำให้น้ำหนักแห้งของข้าว และ ปริมาณไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้เพิ่มขึ้นจากกรรมวิธีที่ไม่มีการใส่เชื้อ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองต่อโดยประยุกต์ใช้วิธีการใส่เชื้อ ในดินบริเวณใกล้รากข้าว เพื่อศึกษา ผลของระบบการปลูกข้าว (ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตกับแบบดั้งเดิม) ร่วมกับการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ต่อปริมาณและการคงอยู่ของเชื้อ ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และผลผลิต ของข้าว โดยทำการทดสอบทั้งในระดับกระถางและแปลงทดลอง ผลการทดลอง พบว่า ทั้ง 2 การทดลอง ปริมาณเชื้อในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดกว่าระบบ ดั้งเดิม และ สามารถยืนยันการคงอยู่ของเชื้อทั้งสองชนิดด้วยวิธี Fluorescent Antibody (FA) และระบบการปลูกข้าวแบบประณีตเอื้ออำนวยให้เชื้อทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าระบบดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการวัดการเจริญเติบโตของข้าว พบว่า น้ำหนักแห้งต้น ความสูงต้น ความยาวราก ปริมาตรราก และน้ำหนักแห้งรากเฉลี่ย ทุกระยะการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันร ะหว่างการใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อ แต่ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตให้ผลสูงกว่าในระบบดั้งเดิม การวัดองค์ประกอบผลผลิต พบว่า การใส่เชื้อทำให้องค์ประกอบผลผลิต สูงกว่าการไม่ใส่เชื้อในระบบ การปลูกข้าวแบบ ประณีต ส่วนในระบบดั้งเดิมไม่แตกต่างกันทั้ง 2 การทดลอง ส่วนผลผลิต พบว่า ในระดับกระถางโดยทั่วไประบบ

การปลูกข้าวแบบประณีตสูงกว่าในระบบดั้งเดิม และในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตการใส่เชื้อมีแนวโน้มให้ผลผลิตสูงกว่า การไม่ใส่ เชื้อเล็กน้อย แต่ในระบบดั้งเดิมการใส่เชื้อไม่ทำให้ผลผลิตแตกต่างจากการไม่ใส่เชื้อ ส่วนในระดับแปลงทดลอง พบว่า ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตให้ผลผลิตสูงกว่าระบบดั้งเดิม โดยการใส่เชื้อ *Az. largimobile* ร่วมกับ *A. vinelandii* ให้ผลผลิตสูงที่สุด ส่วนการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิมการใส่เชื้อ *Az. largimobile* เพียงอย่างเดียวให้ผลผลิตสูงที่สุด

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

APHAKORN LONGTONGLANG : NITROGEN FIXATION EFFICIENCY OF *Azospirillum largimobile* AND *Azotobacter vinelandii* IN SYSTEM OF RICE INTENSIFICATION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SODCHOL WONPRASAID, Ph.D., 80 PP.

RICE/NITROGEN FIXATION/SYSTEM OF RICE INTENSIFICATION/ *Azospirillum largimobile*/*Azotobacter vinelandii*

Nitrogen fixing bacteria play an important role in agricultural systems for replacing nitrogen (N) chemical fertilizer. However, farmers usually grow rice under conventional system (CS). Under this system, rice is grown in submerged rice soils, the biological nitrogen fixation may be limited by oxygen availability. The system of rice intensification (SRI) is based on the cycle of wet and dry soil. It is a management practice which facilitates the oxygen translocation in the soil. It may enhance soil microbial activities including nitrogen fixation. The objective of this study was to compare the effect of seed, seedling, and soil inoculation of *Azospirillum largimobile* and *Azotobacter vinelandii* on their population, biomass, and N-uptake. The results showed that there was no significant difference between the 3 methods of inoculation on their population. However, there were significant differences between bacterial inoculation and un-inoculation which could be confirmed by Fluorescent Antibody (FA) technique. Biomass and N-uptake of rice were significantly different between bacterial inoculation and un-inoculation. Therefore, further study was conducted under pot and field conditions using soil inoculation to study the effect of bacterial inoculation and rice growing systems (CS and SRI) on their population, nitrogen

fixation efficiency, and rice yield. The results indicated that, in both experiments, there was a significant interaction between bacterial inoculation and rice growing systems on their population. FA technique was able to confirm the survival of *Az. largimobile* and *A. vinelandii* under both conditions (pot and field). SRI enhanced the population of both bacteria when their inocula were added. The nitrogen fixation efficiency was increased when bacterial inocula were added but the higher magnitude was observed under SRI. The biomass, plant high, root length, root volume, and root weight were not significantly different between bacterial inoculation and un-inoculation, but they were greater under SRI. The yield and components of yield under SRI were significantly different between bacterial inoculation and un-inoculation but under CS, they were not significantly different between bacterial inoculation and un-inoculation. In the pot experiment, rice yields of SRI were significantly higher than those of CS. The bacterial inoculation under SRI increased the yield but no differences were found between bacterial inoculation and un-inoculation under CS. In the field experiment, rice yields of SRI were significantly higher than those of CS. The *Az. largimobile* and *A. vinelandii* inoculation under SRI had the highest yield but under CS, the *Az. largimobile* inoculation showed the highest yield.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2010

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ผศ. ดร.สุดชล วุ้นประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง และ ศ . เกียรติคุณ ดร.นันทกร บุญเกิด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษา ช่วยแก้ปัญหา และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ อ. ดร.พรรณลดา ติตตะบุตร อาจารย์ประจำ สาขา วิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี คุณกมลลักษณ์ เทียมไธสง เจ้าหน้า ที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิ บัติการทุกท่าน ที่ช่วยอำ นวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์

ขอขอบคุณ พี่น้องบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้คำปรึกษาเป็นเพื่อนและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิตแก่ผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ ด้วยทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รัก และเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

อาภากร หล่องทองหลาง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 2
1.3 สมมติฐานการวิจัย 3
1.4 ขอบเขตการวิจัย 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 ข้าว 5
2.2 แหล่งปลูกข้าวของโลก 5
2.3 การแบ่งชนิดของข้าว 6
2.4 ระยะการเจริญเติบโตของข้าว 8
2.5 สภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสมในการปลูกข้าว 8
2.6 ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1 9
2.7 การปลูกข้าวในระบบดั้งเดิม 10
2.8 การปลูกข้าวในระบบประณีต 10
2.9 Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR 11
2.10 การประยุกต์ใช้ PGPR ในนาข้าว 13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.11 ข้อจำกัดบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนในนาข้าว.....15
2.12 การประมาณเชื้อด้วยวิธี Most Probable Number (MPN).....17
2.13 การตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Fluorescent Antibody (FA).....18
2.14 ปฏิกิริยาทางเคมีในวัฏจักรไนโตรเจน.....18
2.15 ปัญหาการขาดธาตุไนโตรเจนในนาข้าว.....19
2.16 การตรึงไนโตรเจน.....20
2.17 การวัดอัตราการตรึงไนโตรเจน.....20
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....22
3.1 วิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต.....22
3.2 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับกระถางและแปลงทดลอง ต่อปริมาณเชื้อ ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของข้าว.....27
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล.....32
4.1 วิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต.....32
4.2 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับกระถางและแปลงทดลอง ต่อปริมาณเชื้อ ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของข้าว.....42
4.2.1 การทดลองในระดับกระถาง.....43
4.2.2 การทดลองในระดับแปลง.....50
5 สรุปผลการทดลอง.....62
เอกสารอ้างอิง.....64
ภาคผนวก.....70
ประวัติผู้เขียน.....80

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 เนื้อที่เก็บเกี่ยว และผลผลิตข้าวของโลก ปี 2551 6

2 คุณสมบัติต่าง ๆ ของดินก่อนปลูกข้าวในกระถางพลาสติกและกระถางซีเมนต์.....24

3 สมบัติทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 24

4 คุณสมบัติบางประการของเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* 32

5 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อปริมาณ และการคงอยู่ของเชื้อที่ 10, 30 และ 60 วันหลังย้ายปลูก 34

6 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อปริมาณ และการคงอยู่ของเชื้อที่ 5 และ 15 วันหลังย้ายปลูก 35

7 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของรากข้าว 38

8 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นข้าว.....39

9 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อปริมาณธาตุไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ของข้าวอายุ 30 วันหลังย้ายปลูก 40

10 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อปริมาณเชื้อทั้งสองชนิด.....44

11 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน 46

12 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อการเจริญเติบโตของข้าว.....47

13 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อองค์ประกอบผลผลิตของข้าว 49

14 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อปริมาณและการคงอยู่ของ เชื้อทั้งสองชนิด.....51

15 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน.....53

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

16 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อการเจริญเติบโตทางลำต้นของข้าวที่ระยะกล้า แตกกอ ออกรวงและเก็บเกี่ยว.....54

17 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อการเจริญเติบโตทางรากของข้าวที่ระยะกล้า แตกกอ ออกรวงและเก็บเกี่ยว.....55

18 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อองค์ประกอบผลผลิตของข้าว 56

19 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อปริมาณธาตุอาหาร N, P, K ที่สะสมในต้นข้าวหลังปลูก.....59

20 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อคุณสมบัติทางเคมีบางประการของดิน.....60

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1 โครงสร้าง Indole-3-Acetic Acid (IAA) 12

2 กลไกการส่งเสริมการยืดยาวของเซลล์รากพืชโดยเอนไซม์ ACC deaminase ใน PGP 13

3 การจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody โดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody 36

4 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อการเจริญเติบโตของต้น และรากข้าวที่อายุ 30 วันหลังย้ายปลูก 37

5 การจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody โดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody 45

6 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อการเจริญเติบโตของต้นและรากข้าวที่ระยะแตกกอ 47

7 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อจำนวนรวงต่อกระถางของข้าว 48

8 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อผลผลิตของข้าว 50

9 การจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody โดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody 52

10 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลงทดลอง ต่อจำนวนรวงต่อตารางเมตรของข้าว 57

11 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลงทดลอง ต่อผลผลิตของข้าว 58

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

MPN	=	Most Probable Number
FA	=	Fluorescent Antibody
CS	=	Conventional Rice System
SRI	=	System of Rice Intensification
ISAC	=	Institute for Sustainable Agriculture Community
UHDP	=	Upland Holistic Development Project
PGPR	=	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
IAA	=	Indole-3-Acetic Acid
ACC	=	1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate
GS	=	Glutamine Synthethase
GDH	=	Glutamic Acid Dehydrogenase
FITC	=	Fluorescein Isothiocyanate
ATP	=	Adenosine Triphosphate
ADP	=	Adenosine Diphosphate
MS	=	Mass Spectrometry
Km	=	Michaelis constant
GC	=	Gas Chromatography
NA	=	Nutrient Agar
NFB	=	Nitrogen Free Broth
CS	=	Concentrate Suspension
WS	=	Working Suspension
Eh	=	Redox Potential
ORP	=	Oxidation Reduction Potential
CFU	=	Colony-Forming Unit
DAP	=	Day After Planting
SD	=	Standard Deviation
CV	=	Coefficient of Variation

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชที่มีการปลูกแพร่หลายทั่วโลก ทั้งในบริเวณเขตร้อนและเขตอบอุ่น และสามารถปลูกได้ในสภาพนิเวศวิทยาและสภาพทางภูมิอากาศที่แตกต่างกัน ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรในโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก สำหรับประเทศไทยถือว่าข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งของประเทศ คนไทยเราบริโภคข้าวเป็นประจำทุก ๆ วัน นอกจากนี้ข้าวยังเป็นพืชที่นำรายได้เข้าประเทศปีละนับพันล้านบาท ในปี 2553 ประเทศไทยส่งออกข้าว 8,939,630 ตัน คิดเป็นมูลค่า 168,193.1 ล้านบาท (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2554)

การผลิตข้าวของประเทศไทย ยังคงประสบปัญหาเรื่องผลผลิตต่ำ ทั้งนี้เพราะว่าการจัดการในการปลูกยังไม่ดีเท่าที่ควร การปลูกโดยทั่ว ๆ ไปยังจำกัดอยู่ในเขต น้ำฝน และที่สำคัญพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่ขาดธาตุอาหารโดยเฉพาะ ธาตุไนโตรเจน แหล่งของปุ๋ยไนโตรเจนที่ใช้ ส่วนใหญ่คือ ปุ๋ยยูเรีย แต่ไนโตรเจนส่วนใหญ่จะสูญเสียโดย กระบวนการ ชะล้าง (Leaching) กระบวนการ Denitrification หรือระเหยไปในรูปของแอมโมเนีย ซึ่งทำให้เกิดมลพิษต่อบรรยากาศในรูปไนตรัสออกไซด์ (N_2O) และแอมโมเนีย (NH_3) (Reeves *et al*., 2002) ส่วนไนเตรท (NO_3^-) ที่ถูกชะล้างจะตกค้างในน้ำ (Shrestha and Ladha, 1998)

การเพิ่มสารประกอบไนโตรเจนในดินที่สำคัญ เพื่อลด ต้นทุนการผลิตและลด ปัญหาสิ่งแวดล้อม คือ กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต (Biological Nitrogen Fixation: BNF) มีรายงานว่าแบคทีเรียจีนัส *Azotobacter* และ *Azospirillum* มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน และสามารถนำมาใช้ในการปลูกข้าวทดแทนการใช้ปุ๋ยยูเรียได้ดี (Choudhury and Kennedy, 2004) *Azotobacter* สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งและผลผลิตข้าว 7-20 เปอร์เซ็นต์ โดยส่งเสริมการเจริญของรากและใบ และทำให้ไนโตรเจน เพิ่มขึ้น 11-15 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ (Yanni and El-Fattah, 1999) การใช้ *A. vinelandii* และ *A. chroococcum* เป็นหัวเชื้อ PGPR ในการปลูกข้าวให้ผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ (Kanungo *et al*., 1997)

ส่วน *Azospirillum* เช่น *Az. lipoferum* สามารถเพิ่มผลผลิตข้าวได้อย่างมีนัยสำคัญที่ 1.6-10.5 กรัมต่อต้น (32-81 เปอร์เซ็นต์) และ 1.8 ตันต่อเฮกเตอร์ (22 เปอร์เซ็นต์) เมื่อทดสอบในเรือนทดลอง และในแปลงทดลองตามลำดับ (Mirza *et al*., 2000; Malik *et al*., 2002) นอกจากนี้ยัง

สามารถเพิ่มความสูง จำนวนต้นต่อก อ และ NH_4^+ ในข้าวได้ (Balandreau, 2002; Murty and Ladha, 1988)

โดยทั่วไปรูปแบบการใช้ *Azospirillum* มี 3 วิธี คือ 1) แช่เมล็ดข้าว 5 นาที แล้วผึ่งให้แห้งในที่ร่ม 2-4 ชั่วโมง 2) แช่ต้นกล้าข้ามคืน และ 3) การใส่เชื้อลงไปบริเวณใกล้รากของข้าว (Islam and Bora, 1998) ส่วน *Azotobacter* มีรายงานการนำมาใช้ในข้าวด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การแช่เมล็ดในเชื้อ การแช่รากกล้าในเชื้อ การใส่ เชื้อลงไปในดินในช่วงกล้าหรือในแปลงหลังการปักดำ และการพ่นทางใบ (Kannaiyan *et al*., 1980; Chandra and Singh, 1996; Kannaiyan, 1999) นอกจากวิธีการใส่เชื้อที่เหมาะสมแล้ว ในระบบนาข้าวแบบดั้งเดิมมีน้ำท่วมขังจึงขาดออกซิเจน ทำให้เชื้อทั้งสองชนิดเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้น้อย ได้มีการพัฒนาระบบการปลูกข้าวแบบประณีต (System of Rice Intensification: SRI) โดยบาทหลวง Fr. Henri de Laulanie ในขณะที่ทำงานเพื่อปรับปรุงผลผลิตข้าวในประเทศมาดากัสการ์ ระหว่างปี พ.ศ. 2504–2538 (Uphoff, 2002) โดยในทางปฏิบัติคือย้ายปลูกกล้าข้าวที่อายุ 8-10 วัน (ระยะ 2 ใบ) ให้รากได้รับผลกระทบน้อยที่สุด ปักดำ 1 ต้นต่อหลุม ที่ระยะตั้งแต่ 25×25 ถึง 40×40 เซนติเมตร ควบคุมการให้น้ำแบบสลับแห้งแล ะเปียก ตั้งแต่ระยะย้ายปลูกจนถึงก่อนออกรวง และปล่อยน้ำท่วมขังที่ระดับ 2 เซนติเมตร หลังต้นข้าวออกรวงจนถึง 14 วันก่อนเก็บเกี่ยว จึงปล่อยน้ำทิ้ง พบว่า ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นต่อหน่วยพื้นที่อย่างมีนัยสำคัญที่ 1-2 เท่า และลดปริมาณการใช้น้ำ ได้มากกว่าครึ่งหนึ่งของการทำนาแบบดั้งเดิม ทั้งนี้เพราะระบบรากข้าวจะเจริญได้ดี และรากแทงลึกลงไปในดินได้ถึง 30 เซนติเมตร ทำให้การดูดซึมธาตุอาหารได้ดีกว่า (Stoop *et al*., 2002; Barison, 2002) สาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้การเจริญเติบโตของข้าวได้ดีขึ้นอาจเป็นเพ ราะ มีปริมาณออกซิเจนในดินมากกว่าระบบดั้งเดิม ซึ่งทำให้การทำงานของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนธาตุอาหารและการตรึงไนโตรเจนทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังไม่มีรายงานการยืนยันที่แน่นอน ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในระบบการปลูกข้าวแบ บประณีต โดยหาวิธีการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต และศึกษา ระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ว่าจะสามารถเอื้ออำนวยให้แบคทีเรีย สายพันธุ์ดังกล่าว มีปริมาณการอยู่รอดและกิจกรรมในบริเวณรากข้าว มากน้อยเพียงใด และส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้นหรือไม่

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อหารูปแบบที่เหมาะสมในการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต

1.2.2 ศึกษาผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับกระถางและแปลงทดลอง ต่อปริมาณเชื้อประสิทธิภาพการตรึง

ไนโตรเจน และผลผลิต

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 ปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ที่ยังคงอยู่บริเวณรากขึ้นอยู่กับวิธีการใส่เชื้อที่เหมาะสม

1.3.2 การใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตสามารถส่งเสริมให้ปริมาณเชื้อ ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และผลผลิตสูงขึ้น

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต จากนั้นนำวิธีการดังกล่าวไปทดสอบในระดับกระถาง และระดับแปลงทดลองเพื่อ เปรียบเทียบ การใส่เชื้อ ระหว่างระบบการปลูกข้าวแบบประณีต และระบบการปลูกข้าวแบบ ดั้งเดิม โดยทำการ ประเมินปริมาณของเชื้อ ด้วยเทคนิค Most Probable Number (MPN) ร่วมกับเทคนิค Immuno Fluorescent Antibody (FA) ทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ ด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Assay (ARA) วัดองค์ประกอบผลผลิต ผลผลิต และวิเคราะห์ปริมาณธาตุหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โ พแทสเซียม) ที่สะสมในดินและพืช

1.4 1 แหล่งเชื้อ ที่ใช้ในการศึกษามี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* จากโครงการการพัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพในเชิงธุรกิจ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4.2 สถานที่ทำวิจัย

ฟาร์มเกษตรอินทรีย์ และ ศูนย์เ ครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4.3 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

สิงหาคม 2552- พฤศจิกายน 2553

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบรูปแบบที่เหมาะสมในการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต

1.5.2 เพื่อเป็นองค์ความรู้และแนะนำเกษตรกร ในการ ใช้เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต

1.5.3 เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เชื้อชนิดอื่น ๆ ในการเพิ่มผลผลิตข้าว ลดต้นทุนการผลิต ไม่ทำลายสภาพแวดล้อม

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรในโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก โดยเฉพาะประเทศในเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าประเ ทศอื่น ๆ ของโลก การผลิต บริโภคและการค้าข้าวส่วนให ญ่จึงกระจุกตัวอยู่ในทวีปเอเชีย แต่ข้าวที่ ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภ ค ภายในประเทศ ทำให้มีข้าวเพียงร้อยละ 6 เท่านั้น ที่เข้าสู่ตลาดการค้าข้าวระหว่างประเทศ โดยประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการส่งออกข้าว คือประ เทศไทย รองลงมาคือ อินเดีย เวียดนาม จีน และพม่า ตามลำดับ สำหรับประเทศไทยถือว่าข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ และเป็นพืชไร่ที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งของประเทศ คนไทยเราบริโภคข้าวเป็นประจำทุก ๆ วัน นอกจากนี้ข้าวยังเป็นพืชที่นำรายได้เข้าประเทศปีละนับพันล้านบาท ในปี 2553 ประเทศไทยส่งออกข้าว 8,939,630 ตัน คิดเป็นมูลค่า 168,193.1 ล้านบาท (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2554)

ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้าแฟมิลี *Gramineae* และอยู่ในจีนัส *Oryza* มีทั้งหมด 23 สปีชีส์ เป็นข้าวพันธุ์ป่า 21 สปีชีส์ และข้าวพันธุ์ปลูก 2 สปีชีส์ คือ *O. sativa* L. กับ *O. glaberima* Steud. โดย *O. sativa* เป็นข้าวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก เป็นข้าวที่มีการปลูกทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ข้าวสปีชีส์นี้เป็นที่เชื่อกันว่ามีแหล่งกำเนิดแถบทางใต้ของทวีปเอเชีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแถบประเทศจีน ซึ่งคาดว่ามีการปลูกข้าวสปีชีส์นี้ในพื้นที่ดังกล่าวมากกว่า 10,000 ปีมาแล้ว (Chang, 1964) ข้าวพวก *O. sativa* แบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ Indica, Japonica และ Javanica ข้าวพวก Indica ปลูกกันมากในประเทศ อินเดีย พม่า เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ เป็นต้น Japonica ปลูกในประเทศจีนตอนเหนือและตะวันออก ญี่ปุ่น เกาหลี และประเทศอื่น ๆ ที่อยู่ในเขตอบอุ่น ส่วน Javanica เป็นข้าวที่พบปลูกในประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น

2.2 แหล่งปลูกข้าวของโลก

การปลูกข้าว ส่วนใหญ่อยู่ในแถบอบอุ่นและแถบร้อน ในปี 2551 มีพื้นที่เก็บเกี่ยวข้าวรวมทั้งหมด 966,193 พันไร่ ให้ผลผลิตทั้งสิ้น 686,197 พันตัน ผลผลิตต่อไร่ 689 กิโลกรัม ประเทศที่มี

พื้นที่เก็บเกี่ยว ข้าวมากที่สุด คือ ประเทศ อินเดีย (275,000 พันไร่) ประเทศไทยอยู่ในอันดับที่ 5 เท่ากับ 66,772 พันไร่ และประเทศที่ให้ผลผลิตสูงสุดได้แก่ ประเทศจีน (193,354 พันตัน) ประเทศไทยอยู่ในอันดับที่ 7 (31,651 พันตัน) ส่วนผลผลิตต่อไร่ สูงสุดได้แก่ ประเทศจีน (1,049 กิโลกรัม) ส่วนประเทศไทยผลผลิตต่อไร่จะต่ำที่สุด (474 กิโลกรัม) ในประเทศที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูงจะปลูกข้าวพวก Japonica สำหรับประเทศที่ปลูกข้าว Indica ให้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 400-800 กิโลกรัมต่อไร่ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เนื้อที่เก็บเกี่ยว และผลผลิตข้าวของโลก ปี 2551

ประเทศ	เนื้อที่เก็บเกี่ยว (1,000 ไร่)	ผลผลิต (1,000 ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)
รวมทั้งหมด	966,193	686,197	689
จีน	184,333	193,354	1,049
อินเดีย	275,000	148,260	539
อินโดนีเซีย	76,932	60,251	783
บังกลาเทศ	73,381	46,905	639
เวียดนาม	46,339	38,725	836
พม่า	51,250	30,500	595
ไทย	66,772	31,651	474
ฟิลิปปินส์	27,875	16,816	603
บราซิล	17,885	12,100	677
ญี่ปุ่น	10,625	11,029	1,038
อื่น ๆ	165,801	96,607	583

ที่มา: สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2552

2.3 การแบ่งชนิดของข้าว

2.3.1 แบ่งตามพื้นที่ปลูก ได้แก่

1) ข้าวไร่ (Upland Rice) คือ ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ดอน ไม่ชอบน้ำขัง หรือปลูกตามเชิงเขา ที่ลาดชัน แต่ละปีมีการปลูกข้าวไร่ในประเทศไทยกว่า 1 ล้านไร่ ส่วนมากอยู่ในภาคเหนือและภาคใต้ (ปลูกแซมยางพารา) การปลูกข้าวไร่กระทำโดยการถางโค่นป่า เผา และปลูกโดยไม่มีการ

เตรียมดิน มักไม่มีการใส่ปุ๋ย เป็นการปลูกที่ใช้ความอุดมสมบูรณ์ที่สะสมอยู่ในดิน เพราะเมื่อปลูกไป 1-2 ปี ความสมบูรณ์ของดินถูกใช้หรือถูกชะล้างไปมาก จนเกษตรกรต้องย้ายพื้นที่ ปลูกไปยังที่ใหม่

2) ข้าวนาสวน (Lowland rice) คือ ข้าวที่ปลูกในสภาพนาที่มีน้ำขัง 5-10 เซนติเมตร จนถึงระดับ 70-80 เซนติเมตร หรือไม่มีน้ำขัง ซึ่งสามารถปลูกในฤดูปกติ (เรียกนาปี) หรือนอกฤดู (เรียกนาปรัง)

3) ข้าวขึ้นน้ำหรือข้าวนาเมือง (Deep water rice) คือ ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ ซึ่งมีน้ำลึกตั้งแต่ 80 เซนติเมตร ขึ้นไปจนถึง 3-5 เมตร แต่ส่วนใหญ่ระดับน้ำลึก 1-2 เมตร (ขณะปลูกน้ำยังไม่ขังหรือขังเล็กน้อย) ข้าวนาเมืองปลูกโดยวิธีหว่านข้าวแห้ง

2.3.2 แบ่งตามฤดูกาลการปลูก ได้แก่

1) ข้าวนาปี เป็น พันธุ์ข้าวที่ปลูกในฤดูปกติ คือปลูกในต้นฤดู หรือกลางฤดูฝน เก็บเกี่ยวในปลายฤดูฝน ข้าวพวกนี้มีความไวต่อช่วงแสง (sensitive to photoperiod) คือ ออกดอกเมื่อความยาวของวันสั้นลงจนถึงช่วงแสงวิกฤติ (critical day length) ซึ่งส่วนมากสั้นกว่า 12 ชั่วโมง สามารถแบ่งข้าวพวกนี้ออกได้เป็นพันธุ์เบา พันธุ์กลาง และพันธุ์ หนัก ซึ่งต้องการวันสั้นน้อย ปานกลาง และมาก ตามลำดับ ข้าวพันธุ์เบาสามารถปลูกนอกฤดูปกติ (นาปี) ได้ แต่พันธุ์หนักไม่สามารถปลูกได้เพราะนอกฤดูปกตินั้นช่วงแสงวิกฤติจะยาวกว่าต้องการ

2) ข้าวนาปรัง คือ ข้าวที่สามารถปลูกนอกฤดูปลูกปกติได้ เป็นพวกไม่ไวแสง (none sensitive to photoperiod) จึงสามารถปลูกได้ตลอดปี

2.3.3 แบ่งตามคุณสมบัติของแป้งในเมล็ดข้าวสาร ได้แก่

1) ข้าวเจ้า (non-glutinous rice) เป็นพวกที่มีแป้งพวกอมิโลเพคติน (amylopectin) สูงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และเป็นพวกอมิโลส (amylose) ต่ำประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหุงแล้วจะร่วนไม่เกาะกัน

2) ข้าวเหนียว (glutinous rice หรือ sticky rice) เป็นข้าวที่เมล็ดมีแป้งพวก amylopectin ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และเป็น amylose ประมาณ 7-10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหุงแล้วเมล็ดจะเหนียวเกาะกัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ amylopectin เมื่ออุ้มน้ำมาก ๆ

2.3.4 แบ่งตามอายุการเก็บเกี่ยว ได้แก่

1) ข้าวเบา (early variety) เป็นพวกที่มีอายุสั้น เก็บเกี่ยวได้เร็ว เช่น ถ้าปลูกตามปกติ

สามารถเก็บเกี่ยวได้ในเดือนกันยายน-ตุลาคม อายุเก็บเกี่ยวต่ำกว่า 120 วัน

2) ข้าวกลาง (medium variety) เป็นพวกที่มีอายุยาวขึ้นกว่าพันธุ์เบา สามารถเก็บเกี่ยวก่อนสิ้นเดือนธันวาคม มีอายุเก็บเกี่ยว 120-140 วัน

3) ข้าวพันธุ์หนัก (late variety) เป็นพวกที่สามารถเก็บเกี่ยวได้หลังเดือนธันวาคม มีอายุเก็บเกี่ยวมากกว่า 140 วัน

2.4 ระยะการเจริญเติบโตของข้าว

การเจริญเติบโตของข้าวพัฒนาอย่างต่อเนื่อง นับจากการงอกของกล้าจากเมล็ดไปถึงระยะเก็บเกี่ยว การเจริญเติบโตแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ

1) ระยะกล้า (seedling stage) นับจากงอกจากเมล็ดจนกระทั่งข้าวเริ่มแตกกอ ซึ่งกินเวลาประมาณ 20 วัน ข้าวมี 5-6 ใบ

2) ระยะแตกกอ (tillering stage) เริ่มจากข้าวแตกกอจนกระทั่งต้นข้าวเริ่มสร้างดอกอ่อน ซึ่งต่อจากระยะกล้าไปอีก 30-50 วัน ถ้าเป็นข้าวพันธุ์ไวแสง ช่วงนี้จะยาวออก โดยรอวันที่มีช่วงสั้นลงจนถึงช่วงวิกฤต

3) ระยะสืบพันธุ์ (reproductive stage) นับจากการสร้างดอกอ่อน เริ่มจากการเปลี่ยนจากต้นแบนมาเป็นต้นกลม สร้างจุดกำเนิดช่อดอก (premordium of panicle) ต่อจากนั้นสร้างช่อดอก (panicle initiation) ดอกอ่อนจะขยายตัวใหญ่ขึ้นเป็นระยะตั้งท้อง (booting stage) เกิดช่อดอกที่สมบูรณ์อยู่ในการห่อหุ้มของใบธง (flag leaf) เมื่อข้าวตั้งท้องเต็มที่แล้ว จะส่งช่อดอกออกจากกาบใบ ต่อจากนั้น จะผสมระหว่างละอองเกษร และดอกตัวเมียภายในดอกเดียวกันแล้วดอกก็ บานออก เป็นการสิ้นสุดระยะสืบพันธุ์

4) ระยะสุกแก่ (ripening stage) ภายหลังการผสมเมล็ดจะพัฒนาผ่านระยะน้ำนม (milky stage) ระยะแป้ง (dough stage) และระยะสุกแก่

2.5 สภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสมในการปลูกข้าว

ข้าวเป็นพืชที่สามารถปรับตัวได้กว้าง ข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ดี ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลถึง 2,500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล สามารถเจริญได้ในสภาพน้ำขังตั้งแต่ 5-10 เซนติเมตร จนลึก 4-5 เมตร และในสภาพไร่ที่ไม่มีน้ำขัง แม้ข้าวเป็นพืชที่ชอบดินด่าง (pH < 7) แต่สามารถเจริญเติบโตได้

ดีในช่วง pH กว้าง 3-10 ปริมาณน้ำฝนตั้งแต่ 200 มิลลิเมตร ขึ้นไป สำหรับในประเทศไทยนั้นทุกแหล่งที่ปลูกข้าวมีปริมาณน้ำฝน 1,000 มิลลิเมตร ต่อปีขึ้นไป อย่างไรก็ดีฝนต้องมีการกระจายตัวดี De Datta, (1981) กล่าวว่า ความต้องการน้ำของข้าวตั้งแต่ปลูกถึงเก็บเกี่ยวอยู่ระหว่าง 800-1,000 มิลลิเมตร

1) แสงและความยาวของวัน การ ปลูกข้าวในฤดูฝนมักให้ผลผลิตต่ำกว่าในฤดูแล้ง ทั้งนี้เพราะในฤดูฝนมีเมฆหมอกมาก ทำให้มีความเข้มของแสงน้อย จากการทดลองของสถาบันวิจับข้าว พบว่า ข้าวพันธุ์เดียวกันเมื่อปลูกในฤดูแล้งให้ผลผลิตสูงกว่าปลูกในฤดูฝน 13.64 เปอร์เซ็นต์ ปกติข้าวเป็นพืชไวแสงและเป็นพืชวันสั้น (short day plant) ดังนั้นถ้าในช่วงใกล้ออกดอก ถ้ากลางวันยาวขึ้น ๆ จะทำให้ต้นข้าวไม่ออกดอกหรือออกดอกช้าไป (สำหรับประเทศไทยกลางวันยาวที่สุดอยู่ในเดือนมิถุนายน และสั้นที่สุดในปลายเดือนธันวาคม)

2) อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของข้าวอยู่ระหว่าง 25-33 องศาเซียลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำข้าวงอกช้า เจริญเติบโตช้า ออกดอกช้า

2.6 ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1

ชื่อพันธุ์ ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) เป็นข้าวเจ้า ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ BKNA6-18-3-2 กับสายพันธุ์ PTT85061-86-3-2-1 ที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีในปี พ.ศ. 2533 ปลูกคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ PTT90071-93-8-1-1 คณะกรรมการวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตรมีมติให้เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 30 พฤษภาคม 2543 ลักษณะประจำพันธุ์ คือ เป็นข้าวเจ้า ต้นสูงประมาณ 104-133 เซนติเมตร ไม่ไวต่อช่วงแสง อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 104-126 วัน ทรงกอตั้ง ใบสีเขียวมีขน กาบใบและปล้องสีเขียว ใบธงยาวทำมุม 45 องศากับคอรวง รวงอยู่ใต้ใบธง เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง มีขน มีหางยาวเล็กน้อย ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 3-4 สัปดาห์ เมล็ดข้าวกล้องกว้าง×ยาว×หนา เท่ากับ 2.1×7.6×1.7 มิลลิเมตร ปริมาณอมิโลส 15-19 เปอร์เซ็นต์ คุณภาพข้าวสุกนุ่มเหนียว มีกลิ่นหอมอ่อน ผลผลิตสูงประมาณ 650-774 กิโลกรัมต่อไร่ คุณภาพเมล็ดคล้ายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง ค่อนข้างอ่อนแอเพลี้ยจักจั่นสีเขียว โรคใบหงิก และโรคใบสีส้ม ปลูกมากในเขตชลประทานในภาคกลาง (กรมการข้าว, 2554)

เนื่องจากช่วงทำการทดลองอยู่ในช่วงเดือนสิงหาคม- ธันวาคม จึงเลือกใช้ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1ซึ่งเป็นข้าวไม่ไวแสง สามารถปลูกได้ตลอดปี เป็นข้าวอายุสั้น เก็บเกี่ยวได้เร็ว (120 วัน)

และเนื่องจากข้าวไม่ไวแสงมีความต้องการไนโตรเจนสูงกว่าหรือมีการตอบส นอง (sensitive) ต่อไนโตรเจนน้อยกว่าข้าวไวแสง ซึ่งจะเห็นได้จากการใส่ปุ๋ยเคมีแอมโมเนียมซัลเฟต (20 เปอร์เซ็นต์ N) ข้าวไวแสงใส่ 4-12 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวไม่ไวแสงใส่ 12-22 กิโลกรัมต่อไร่ หรือถ้าเป็นปุ๋ยแอมโมเนียมคลอไรด์ (25 เปอร์เซ็นต์ N) ข้าวไวแสงใส่ 4-10 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวไม่ไวแสงใส่ 10-13 กิโลกรัมต่อไร่ หรือปุ๋ยยูเรีย (45 เปอร์เซ็นต์ N) ข้าวไวแสงใส่ 2-6 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวไม่ไวแสงใส่ 6-10 กิโลกรัมต่อไร่ (วัชรินทร์ บุญวัฒน์, 2527)

2.7 การปลูกข้าวในระบบดั้งเดิม (Conventional rice system)

วิธีการปลูกแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการตกกล้าในแปลงขนาดเล็ก ใช้เมล็ดพันธุ์ประมาณ 25-40 กิโลกรัม ใช้ดำนาได้ 1 ไร่ และขั้นตอนที่ 2 เป็นการถอนต้นกล้าเอาไปปักดำ ทำการปักดำเมื่อต้นกล้ามีอายุประมาณ 20-30 วัน โดยถอนต้นกล้าขึ้นมาจากแปลงแล้วมัดรวมกันเป็นมัด ๆ ถ้าต้นกล้าสูงมากก็ตัดปลายใบทิ้ง ต้องสลัดเอาดินที่รากออก แล้วเอาไปปักดำในพื้นที่นาที่ได้เตรียมไว้ พื้นที่นาที่ใช้ปักดำควรมีน้ำขังอยู่ประมาณ 5-15 เซนติเมตร เมื่อข้าวโตขึ้นจึงเพิ่มระดับน้ำ โดยทั่วไปการปักดำจะใช้ต้นกล้าจำนวน 3-4 ต้นต่อกอ ระยะปลูกหรือปักดำ 20×20 เซนติเมตร (วัชรินทร์ บุญวัฒน์, 2527)

2.8 การปลูกข้าวในระบบประณีต (System of Rice Intensification: SRI)

ระบบการปลูกข้าวแบบประณีต (System of Rice Intensification: SRI) ได้รับการพัฒนาโดยบาทหลวง Fr. Henri de Laulanie ที่ประเทศมาดากัสการ์ ระหว่างปี พ .ศ. 2504–2538 และได้รับการผลักดันจากศาสตราจารย์ Norman Uphoff มหาวิทยาลัยคอแนลล์ ได้ทำการศึกษาการปลูกข้าวที่มีการจัดการน้ำ โดยให้น้ำในปริมาณน้อย และมีการปล่อยน้ำออกในบางช่วง ซึ่งมีวิธีการที่สำคัญ คือ 1) ย้ายปลูกกล้าข้าวที่อายุ 8-10 วัน (ระยะ 2 ใบ) ให้รากได้รับผลกระ ทบน้อยที่สุด 2) ปักดำ 1 ต้นต่อหลุม ที่ระยะตั้งแต่ 25×25 ถึง 40×40 เซนติเมตร 3) ควบคุมการให้น้ำแบบสลับแห้งและเปียก ตั้งแต่ระยะย้ายปลูกจนถึงก่อนออกรวง และปล่อยน้ำท่วมขังที่ระดับ 2 เซนติเมตร หลังต้นข้าวออกรวงจนถึง 14 วันก่อนเก็บเกี่ยว จึงปล่อยน้ำทิ้ง ให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Uphoff, 2002) มีรายงานว่าวิธีการปลูกข้าววิธีนี้ ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นต่อหน่วยพื้นที่อย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถเพิ่มผลผลิตของข้าวมากขึ้นจากระบบดั้งเดิม 1-2 เท่า นอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณการใช้น้ำได้

มากกว่าครึ่งหนึ่งของการทำนาแบบ ดั้งเดิมที่มีน้ำขังในแปลงนาตลอดฤดูกาลปลูก (Stoop *et al*., 2002) มีงานวิจัยหลายเรื่องเพื่ออธิบายถึงเหตุผลในการที่ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระบบการปลูกข้าวแบบประณีต เช่น ระบบรากข้าวจะเจริญได้ดีกว่าแบบดั้งเดิมส่งผลให้การดูดซึมธาตุอาหารได้ดีกว่า (Stoop *et al*., 2002) การปลูกข้าวแบบประณีตรากแทงลึกลงไปในดินได้ถึง 30 เซนติเมตร ทำให้สามารถดูดธาตุอาหารได้มากกว่าระบบดั้งเดิม (Barison, 2002) การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการปลูกข้าวแบบประณีตผลผลิตจะเพิ่มขึ้นมากกว่า 10 ตันต่อเฮกเตอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใส่ปุ๋ยซึ่งผลผลิตจะอยู่ระหว่าง 5.3 – 7.9 ตันต่อเฮกเตอร์ และพบแบคทีเรียกลุ่ม ที่อาศัยแบบอิสระ (Free-living) ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้บริเวณรากข้าว ซึ่งสามารถลดปริมาณการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในนาข้าวได้ (Randriamiharisoa and Uphoff, 2002)

ต่อมาได้มีการขยายผล และทดสอบในหลายประเท ศ เช่น ประเทศจีน กัมพูชา ลาว ฯลฯ งานที่ประเทศไทยเริ่มปี 2544-2545 เริ่มช้ากว่าประเทศอื่น ๆ และขยายผลไปยังเครือข่ายองค์กรพัฒนาเอกชนในปี 2545-2546 โดยได้ทำการทดสอบ ยังพื้นที่ต่าง ๆ โดยองค์กรพัฒนาเอกชน และมหาวิทยาลัย เช่น สถาบันแมคเคน ISAC, UHDP และ Tract of Tiger และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่า ผลลัพธ์ยังไม่แน่นอน ผลผลิตข้าวมีความแปรปรวนสูง และผลผลิตน้อยกว่าประเทศอื่น ๆ ที่เคยมีการทดสอบ เนื่องจากงานทดลองหลายพื้นที่ชี้ให้เห็นว่า การปลูกข้าวระบบประณีตให้ผลดีในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ปานกลางถึงดีขึ้นไป และการท ดลองขององค์กรต่าง ๆ ดังกล่าวมาไม่ได้นำเชื้อจุลินทรีย์ใส่ลงไปโดยตรงแต่เน้นจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในดิน ผลจึงอาจไม่แน่นอน

2.9 Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR

Plant Growth Promoting Rhizobacteria หรือ PGPR เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

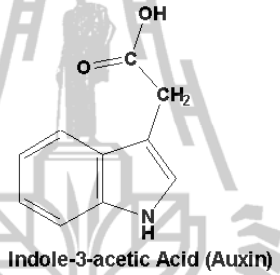
1. พวกที่อาศัยแบบอิสระ (free-living organism) พบอยู่ใกล้ ๆ บริเวณรากพืช ได้แก่ *Rhodospirillum*, *Azotobacter*, *Azospirillium*, *Beijerinckia* และ *Clostridium* เป็นต้น

2. พวกที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช (Symbiotic nitrogen fixer) หรือเรียกว่า Symbiosis คือ แบคทีเรียจำพวกที่สามารถเข้าสู่รากพืชแล้วเกิดกระบวนการต่าง ๆ ที่จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น *Rhizobium*, *Frankia*, *Nostoc* และ *Anabaena* เป็นต้น

แบคทีเรียกลุ่ม PGPR เป็นกลุ่มแบคทีเรีย ทีมีคุณสมบัติที่ดีต่อพืช ใน 3 ประการ (Glick *et al*., 1999)

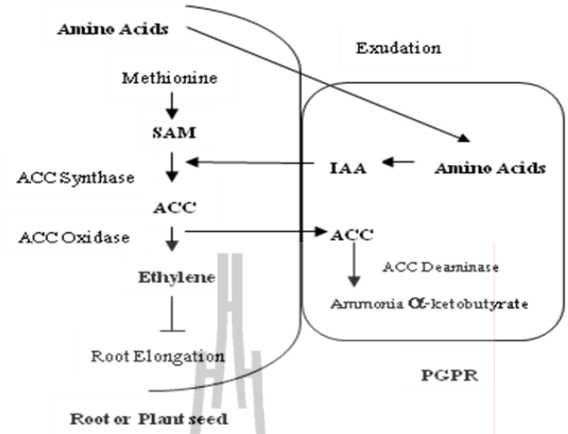
1. ความเป็นปุ๋ยชีวภาพ (Biofertilizer) กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillium*, *Acetobacter,* และ *Pseudomonas* เป็นต้น

2. ความสามารถในการสร้างฮอร์โมนให้พืช (Phytostimulators) การผลิตฮอร์โมนโดย PGPR เป็นกลไกที่สำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืช โดยรายงานเกี่ยวกับการผลิต phytohormones จาก PGPR ส่วนใหญ่จะมุ้งเน้นไปที่กลุ่มออกซิน ได้แก่ Indole-3-Acetic Acid (IAA) ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ (cell elongation) การแบ่งเซลล์ (cell division) และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (cell differentiation)



รูปที่ 1 โครงสร้าง Indole-3-Acetic Acid (IAA)

นอกจากนี้ PGPR บางชนิดยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตข องพืชผ่านกลไกของเอนไซม์ 1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate (ACC) deaminase ได้อีกทางหนึ่งด้วย วิถีการสังเคราะห์เอทธิลีนเริ่มจากกรดอะมิโนเมไธโอนีน (Methionine) ทำปฏิกิริยากับ ATP เกิด S-adenosylmethionine (SAM) ต่อมา SAM จะเปลี่ยนเป็น 1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) และ ACC จะสลายตัวเป็นเอทธิลีน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มแวคิวโอล คือ EFE (Ethylene Forming Enzyme) จากการศึกษาพบว่า ขั้นตอนที่จำกัดอัตราการสังเคราะห์เอทธิลีน คือขั้นตอนการสร้าง ACC จาก SAM ซึ่งแคตาไลส์โดยเอนไซม์ ACC synthase ซึ่งถูกกระตุ้นโดยปัจจัยภายนอก เช่น การเกิดแผล การขาดน้ำ เป็นต้น และปัจจัยภายใน เช่น ปริมาณออกซินสูง กระบวนการสุกของผล เป็นต้น (Glick *et al*., 1998)



รูปที่ 2 กลไกการส่งเสริมการยืดยาวของเซลล์รากพืชโดยเอนไซม์ ACC deaminase ใน PGPR

3. ความสามารถในการควบคุมโรคพืชได้ (Biological control) PGPR บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดยไปย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้ เช่น *Pseudomonas stutzeri* สามารถป้องกันเชื้อรา *Fusarium solani* ที่เป็นสาเหตุโรคร ากเน่าได้ (Lim *et al*., 1991)

2.10 การประยุกต์ใช้ PGPR ในนาข้าว

ในการผลิตข้าวได้มีการนำแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มาใช้กันมากขึ้น โดยมีรายงานว่า *Azotobacter, Azospirillum, Clostridium, Herbaspirillum,* และ *Beijerinckia* มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน และสามารถนำมาใช้ในการปลูกข้าวทดแทนการใช้ปุ๋ยยูเรียได้ดี (Choudhury and Kennedy, 2004) ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวจะเป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยอาศัยอยู่อย่างอิสระในดิน มีทั้งพวกที่เป็น aerobe, anaerobe, และ facultative anaerobe (ธงชัย มาลา , 2546) แบคทีเรีย aerobe ที่ตรึงไนโตรเจนได้เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและสามารถตรึงไนโตรเจนได้ ได้แก่ *Azotobacter* sp., *Azomonas* sp., *Beijerinckia* sp., *Derxia* sp., *Mycobacterium* sp., และ *Azospirillum* sp. (micro-aerophile) เป็นต้น แบคทีเรีย anaerobe ที่ตรึงไนโตรเจนได้ หมายถึง แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน หากมีออกซิเจนอยู่จะยับยั้งการเจริญเติบโต ได้แก่ *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Chlorobium,* และ *Chromatium* เป็นต้น ส่วนแบคทีเรีย falcultative anaerobe ที่ตรึงไนโตรเจนได้ หมายถึงแบ คทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่สามารถเติบโตในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนได้เช่นกัน ได้แก่ *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiell* sp., *Rhodopseudomonas* sp. และ *Rhodospirillum* sp.

เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็น heterotroph ได้พลังงานจากการเข้าสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น ซากพืช แบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนที่มีรายงานการนำมาใช้ในการปลูกข้าว คือ แบคทีเรียในสกุล *Azotobacter* และ *Azospirillum*

1) แบคทีเรียในจีนัส *Azotobacter*

Azotobacter เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน (rod) ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต มีกลไกที่ใช้ ในการป้องกันเอนไซม์ไนโ ทรจีเนสไม่ให้สัมผัสกับออกซิเจนโดยมีอัตราการหายใจสูง และสร้างเมือก ต้องการคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน มีรายงานว่าสามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้ง และผลผลิตข้าวในระ ดับเรือนทดลองถึง 0.4 ตันต่อเฮกเตอร์ และในระดับแปลง 0.9 ตันต่อเฮก เตอร์ หรือประมาณ 7-20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับแปลงทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ โดยช่วยส่งเสริมการเจริญของรากและใบ ทั้งในช่วงกล้าและช่วงการเจริญเติบโตของใบในช่วงแรก และการใส่เชื้อ *Azotobacter* ยังทำให้ไนโตรเจนในข้าวเพิ่มขึ้น 11-15 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ (Yanni and El-Fattah, 1999) การใช้ *Azotobacter vinelandii* และ *A. chroococcum* เป็นหัวเชื้อ PGPR ในการปลูกข้าว พบว่าให้ผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ (Kanungo *et al*., 1997)

2) แบคทีเรียในจีนัส *Azospirillum*

Azospirillum เป็นแบคทีเรีย heterotrophic ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Roper and Ladha, 1995) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน (rod) เชื้อชนิดนี้เจริญอยู่บริเวณรากของพืชตระกูลหญ้า บางชนิดสามารถแทงทะลุเข้าไปเจริญอยู่ในส่วน intercellular ของเซลล์รากได้ (Baldani and Dobereiner, 1980) ซึ่งจะเห็นได้จาก *Az. lipoferum* และ *Az. brasilense* ที่แยกได้จากบริเวณรากและต้นของข้าว (Ladha *et al*., 1982) ในขณะที่ *Az. amazonease* พบเฉพาะในส่วนของราก (Pereira *et al*., 1988) สามารถเจริญเติบโตได้ในทั้งสภาพที่มีออกซิเจน (aerobic) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic) แต่อยู่ในสภาพที่ มีออกซิเจนได้ดีกว่าทั้งในอาหารที่มีและไม่มีไนโตรเจน (Okon and Labandera-Gonzalez, 1994) สถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ (IRRI) จึงให้ความสนใจเชื้อ *Azospirillum* เป็นอย่างมาก และได้มีการศึกษา พบว่า ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ของ *Azospirillum* เช่น *Az. lipoferum* สามารถเกาะรากข้าวได้ดีมาก (Ladha *et al*., 1987) การใส่เชื้อ *Azospirillum* ช่วยเพิ่มผลผลิตข้าวอย่างมีนัยสำคัญ 1.6-10.5 กรัมต่อต้น หรือประมาณ 32-81 เปอร์เซ็นต์ ที่ทำการทดสอบในระดับเรือนทดลอง แต่ในระดับแปล งผลผลิตเพิ่มขึ้น 1.8 ตันต่อเฮกเตอร์ หรือประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ (Mirza *et al*., 2000; Malik *et al*., 2002) จากรายงานของ Balandreau, 2002 เชื้อ *Azospirillum* สามารถเพิ่มความสูง และจำนวนต้นต่อกอของข้าวได้ (Nayak *et al*., 1986) *Azospirillum* สามารถเพิ่มปริมาณของ PO_4^{3-} และ NH_4^+ ในข้าวได้ (Murty and Ladha, 1988)

2.11 ข้อจำกัดบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนในนาข้าว

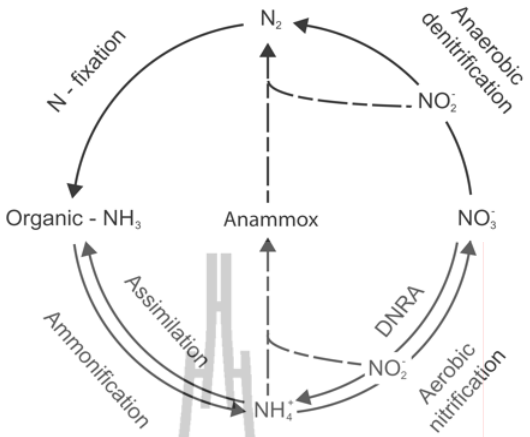
2.11.1 วิธีการใส่เชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในนาข้าว

วิธีการใส่เชื้อให้กับข้าวมีหลายวิธีแตกต่างกันไป แต่ที่นิยมใช้กันมาก คือ วิธีการแช่เมล็ดในสารละลายแบคทีเรีย (bacterial suspension) วิธีแช่ต้นกล้าลงใน สารละลายแบคทีเรีย วิธีการใส่สารละลายแบคทีเรียลงในดินโดยตรงในช่วงกล้าหรือใส่ช่วงที่ปลูกกล้าลงแปลง และวิธีการฉีดหรือพ่นทางใบ (Kannaiyan *et al*., 1980; Chandra and Singh, 1996; Kannaiyan, 1999; Singh *et al*., 1999) เพราะวิธีการใส่เชื้อแต่ละวิธีจะมีผลต่อปริมาณเชื้ อที่รอดชีวิตและยังคงอยู่บริเวณรากพืชต่างกัน นอกจากวิธีการใส่เชื้อแล้ว ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ชนิดของพืช สายพันธุ์พืชและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน อุณหภูมิ pH ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ความชื้นในดิน และความสามารถในการอุ้มน้ำในดิน (water holding capacity) เป็นต้น (Kannan and Ponmurugan, 2010) ซึ่งปัจจัยอื่นๆ ที่กล่าวมาเราไม่มาสามารถควบคุมได้หรือควบคุมได้ยาก ดั้งนั้นจึงควรมีการทดสอบเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมก่อนนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* มาใช้กับข้าวในสภาพต่าง ๆ

2.11.2 ปริมาณออกซิเจน

แบคทีเรียกลุ่มตรึงไน โตรเจนส่วนใหญ่ เช่น กลุ่ม *Azotobacter* และ *Azospirillum* ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจน (สุมนทิพย์ บุนนาค , 2542) ในระบบนาข้าวแบบดั้งเดิมมีน้ำท่วมขังจึงขาดออกซิเจน ทำให้เชื้อทั้งสองชนิดเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้น้อย และเกิดกระบวนการต่าง ๆ ในการสูญเสียไนโตรเจนได้ เช่น

1) แอมโมเนียที่เกิดจากปฏิกิริยาตรึงไนโตรเจน จะระเหยออกจากเซลล์ได้ หากไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น เนื่องจากแอมโมเนียและแอมโมเนียมสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ง่าย การเปลี่ยนแอมโมเนียเข้าเป็นสารอินทรีย์มีอยู่ 3 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยา ที่ถูกแคตาไลลต์ โดยเอนไซม์ glutamine synthethase (GS/GOGAT) และ เอนไซม์ glutamic acid dehydrogenase (GDH) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) จะเกิดแอมโมเนียมกลายเป็นก๊าซไนโตรเจนโดยกระบวนการ Anaerobic Ammonium Oxidation หรือ Anammox ได้



รูปที่ 2 กระบวนการ Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) ในวัฏจักรไนโตรเจน

กระบวนการ Anaerobic Ammonium Oxidation เป็นการเปลี่ยนแอมโมเนียและไนโตรท์ให้เป็นก๊าซไนโตรเจน ได้โดยตรงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน โดยใช้ไนไตรท์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ดังสมการ

$$NH_4^+ + NO_2^- \longrightarrow N_2 + 2H_2O$$

2) การออกซิไดส์แอมโมเนียให้เป็นไนเตรทโดย nitrifying bacteria โดยแบคทีเรียในกลุ่มจีนัส *Nitrosomonas* สามารถออกซิไดส์แอมโมเนีย (NH_3) ให้เป็นไนไตร ท์ (NO_2^-) และแบคทีเรียในกลุ่ม *Nitrobacter* สามารถออกซิไดส์ ไนไตร ท์ให้เป็นไนเตรท (NO_3^-) เรียกว่า กระบวนการ Nitrification

Nitrosomonas

ขั้นตอน 1: $2NH_4^+ + 3O_2 \longrightarrow 2NO_2^- + 2H_2O + 4H^+$

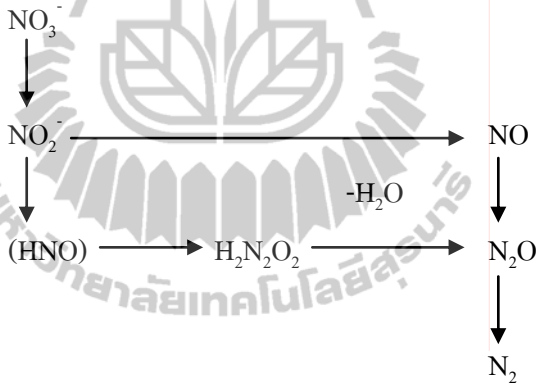
Nitrobacter

ขั้นตอน 2: $2NO_2^- + O_2 \longrightarrow 2NO_3^-$

กระบวนการดังกล่าวจะต้องใช้ออกซิเจน ดังนั้นในดินหรือน้ำจะต้องมีออกซิเจนในปริมาณมากพอ ที่จะทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ ดังนั้ น Nitrification จะเกิดได้ดีบริเวณผิวดินหรือผิวน้ำเท่านั้น pH ในดินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มนี้เท่ากับ 6.0 ขึ้นไป แต่ถ้า pH สูงเกินไปและมีปริมาณแอมโมเนียสูงจะเกิดการสะสมของไนไตรท์ ในดินที่มีการระบาย

อากาศดี ไนโตรเจนส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไนเ ตรท ซึ่งพืชก็จะสามารถเจริญเติบโตได้ แม้จะได้รับเฉพาะไนเตรทเพียงอย่างเดียว เมื่อไนเตรทเข้าสู่เซลล์พืชจะถูกรีดิวส์ จนได้แอมโมเนียม แล้วจึงเข้ารวมกับสารอินทรีย์บางชนิด สังเคราะห์เป็นกรดอะมิโน (ยงยุทธ โอสถสภา, 2552)

3) ไนเตรทบางส่วนอาจสูญเสียไปจากดินโดยการ รีดิวซ์ของแบคทีเรียบางชนิดกลายเป็นก๊าซไนโตรเจน (N_2) ระเหยไปในบรรยากาศ ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า Denitrification แบคทีเรียที่สามารถ รีดิวซ์ไนเตรท หรือ ไนไตรท์ ให้เป็นไนโตรเจนเรียกว่า denitrifying bacteria ได้แก่ *Paracoccus denitrificans, Brucella melitensis, Rhodobacter sphaeroides, Bradyrhizobium japonicum, Pseudomonad, Wautersia eutropha, Neisseria gonorrhoeae,* แบคทีเรียแกรมบวก , archeae และเชื้อราบางสกุล เป็นต้น (Bothe *et al*., 2007) ในสภาพที่ขาดออกซิเจน หรือออกซิเจนไม่เพียงพอ แบคทีเรียดังกล่าวจะใช้ ไนไตรท์หรือ ไนเตรทเป็นตัวรับอิเลคตรอน ไนเตรทและไนไตรท์จะถูกลดออกซิเจนตามลำดับ จนกลายเป็นก๊าซไนโตรเจน ดังสมการ



จากปฏิกิริยา ไนเตรทเมื่อได้รับอิเลคตรอนจะถูกลดออกซิเจนกลายเ ป็นไนไตรท์ และเป็น nitroxyl (HNO) ซึ่งเป็น intermediate product ต่อมาไนเตรทจะถูกเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์ (NO) ได้ ถ้าสภาพเป็นกรดและเปลี่ยนเป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) ส่วน HNO จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น hyponitrite ($H_2N_2O_2$) ซึ่งจะเปลี่ยนต่อไปเป็น N_2O และ N_2 ผลที่เกิดจากกระบวนการ Denitrification คือ N_2, N_2O และ NO โดย NO เกิดเฉพาะเมื่อสภาพเป็นกรดมากเท่านั้น NO ที่เกิดขึ้นนี้อาจรวมกับออกซิเจน ในอากาศโดยทางเคมีกลายเป็น NO_2 ได้ (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2542)

2.12 การประมาณเชื้อด้วยวิธี Most Probable Number (MPN)

MPN หมายถึง มีเชื้ออยู่อย่างน้อย 1 เซลล์ (ตัว) ที่มีการเจริญเติบโตหรือไม่ในหลอดทดลองหลาย ๆ หลอด (ซ้ำ) ของแต่ละระดับการเจือจาง (dilution) ของตัวอย่าง วิธี MPN เป็นวิธีประมาณ

จำนวนเชื้อในตัวอย่าง โดยอ่านผลจากตารางทางสถิติ และคำนวณหา MPN ของตัวอย่างนั้น โดยตารางทางสถิติที่ใช้จะแตกต่างกันขึ้นกับจำนวนซ้ำ เช่น ชุด 3 ซ้ำ 4 ซ้ำ และ 5 ซ้ำ เป็นต้น วิธีดังกล่าวสามารถปรับให้เข้ากับสถานการณ์ต่าง ๆ ได้ดี ดังนั้นจึงมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์อาหาร และน้ำ วิธี MPN เป็นวิธีที่ประมาณ (estimate) ไม่ใช่วิธีการนับ (enumerate) จำนวนเชื้อ ความถูกต้องในการประมาณจำนวนเชื้อนี้มากขึ้น เมื่อมีการเพิ่มจำนวนซ้ำในแต่ละระดับการเจือจาง การเลือกว่าจะใช้ซ้ำชุดใดนั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์

2.13 การตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Fluorescent Antibody (FA)

FA เป็นวิธีการตรวจสอบและ จำแนกจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา และแบคทีเรีย ซึ่งสามารถตรวจสอบจุลินทรีย์ได้ทันที และรู้ผลอย่างรวดเร็ว หลักการของ FA เหมือนกับ serology คือ ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (antigen) และ แอนติบอดี (antibody) แต่ต้องทำเครื่องหมาย (lable) แอนติบอดี ด้วยสารเรืองแสง ที่นิ ยมกันมากและใช้ได้ผลดี คือ fluorescein isothiocyanate (FITC) เมื่อแอนติบอดีโปรตีนทำปฏิกิริยากับสารเรืองแสงก็จะได้สาร FA ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเฉพาะของมันจะทำให้แอนติเจนนั้นมีสารเรืองแสงเกาะอยู่ ซึ่งสารเรืองแสงนี้เมื่อกระทบกับแสงอัลทราไวโอเล็ต (UV) ก็จะเกิดเรืองแสง ดังนั้น เมื่อเซลล์แบคทีเรียทำปฏิกิริยากับ FA ของมันแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลท รรศน์ที่ให้แสง UV ก็จะทำให้เซลล์เกิดเรืองแสงขึ้น จึงทำให้เห็นเซลล์ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นวิธีการนี้จึงเป็นประโยชน์มากทางการเกษตรและด้านแพทย์

2.14 ปฏิกิริยาทางเคมีในวัฏจักรไนโตรเจน

1) Nitrogen fixation เป็นการเปลี่ยนก๊าซ N_2 ให้อยู่ในรูปที่สิ่งมีชีวิตนำไปใช้ประโยชน์ได้ เป็นปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศให้อยู่ในรูปของสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตหรือไม่เกี่ยวข้องก็ได้ มีทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และรีดักชัน (reduction)

2) Assimilation เป็นการใช้แอมโมเนียไปสร้างกรดอะมิโนและ organic amide

3) Nitrification เป็นปฏิกิริยาการ oxidize แอมโมเนียให้เป็นไนเตรท โดยมีแบคทีเรียพวก nitrifying bacteria เข้าช่วย

4) Denitrification เป็นปฏิกิริยาการ reduce ไนเตรทให้เป็นแก๊สไนโตรเจน โดยแบคทีเรีย denitrifying bacteria ในสภาพที่ขาดออกซิเจน

5) Nitrate reduction เป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นแอมโมเนียก่อนที่จะนำไปสร้างสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ ต่อไป

6) Ammonification หรือ Mineralization เป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเป็นสารอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยกิจกรรมของแบคทีเรียและราในดิน โดยเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนีย

7) Immobilization เป็นการใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจนให้เป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจน โดยจุลินทรีย์

2.15 ปัญหาการขาดธาตุไนโตรเจนในนาข้าว

การผลิตข้าวของประเทศไทย ประสบปัญหาเรื่องผลผลิตต่ำ ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ในปี 2552 คือ 425 กิโลกรัม โดยทั่วไปประเทศในแถบเขตร้อนผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่อยู่ระหว่าง 300 ถึง 400 กิโลกรัม ทั้งนี้เพราะว่าในประเทศเหล่านี้การจัดการในการปลูกยังไม่ดีเท่าที่ควร การปลู กโดยทั่วๆ ไปยังจำกัดอยู่ในเขตเกษตรน้ำฝน นอกจากนี้สภาพทางภูมิอากาศยังไม่เอื้ออำนวย และที่สำคัญพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่ขาดธาตุอาหาร โดยเฉพาะธาตุไนโตรเจน ข้าวจะดูดไนโตรเจนในรูปของไนเตร ท (NO_3^-) หรือ แอมโมเนียม (NH_4^+) ปกติทั้ง NO_3^- และ NH_4^+ มักจะมีอยู่ในดินในปริมาณต่ำ ไนโตรเจนจึงมักเป็นธาตุอาหารที่เป็นปัจจัยจำกัดสำหรับการเจริญเติบโต ปุ๋ยไนโตรเจนส่วนใหญ่ที่ใช้ในนาข้าว คือ ปุ๋ยยูเรีย ซึ่งให้ธาตุไนโตรเจน 46 เปอร์เซ็นต์ แต่ไนโตรเจนส่วนใหญ่จะสูญเสียไปโดยวิธีการต่าง ๆ เช่น ขบวนการชะล้าง (leaching) ของ NO_3^- เนื่องจาก NO_3^- ไม่ถูกดูดไว้โดยอนุภาคดิน จึงเกิดการชะล้างได้ง่าย กระบวนการ Denitrification ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการรีดิวส์ไนเตรตให้เป็นแก๊สไนโตรเจน (N_2) โดยแบคทีเรีย denitrifying bacteria ในสภาพที่ขาดออกซิเจน ทำให้ไนเตรตถูกรีดิวส์เป็นแก๊สไนโตรเจนกลับคืนสู่บรรยากาศ และเกิดการระเหยไปในรูปของแอมโมเนีย ในสภาพดินหรือน้ำที่มี pH สูง การสูญเสียไนโตรเจนในรูปของแก๊สทำให้เกิดมลพิษต่อบรรยากาศในรูปไนตรัสออกไซด์ (N_2O) และแอมโมเนีย (NH_3) (Reeves *et al*., 2002) ส่วนไนเตรท (NO_3^-) ที่ถูกชะล้างจะตกค้างในน้ำทั้งบนดินและใต้ดิน (Shrestha and Ladha, 1998)

ธาตุอาหารที่พืชพืชต้องการมากที่สุด คือ ไนโตรเจน ในการใส่ปุ๋ยในนาข้าว ถ้าเป็นปุ๋ยอินทรีย์ อัตราการใส่ คือ 1,000-2,000 กิโลกรัมต่อไร่ โดยหว่านในขณะเตรียมดินหรือก่อนปักดำ แต่ถ้าเป็นปุ๋ยเคมี การใส่ปุ๋ยควรพิจารณาถึงคุณสมบัติของดินเป็นสำคัญ และชนิดของข้าวก็ จะต้องการไนโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกันด้วย เช่น

1) ดินเหนียว ดินร่วนปนดินเหนียว ซึ่งมักเป็นดินนาในภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้บางส่วน ควรใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0, 18-22-0 หรือ 20-20-0 เป็นปุ๋ยรองพื้น ในอัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ ครั้งที่สองใส่แอมโมเนียมซัลเฟต (20 เปอร์เซ็นต์ N) ข้าวไวแสง 4-12 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวไม่ไวแสง 12-22 กิโลกรัมต่อไร่ หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ (25 เปอร์เซ็นต์ N) ข้าวไวแสง 4-10

2.15 การตรึงไนโตรเจน (Nitrogen Fixation)

2.17.1 การตรึงไนโตรเจนโดยกรรมวิธีทางเคมี (Haber Bosch procees) เป็นกระบวนการผลิตแอมโมเนียโดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนและไนโตรเจนเป็นวัตถุดิบก่อให้เกิดปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิสูงประมาณ 500 องศาเซลเซียส ความดัน 100-200 บรรยากาศ โดยใช้เหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2.17.2 การตรึงไนโตรเจนที่เกิดจากฟ้าแลบ ฟ้าผ่า (Almospheric fixation) เป็นการเปลี่ยนไนโตรเจน ในบรรยากาศ (N_2) ให้เป็นไนโตรเจนออกไซด์ ($NO+NO_2$) ฟ้าแลบฟ้าผ่าแต่ละครั้งกระแสไฟฟ้าจะทำให้ไอน้ำ และออกซิเจนแตกตัวเป็นอะตอมและอนุมูลอิสระของ OH^-, H^+, และ O^- และเข้าทำปฏิกิริยากับไนโตรเจนในบรรยากาศอย่างรวดเร็ว ได้ผลผลิตเป็นกรดไนตริก (HNO_3) ซึ่งถูกละลายในน้ำฝน และตกลงสู่พื้นดินกลายเป็นปุ๋ยไนเตรท ซึ่งพืชสามารถดูดไปใช้ได้

2.17.3 การตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต (Biological nitrogen fixation) เป็นกระบวนการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศ (N_2) ไปอยู่ในรูปของแอมโมเนียและเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเ จน (organic nitrogen) แบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนไ ด้เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโทรจีเนส กระบวนการตรึงไนโตรเจนที่ถูกกระทำโดยเอนไซม์ไนโทรจีเนส แสดงดังนี้

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยเ อนไซม์ไนโ ทรจีเนส ในขั้นแรก Fe-protein จะถูกรีดิวส์โดย ferredoxin ต่อมา Fe-protein ที่ถูกรีดิวส์จะเข้าจับกับ ATP และไปรีดิวส์ molybdenum-iron protein และให้อิเล็กตรอนกับ N_2 และเกิดเป็น HN=NH และถูกรีดิวส์ต่อไปเรื่อย ๆ โดยรับอิเล็กตรอนจาก ferredoxin จนกลายเป็น $2NH_3$ เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (iron protein) หรือ (Fe-protein) และโปรตีนที่มีโมลิบดีนัมและเหล็กเป็นองค์ประกอบ (molybdenum-iron protein) ดังนั้นการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต (Biological N_2 fixation) จึงเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญมากในการเพิ่มไนโตรเจนให้แก่ดิน

2.17 การวัดอัตราการตรึงไนโตรเจน

วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโทรจีเนส สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดปริมาณ H_2 การวัดการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไนโ ทรจีเนส กับสารที่เอนไซม์สามารถออกซิไดซ์ เช่น ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) เป็นมีเทน (CH_4) และอเซทิลีน (C_2H_2) เป็นเอทิลีน (C_2H_4) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค N^{15}-enrichment analysis ด้วยเครื่อง Mass Spectrometry (MS) และการใช้เทคนิค N^{13}-

incorporation assay ด้วยหลักการของกัมมันตภาพรังสี แต่วิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การเปลี่ยนอเซทิลีนเป็นเอทิลีน (Acetylene Reduction Assay: ARA) เนื่องจากเป็นวิธีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา มีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยา รวดเร็ว ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูงเกินไป และไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติและสิ่งแวดล้อม ค่า Km (Michaelis constant) และความต้องการ ATP ที่น้อยกว่าสารอื่นจึงทำให้การเข้าทำปฏิกิริยาของอเซทิลีนและเอนไซม์ ไนโทรจีเนสเกิดได้เร็วกว่าสารอื่น ๆ โดยทั่วไปประมาณ 30 นาที ก็สามารถตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ได้ด้วย Gas Chromatography (GC)

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 วิธีการใส่เชื้อ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต

3.1.1 การเตรียมเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii*

นำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* จากโครงการการพัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพในเชิงธุรกิจ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร nutrient agar (NA) มีองค์ประกอบดังนี้ Beef extract 3 กรัม Peptone 5 กรัม Agar 15 กรัม ในปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 6.8 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 28-30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ได้ความเข้มข้นเชื้อที่ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.1.2 ทดสอบคุณสมบัติบางประการของเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii*

3.1.2.1 การวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (Acetylene Reduction Assay : ARA)

นำแบคทีเรีย *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NFB และ LG ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเปลี่ยนจุกหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นจุก ยาง ทำการอัดก๊าซ Acetylene ลงไปในส่วนปริมาตรเหนืออาหารเหลว 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดึงก๊าซจากหลอดที่ผ่านการบ่มแล้วมาในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดวิเคราะห์ในเครื่อง Gas Chromatograph: GC (Perkin Elmer) โดยใช้ PE-alumina column

3.1.2.2 การทดสอบการสร้างฮอร์โมน Indole Acetic Acid (IAA)

นำแบคทีเรียทั้งสองชนิดเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Tris-TMRT (glucose 10 กรัม yeast extract 0.2 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.2 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.25 กรัม Tris-base 1.21 กรัม L-tryptophan 0.061 กรัม pH 6.8 ในน้ำ 1 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ในที่มืด จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ ใช้ส่วนที่เป็นสารละลายใสไปตรวจสอบการสร้าง IAA โดยดูดสารละลายใสมา 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้น เติมสารละลาย 0.01 M $FeCl_3$ ใน 35 เปอร์เซ็นต์ $HClO_4$ (Salkowsky reagent) ในปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (Costacurta *et al*., 2006) (ทำการเทียบกับ IAA มาตรฐาน) ส่วนที่เป็นตะกอนนำไปหาปริมาณเชื้อ โดยวิธี spread plate บนอาหารสูตร LG และ NFB แล้วนับจำนวนโคโลนี

3.1.3 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีว ภาพ อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

3.1.4 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

สิงหาคม 2552-พฤศจิกายน 2552

3.1.5 วิธีการทดลอง

3.1.5.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียลใน CRD ศึกษา 2 ปัจจัย จำนวน 4 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือ การใส่เชื้อ 4 ระดับ ได้แก่

ระดับที่ 1 ไม่ใส่เชื้อ (ชุดควบคุม)

ระดับที่ 2 ใส่เชื้อ *Az. largimobile*

ระดับที่ 3 ใส่เชื้อ *A. vinelandii*

ระดับที่ 4 ใส่เชื้อสองชนิดร่วมกัน

ปัจจัยที่ 2 คือ รูปแบบการใส่เชื้อ 3 ระดับ ได้แก่

ระดับที่ 1 การแช่เมล็ดข้าวในเชื้อข้ามคืน

ระดับที่ 2 แช่รากกล้าข้าวข้ามคืน

ระดับที่ 3 ใส่ในดินบริเวณใกล้รากกล้าข้าวหลังปลูก 2 วัน

3.1.5.2 วิเคราะห์ดินและปุ๋ยก่อนและหลังปลูก

วัดระดับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ดินและปุ๋ยอินทรีย์ โดยอัตราส่วน ดิน หรือปุ๋ย: น้ำ เท่ากับ 1:1 ด้วยเครื่อง pH meter ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ของดินและปุ๋ย โดยอัตราส่วน ดินหรือปุ๋ย: น้ำ เท่ากับ 1:5 ด้วยเครื่อง Electrical Conductivity Meter อ่านตัวอย่างละ 3-4 ครั้ง วิเคราะห์อินทรีย์วัตถุ (OM) ในดินและปุ๋ยด้วยวิธี Walkley and Black (Black, 1965) วิเคราะห์ไนโตรเจน (Total N) ในดินและปุ๋ย โดยวิธี Kjeldahl วิเคราะห์ NO_3^- และ NH_4^+ ด้วยวิธี Steam Distillation (Bremner, 1996) วิเคราะห์ฟอสฟอรัส (available P) ในดิน ด้วยวิธี Bray II (Bray *et al*., 1945) สำหรับตัวอย่างปุ๋ยย่อยด้วย HNO_3+ $HClO_4$ อัตราส่วน 5:3 และวัดเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัส ด้วยวิธี Vanadomolybdate (Hesse, 1971) วิเคราะห์ exchangeable K ในดิน โดยวิธี NH_4OAc 1.0 M วัดด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophometer (Jones, 2001) สำหรับตัวอย่างปุ๋ยย่อยด้วย HNO_3+$HClO_4$ อัตราส่วน 5:3 วัดธาตุ K ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophometer (Jones, 2001) และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ K ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ของดินและปุ๋ยอินทรีย์แสดงในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 คุณสมบัติต่าง ๆ ของดินก่อนปลูกข้าวในกระถางพลาสติกและกระถางซีเมนต์

คุณสมบัติทางเคมี		ค่าวิเคราะห์
pH		7.3
EC	(mS/cm)	0.28
OM	(%)	1.6
Total N	(%)	0.1
NH_4^+	(mg kg^{-1})	4.05
NO_3^-	(mg kg^{-1})	2.83
P	(mg kg^{-1})	22.6
K	(mg kg^{-1})	380

ตารางที่ 3 สมบัติทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

คุณสมบัติทางเคมี		ค่าวิเคราะห์
pH		7.1
EC	(mS/cm)	2.1
OM	(%)	15.5
Total N	(%)	0.88
NH_4^+	(mg kg^{-1})	208
NO_3^-	(mg kg^{-1})	1,346
P_2O_5	(%)	3.9
K_2O	(%)	0.9

3.1.5.3 การเตรียมกล้าข้าว

ใช้ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ทำการฆ่าเชื้อที่เมล็ดข้าวโดยนำ เมล็ดข้าวไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ใน 2 เปอร์เซ็นต์ NaHCl เป็นเวลา 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3-5 ครั้ง จากนั้นประยุกต์ใช้วิธีการใส่เชื้อของ Islam and Bora, 1998 โดย 1) นำเมล็ดข้าวไปแช่ในเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนนำไปเพาะ 2) นำเมล็ดข้าวไปเพาะในทรายที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จนกล้าอายุได้ 8 วัน นำต้นกล้าข้าวไปแช่ใน

เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนนำไปปลูก และ 3) นำกล้าข้าวที่อายุได้ 8 วัน ที่ไม่ได้ใส่เชื้อนำไปปลูกในกระถางเพื่อใส่เชื้อในดินบริเวณรากข้าวหลังย้ายปลูก 2 วัน

3.1.5.4 การปลูกข้าวทดสอบ

ทำการทดลองในระดับกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 เซนติเมตร ไม่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม โดยเตรียมดิน 3 กิโลกรัมต่อกระถาง ผสมดินกับปุ๋ยอินทรีย์ที่ไม่ ใส่เชื้อในอัตราส่วน 10:1 นำต้นกล้าอายุ 8 วัน ที่ผ่านการใส่เชื้อด้วยกรรมวิธีการแช่เมล็ด ข้าวในเชื้อข้ามคืน และการแช่รากกล้า ข้าวข้ามคืนไปปลูกในกระถาง และนำกล้าที่ไม่มีการใส่เชื้อไปปลูกในกระถางทิ้งไว้ 2 วัน หลังจากนั้น จึงทำการใส่เชื้อ โดยหยอดลงไปในดินบริเวณใกล้ ๆ รากข้าว ในกรรมวิธีการทดลอง ที่ใส่เชื้อในดิน ปลูกข้าว 9 ต้นต่อกระถาง ควบคุมการให้น้ำแบบสลับแห้งและเปียกตั้งแต่ระยะย้ายปลูกจนถึงก่อนออกรวง และวางไว้ในสภาพแวดล้อมปกติ ระยะเวลา 60 วัน

3.1.6 การเก็บข้อมูล

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากกระถางละ 10 กรัมต่อครั้ง และตัวอย่างข้าวกระถางละ 1 ต้นต่อครั้ง เก็บที่ 5, 10, 15, 30 และ 60 วันหลังการย้ายปลูก โดยทำการเก็บข้อมูลดังนี้

3.1.6.1 ตรวจนับปริมาณเชื้อ ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN)

นับปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* โดยนำตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร ทำการเจือจางลงเป็น 10^{-1}-10^{-10} นำตัวอย่างดินที่เจือจางแล้วดังกล่าวปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทุกระดับการเจือจาง ใส่ลงในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน (สูตรอาหาร LG สำหรับ *A. vinelandii* มีองค์ประกอบดังนี้ Glucose 10 กรัม K_2HPO_4 0.05 กรัม KH_2PO_4 0.15 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.02 กรัม $FeCl_3.6H_2O$ 0.01 กรัม $NaMo0_4.2H_2O$ 0.002 กรัม yeast extract 0.2 กรัม ในปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 6.8 (Lipman, 1904) และอาหารสูตร NFB สำหรับ *Az. largimobile* มีองค์ประกอบดังนี้ Malic acid 5 กรัม K_2HPO_4 0.1 กรัม KH_2PO_4 0.4 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม NaCl 0.1 กรัม $CaCl.2H_2O$ 0.02 กรัม $FeCl_3.6H_2O$ 0.01 กรัม $NaMoO_4.2H_2O$ 0.002 กรัม KOH 4 กรัม yeast extract 0.2 กรัม NaCl 0.1 กรัม $CaCl.2H_2O$ 0.02 กรัม $FeCl_3.6H_2O$ 0.01 กรัม ในปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร ปรับ pH 6.8 (Meunchang *et al*, 2005) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ทำ 4 หลอด ตามระบบ MPN (Vincent, 1970) โดยทำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* เริ่มต้น10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางไปจนถึง 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิ ตร ด้วยระบบ 4 หลอดเช่นกัน เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมไปพร้อมกันด้วย เปลี่ยนฝาหลอดทดลองให้เป็นจุกยางเพื่อดูดอากาศภายในหลอดออก 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรส่วนช่องว่างที่เหลือ (head space) แทนที่อากาศด้วยก๊าซ Acetylene ในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซล เซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ กรรมวิธี การทดลองที่ไม่มีการแทนที่อากาศด้วยก๊าซ Acetylene และที่ไม่มีการใส่ตัวอย่างดินเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบควบคุม นำไปวัดประสิทธิภาพการ

ตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Assay ตรวจวัดปริมาณ Ethylene ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ใช้ PE-Alumina column (Perkin Elmer,USA) (Somasegaran and Hoben, 1994)

3.1.6.2 ยืนยันการคงอยู่ของเชื้อโดยใช้เทคนิค Immuno Fluorescent Antibody (FA)

3.1.6.2.1 การเตรียม Antigen

เลี้ยงเชื้อ *Az. largimobile* ในอาหารสูตร NFB และ *A. vinelandii* ในอาหารสูตร LG ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ได้ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เรียกว่า Antigen เข้มข้น (CS) อีกส่วนหนึ่งนำไปเจือจางเท่ากับ 10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ฉีดกระต่าย (working suspension : WS) นำ Antigen ทั้ง 2 ส่วนไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นแล้วเติม methyliodate ในอัตราส่วน 1:1,000 และเก็บ Antigen ไว้ในตู้เย็น เลือกกระต่ายพันธุ์ New Zealand white ที่มีสุขภาพดีและมีอายุไม่เกิน 3 ปี โดยฉีดเข้าไปที่หู ในวันที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ปริมาณ Antigen ที่ฉีดคือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อครบ 13 วันจึงทำการเก็บเลือดกระต่ายจากบริเวณใบหูปริมาณ 3-5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบความเข้มข้นของ Antiserum (agglutination) โดยเจือจาง Antiserum แต่ละชนิดด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl โดยทดสอบที่ความเจือจาง 1/25, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1,600 และ 1/3,200 หลังจากนั้นใส่ Antigen ที่เป็นชนิดเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปไว้ในตู้เย็นนาน 2 ชั่วโมง จนสังเกตเห็นตะกอนที่ความเข้มข้นมากกว่า 1/1,280 จึงเก็บเลือดจากกระต่าย โดยเก็บจากหัวใจตัวละประมาณ 30 มิลลิลิตร แยก immunoglobulin ออกจาก antiserum เพื่อ conjugate กับ FITC (Fluorescent isothiocyanate) โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือ $NaSO_4$ อิ่มตัว โดยการนำ serum ใส่ในบีกเกอร์ และหยด $NaSO_4$ ช้า ๆ และกวนที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl นำไปปั่นเหวี่ยง และละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดใส่ในถุง dialysis และนำไป dialysis ด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl จากนั้นตัวอย่างที่ได้นำไปหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry *et al*., 1951)

3.1.6.2.2 การยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธีImmuno Fluorescent Antibody (FA)

นำหลอดที่เจือจางที่สุดที่ให้ผลเป็นบวกจากการหา MPN ไปตรวจสอบเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหารสูตร LG และ NFB จากนั้นเอาโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่เจริญบนอาหารไปวางบนสไลด์ หยด 100 ไมโครลิตร primary antibody ที่เจือจาง (1:80) โดย PBS buffer ที่เติม 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ sodium azide บ่มไว้นาน 45 นาที ล้างด้วย PBS buffer ที่เติมสารเคมีดังกล่าวไปแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นหยด 100 ไมโครลิตร ของ FITC conjugated goat anti-

rabbit IgG (whole molecule) FITC Conjugate เจือจาง (1:400) ด้วย PBS buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในภาชนะที่มีความชื้น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในที่มืด และล้างด้วย PBS buffer อีก 3 ครั้ง หยดตัวอย่างด้วย FA-mounting fluid นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ Fluorescent ภายใต้แสง Fluorescent (450-480 นาโนเมตร) (Somasegaran and Hoben, 1994)

3.1.6.3 วัดการเจริญเติบโต

วัดความยาวรากโดยใช้เครื่อง Root length scanner (Newman, 1966) ความสูงต้น น้ำหนักแห้งต้นและราก

3.1.6.4 วัดปริมาณธาตุไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ (N-uptake)

ทำการเก็บตัวอย่างข้าวเพื่อวิเคราะห์ N-uptake โดยเก็บส่วนที่อยู่เหนือพื้นดินทั้งหมดของข้าวที่อายุ 60 วัน ทำการเก็บซ้ำละ 3 ต้น อบที่ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท บดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นทำการวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืช ด้วยวิธี Kjeldahl

3.1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v. 13 for window (Levesque and SPSS Inc., 2006) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักแห้งต้นและราก และปริมาณ N-uptake โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.2 การทดลองที่ 2 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับกระถางและแปลงทดลอง ต่อปริมาณเชื้อ ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของข้าว

3.2.1 การเตรียมเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii*

แบคทีเรีย *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร nutrient agar (NA) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 6 ลิตร และให้ออกซิเจนโดยใช้ปั๊มอากาศ ใช้เวลา 48 ชั่วโมง หรือให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การใส่เชื้อประยุกต์ใช้วิธีการที่ดี ที่สุดจากการทดลองที่ 1

3.2.2 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

3.2.3 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ธันวาคม 2552–พฤศจิกายน 2553

3.2.4 วิธีการทดลอง

3.2.4.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2×4 แฟคตอเรียลใน RCBD จำนวน 3 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 มี 2 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 ระบบดั้งเดิม

ระดับที่ 2 ระบบประณีต

ปัจจัยที่ 2 มี 4 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 ไม่ใส่เชื้อ (ชุดควบคุม)

ระดับที่ 2 ใส่เชื้อ *Az. largimobile*

ระดับที่ 3 ใส่เชื้อ *A. vinelandii*

ระดับที่ 4 ใส่เชื้อสองชนิดร่วมกัน

3.2.4.2 การเตรียมปุ๋ยอินทรีย์

ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งผ่านกระบวนการหมักสมบูรณ์แล้ว ความชื้นอยู่ที่ 40 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยใช้อัตราส่วนของปุ๋ย:น้ำ เท่ากับ 1:1 ด้วยเครื่อง pH meter ค่าการนำไฟฟ้าของปุ๋ย (EC) อัตราส่วนของปุ๋ย:น้ำ เท่ากับ 5:1 ด้วยเครื่อง Electrical Conductivity Meter วิเคราะห์อินทรียวัตถุ (OM) ด้วยวิธี Walkley and Black (Black, 1965) วิเคราะห์ K โดยย่อยด้วย HNO_3+$HClO_4$ อัตราส่วน 5:3 วัดด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Jones, 2001) วิเคราะห์ N ด้วยวิธี Kjedahl วิเคราะห์ P ย่อยด้วย HNO_3+$HClO_4$ อัตราส่วน 5:3 วัดเปอร์เซ็นต์ P ด้วยวิธี Vanadomolybdate (Hesse, 1971) ใส่ปุ๋ยในกระถางและแปลงก่อนทำการปลูก 1 สัปดาห์ ในอัตราปุ๋ยต่อดินเท่ากับ 2,000 กิโลกรัมต่อไร่

3.2.4.3 การเตรียมกระถางและแปลงทดลอง

กระถางที่ใช้ในการทดลองเป็นกระถางซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร สูง 40 เซนติเมตร สำหรับปลูกข้าวในระบบประณีต และสูง 80 เซนติเมตร สำหรับปลูกข้าวในระบบดั้งเดิม ใส่ดิน 300 กิโลกรัมต่อกระถางทั้งสองระบบ จากนั้น เติมน้ำแล้วผสมดินให้เข้ากันและปรับพื้นที่ผิวหน้าดินให้สม่ำเสมอ สำหรับแปลงทดลอง ทำการไถดะ จากนั้นปล่อยน้ำเข้านาพอให้ดินชุ่มน้ำทิ้งไว้ประมาณ 5-10 วัน เพื่อให้เมล็ดวัชพืชงอก จากนั้นไถแปรเพื่อย่อยดินให้มีขนาดเล็กลง และทำลายวัชพืชที่งอกขึ้นมา ทำการคราดกำจัดเศษวัชพืชที่ลอย จากนั้นระบายน้ำออก ทำการตีดินและปรับพื้นที่ผิวหน้าดินให้สม่ำเสมอ กั้น แปลงขนาด 2×4 ตารางเมตร ทำคันกั้นสูง 50 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างดินทั้งก่อนและหลังการปลูก เพื่อทำการวัดระดับความเป็นกรดเป็นด่าง ของ

ดิน (pH) โดยใช้อัตราส่วนของดิน:น้ำ เท่ากับ 1:1 ด้วยเครื่อง pH meter ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC) อัตราส่วนของดิน:น้ำ เท่ากับ 5:1 ด้วยเครื่อง Electrical Conductivity Meter อินทรียวัตถุ (OM) ด้วยวิธี Walkley and Black (Black, 1965) วิเคราะห์ exchangeable K โดยสกัดดินด้วย NH_4OAc 1.0 M วัดด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Jones, 2001) วิเคราะห์ ไนโตรเจนในดิน (Total N) ด้วยวิธี Kjeldahl วิเคราะห์ฟอสฟอรัส (available P) ด้วยวิธี Bray II (Bray *et al*., 1945)

3.2.4.4 การเตรียมกล้าข้าว

ใช้ข้าว จ้าว พันธุ์ปทุมธานี 1 เพาะเมล็ดข้าวในเวอร์มิคูไลต์ ผสมทราย ในตะกร้าพลาสติกสำหรับระบบการปลูกข้าวแบบประณีต และเพาะเมล็ดข้าวในแปลงเพาะกล้าสำหรับการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิม จากนั้นนำกล้ามาปลูก สำหรับระบบการปลูกข้าวแบบประณีตใช้กล้าอายุ 8 วัน การย้ายกล้าไปปลูกต้องระมัดระวังให้รากกระทบกระเทือนน้อยที่สุด ส่วน ในระบบดั้งเดิมใช้กล้าอายุ 30 วัน โดยถอนกล้าแล้วต้องล้างรากและตัดใบ

3.2.4.5 การปลูกข้าวทดสอบ

การปลูกในระดับกระถางใช้ระยะห่างเท่ากันทั้งสองระบบ คือ 15×15 เซนติเมตร ระดับน้ำแบบดั้งเดิม คือ รักษาระดับน้ำให้อยู่ที่ระดับ 30 เซนติเมตร ใช้ต้นกล้า 3-5 ต้นต่อหลุม ส่วนระดับน้ำระบบการปลูกข้าวแบบประณีต คือ ควบคุมการให้น้ำแบบสลับแห้งและเปียก ตั้งแต่ระยะย้ายปลูกจนถึงก่อนออกรวง และปล่อยน้ำท่วมขังที่ระดับ 2 เซนติเมตร หลังต้นข้าวออกรวงจนถึง 14 วันก่อนเก็บเกี่ยว จึงปล่อยน้ำทิ้ง ใช้ต้นกล้า 1 ต้นต่อหลุม ปลูกกระถางละ 9 หลุม ทั้งสองระบบ ส่วนในระดับแปลงทดลอง ระบบการปลูกข้าวแบบดั้งเดิมใช้ระยะห่าง 20×20 เซนติเมตร ส่วน ระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ใช้ระยะห่าง 30×30 เซนติเมตร ระดับน้ำและจำนวนต้นต่อหลุมของกล้า ทำเช่นเดียวกับการทดลองในระดับกระถาง

3.2.4.6 ตรวจวัดค่า Redox Potential (Eh)

ทำการวัดค่า Redox Potential โดยใช้เครื่อง Oxidation Reduction (redox) Potential (ORP-200) โดยในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตให้ค่าออกซิเดชัน- รีดักชัน บริเวณเหนือผิวดินอยู่มากกว่า +220 mV ส่วนระบบการปลูกข้าวแบบดั้งเดิมให้ค่าออกซิเดชัน- รีดักชันต่ำกว่า +220 mV (Patrick and Tusneem, 1972)

3.2.5 การเก็บข้อมูล

3.2.5.1 วัดประสิทธิภาพของ Nitrogenase โดยวิธี Acetylene Reducing Assay (ARA)

เก็บตัวอย่างแก๊ส ในระหว่างการปลูกข้าว 4 ครั้ง โดยสุ่ม 3 จุดต่อกระถางและต่อแปลง คือ ครั้งที่ 1 เก็บช่วงระยะกล้า (25 วันหลังย้ายปลูก) ครั้งที่ 2 เก็บช่วงข้าวแตกกอ (55 วันหลังย้ายปลูก) ครั้งที่ 3 เก็บช่วงข้าวสร้างรวง (90 วันหลังย้ายปลูก) และครั้งที่ 4 เก็บช่วงหลังข้าวออก

ดอกถึงเก็บเกี่ยว (120 วันหลังย้ายปลูก) โดยประยุกต์วิธีของ Lee *et al*., (1977) ใช้ท่อที่ทำจากสังกะสีแผ่นเรียบแทนโลหะ ขนาด สูง 20 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ลักษณะคล้ายกระบอกตวง ใช้ถุงพลาสติก High Density Polyethylene (HDPE) ครอบทั้งต้นข้าวปิดให้สนิท รัดด้วยหนังยางขนาดใหญ่และหนาพิเศษ ต่อจุกยางสำหรับอัดแก๊ส Acetylene และดูดเก็บแก๊ส Ethylene ทำการดูดอากาศภายในท่อออก 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรส่วนช่องว่างที่เหลือ (head space) แทนที่อากาศด้วยก๊าซ Acetylene ในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิปกตินาน 12 ชั่วโมง ทำกรรมวิธีการทดลองที่ไม่มีการแทนที่อากาศด้วยก๊าซ Acetylene กรรมวิธีที่ครอบบริเวณดินที่ไม่มีต้นข้าว และกรรมวิธีที่ใส่แก๊ส Ethylene แทนที่ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบควบคุม เก็บแก๊สใส่หลอด เก็บตัวอย่างที่เป็นสูญญากาศขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปตรวจวัดปริมาณ Ethylene ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ใช้ PE-Alumina column (Perkin Elmer,USA) (Somasegaran and Hoben, 1994)

3.2.5.2 ตรวจนับปริมาณเชื้อโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

การเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวจากกระถางและแปลงทดลอง โดยเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง คือ ระยะกล้า ระยะแตกกอ ระยะสร้างรวงอ่อน และระยะเก็บเกี่ยว เก็บกระถาง และแปลงละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 กรัม แล้วนำมาผสมให้เข้ากัน เพื่อนำไปประเมินปริมาณของเชื้อ *Az. largimobile.*และ *A. vinelandii* ในการปลูกข้าว โดยทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.2.5.3 ยืนยันชนิดการคงอยู่ของเชื้อ โดยใช้เทคนิค Immuno Fluorescent Antibody (FA)

นำหลอดที่ให้ผลเป็นบวกจากการหา Most Probable Number ไปตรวจสอบเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหารสูตร LG และ NFB จากนั้นเอาโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่เจริญบนอาหารไปทดสอบขั้นยืนยันโดยใช้เทคนิค Immuno Fluorescent Antibody (FA) โดยทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.2.5.4 วัดการเจริญเติบโตของข้าว

วัดความยาวราก โดยใช้เครื่อง Root length scanner (Newman, 1966) ปริมาตรของรากโดยการแทนที่ด้วยน้ำ วัดน้ำหนักสดต้นและราก น้ำหนักแห้งต้นและราก

3.2.5.5 วัดองค์ประกอบผลผลิตและผลิต

ทำการเก็บส่วนที่อยู่เหนือพื้นดินทั้งหมดของข้าวในระยะเก็บเกี่ยว เก็บตำรับการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น อบที่ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท จากนั้นทำการวัดจำนวนต้นต่อกอ รวงต่อตารางเมตร เมล็ดต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด สำหรับระดับกระถาง และ1,000 เมล็ด สำหรับระดับแปลง และผลผลิตต่อกระถางและต่อแฮกเตอร์ในระดับแปลง

3.2.5.6 วัดปริมาณธาตุอาหารที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ (Nutrient uptake)

ทำการเ ก็บตัวอย่างข้าว ในระยะเก็บเกี่ยว เพื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ โดยเก็บส่วนที่อยู่เหนือพื้นดินทั้งหมดของข้าวในระยะเก็บเกี่ยว กรรมวิธีการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น อบที่ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท บดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นทำการวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืช ด้วยวิธี Kjeldahl วิเคราะห์ P โดยย่อยด้วย HNO_3+$HClO_4$ อัตราส่วน 5:3 วัดเปอร์เซ็นต์ P ด้วยวิธี Vanadomolybdate (Hesse, 1971) และวิเคราะห์ K โดยย่อยด้วย HNO_3+$HClO_4$ อัตราส่วน 5:3 วัดด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Jones, 2001)

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA) ของข้อมูลทั้งหมดด้วยโปรแกรม SPSS v. 13 for window (Levesque และ SPSS Inc., 2006) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan' New Multiple Range Test) ของปริมาณเชื้อ การตรึงไนโตรเจน การเจริญเติบโต องค์ประกอบผลผลิตและผลผลิต ปริมาณธาตุอาหารที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ และค่าวิเคราะห์ดินก่อนและหลังปลูก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และการอภิปรายผล

4.1 การทดลองที่ 1 วิธีการใส่เชื้อ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต

4.1.1 คุณสมบัติบางประการของเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii*

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบคือ แบ คทีเรียสายพันธุ์ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทางมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีผลิตเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ และปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพทางการค้า เชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมนออกซิน ได้แก่ Indole-3-Acetic Acid (IAA) โดยเชื้อ *Az. largimobile* ผลิตได้มากกว่าเชื้อ *A. vinelandii* ส่วนความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเชื้อ *A. vinelandii* สูงกว่าเชื้อ *Az. largimobile* (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติบางประการของเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii*

PGPR	การผลิตฮอร์โมนพืช IAA (nM/mL/10^8 CFU)	การตรึงไนโตรเจน (nmole C_2H_4/day/10^8 CFU)
Az. largimobile	445±0.01	0.05±0.06
A. vinelandii	155±0.05	9.74±0.78

4.1.2 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อปริมาณ และการคงอยู่ของเชื้อ

หลังจากปลูกข้ าวในกระถาง 5, 10, 15, 30 และ 60 วัน ทำการประเมินปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* จากดินรอบบริเวณรากข้าว (rhizosphere) ด้วยวิธี MPN พบว่าที่ 10, 30 และ 60 วันหลังย้ายปลูก ปริมาณเชื้อทั้งสองชนิดมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการใส่เชื้อและการใส่เชื้อ โดยปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* ที่ 10 วันหลังย้ายปลูก มีปริมาณมากที่สุดในกรรมวิธีการทดลองที่ใส่เชื้อ *Az. largimobile* ร่วมกับ *A. vinelandii* ด้วยวิธีแช่รากกล้าข้าวข้ามคืน (8.57 Log_{10} MPN เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ที่ 30 วันหลังย้ายปลูก มีปริมาณมากที่สุด ใน กรรมวิธีการทดลองที่ใส่เชื้อ *Az. largimobile* ด้วยวิธีใส่ลงไปในดินใกล้รากข้าว (7.47 Log_{10} MPN เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) และที่ 60 วันหลังย้ายปลูก มีปริมาณมากที่สุด ในกรรมวิธีการทดลองที่ใส่เชื้อ *Az. largimobile* ด้วย

วิธีใส่ลงไปในดินใกล้รากข้าว (6.23 Log $_{10}$ MPN เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ส่วนปริมาณเชื้อ *A. vinelandii* ที่ 10 วันหลังย้ายปลูก มีปริมาณมากที่สุด ในกรรมวิธีการทดลองที่ใส่เชื้อ *Az. largimobile* ร่วมกับ *A. vinelandii* ด้วยวิธีแช่เมล็ดข้าวข้ามคืน (9.26 Log $_{10}$ MPN เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) ที่ 30 วันหลังย้ายปลูก มีปริ มาณมากที่สุด ในกรรมวิธีการทดลองที่ใส่เชื้อ *Az. largimobile* ร่วมกับ *A. vinelandii* ด้วยวิธีแช่รากกล้าข้าวข้ามคืน (6.97 Log $_{10}$ MPN เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) และที่ 60 วันหลังย้ายปลูก มีปริมาณมากที่สุด ในกรรมวิธีการทดลองที่ใส่เชื้อ *Az. largimobile* ร่วมกับ *A. vinelandii* ด้วยวิธีแช่รากกล้าข้าวข้ามคืน (5.76 Log $_{10}$ MPN เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง) (ตารางที่ 5)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 5 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ต่อปริมาณ และการคงอยู่ของเชื้อ ที่ 10, 30 และ 60 วันหลังย้ายปลูก

กรรมวิธีการทดลอง		ปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* [2] (Log_{10} MPN เซลล์/กรัมดินแห้ง)			ปริมาณเชื้อ *A. vinelandii* (Log_{10} MPN เซลล์/กรัมดินแห้ง)		
		10 [3] DAP	30 DAP	60 DAP	10 DAP	30 DAP	60 DAP
แช่เมล็ดข้าวข้ามคืน	ไม่ใส่เชื้อ	1.73±0.7 f [1]	2.23±0.0 de	2.57±0.4 ef	1.38±0.2 e	2.49±0.9 def	2.49±0.9 def
	Az. largimobile	7.97±.0 ab	4.76±0.0 b	4.50±0.7 bc	1.23±0.0 e	2.49±0.9 def	2.49±0.9 def
	A. vinelandii	1.23±.0 f	2.76±0.0 cde	2.76±0.0 def	4.23±0.0 d	6.93±.6 ab	3.97±0.7 bcd
	Az. largimobile+A. vinelandii	7.23±0.0 bc	3.76±0.0 bcd	3.57±0.4 cde	9.26±0.0 a	3.76±0.0 cde	3.76±0.0 bcd
แช่รากกล้าข้าวข้ามคืน	ไม่ใส่เชื้อ	3.06±0.3 e	2.47±.1 e	1.23±0.0 g	1.13±0.16 e	1.23±0.0 f	1.23±0.0 f
	Az. largimobile	5.76±0.0 d	4.06±0.3 bc	4.06±0.3 bcd	1.23±0.0 e	2.47±.1 def	2.47±.1 def
	A. vinelandii	1.23±0.0 f	2.47±.1 e	2.47±.1 fg	4.47±.1 d	4.47±.1 cd	4.47±.1 bc
	Az. largimobile+A. vinelandii	8.57±0.4 a	7.23±0.0 a	4.06±0.3 bcd	7.23±0.0 b	6.97±0.7 a	5.76±0.0 a
ใส่ลงไปในดินใกล้รากข้าว	ไม่ใส่เชื้อ	2.23±0.0 ef	2.06±0.3 e	1.76±0.0 fg	3.50±0.7 d	1.97±0.7 ef	1.65±0.2 ef
	Az. largimobile	6.76±0.0 cd	7.47±.1 a	6.23±0.0 a	1.23±0.0 e	2.47±.1 def	2.47±.1 def
	A. vinelandii	2.47±.1 ef	2.47±.1 e	2.47±.1 fg	5.97±0.7 c	6.23±0.0 ab	5.50±0.7 ab
	Az. largimobile+A. vinelandii	8.23±0.0 ab	4.50±0.7 bc	4.76±0.0 b	7.23±0.0 b	4.50±0.7 bc	3.50±0.7 cde
	CV %	10.75	18.28	16.25	10.97	24.68	24.27

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

[2] Most Probable Number (MPN) ของเซลล์ที่แสดงในรูป Log_{10} ±SD, [3] DAP=Day After Planting, วันหลังย้ายปลูก

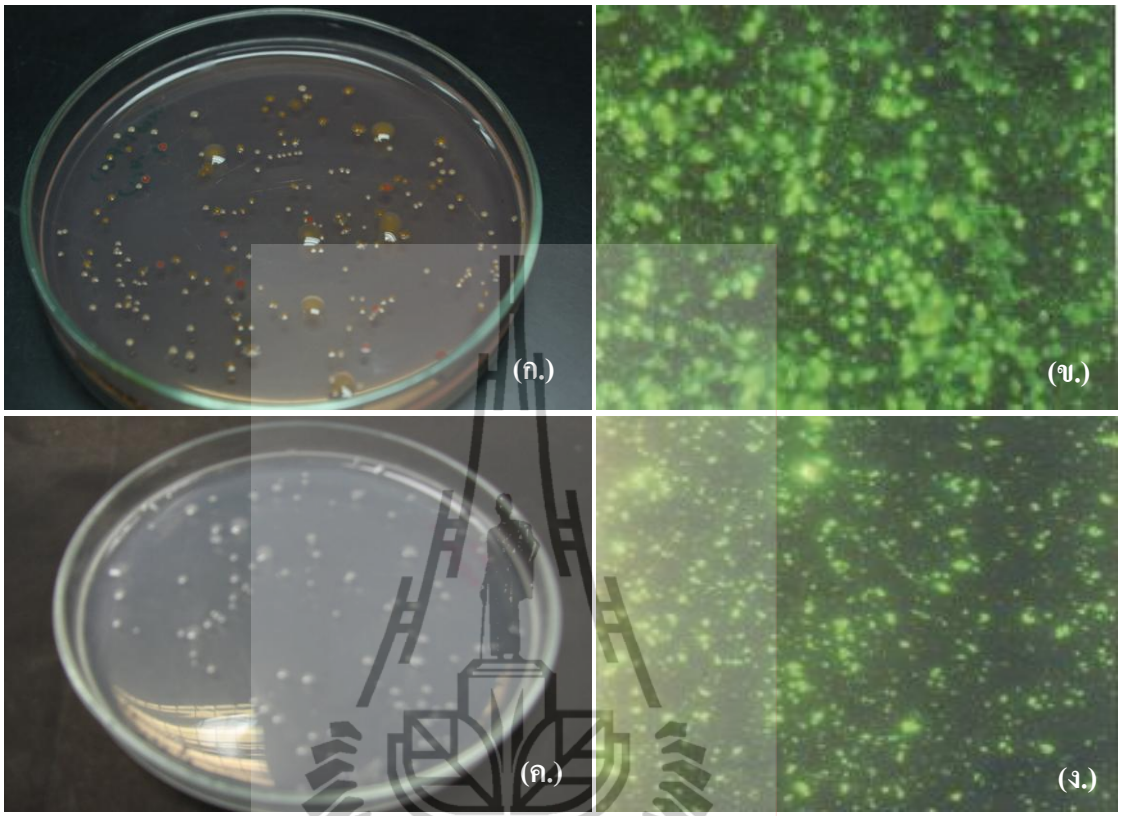
ส่วนที่ 5 และ 15 วันหลังย้ายปลูก ปริมาณเชื้อทั้งสองชนิดไม่มีป ฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการใส่เชื้อและการใส่เชื้อ โดยวิธีการใส่เชื้อไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อทั้งสองชนิด แต่การใส่เชื้อทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจากกรรมวิธี การทดลอง ที่ไม่มีการใส่เชื้อหรือชุดควบคุม โดยปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* และเชื้อ *A. vinelandii* ที่ 5 และ 15 วันหลังย้ายปลูก มีปริมาณมากที่สุด ในกรรมวิธี การทดลองที่ใส่เชื้อสองชนิดร่วมกัน (ตารางที่ 6) จะเห็นได้ว่า วิธีการใส่เชื้อต่าง ๆ ไม่มีผลต่อปริมาณการคงอยู่ของเชื้ออย่างเด่นชัด

ตารางที่ 6 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อปริมาณและการคงอยู่ของเชื้อที่5 และ 15 วันหลังย้ายปลูก

กรรมวิธีการทดลอง		ปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* (Log_{10} MPN เซลล์/กรัมดินแห้ง)		ปริมาณเชื้อ *A. vinelandii* (Log_{10} MPN เซลล์/กรัมดินแห้ง)	
		5 DAP	15 DAP	5 DAP	15 DAP
วิธีการใส่เชื้อ	แช่เมล็ดข้าวข้ามคืน	4.92±3.6	4.12±3.3	3.99±3.5	3.73±3.5
	แช่รากกล้าข้าวข้ามคืน	4.74±3.7	3.55±3.1	3.65±2.7	3.11±2.6
	ใส่เชื้อในดินบริเวณรากข้าว	5.21±3.9	4.05±2.9	4.94±3.9	3.24±2.5
ชนิดของเชื้อที่ใส่	ไม่ใส่เชื้อ	1.79±0.2 [c 1]	1.65±0.4 [c]	1.66±0.4 [c]	1.40±0.3 [c]
	Az. largimobile	7.69±0.8 [b]	4.00±0.0 [b]	1.36±0.0 [c]	1.23±0.0 [c]
	A. vinelandii	1.74±0.4 [c]	1.74±0.4 [c]	5.45±1.1 [b]	3.41±0.3 [b]
	Az. largimobile+A. vinelandii	8.62±0.1 [a]	8.24±0.5 [a]	8.30±1.4 [a]	7.40±1.2 [a]
	CV%	10.63	12.86	11.96	18.92

[1]ค่าเฉลี่ยในปัจจัยเดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

จากการยืนยันชนิดและการคงอยู่ของเชื้อด้วยเทคนิค Immuno Fluorescent Antibody (FA) จากตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกด้วยวิธีการ MPN โดยลักษณะการจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody จะเห็นเป็นสีเขียวเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงใน รูปที่ 3 พบว่า มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody ในทุกกรรมวิธี การทดลอง ซึ่งการจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody หมายถึง เชื้อที่ตรวจพบในตัวอย่างดินบริเ วณรากข้าวเป็นชนิดเดียวกับที่ใส่ (Inoculate) ลงไป



รูปที่ 3 การจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibodyโดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody

(ก.) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Az. largimobile* ในอาหาร NFB

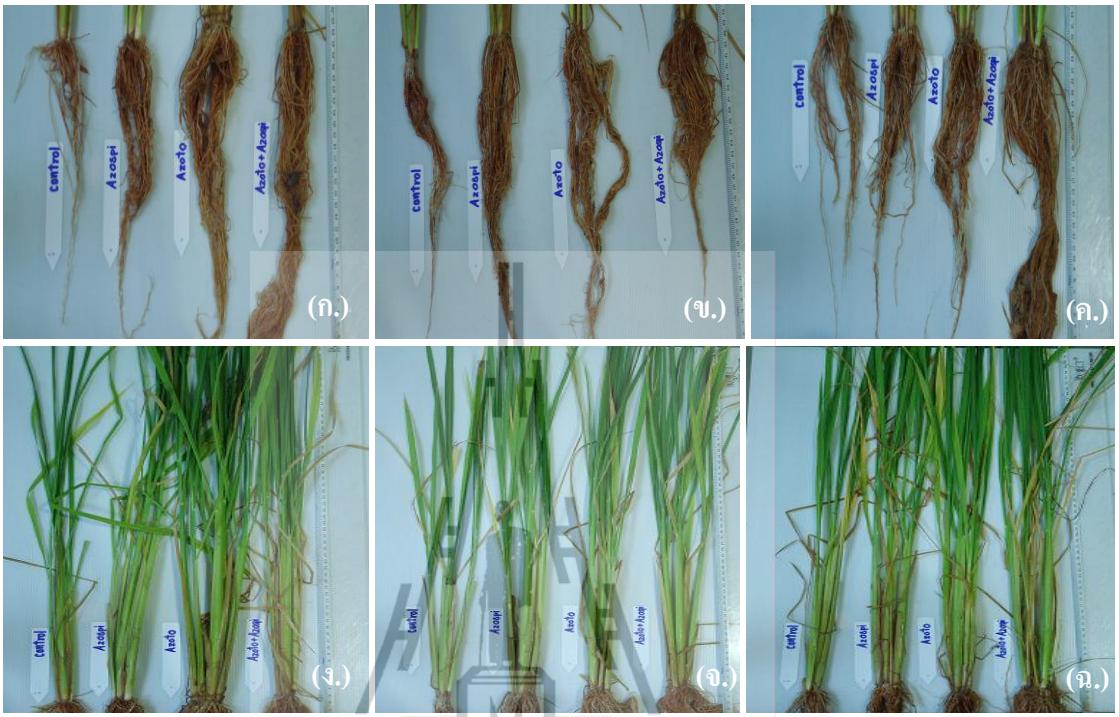
(ข.) การเกิดการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent ของเชื้อ *Az. largimobile*

(ค.) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. vinelandii* ในอาหาร LG

(ง.) การเกิดการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent ของเชื้อ *A. vinelandii*

4.1.3 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นและรากข้าว

จากการเก็บตัวอย่างข้าวที่อายุ 5, 10, 15, 30 และ 60 วันหลังย้ายปลูก พบว่า ความยาวราก (Root length density) จากการวัดด้วยเครื่อง Root length scanner ที่ความลึก 30 เซนติเมตร น้ำหนักแห้งรากข้าว ความสูงต้นและน้ำหนักแห้งต้น ข้าว ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการใส่เชื้อและการใส่เชื้อ แต่กา รใส่เชื้อทำให้ความยาวราก น้ำหนักแห้งราก ความสูงต้น และน้ำหนักแห้งต้นของข้าวเพิ่มขึ้นจากกรรมวิธีการทดลองที่ไม่มีการใส่เชื้อหรือชุดควบคุม (ตารางที่ 7 และ 8)



รูปที่ 4 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อการเจริญเติบโตของต้น และรากข้าวที่อายุ 30 วันหลังย้ายปลูก
(ก.) และ (ง.) รากและต้นข้าว วิธีใส่เชื้อโดยแช่เมล็ดข้าวข้ามคืน
(ข.) และ (จ.) รากและต้นข้าว วิธีใส่เชื้อโดยแช่รากกล้าข้าวข้ามคืน
(ค.) และ (ฉ.) รากและต้นข้าว วิธีใส่เชื้อโดยใส่ลงไปในดินใกล้รากข้าว

เมื่อพิจารณา จากรูปที่ 4 พบว่า การใส่เชื้อโดยเฉพาะการใส่เชื้อทั้งสองชนิดร่วมกันทำให้ความยาวรากข้าวเพิ่มขึ้น การแพร่กระจายของรากมากขึ้น กว่าการไม่ใส่เชื้อหรือชุดควบคุม แต่เมื่อพิจารณาที่การแตกกอหรือจำนวนต้นต่อกอจะเห็นว่าแตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างการใส่เชื้อชนิดต่าง ๆ แต่การแตกกอจะเพิ่มขึ้นในกรรมวิธีการทดลองที่ใส่เชื้อในข้าวเมื่อเทียบกับกรรมวิธีการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อหรือชุดควบคุม

ตารางที่ 7 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของรากข้าว

กรรมวิธีการทดลอง		ความยาวรากข้าว (เมตร/ตารางเมตร)					น้ำหนักแห้งรากข้าว (กรัม)				
		5 DAP	**10 DAP**	**15 DAP**	**30 DAP**	**60 DAP**	**5 DAP**	**10 DAP**	**15 DAP**	**30 DAP**	**60 DAP**
วิธีการใส่เชื้อ	แช่เมล็ดข้าวข้ามคืน	5.9±1.1	7.9±1.5	15.6±3.0	31.5±6.9	31.8±7.2	0.01±0	0.02±0.01	0.04±0.03	0.13±0.08	1.4±0.76
	แช่รากกล้าข้าวข้ามคืน	6.2±1.1	8.3±2.9	17.5±6.2	34.6±13.3	35.5±6.1	0.01±0	0.03±0.01	0.05±0.02	0.15±0. 06	1.7±0.75
	ใส่เชื้อในดินบริเวณรากข้าว	6.2±2.1	7.8±1.8	12.4±4.5	23.9±9.7	34.4±11.0	0.01±0	0.03±0.02	0.06±0.04	0.18±0.12	1.9±1.01
เชื้อ	ไม่ใส่	5.1±1.1[c 1]	7.3±2.0[b]	10.3±3.8[b]	20.4±7.8[b]	27.4±3.8[b]	0.001±0[b]	0.02±0.0	0.03±0.01[b]	0.09±0.02[b]	1.0±0.28[b]
	Az. largimobile	7.3±1.1[a]	9.2±2.8[a]	17.9±6.5[a]	35.0±14.2[a]	35.4±7.4[ab]	0.01±0[a]	0.03±0.01	0.06±0.01[a]	0.14±0.04[ab]	1.9±0.75[a]
	A. vinelandii	5.6±1.2[bc]	7.7±2.0[ab]	15.3±2.9[a]	30.7±6.4[a]	32.9±5.9[ab]	0.01±0[a]	0.03±0.01	0.05±0.02[ab]	0.19±0.14[a]	1.8±0.78[a]
	Az. largimobile+A. vinelandii	6.3±0.9[ab]	8.6±3.1[ab]	17.1±6.8[a]	33.8±15.6[a]	36.8±6.7[a]	0.01±0[a]	0.03±0.01	0.06±0.01[a]	0.18±0.09[a]	2.0±0.63[a]
	CV%	19.6	22.2	24.3	28.6	24.5	31.0	0.0	24.8	4.7	26.2

[1] ค่าเฉลี่ยในปัจจัยเดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 8 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นข้าว

กรรมวิธีการทดลอง		ความสูงต้นข้าว (เซนติเมตร)					น้ำหนักแห้งต้น (กรัม)				
		5 DAP	10 DAP	15 DAP	30 DAP	60 DAP	5 DAP	10 DAP	15 DAP	30 DAP	60 DAP
วิธีการ	แช่เมล็ดข้าวข้ามคืน	23.5±4.6	38.1±2.0 [a 1]	53.6±3.7 [a]	68.4±5.2 [a]	89.8±5.8 [a]	0.02±0.01	0.07±0.01	0.26±0.06	1.0±0.22	1.0±2.65
ใส่เชื้อ	แช่รากกล้าข้าวข้ามคืน	23.1±2.9	34.2±2.9 [c]	46.8±2.9 [c]	67.58±2.4 [a]	79.8±8.9 [b]	0.02±0.1	0.06±1.01	0.26±0.01	0.96±0.18	0.96±1.77
	ใส่เชื้อในดินบริเวณรากข้าว	23.4±3.4	36.8±2.4 [b]	49.5±3.1 [b]	63.24±3.9 [b]	88.3±9.8 [a]	0.02±0	0.06±0.01	0.24±0.07	1.10±0.09	1.10±1.6
เชื้อ	ไม่ใส่	22.0±3.6	34.7±3.6 [b]	47.8±3.1 [b]	63.14±3.9 [b]	79.9±10.2 [b]	0.01±0.00 [b]	0.05±0.01 [b]	0.21±0.1	0.95±0.2 [b]	0.95±1.1 [b]
	Az. largimobile	24.6±1.7	36.4±3.6 [ab]	51.9±4.2 [a]	66.68±5.9 [a]	89.0±7.0 [a]	0.02±0.01 [a]	0.06±0.01 [a]	0.26±0.1	1.10±0.1 [a]	1.10±1.5 [a]
	A. vinelandii	24.2±4.0	37.4±3.5 [a]	49.3±3.7 [ab]	67.93±2.6 [a]	89.0±7.6 [a]	0.02±0.01 [a]	0.06±0.01 [a]	0.27±0.1	0.96±0.2 [b]	0.96±1.5 [b]
	Az. largimobile+A. vinelandii	22.5±3.7	37.0±2.4 [a]	50.8±4.1 [a]	67.86±4.0 [a]	86.1±6.5 [ab]	0.02±0.00 [a]	0.06±0.02 [a]	0.28±0.1	1.0±0.2 [ab]	1.0±0.9 [ab]
	CV%	13.9	6.6	5.9	5.5	9.0	0.0	0.0	25.0	22.2	21.8

[1] ค่าเฉลี่ยในปัจจัยเดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4.1.4 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อปริมาณธาตุไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ (N-uptake)

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ (N-uptake) ที่ข้าวอายุ 30 วันหลังย้ายปลูก พบว่า โดยส่วนใหญ่การใส่เชื้อมีปริมาณ N-uptake เพิ่มขึ้นจากกรรมวิธี การทดลองที่ไม่มีการใส่เชื้อหรือชุดควบคุม แต่วิธีการใส่เชื้อไม่มีผลต่อปริมาณ N-uptake (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตต่อปริมาณธาตุไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ (N-uptake) ของข้าวอายุ 30 วันหลังย้ายปลูก

กรรมวิธีการทดลอง		N-uptake (กรัม/ต้น)
วิธีแช่เมล็ดข้าวข้ามคืน	ไม่ใส่เชื้อ	3.1±0.2 cde 1
	Az. largimobile	3.9±0.8 abc
	A. vinelandii	2.5±0.5 e
	Az. largimobile+A. vinelandii	4.2±0.4 a
วิธีแช่รากกล้าข้าวข้ามคืน	ไม่ใส่เชื้อ	2.8±0.6 e
	Az. largimobile	4.5±0.3 a
	A. vinelandii	4.1±0.4 ab
	Az. largimobile+A. vinelandii	3.3±0.3 bcde
วิธีใส่เชื้อในดินบริเวณรากข้าว	ไม่ใส่เชื้อ	3.0±0.5 de
	Az. largimobile	4.3±0.2 a
	A. vinelandii	3.8±0.5 abcd
	Az. largimobile+A. vinelandii	4.4±0.5 a
CV%		12.6

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในนาข้าว ระหว่าง วิธีแช่เมล็ดข้าวข้ามคืน วิธีแช่รากกล้าข้าวข้ามคืน และวิธีใส่เชื้อในดินบริเวณรากข้าว ร่วมกับการใส่เชื้อในข้าว ทั้งการใส่เชื้อชนิดเดียวและการใส่เชื้อสองชนิดร่วมกัน มีผลทำให้ปริมาณเชื้อดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใส่ แสดงให้เห็นว่าการใส่เชื้อลงไปสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อบริเวณรากได้ ซึ่งโดยปกติเชื้ออาจจะมีอยู่ในดินอยู่แล้วแต่มีปริมาณน้อย ส่วนวิธีการใส่เชื้อทั้ง 3 วิธี ไม่ทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างชัดเจน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับช่วงอายุข้าวที่ทำการตรวจสอบเชื้อ ซึ่งมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับสารที่พืชปล่อยออกมา (Root exudates) ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อที่อยู่บริเวณรากพืช (Macario, *et al*., 2003) และยังเป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่สำคัญที่ใช้ในการสังเคราะห์สารต่าง ๆ เช่น Ethylene, Jasmonic acid (JA), และ Salicylic acid (SA) ซึ่งสารดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มที่มีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Reymond and Farmer, 1998; Metraux, 2001) และมีรายงานที่ให้ผลคล้ายกับการทดลองนี้ คือ การนำเชื้อทั้งสองชนิดไปใช้ในการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ซึ่งใช้วิธีใส่เชื้อในดินบริเวณรากโดยผสมกับปุ๋ยอินทรีย์ พบว่า โครงสร้างของชุมชนจุลินทรีย์ท้องถิ่นหรือที่มีอยู่ในธรรมชาติและจุลินทรีย์ที่ใส่เข้าไป ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของพืช ซึ่งเป็นกลไกระหว่างพืชกับเชื้อ และเชื้อกับเชื้อด้วยกันเอง (Piromyou, *et al*., 2011) นอกจากการประเมิน ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในดิน การศึกษาผลกระทบของเชื้อ PGPR ต่อโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ก็มีความสำคัญ เพราะแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ ถ้ามีการใช้จำนวนมากในบางครั้งอาจทำให้จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิม หรือจุลินทรีย์ท้องถิ่นนั้น ๆ ได้รับผลกระทบ หรือส่งผลต่อความสัมพันธ์บางอย่างในดินเสียไป (Blouin-Bankhead *et al*., 2004; Winding *et al*., 2004) และการที่วิธีการทั้ง 3 วิธี ทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน อาจเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณธาตุอาหารในดิน และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น เนื่องจากการทดลองดังกล่าว ทำการทดลองในโรงเรือนทำให้สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อได้ มีการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน ทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี และเนื่องจากการทดลองนี้ทำการปลูกข้าวในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต จึงทำให้ดินมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ปริมาณเชื้อที่ใส่โดยวิธี การต่าง ๆ ไม่แตกต่างกัน มีรายงานสนับสนุนว่าการใส่เชื้อให้ได้ผลดียังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ด้วย เช่น Gopalaswamy and Vidhyaekaran, (1987) พบว่า การใส่เชื้อ *Azospirillum* จะให้ผลดี ขึ้นกับไนโตรเจนในดิน และสายพันธุ์ข้าว หรืองานวิจัยของ Balasubramanian and Kumar, (1991) พบว่า การใส่เชื้อ *Az. lipoferum* ร่วมกับไนโตรเจน 50, 75 และ 100 กิโลกรัมต่อแฮกเตอร์ เมื่อทดสอบกับข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น IR50, IR20, PMK1 และ CO37 ในฤดูกาลต่าง ๆ สามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการใช้เชื้อร่วมกับ

ปริมาณไนโตรเจนที่ต่ำ (30 หรือ 45 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อแฮกเตอร์ จะให้ผลดีกว่าการใช้เชื้อร่วมกับปริมาณไนโตรเจนที่ 60 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อแฮกเตอร์ (Rao *et al*., 1983) หรือในข้าวบางสายพันธุ์ การไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเลย แต่ใส่เชื้ออย่างเดียว สามารถเพิ่มผลผลิตข้าวได้ 43 เปอร์เซ็นต์ (Jeyaraman and Purushothaman, 1988) และวิธีการใส่เชื้อโดยการแช่เมล็ดข้าวในเชื้อ การแช่รากกล้าในเชื้อร่วมกับการใส่เชื้อในดินให้ผลดีกว่าการใส่เชื้อในดินอย่างเดียว (Gopalaswamy *et. al*., 1989)

ผลของวิธีการใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในนาข้าว ต่อการ เจิญเติบโตของข้าว พบว่า รากข้าวในกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อจะยาวและแพร่กระจายได้ดีกว่า การแตกกอก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน น่าจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเชื้อในด้านการสร้าง IAA ได้ ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการสร้างรากฝอย ซึ่งมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่า การสร้างฮอร์โมนของเ ชื้อแบค ทีเรียสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น งานวิจัยของ Ramos *et al*., (2002) พบว่า การใช้แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* กับการปลูกต้นกล้า Alder (*Alnus glutinosa*) สามารถส่งเสริมการเจริญของต้น Alder ได้อย่างดีเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่เชื้อ โดยเฉพาะมีระบบรากที่สมบูรณ์ พื้นที่ผิวของใบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบว่าเป็นบทบาทมาจากสารประกอบกลุ่ม auxin และ gibberllin ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ หรือการใช้ *B. licheniformis* ร่วมกับ *B. pumis* กับต้นกล้าของพืช *Pinus pinae* ซึ่งมีความสามารถในการสร้าง gibberllin พบว่าเพิ่มพื้นที่ผิวของใบและความยาวของรากสูงกว่าการใช้ *Bacillus* เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ (Probanaza *et al*., 2002) การที่ความยาวรากทั้งสามวิธีการใส่เชื้อไม่แตกต่าง กันน่าจะเกี่ยวข้องกับปริมาณเชื้อ ที่ใส่ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเชื้อ ที่พบว่า วิธีการใส่เชื้อไม่ ทำให้ปริมาณเชื้อที่ตรวจสอบได้ แตกต่างกัน แต่การใส่เชื้อทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อ

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ (N-uptake) ที่ข้าวอายุ 30 วันหลังปลูกข้าว พบว่า การใส่เชื้อมีปริมาณไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ เพิ่มขึ้นจากกรรมวิธีที่ไม่มีการใส่เชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* และข้อมูลมวลชีวภาพของข้าว ที่อายุ 30 วันหลังย้ายปลูก ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ เช่น Yanni and El-Fattah, (1999) พบว่า *Azotobacter* ทำให้ไนโตรเจน เพิ่มขึ้น 11-15 กิโลกรัมต่อเฮก เตอร์ และ *Azospirillum* สามารถเพิ่มความสูง จำนวนต้นต่อกอ และ NH_4^+ ในข้าวได้ (Balandreau, 2002 ; Murty and Ladha, 1988) การเพิ่มขึ้นของ N-uptake อาจเกิดจากเหตุผลที่กล่าวมาในเบื้องต้น ในเรื่องความสามารถในการสร้างฮอร์โมนของเชื้อที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของราก ทำให้รากสามารถดูดอาหารได้มากขึ้น และในเรื่องของระบบที่ใช้ปลูกสามารถเพิ่มไนโตรเจนในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อข้าว ทำให้ข้าวสามารถดูดอาหารได้มากขึ้น

4.2 การทดลองที่ 2 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับกระถางและแปลงทดลอง ต่อปริมาณเชื้อ ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของข้าว

4.2.1. การทดลองในระดับกระถาง

4.2.1.1 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อปริมาณและการคงอยู่ของเชื้อทั้งสองชนิด

ปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบการปลู กข้าวและ การใส่เชื้อ โดยในระบบ การปลูกข้าวแบบประณีต มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดกว่าระบบการปลูกข้าวแบบ ดั้งเดิม ค่า MPN ของ *Az. largimobile* สูงที่สุดในกรรมวิธี การทดลองที่ใส่เชื้อ *Az. largimobile* ส่วนปริมาณเชื้อ *A. vinelandii* มีปริมาณไม่แตกต่างกันระหว่างกรรมวิธี การทดลองที่ใส่เชื้อ *A. vinelandii* และกรรมวิธีการทดลองที่ใส่เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *Az. largimobile+A. vinelandii* (ตารางที่ 10)

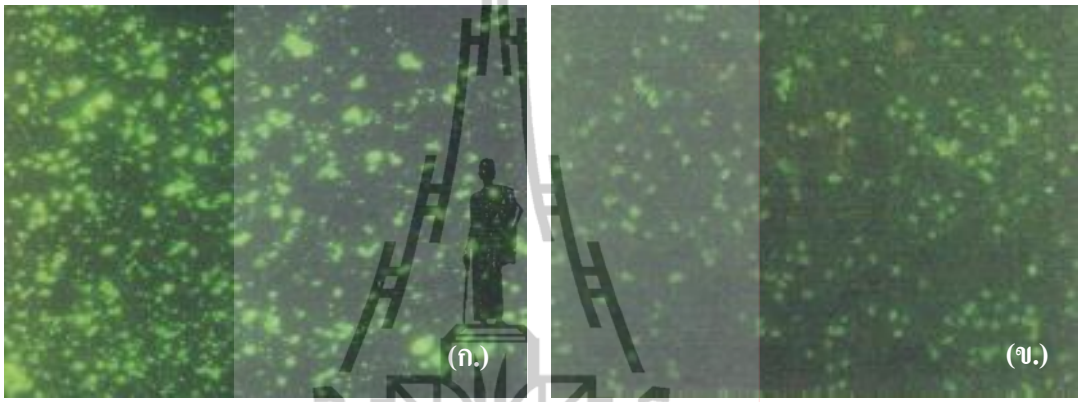
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 10 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อปริมาณเชื้อทั้งสองชนิด

กรรมวิธีการทดลอง		ปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* (Log_{10} MPN เซลล์/กรัมดินแห้ง)				ปริมาณเชื้อ *A. vinelandii* (Log_{10} MPN เซลล์/กรัมดินแห้ง)			
		ระยะกล้า	แตกกอ	ออกดอก	เก็บเกี่ยว	ระยะกล้า	แตกกอ	ออกดอก	เก็บเกี่ยว
CS	ไม่ใส่เชื้อ	2.58±2.4 $^{d\,1}$	2.41±2.4 ^{e}	1.23±0.0 ^{c}	3.07±2.8 ^{b}	2.74±2.9 ^{c}	3.41±3.9 ^{b}	3.56±3.9 ^{c}	3.92±4.5 ^{bc}
	Az. largimobile	4.23±3.4 ^{c}	4.25±2.8 ^{cd}	4.07±2.9 ^{b}	3.25±2.8 ^{b}	3.90±3.9 ^{bc}	3.92±4.5 ^{b}	3.74±3.9 ^{bc}	4.07±4.5 ^{bc}
	A. vinelandii	3.58±0.0 ^{cd}	3.07±4.5 ^{e}	2.74±4.5 ^{bc}	3.07±4.5 ^{b}	2.90±2.9 ^{bc}	3.56±3.9 ^{b}	3.74±3.9 ^{bc}	3.43±3.5 ^{c}
	Az. largimobile+A. vinelandii	4.41±5.5 ^{c}	4.58±4.4 ^{cd}	4.25±5.5 ^{b}	3.41±4.5 ^{b}	3.41±4.5 ^{bc}	3.90±3.9 ^{b}	5.09±5.5 ^{b}	3.56±4.0 ^{c}
SRI	ไม่ใส่เชื้อ	4.09±4.5 ^{c}	4.07±3.8 ^{d}	3.41±3.4 ^{b}	4.09±4.5 ^{b}	3.90±3.9 ^{bc}	3.74±4.5 ^{b}	7.92±4.5 ^{a}	4.92±4.8 ^{b}
	Az. largimobile	9.25±4.5 ^{a}	9.07±4.8 ^{a}	8.41±5.0 ^{a}	7.23±3.8 ^{a}	4.07±7.8 ^{b}	4.07±8.5 ^{b}	4.25±7.8 ^{bc}	4.25±0.0 ^{bc}
	A. vinelandii	3.92±9.4 ^{c}	4.92±8.8 ^{c}	3.90±8.4 ^{b}	4.07±0.0 ^{b}	8.07±4.5 ^{a}	7.74±4.5 ^{a}	7.92±4.5 ^{a}	7.23±4.4 ^{a}
	Az. largimobile+A. vinelandii	7.56±7.9 ^{b}	7.74±7.7 ^{b}	7.23±8.0 ^{a}	6.56±7.0 ^{a}	7.92±7.8 ^{a}	7.74±8.5 ^{a}	7.07±8.0 ^{a}	7.74±7.9 ^{a}
	CV %	13.0	8.7	21.4	18.7	14.6	17.1	15.5	13.4

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

การยืนยันการคงอยู่ของเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ที่ระดับการเจือจางต่ำที่สุดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ พบว่า เกิด การจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody ในกรรมวิธี การทดลองที่มีการใส่เชื้อจะมากกว่าในกรรมวิธี การทดลอง ที่ไม่มีการใส่เชื้อ แสดงว่าปริมาณข องเชื้อที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ คือเชื้อที่ใส่ให้กับข้าว และมีบางส่วนที่เป็นเชื้อที่มีอยู่ใน ธรรมชาติ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody โดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody
(ก.) การเกิดการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent ของเชื้อ *Az. Largimobil*
(ข.) การเกิดการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent ของเชื้อ *A. vinelandii*

4.2.1.2 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ในระดับกระถาง การปลูกข้าวแบบ ประณีต ซึ่งเป็นระบบที่ ควบคุมการให้น้ำแบบสลับแห้งและเปียก ตั้งแต่ระยะย้าย ปลูกจนถึงก่อนออกรวง และปล่อยน้ำท่วมขั งที่ระดับ 2 เซนติเมตร หลังต้นข้าวออกรวงจนถึง 14 วันก่อนเก็บเกี่ยว จึงปล่อยน้ำทิ้ง เอื้ออำนวยให้เชื้อ *Az. Largimobile* และ *A. vinelandii* มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าระบบ ดั้งเดิม อย่างมีนัยสำคัญ และในระบบ ประณีตการใส่เชื้อ *Az. largimobile* ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าการใส่เชื้อ *A. vinelandii* นอกจากนั้นยัง พบว่า ในระยะกล้า และระยะข้าวแตกกอประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อสูงกว่าในระยะสร้างรวงถึงออกดอก (ตารางที่ 11)

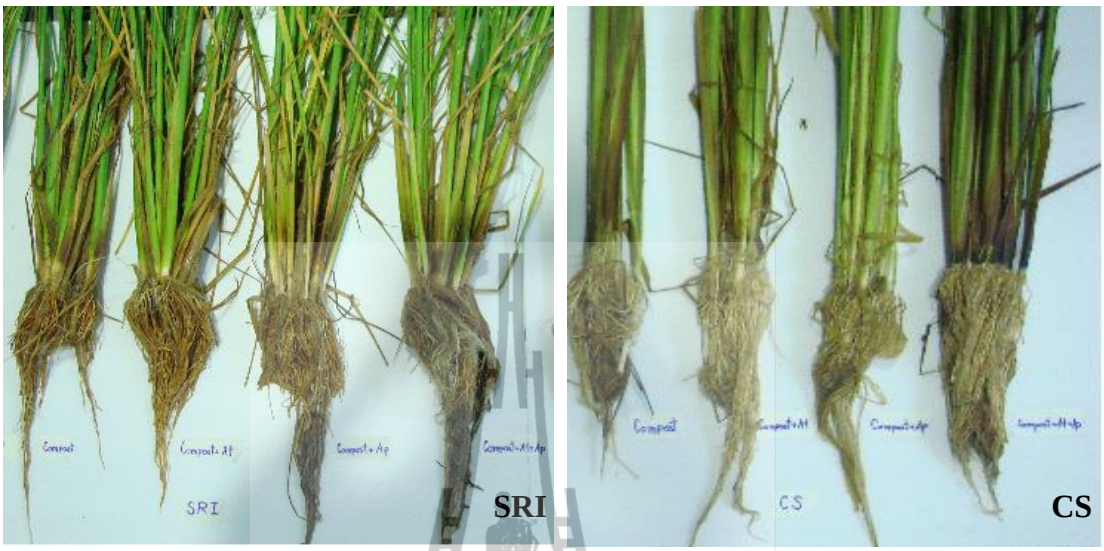
ตารางที่ 11 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

กรรมวิธีการทดลอง		ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน μmole C_2H_4 /วัน/กอ			
		ระยะกล้า	ระยะแตกกอ	ระยะออกดอก	ระยะเก็บเกี่ยว
CS	ไม่ใส่เชื้อ	190±21$^{cd\,1}$	4±0.8^{d}	2±0.4^{d}	8±2^{c}
	Az. largimobile	106±31^{d}	147±53^{c}	29±8^{bcd}	11±^{c}
	A. vinelandii	125±32^{d}	67±12^{cd}	15±^{cd}	9±3^{c}
	Az. largimobile+A. vinelandii	122±18^{d}	222±57^{c}	47±16^{abc}	27±^{bc}
SRI	ไม่ใส่เชื้อ	374±90^{bc}	21±.7^{cd}	10±^{d}	13±4^{c}
	Az. largimobile	622±27^{a}	910±185^{a}	59±9^{ab}	54±2^{a}
	A. vinelandii	465±58^{ab}	450±60^{b}	54±10^{ab}	38±3^{b}
	Az. largimobile+A. vinelandii	417±107^{ab}	938±106^{a}	77±1^{a}	8±4^{c}
	CV %	36.3	30.1	31.3	25.7

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4.2.1.3 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อการเจริญเติบโตของข้าว

จากการเก็บตัวอย่างข้าวที่ระยะกล้า แตกกอ ออกรวง และเก็บเกี่ยว เพื่อทำการวัดการเจริญเติบโตของข้าว พบว่า ความสูงต้น และน้ำหนักแห้งต้นเฉลี่ยทุกระยะการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันระหว่างการใส่เชื้อ และไม่ใส่เชื้อ ส่วนระบบ การปลูก พบว่า ในระยะข้าวแตกกอ ออกรวง และเก็บเกี่ยว ความสูงต้น และน้ำหนักแห้งต้นข้าวในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต สูงกว่าในระบบดั้งเดิม ส่วนความยาวราก ปริมาตรราก และน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างกันระหว่างการใส่เชื้ อ และการไม่ใส่เชื้อทั้งระบบ การปลูกข้าวแบบประณีต และระบบดั้งเดิม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างระบบการปลูก โดยการปลูกในระบบ ประณีต ที่มีการใช้กล้าอายุน้อย (15 วัน) ทำให้รากกล้ากระทบกระเทือนน้อย และปักดำในระยะห่าง (30×30 เซนติเมตร) ทำให้รากสามารถแพร่กระจายได้ดีกว่า ทำให้ความยาวราก ปริมาตรราก และน้ำหนักแห้งรากมากกว่าระบบดั้งเดิม (รูปที่ 6 และ ตารางที่ 12)



รูปที่ 6 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถางต่อการเจริญเติบโตของต้นและรากข้าวที่ระยะแตกกอ

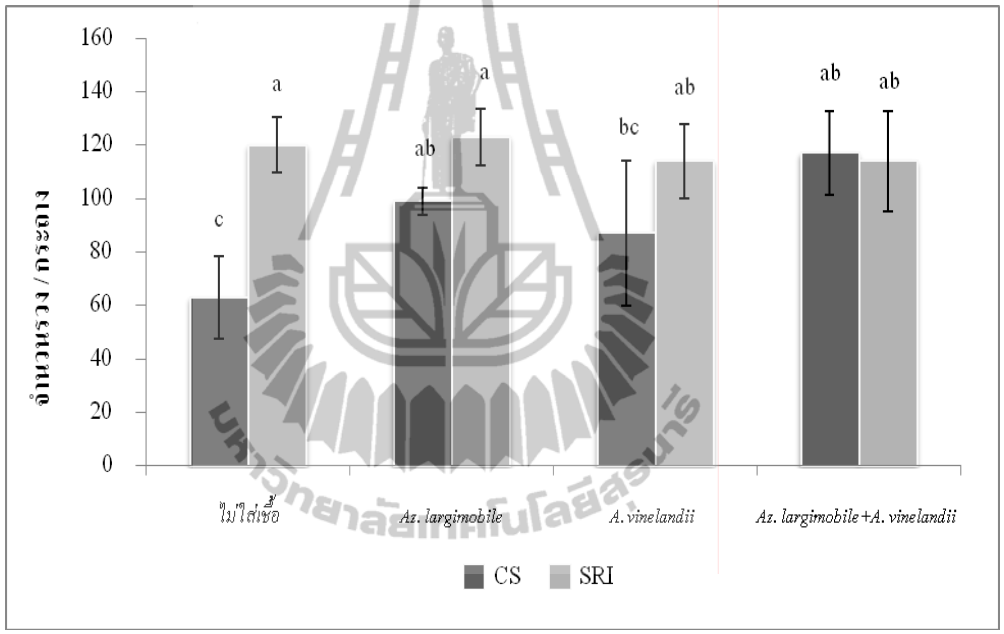
ตารางที่ 12 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อการเจริญเติบโตของข้าว

กรรมวิธีการทดลอง	ความสูงต้น (ซม./ต้น)	น้ำหนักแห้งต้น (กรัม/กระถาง)	ปริมาตรราก (ซม.^{3}/กระถาง)	ความยาวราก (เมตร/เมตร^3)	น้ำหนักแห้งราก (กรัม/กระถาง)
ระบบ					
CS	106±8 ^{a}	176±7 ^{b}	158±6 ^{b}	29±4	16±9 ^{b}
SRI	99±6 ^{b}	347±5 ^{a}	274±0 ^{a}	31±6	74±8 ^{a}
การใส่เชื้อ					
ไม่ใส่เชื้อ	104±2	219±0 ^{b}	158±9	27±4	32±8 ^{b}
Az. largimobile	102±7	276±3 ^{ab}	248±3	30±6	60±4 ^{a}
A. vinelandii	101±7	238±9 ^{b}	203±6	29±6	46±7 ^{ab}
Az. largimobile+ *A. vinelandii*	103±7	313±1 ^{a}	255±4	33±2	50±3 ^{ab}
CV%	7.8	19.3	35.4	16.4	33.6

[1]ค่าเฉลี่ยในปัจจัยเดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4.2.1.4 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถางต่อองค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตของข้าว

องค์ประกอบผลผลิต พบว่า จำนวนรวงต่อ กระถาง มีปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ระหว่างระบบกับการใส่เชื้อ คือ การใส่เชื้อมีผลทำให้ผลของอิทธิพลหลัก (ระบบการปลูก) ที่มีต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนรวงต่อ กระถางเปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่า การใส่เชื้อไม่มีผลต่อจำนวนรวงของข้าวในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต แต่มีผลทำให้จำนวนรวงของข้าวเพิ่มขึ้นในระบบดั้งเดิม (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถางต่อจำนวนรวงต่อกระถางของข้าว

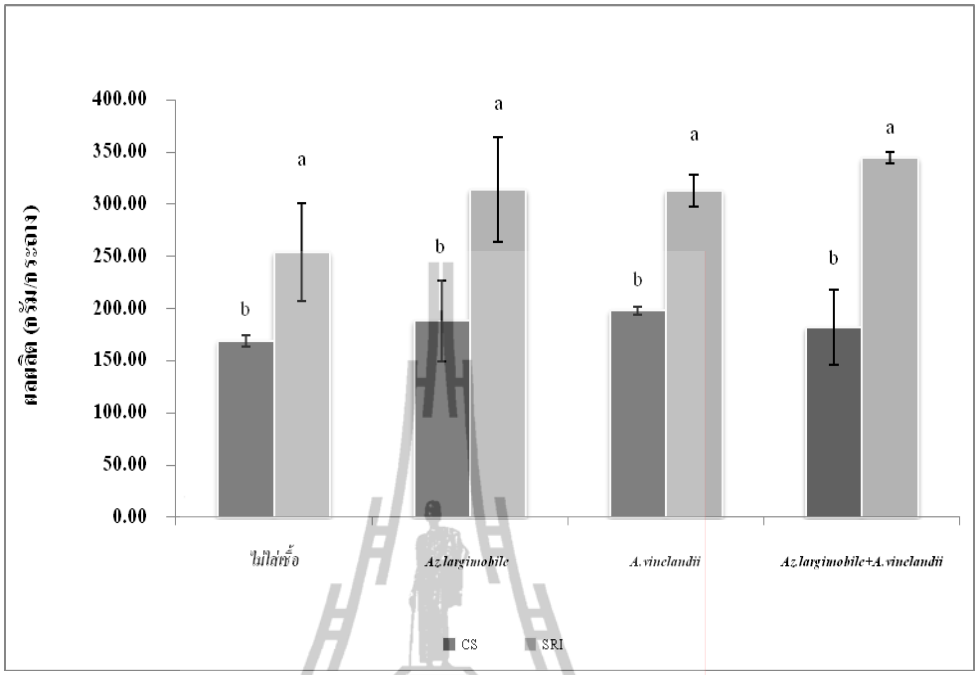
จำนวนเมล็ดต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี และน้ำหนัก 100 เมล็ด ไม่แตกต่างกันระหว่างการใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อทั้งสองระบบ ส่วนระบบการป ลูกข้าว พบว่า ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตส่งเสริมให้เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี สูงกว่าระบบดั้งเดิม ส่วนน้ำหนักข้าว 100 เมล็ด และจำนวนเมล็ดต่อรวง ไม่แตกต่างกันระหว่างระบบการปลูกข้าวประณีต และระบบดั้งเดิม (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถาง ต่อองค์ประกอบผลผลิตของข้าว

กรรมวิธีการทดลอง	เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	จำนวนเมล็ด/รวง
ระบบ			
CS	78±7 [b 1]	2.4±0.8	140±36
SRI	89±4 [a]	2.9±0.2	145±26
การใส่เชื้อ			
ไม่ใส่เชื้อ	84±8	2.3±1.1	158±23
Az. Largimobile	84±5	2.8±0.3	126±26
A. vinelandii	84±9	2.7±0.1	145±44
Az. largimobile+ A. vinelandii	83±11	2.7±0.2	140±25
CV%	8.2	21.1	23.9

[1]ค่าเฉลี่ยในปัจจัยเดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ผลของระบบการปลูกข้าวและการใส่เชื้อต่อผลผลิตของข้าว พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบการปลูกข้าวแ ละการใส่เชื้อ ใน ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตให้ผลผลิต สูงกว่าในระบบดั้งเดิม และในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตการใส่เชื้อมีแนวโน้มจะให้ผลผลิตสูงกว่า การไม่ใส่ เชื้อหรือชุด ควบคุม เล็กน้อย แต่ในระบบดั้งเดิม การใส่เชื้อไม่ทำให้ผลผลิตแตกต่างจากกรรมวิธีการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อหรือชุดควบคุม (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับกระถางต่อผลผลิตของข้าว

4.2.2 การทดลองในระดับแปลง

4.2.2.1 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อปริมาณและการคงอยู่ของเชื้อทั้งสองชนิด

จากการประเมินปริมาณของเชื้อ *Az. largimobile.*และ *A. vinelandii* ด้วยวิธี MPN โดยการวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ของเชื้อดังกล่าว ด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) พบว่า ปริมาณเชื้อที่ประเมินได้มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบการปลูกข้าว และชนิดของเชื้อที่ใส่ โดยการใส่เชื้อในระบบ การปลูกข้าวแบบประณีต มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นจากไม่ใส่อย่างเห็นได้ชัดกว่าระบบดั้งเดิม ปริมาณเชื้อของ *Az. largimobile* สูงที่สุดในกรรมวิธี การทดลองที่ใส่เชื้อ *Az. largimobile* ส่วนปริมาณเชื้อ *A. vinelandii* เนื่องจากเชื้อไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ปริมาณเชื้อของ *A. vinelandii* มีปริมาณไม่แตกต่างกันระหว่างกรรมวิธี การทดลองที่ใส่เชื้อ *A. vinelandii* และกรรมวิธีการทดลองที่ใส่เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *Az. largimobile+A. vinelandii* (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับแปลง ต่อปริมาณและการคงอยู่ของเชื้อทั้งสองชนิด

กรรมวิธีการทดลอง		Log $_{10}$ MPN เซลล์/กรัมดินแห้ง							
		ปริมาณเชื้อ *Az. largimobile*				ปริมาณเชื้อ *A. vinelandii*			
		ระยะกล้า	แตกกอ	ออกดอก	เก็บเกี่ยว	ระยะกล้า	แตกกอ	ออกดอก	เก็บเกี่ยว
CS	ไม่ใส่เชื้อ	4.59±0.6 [de 1]	4.41±0.0 [d]	3.23±0.8 [de]	5.07±0.3 [bc]	3.74±0.5 [bc]	4.41±0.3 [b]	4.56±.1 [bc]	4.92±0.3 [bc]
	Az. largimobile	6.23±0.5 [c]	6.25±0.5 [c]	6.07±0.8 [bc]	5.25±0.3 [bc]	2.90±0.6 [c]	3.56±0.5 [b]	3.74±0.8 [c]	3.43±0.7 [d]
	A. vinelandii	6.25±0.5 [c]	5.07±0.8 [d]	4.74±0.6 [cd]	5.07±.3 [bc]	3.90±0.6 [bc]	3.92±0.0 [b]	3.74±0.6 [c]	6.07±0.9 [b]
	Az. largimobile+A. vinelandii	6.41±0.6 [c]	6.59±.1 [c]	6.59±.2 [b]	6.41±0.3 [ab]	4.07±0.8 [b]	3.90±.3 [b]	5.10±0.6 [b]	3.56±0.3 [d]
SRI	ไม่ใส่เชื้อ	5.43±.0 [cd]	5.07±0.5 [d]	2.74±0.3 [e]	3.43±.2 [d]	3.90±0.6 [bc]	3.74±0.6 [b]	3.92±0.9 [bc]	4.92±0.8 [bc]
	Az. largimobile	9.25±0.3 [a]	9.07±.2 [a]	8.41±0.0 [a]	7.56±0.3 [a]	4.07±0.3 [b]	4.41±0.78 [b]	4.25±0.9 [bc]	4.59±0.3 [cd]
	A. vinelandii	3.90±0.9 [e]	4.92±0.3 [d]	3.90±0.31 [de]	4.07±0.6 [cd]	8.07±0.8 [a]	7.74±0.5 [a]	7.92±0.3 [a]	7.23±0.3 [a]
	Az. largimobile+A. vinelandii	7.56±0.8 [b]	7.74±.7 [b]	7.23±0.5 [ab]	6.90±0.6 [a]	7.92±0.3 [a]	7.74±0.6 [a]	7.41±0.9 [a]	7.74±0.5 [a]
	CV%	10.65	8.24	16.99	13.08	11.85	15.72	13.31	12.02

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

การยืนยันชนิด และการคงอยู่ของเชื้อด้วยเทคนิค Immuno Fluorescent Antibody (FA) จากตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกด้วยวิธีการ MPN พบว่า มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody ในทุกกรรมวิธีการทดลองลักษณะการจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody จะเห็นเป็นสีเขียวเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งการจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody หมายถึง เชื้อที่ตรวจพบในนาข้าวเป็นชนิดเดียวกับที่ใส่ (Inoculate) ลงไป และที่มีการจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody ในแปลงที่ไม่มีการใส่เชื้อ น่าจะเกิดจากเชื้อที่มีอยู่ในแปลงมีความใกล้เคียงกับเชื้อที่ใส่ลงไป แต่ถึงอย่างไรก็ตาม การจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody ในแปลงที่มีการใส่เชื้อมีเปอร์เซ็นต์มากกว่าแปลงที่ไม่ใส่เชื้อ แสดงให้เห็นว่า มีการอยู่รอดของเชื้อที่ใส่ลงไป

รูปที่ 9 การจับกันระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody โดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody
(ก.) การเกิดการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent ของเชื้อ *Az. Largimobile*
(ข.) การเกิดการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent ของเชื้อ *A. vinelandii*

4.2.2.2 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ระบบการปลูกข้าวแบบ ประณีต ทำให้ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อทั้งสองชนิดสูงกว่าระบบ ดั้งเดิม และการใส่เชื้อทำให้ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าการไม่ใส่เชื้อทั้งในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตและระบบดั้งเดิม โดยการเพิ่มขึ้นในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตสูงกว่าในระบบดั้งเดิมโดยเฉพาะในระยะกล้าจนถึงแตกกอ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลง ต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

กรรมวิธีการทดลอง		ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (μmole C_2H_4 /วัน/กอ)			
		ระยะกล้า	แตกกอ	ออกดอก	เก็บเกี่ยว
CS	ไม่ใส่เชื้อ	45±2$^{c\ 1}$	181±55^{c}	205±10^{bc}	224±95^{bc}
	Az. largimobile	179±16^{c}	457±37^{bc}	362±18^{b}	211±5^{bc}
	A. vinelandii	117±21^{c}	316±56^{c}	230±31^{bc}	236±61^{bc}
	Az. largimobile+A. vinelandii	56±5^{c}	264±39^{c}	122±18^{c}	114±13^{c}
SRI	ไม่ใส่เชื้อ	506±74^{b}	345±16^{c}	316±61^{bc}	261±29^{bc}
	Az. largimobile	1,316±99^{a}	934±40^{a}	637±292^{a}	508±78^{ab}
	A. vinelandii	701±2^{ab}	655±23^{ab}	608±226^{a}	558±34^{a}
	Az. largimobile+A. vinelandii	798±33^{ab}	674±18^{ab}	369±79^{b}	478±49^{ab}
	CV %	24.33	18.96	21.30	13.93

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4.2.2.3 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลงทดลอง ต่อการเจริญเติบโตของข้าว

จากการเก็บตัวอย่างข้าวที่ระยะกล้า แตกกอ ออกรวง และเก็บเกี่ยว เพื่อวัดการเจริญเติบโตของข้าว พบว่า ความสูงต้น และน้ำหนักแห้งต้นเฉลี่ยทุกระยะการ เจริญเติบโตไม่แตกต่างกันระหว่างการใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อ ส่วนระบบ การปลูกข้าว พบว่า ในระยะข้าวแตกกอ ออกรวง และเก็บเกี่ยว ความสูงต้น และน้ำหนักแห้งต้นข้าวในระบบ การปลูกข้าวแบบประณีต สูงกว่าในระบบดั้งเดิม (ตารางที่ 16)

ส่วนความยาวราก ปริมาตรราก และน้ำหนักแห้งรา กข้าวไม่แตกต่างกันระหว่างการใส่เชื้อและการไม่ใส่เชื้อ ทั้งระบบ การปลูกข้าวแบบประณีต และระบบ ดั้งเดิม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างระบบการปลูก โดยระบบ การปลูกข้าวแบบประณีต ที่มีการใช้กล้าอายุน้อย (15 วัน) ทำให้รากกล้ากระทบกระเทือนน้อย และปักดำในระยะห่าง ทำให้รากสามารถแพร่กระจายได้ดีกว่า ทำให้ความยาวราก ปริมาตรราก และน้ำหนักแห้งรากมากกว่าระบบ ดั้งเดิม (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 16 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับแปลงทดลอง ต่อการเจริญเติบโตทางลำต้นของข้าวที่ระยะกล้า แตกกอ ออกรวง และเก็บเกี่ยว

กรรมวิธีการทดลอง	ความสูงต้นของข้าว (เซนติเมตร)				น้ำหนักแห้งต้นข้าว (กรัม/ตารางเมตร)			
	ระยกล้า	แตกกอ	ออกรวง	เก็บเกี่ยว	ระยะกล้า	แตกกอ	ออกรวง	เก็บเกี่ยว
ระบบ								
CS	71.1	80.5[b 1]	86.1[b]	95.9[b]	214.4	315.2	363.2[b]	368.0[b]
SRI	66.4	87.7[a]	96.1[a]	102.5[a]	276.8	307.2	585.6[a]	779.2[a]
การใส่เชื้อ								
ไม่ใส่เชื้อ	65.3	81.6	90.8	97.5	203.2	267.2	476.8	488.0
Az. largimobile	70.8	84.0	92.6	101.5	270.4	329.6	470.4	587.2
A. vinelandii	68.3	85.4	90.5	99.8	254.4	315.2	480.0	608.0
Az. largimobile+A. vinelandii	70.6	85.7	90.3	97.9	257.6	332.8	472.0	612.8

[1]ค่าเฉลี่ยในปัจจัยเดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 17 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับแปลงทดลอง ต่อการเจริญเติบโตทางรากของข้าวที่ระยะกล้า แตกกอ ออกรวง และเก็บเกี่ยว

กรรมวิธีการทดลอง	ความยาวราก (เมตร/เมตร^3)				ปริมาตรรากข้าว (เซนติเมตร^3/ตารางเมตร)		น้ำหนักแห้งรากข้าว (กรัม/ตารางเมตร)	
	ระยะกล้า	แตกกอ	ออกรวง	เก็บเกี่ยว	ระยะกล้า	แตกกอ	ระยะกล้า	แตกกอ
ระบบ								
CS	47.8 $^{b\,1}$	40.2 ^{b}	61.3 ^{b}	52.6 ^{b}	108.8 ^{b}	115.2 ^{b}	6.4 ^{b}	6.4 ^{b}
SRI	170.8 ^{a}	182.6 ^{a}	194.6 ^{a}	229.7 ^{a}	440.0 ^{a}	432.0 ^{a}	17.6 ^{a}	19.2 ^{a}
การใส่เชื้อ								
ไม่ใส่เชื้อ	99.6	112.0	136.8	134.2	291.2	336.0	9.6	12.8
Az. largimobile	108.0	106.4	143.2	159.8	228.8	292.8	11.2	12.8
A. vinelandii	134.4	121.6	129.6	129.0	291.2	521.6	14.4	16.0
Az. largimobile+A. vinelandii	95.2	105.6	102.1	141.5	243.2	254.4	9.6	12.8

[1]ค่าเฉลี่ยในปัจจัยเดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4.2.2.4 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลงทดลองต่อองค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตของข้าว

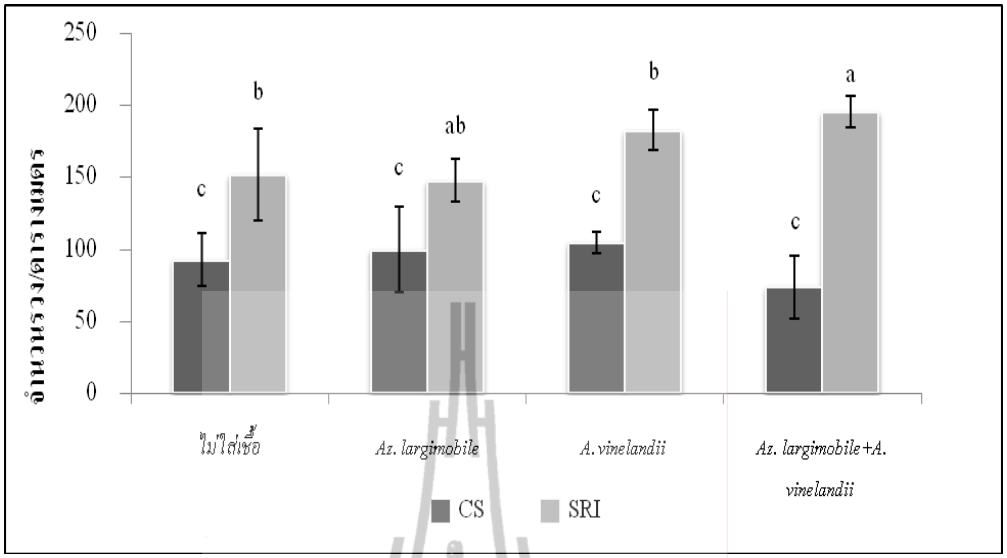
องค์ประกอบผลผลิต ข้าว พบว่า จำนวนเมล็ดต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี เปอร์เซ็นต์เมล็ดเสีย และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด ไม่แตกต่างกันระหว่างการใส่ เชื้อ และไม่ใส่เชื้อทั้งสองระบบ ส่วนระบบการปลูกข้าว พบว่า ระบบการปลูกข้าวแบบ ประณีตส่งเสริมให้องค์ประกอบของผลผลิต ยกเว้นน้ำหนัก 1,000 เมล็ด สูงกว่าระบบดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลงทดลอง ต่อองค์ประกอบผลผลิตของข้าว

กรรมวิธีการทดลอง	จำนวนเมล็ด (เมล็ด/รวง)	เปอร์เซ็นต์ เมล็ดดี	เปอร์เซ็นต์ เมล็ดเสีย	น้ำหนัก 1,000 เมล็ด (กรัม)
ระบบ				
CS	40.3 [b 1]	65.3 [b]	34.5 [b]	25.0
SRI	150.5 [a]	96.7 [a]	3.3 [a]	29.0
การใส่เชื้อ				
ไม่ใส่เชื้อ	91.5	86	14.1	25.0
Az. largimobile	95.5	82	18.0	25.9
A. vinelandii	98.0	79	20.5	25.5
Az. largimobile+A. vinelandii	96.5	77	23.0	31.6

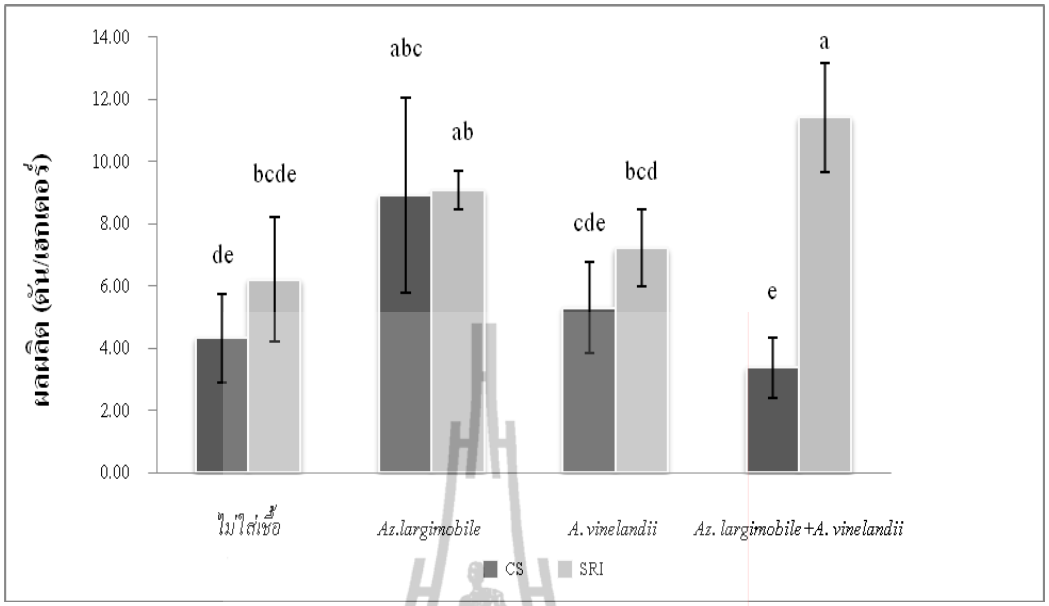
[1]ค่าเฉลี่ยในปัจจัยเดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ส่วนจำนวนรวงต่อตารางเมตรมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบการปลูกข้าวกับการใส่เชื้อ คือ ชนิดของเชื้อที่ใส่มีผลทำให้ ผลของอิทธิพล ของระบบการปลูก ที่มีต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนรวงต่อตารางเมตรเปลี่ยนแปลง ไป โดยการใส่เชื้อ *Az. largimobile+A. vinelandii* และการใส่เชื้อ *A. vinelandii* ในระบบ ประณีต ทำให้จำนวนรวงข้าว เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด แต่ในระบบการปลูกข้าวแบบดั้งเดิม การใส่เชื้อไม่มีผลต่อจำนวนรวงต่อตารางเมตรของข้าว (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลงทดลอง ต่อจำนวนรวงต่อตารางเมตรของข้าว

ส่วนผลผลิตของข้าว พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบการปลูกกับการใส่เชื้อ โดยทั่วไประบบการปลูกข้าวแบบประณีตให้ผลผลิตสูงกว่าการป ลูกข้าวในระบบดั้งเดิม แต่การใส่เชื้อ 2 ชนิด คือ การใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ให้ผลผลิตสูงที่สุดในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ส่วนการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิมการใส่เชื้อ *Az. largimobile* เพียงอย่างเดียวให้ผลผลิตสูงที่สุด (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตในระดับแปลงทดลองต่อผลผลิตของข้าว

การวิเคราะห์ ธาตุอาหารในข้าว พบว่า ไนโตรเจนในเมล็ดข้าว มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบการปลูกกับการใส่เชื้อ โดยทั่วไประบบการปลูกข้าวแบบประณีตให้ ไนโตรเจนในเมล็ดข้าวสูงกว่าการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิม และการใส่เชื้อทำให้ ไนโตรเจนในเมล็ดข้าวสูงกว่าการไม่ใส่เชื้อในทั้งสองระบบ ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต การใส่เชื้อ *Az. largimobile* เพียงอย่างเดียวให้ ไนโตรเจนในเมล็ดข้าวสูงที่สุด และการใส่เชื้อดังกล่าว ยังช่วยให้ไนโตรเจนในเมล็ดข้าวในระบบการปลูกข้าวแบบดั้งเดิมสูงขึ้นด้วย ส่วนไนโตรเจนในต้นข้าวส่วนที่อยู่เหนือดิน พบว่า ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตให้ ไนโตรเจนใ นต้นข้าวสูงกว่าการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิม แต่การใส่เชื้อไม่ทำให้ ไนโตรเจนใ นต้นข้าว สูงกว่าการไม่ใส่เชื้อในทั้งสองระบบ ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในต้นข้าวส่วนที่อยู่เหนือดิน พบว่า ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตสูงกว่าการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิม แต่การใส่เชื้อไม่ทำให้ ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในต้นข้าว สูงกว่าการไม่ใส่เชื้อในทั้งสองระบบ ส่วนฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในเมล็ดข้าวทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับแปลงทดลองต่อปริมาณธาตุอาหาร N, P, K ที่สะสมในต้นข้าวหลังปลูก

กรรมวิธีการทดลอง	ไนโตรเจนทั้งหมด (กิโลกรัม/เฮกเตอร์)		ฟอสฟอรัส (กิโลกรัม/เฮกเตอร์)		โพแทสเซียม (กิโลกรัม/เฮกเตอร์)	
	ต้น	เมล็ด	ต้น	เมล็ด	ต้น	เมล็ด
CS ไม่ใส่เชื้อ	21.0 ^{b1}	29.0 ^{b}	3.1 ^{b}	3.6	59.1 ^{b}	10.7
Az. largimobile	21.5 ^{b}	40.5 ^{ab}	3.0 ^{b}	8.9	65.6 ^{b}	14.2
A. vinelandii	18.8 ^{b}	31.5 ^{b}	2.9 ^{b}	6.1	51.3 ^{b}	11.8
Az. largimobile+A. vinelandii	15.2 ^{b}	24.7 ^{b}	2.3 ^{b}	5.6	38.1 ^{b}	8.8
SRI ไม่ใส่เชื้อ	56.9 ^{ab}	29.1 ^{b}	10.3 ^{a}	6.3	176.8 ^{a}	7.9
Az. largimobile	71.1 ^{a}	50.3 ^{a}	13.6 ^{a}	9.7	215.4 ^{a}	12.5
A. vinelandii	69.6 ^{a}	33.8 ^{ab}	12.3 ^{a}	7.8	213.2 ^{a}	10.6
Az. largimobile+A. vinelandii	91.4 ^{a}	37.9 ^{ab}	16.5 ^{a}	6.1	223.6 ^{a}	7.7
CV%	18.63	11.83	20.8	24.42	14.58	10.93

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกัน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ค่าวิเคราะห์ คุณสมบัติทางเคมีบางประการของ ดินก่อนและหลังปลูก พบว่า ค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ลดลง โดยการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิมลดลงมากกว่าการปลูกข้าวในระบบประณีต แต่การใส่เชื้อไม่มีผลต่อ pH ทั้ง 2 ระบบ ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC) ในทุกกรรมวิธีการทดลองมีค่าสูงขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ค่า อินทรีย วัตถุ (OM) เพิ่มขึ้นจากก่อนทำการทดลอง โดยการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิมจะเพิ่มขึ้นน้อยกว่าการปลูกข้าวในระบบประณีต แต่การใส่เชื้อไม่มีผลต่อ OM ทั้ง 2 ระบบ และปริมาณ NH_4^+ NO_3^- ปริมาณฟอสฟอรัส (P) และปริมาณโพแทสเซียม (K) ในทุกกรรมวิธีการทดลองเพิ่มขึ้นหลังการทดลองทั้ง 2 ระบบ ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน และไม่มีความแตกต่างระหว่างการใส่เชื้อชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 ผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตก่อนและหลังปลูก ต่อคุณสมบัติทางเคมีบางประการของดิน

ค่าวิเคราะห์ดิน		pH	EC (mS/cm)	OM (%)	NH_4^+ (ppm)	NO_3^- (ppm)	P (ppm)	K (ppm)
ก่อนปลูก		7.39	0.09	0.69	1.88	3.755	30.17	89.53
หลังปลูก	CS ไม่ใส่เชื้อ	6.69 [b 1]	0.11	1.84 [b]	11.27	1.25	113.06	134.70
	Az. largimobile	6.26 [b]	0.10	1.68 [b]	12.52	2.51	102.13	128.00
	A. vinelandii	6.45 [b]	0.10	1.76 [b]	5.01	2.51	88.08	139.70
	Az. largimobile+A. vinelandii	6.77 [b]	0.10	1.66 [b]	12.53	5.01	87.67	190.00
	SRI ไม่ใส่เชื้อ	7.05 [a]	0.10	2.17 [a]	12.53	1.25	84.24	118.30
	Az. largimobile	7.09 [a]	0.12	2.43 [a]	8.76	1.25	80.71	171.30
	A. vinelandii	7.17 [a]	0.11	1.91 [ab]	7.50	2.51	86.72	107.30
	Az. largimobile+A. vinelandii	7.13 [a]	0.11	2.44 [a]	15.04	2.51	88.75	162.70
	CV%	6.1	23.0	9.9	29.3	25.6	25.1	32.3

[1]ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิจารณ์การทดลอง

จากการศึกษาผลของการนำเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ไปใช้ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ในระดับกระถาง และแปลงทดลอง ต่อปริมาณ และการคงอยู่ของเชื้อ พบว่าปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างระบบการปลู กข้าวและการใส่เชื้อ โดยในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดกว่าระบบ ดั้งเดิม ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะ ระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ที่มีปริมาณออกซิเจนในดินมากกว่า ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดเป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต และดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2542)

เมื่อทำการวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน พบว่า ระบบการปลูกข้าวแบบ ประณีตทำให้ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อทั้งสองชนิดสูงกว่าระบบ ดั้งเดิม การใส่เชื้อทำให้ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูง กว่าการไม่ใส่เชื้อทั้งในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต และระบบดั้งเดิม โดยการเพิ่มขึ้นในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตจะสูงกว่าในระบบดั้งเดิม โดยเฉพาะในระยะกล้าจนถึงแตกกอที่สูง เนื่องจากเชื้อต้องการออกซิเจนในการการตรึงไนโตรเจน ในระบบนาข้าวแบบดั้งเดิมมีน้ำท่วมขังจึงขาดออกซิเจน ทำให้เชื้อทั้งสองชนิดเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้น้อย (Okon and Labandera-Gonzalez, 1994) ผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณเชื้อที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การเจริญเติบโตของข้าวตลอดจนผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตต่าง ๆ สูงขึ้นเมื่ อเปรียบเทียบกับตำหรับทดลองที่ใส่เฉพาะปุ๋ยอินทรีย์ หรือชุดควบคุม โดยเฉพาะในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต แสดงว่าระบบการปลูกข้า วดังกล่าวเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของข้าวและจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งมีรายงานว่าระบบการปลูกข้าวแบบประณีตนี้มีผลต่อกระบวนการ Nitrification อย่างชัดเจน เนื่องจากการจัดการน้ำ โดยให้มีน้ำน้อยสลับแห้งทำให้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะไปช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียที่ ควบคุมกระบวนการ Nitrification สามารถทำงานได้ดี (Sooksa-nguan, *et al*., 2009) ทำให้การหมุนเวียนของไนโตรเจนมีสูงขึ้น ไนโตรเจนในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชสูงขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของข้าว ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจน คือ ปริมาณการดูดใช้ไนโตรเจนของข้าวในระบบการปลูกข้า วแบบประณีตสูงกว่าในการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิม ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลที่สำคัญที่ทำให้ระบบการปลูกข้าวแบบประณีตให้ผลผลิตของข้าวสูงกว่าในระบบดั้งเดิม

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. วิธีการใส่เชื้อทั้ง 3 วิธี (วิธีแช่เมล็ดข้าวในเชื้อข้ามคืน แช่รากกล้าข้าวข้ามคืน และใส่เชื้อในดินบริเวณรากข้าว) ไม่ทำให้ปริมาณเชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* เพิ่มขึ้นแตกต่างกัน แต่ขึ้นอยู่กับช่วงอายุข้าวที่ทำการตรวจสอบเชื้อ แต่การใส่เชื้อชนิดเดียวและการใส่เชื้อสองชนิดร่วมกัน มีผลทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการไ ม่ใส่ และสามารถ ตรวจสอบยืนยันการคงอยู่ของเชื้อด้วยเทคนิค FA ได้

2. การใส่เชื้อทำให้ความยาวราก น้ำหนักแห้งราก ความสูงต้น และน้ำหนักแห้งต้นของข้าวเพิ่มขึ้นจากกรรมวิธีการทดลองที่ไม่มีการใส่เชื้อ แต่ไม่แตกต่างกันระหว่างวิธีการใส่เชื้อทั้ง 3 วิธี

3. การใส่เชื้อมีปริมาณไนโตรเจนที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ (N-uptake) เพิ่มขึ้นจากกรรมวิธีการทดลองที่ไม่มีการใส่เชื้อ แต่ไม่แตกต่างกันระหว่างวิธีการใส่เชื้อทั้ง 3 วิธี

4. การใช้เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ในนาข้าวระบบ ประณีต ทำให้มีปริมาณของเชื้อทั้ง 2 ชนิด เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้เชื้อในระบบดั้งเดิม และสามารถตรวจสอบยืนยันการคงอยู่ของเชื้อ โดยพบการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ Antibody ในกรรมวิธีการทดลองที่มีการใส่เชื้อมากกว่าในกรรมวิธีการทดลองที่ไม่มีการใส่เชื้อ

5. การปลูกข้าวแบบ ประณีต เอื้ออำนวยให้เชื้อ *Az.largimobile* และ *A. vinelandii* มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าระบบดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ โดยในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต การใส่เชื้อ*Az. largimobile* มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าการใส่เชื้อ *A. vinelandii*

6. การใส่เชื้อ *Az.largimobile* และ *A. vinelandii* ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน สูงกว่าการไม่ใส่เชื้อ และระยะกล้าถึงระยะข้าวแตกกอประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อจะสูงกว่าในระยะสร้างรวงถึงออกดอก หลังจากนั้นจะลดลง โดยในระดับกระถาง ลดลงอย่างรวดเร็ว และน้อยกว่าในระดับแปลงทดลอง

7. ความสูงต้น น้ำหนักแห้งต้น ความยาวรา ก ปริมาตรราก และน้ำหนักแห้งราก เฉลี่ยทุกระยะการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันระหว่างการใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อ แต่ในระบบการปลูกข้าวแบบประณีตสูงกว่าในระบบดั้งเดิม

8. การใส่เชื้อ ทำให้องค์ประกอบผลผลิตสูงกว่า การไม่ใส่เชื้อในระบบ การปลูกข้าวแบบประณีต ส่วนในระบบดั้งเดิมไม่แตกต่างกัน

9. ในระดับกระถาง โดยทั่วไประบบ การปลูกข้าวแบบ ประณีต ให้ผลผลิต สูงกว่าในระบบดั้งเดิม และในระบบการปลูกข้าวแบบ ประณีต การใส่เชื้อมีแนวโน้ม ให้ผลผลิตสูงกว่าการไม่ใส่เชื้อเล็กน้อย แต่ในระบบดั้งเดิมการใส่เชื้อไม่ทำให้ผลผลิตแตกต่างจากกรรมวิธีการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ

10. ในระดับแปลงทดลอง ระบบการปลูกข้าวแบบ ประณีต ให้ผลผลิตสูงกว่าในระบบดั้งเดิม แต่การใส่เชื้อ *Az. largimobile* และ *A. vinelandii* ให้ผลผลิตสูงที่สุดในระบบการปลูกข้าวแบบประณีต ส่วนในระบบดั้งเดิมการใส่เชื้อ *Az. largimobile* เพียงอย่างเดียวให้ผลผลิตสูงที่สุด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. (2554). องค์ความรู้เรื่องข้าว.[ออนไลน์]. ได้จาก : http://www.brrd.in.th.

ธงชัย มาลา. (2546). **ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ** (เทคนิคการผลิตและการใช้ประ โยชน์). คณะเกษตร กำแพงแสน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ. 300 หน้า.

ยงยุทธ โอสถสภา. (2552). **ธาตุอาหารพืช.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ. 529 หน้า.

วัชรินทร์ บุญวัฒน์. (2527). **พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ เล่ม 1**. ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ. หน้า 26-34.

สุมนทิพย์ บุนนาค. (2542). **ไนโตรเจนเมแทบอลิซึม**. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 107 หน้า.

สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. (2552). ข้อมูลสินค้าข้าว.[ออนไลน์]. ได้จาก : http://www.oae.go.th.

สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). ข้อมูลสินค้าข้าว.[ออนไลน์]. ได้จาก : http://www.oae.go.th.

Balandreau, J. (2002). The spermosphere model to select for plant growth promoting rhizobacteria. In: **Kennedy IR, Choudhury ATMA (eds) Biofertilisers in action. Rural Industries Research and Development Corporation. Canberra**. pp 55-63.

Balasubramanian, A., and Kumar, K. (1991). Influence of *Azospirillum* biofertilizer in rice crop. In: **Biological Nitrogen Fixation Assoociated with Rice Production (eds.) S.K. Dutta and C.Sloger, Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi**. pp 265-275.

Baldani, V.L.D., and Dobereiner, J. (1980). Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biol Biochem**. 12:433-439.

Barison, J. (2002). Nutrient uptake, nutrient-use efficiency and productivity in conventional and intensive rice cultivation systems in Madagascar. (Master dissertation, Cornell Cornell University)

Black, C.A. (1965). Method of soil analysis In: **the series Agronomy American Society of Agronomy Inc**, Medison, Wisconsin, USA.

Blouin-Bankhead, S., Ladha, B.B., Lutton, E., Weller, D.M., and McSpadden, G.B.B. (2004). Minimal changes in the rhizobacterial population struvture following root colonization by wild type and transgenic biocontrol strains. **FEMS Microbiol Ecol**.49:307-318.

Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E., and Netlibrary, I. (2007). Biology of the Nitrogen cycle. **Elsevier**. The Netherlands.

Bray, R.H., and Kurtz, L.T. (1945). Determination of total organic and available forms of phosphorus in soil. **Soil Sci**. 59:39-45.

Bremner, J.B. (1996). Nitrogen-total In: Method of soil analysis. Part 3. **Chemical methods-SSSA book series on 5**. Chapter 37: 1085-1121.

Chandra, K., and Singh, K.J. (1996). Effect of *Azotobacter* and phosphate solubilizing micro organism on yield of rice crop. **Environ Ecol** 14:39-41.

Chang, T.T. (1964). Varietal differences in lodging resistance. Intl. Rice Comm. Newsl. Intl. Rice Res. Inst., **Los Banos, Philippines**. **13**(4): 1-11.

Choudhury, A.T.M.A., and Kennedy, I.R. (2004). Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biol Fertil Soils**. 39:219-227.

Costacurta, A., Mazzafera, P., and Rosato, Y.B. (2006). Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is increased in the presence of plant leaf extracts, **FEMS Microbiol Lett**. 159:215-220.

De Datta, S.K. (1981). **Principles and practices of rice production**. Department of Agronomy. The International Rice Research Institute. Los Banos Philippines.pp 618.

Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G., and Penrose, D.M. (1999). **Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria.**Imperial College Press.

Glick, B.R., Penrose, D.M., and Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. **J Theor Biol**. 190:3-68.

Gopalaswamy, G., and Vidhyaekaran, P. (1987). Effects of green leaf manure on soil fertilizer and rice yield. **Inte. Rice Res. Newsletter** 1291:34.

Gopalaswamy, G., Vidhyasekaran P., and Chelliah, S. (1989). Effect of *Azospirillum lipoferum* inoculation and inorganic N on wetland rice. **Oryza**, 26:378-380.

Hesse, P.R. (1971). Total elemental analysis and some trace elements. **A test book of soil chemical analysis**: pp 371-475.

Islam, N., and Bora, L.C. (1998). Biological management of bacterial leaf blight of rice (*Oryza sativa*) with plant growth promoting rhizobacteria. **Indian J Agric Sci**. 68:798-800.

Jeyaraman, S., and Purushothaman, S. (1988). Biofertilizers efficiency in low land rice. Int. Rice Res. Newsletter, 13:24-25.

Jones, J.B. (2001). Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. **CRC Press LLC, Boca Raton, Florida**.

Kannaiyan, S., Govindarajan, K., and Lewin, H.D. (1980). Effect of foliar spray of *Azotobacter chroococcum* on rice crop. **Plant Soil** 56:487-490.

Kannaiyan. S, (1999). Biological fertilizers for rice production. In: **Kannaiyan S (ed) Bioresources technology for sustainable agriculture. Associate Publishing Company, New Delhi**, pp 1-29.

Kannan, T., and Ponmurugan, P. (2010). Response of Paddy (*Oryza sativa* L.) Varieties to *Azospirillum brasilense* Inoculation. **J Phytol** 2(6):8-13.

Kanungo, P.K., Ramakrishnan, B., and Rao, V.R. (1997). Placement effects of organic sources on nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria in flooded rice soils. **Biol Fertil Soils**. 25:103-108.

Ladha, J.K., Baraquio, W.L., and Watanabe, I. (1982). Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with rice. **Can J Microbiol** 28:478-485.

Ladha, J.K., So, R.B., and Watanabe, I. (1987). Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plant grown in different soil. **Plant Soil.** 102:127-129.

Lee, K.K., Alimagno, B., and Yoshida, T. (1977). Field technigue using the acetylene reduction method to assay nitrogenase activity and its association with the rice rhizosphere. **Plant and Soil.** 47, 519-526.

Levesque, R., and SPSS Inc. (2006). SPSS programming and Data Management, 3rd Edition. **SPSS Institute. United State of America**.

Lim, H., Kim, Y., and Kim, S. (1991). *Pseudomonas stutzeri* YLP-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. **Appl. Environ. Microbiol.** 57:510-516.

Lipman, J. G. (1904). Soil bacteriological studies. Further contributions to the physiology and morphology of the members of the *Azotobacter* group. **Report of the New Jersey State Agricultural Experiment Station.** 25: 237-289.

Lowry, O. H., Rosebrogh, N. J., Farr, A. L., and Raldall, R. J. (1951). Protein measurement with

the folin phenol reagent. **The J. Biol. Chemical**. 193: 265-275.

Macario, B.J., Sara, A.F., Elsa, V.Z., Eduardo, P.C., Stephane, B., and Edgar, Z. (2003). Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. **Plant Soil**. 249: 271-277.

Malik, K.A., Mirza, M.S., Hassan, U., Mehnaz, S., Rasul, G., Haurat, J., Bally, R., and Normand, P. (2002). The role of plant-associated beneficial bacteria in rice-wheat cropping system. In: **Kennedy IR, Choudhury ATMA (eds) Biofertilisers in action. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra**, pp 73-83.

Metraux, J.P. (2001). Systemic acquired resistance and Salicylic acid: Current state of knowledge. **Eur J Plant Pathol**. 107: 13-18.

Meunchang, S., Panichsakpatana, S., and Weaver, R. W. (2005). Inoculation of sugar mill by-products compost with N_2-fixing bacteria. **Plant Soil**. 271: 219–225.

Mirza, M.S., Rasul, G., Mehnaz, S., Ladha, J.K., So, R.B., Ali, S., and Malik, K.A. (2000). Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. In: **Ladha JK, Reddy PM (eds) The quest for nitrogen fixation in rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines**, pp 191-204.

Murty, M.G., and Ladha, J.K. (1988). Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant Soil**. 108:281-285.

Nayak, D.N., Ladha, J.K., and Watanabe, I. (1986). The fate of marker *Azospirillum lipoferum* inoculated into rice and its effect on growth, yield and N_2 fixation of plants studied by acetylene reduction, $^{15}N_2$ feeding and ^{15}N dilution techniques. **Biol Fertil Soils** 2:7-14.

Newman, E.I. (1966). A method of estimating the total length of root in a sample. **J. appl Ecol** 3:139-145.

Okon, Y., and Labandera-Gonzalez, C.A. (1994). Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biol. Biochem**. 12:1591-1601.

Patrick, W.H.JR., and Tusneem, M.E. (1972). Nitrogen loss from flooded soil. **Ecology**. 53:735-737.

Pereira, J.A.R., Cavalcante, V.A., Baldani, J.I., and Dobereiner, J. (1988). Firld inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil** 110:269-274.

Piromyou, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkeed, N., and Teaumroong, N. (2011). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community stracture in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. **Eu J Soil Biol** 47:44-54.

Probanaza, A., Lucas Garcia, J.A., Ruiz Palomino, M., Ramos, B., and Gutierrez Manero, F.J. (2002). *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR Bacillus (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). **Appl Soil Ecol**. 20:75-84.

Ramos, B., Lucas Garcia, J.A., Probanza, A., Barrientos, M.L., and Guterrrez Manero, F. J. (2002). Alterations in the rhizobacterial community associated with European alder growth when inoculated with PGPR strain *Bacillus licheniformis*. **Environmental and Experimental Botany**. 49:61-68.

Randriamiharisoa, R., and Uphoff, N. (2002). Factorial trials evaluating the separate and combined effects of SRI practices. In N. Uphoff, et al. (Eds). **Assessment of the system for rice intensification (SRI). Proceeding of an International Conference, Sanya, China, April 1-4, 2002** (pp 40-46). Ithaca,NY: Cornell Internation Institute for Food, Agriculture and Development (CIIFAD).

Rao, V.R., Nayak, D.N., Charyulu, P.B.D., and Adhya, T.K. (1983). Yield response of rice to root inoculation with *Azospirillum*. **J Agric. Sci**. 100:689-691.

Reeves, T.G., Waddington, S.R., Ortiz-Monasterio, I., Banziger, M., and Cassaday, K. (2002). Removing nutritional limits to maize and wheat production: A developing country perspective. In: **Kennedy IR, Choudhury ATMA (eds) Biofertilizers in Action. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra**, pp 11-36.

Reymona, P., and Farmer, E.E. (1998). Jasmonate and Salicylate as global signals for defense gene expression. Curr. Opin. **Plant Biol**. 5: 404-411.

Roper, M.M., and Ladha, J.K. (1995). Biological N_2 fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. **Plant Soil** 174:211-224.

Shrestha, R.K., and Ladha, J.K. (1998). Nitrate in groundwater and integration of nitrogen-catch crop in rice-sweet pepper cropping system. **Soil Sci Soc Am J**. 62:1610-1619.

Singh, M.S., Devi, R.K.T., and Singh, N.I. (1999). Evaluation of methods for *Azotobacter* application

on the yield of rice. **Indian J Hill Farm** 12:22-24.

Somasegaran, P., and Hoben, H.J. (1994). **Handbook for Rhizobia**: Methods in Legume-Rhizobium Technology. University of Hawaii NifTAL Project.Paia. USA. 450 p.

Sooksa-nguan, T., Thies, J.E., Gypmantasiri, P., Boonkerd, N., and Teaumroong, N. (2009). Effect of rice cultivation systems on nitrogen cycling and nitrifying bacterial community structure. **Appl Soil Ecol**. 43:139-149.

Stoop, W. A., Uphoff, N., and Kassam, A. (2002). A review of agricultural research issues raised by the system of rice intensification (SRI) from Madagascar: oppprtunities for improving farming systems for resource-poor farmers. **Agr Syst**. 71: 249-274.

Uphoff, N. (2002). Changes and evolution in SRI methods. In N. Uphoff, et al. (Eds). **Assessment of the system for rice intensification (SRI). Proceeding of an International Conference, Sanya, China, April 1-4, 2002** (pp 8-14). Ithaca,NY: Cornell Internation Institute for Food, Agriculture and Development (CIIFAD).

Uphoff, N. (2002). Opportunities for raising yields by changing management practices: The system of rice intensification in Madagascar In Uphoff, N. ed. 2002. **Agroecologocal Innovations. Earthscan** London. 306 p.

Vincent, J.M. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. **Blackwell Scientific Publ**.,Oxford and Edinburgh.

Winding, A., Binnerup, S.J., and Pritchard, H. (2004). Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. **FEMS Microbiol Ecol**. 47:129-141.

Yanni, Y.G., and EI-Fattah, F.K.A. (1999). Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile delta. **Symbiosis**. 27:319-331.

ภาคผนวก

TABLE A14.6 Number (m) of Rhizobia Estimated by the Plant Infection Count (After Vincent, 1970). C. Tenfold Dilutions (A=10)[1]

Positive Tubes		Dilution Steps (s)			
n=4	n=2	s=10			
40	20	$>7\times10^{8}$			
39					
38	19	6.9			
37		3.4			
36	18	1.8			
35		1.0			
34	17	5.9×10^{7}			
33		3.1	s=8		
32	16	1.7	$>7\times10^{6}$		
31		1.0			
30	15	5.8×10^{6}	6.9		
29		3.1	3.4		
28	14	1.7	1.8		
27		1.0	1.0		
26	13	5.8×10^{5}	5.9×10^{5}		
25		3.1	3.1	s=6	
24	12	1.7	1.7	$>7\times10^{4}$	
23		1.0	1.0		
22	11	5.8×10^{4}	5.8×10^{4}	6.9	
21		3.1	3.1	3.4	
20	10	1.7	1.7	1.8	
19		1.0	1.0	1.0	
18	9	5.8×10^{3}	5.8×10^{3}	5.9×10^{3}	
17		3.1	3.1	3.1	s=4
16	8	1.7	1.7	1.7	$>7\times10^{2}$
15		1.0	1.0	1.0	
14	7	5.8×10^{2}	5.8×10^{2}	5.8×10^{2}	6.9
13		3.1	3.1	3.1	3.4
12	6	1.7	1.7	1.7	1.8
11		1.0	1.0	1.0	1.0
10	5	5.8×10^{1}	5.8×10^{1}	5.8×10^{1}	5.9×10^{1}
9		3.1	3.1	3.1	3.1
8	4	1.7	1.7	1.7	1.7
7		1.0	1.0	1.0	1.0
6	3	5.8×1	5.8×1	5.8×1	5.8×1
5		3.1	3.1	3.1	3.1
4	2	1.7	1.7	1.7	1.7
3		1.0	1.0	1.0	1.0
2	1	0.6	0.6	0.6	0.6
1		<0.6	<0.6	<0.6	<0.6
0	0				
Approximate range		10^{9}	10^{7}	10^{5}	10^{3}
Factor, 95% Fiducial limits [2]		n=2 6.6			
(×, ÷)		n=4 3.8			

[1] Calculated from Table VII_2 of Fisher and Yates (1963).
[2] Cochran; *Biometrics* (1950) 6: 105.

ภาพภาคผนวกที่ 1 ตาราง Number (m) สำหรับคำนวณค่า MPN

ตารางภาคผนวกที่ 1 ระดับการเจือจางต่ำสุดที่ให้ผล ARA เป็นบวก และจำนวนโคโลนีบนอาหารสูตร NFB ที่มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ *Az.gimobile* และ antibody การทดลองที่ 1

กรรมวิธีการทดลอง		ระดับการเจือจาง (จำนวนโคโลนีที่มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ *Az. largimobile* และ antibody)				
		5 DAP	**10 DAP**	**15 DAP**	**30 DAP**	**60 DAP**
วิธีแช่เมล็ดข้าวข้ามคืน	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-2}(46)	10^{-2}(44)	10^{-2}(57)	10^{-3}(61)	10^{-4}(56)
	Az. largimobile	10^{-6}(72)	10^{-5}(92)	10^{-4}(78)	10^{-8}(73)	10^{-4}(78)
	A. vinelandii	10^{-3}(57)	10^{-1}(63)	10^{-1}(53)	10^{-4}(88)	10^{-4}(83)
	A. vinelandii+Az. largimobile	10^{-9}(69)	10^{-10}(63)	10^{-9}(56)	10^{-5}(74)	10^{-5}(54)
วิธีแช่รากกล้าข้ามคืน	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-2}(55)	10^{-1}(47)	10^{-1}(85)	10^{-1}(46)	10^{-1}(53)
	Az. largimobile	10^{-6}(74)	10^{-4}(50)	10^{-4}(76)	10^{-4}(54)	10^{-4}(58)
	A. vinelandii	10^{-1}(55)	10^{-1}(85)	10^{-1}(57)	10^{-4}(87)	10^{-4}(96)
	A. vinelandii+Az. largimobile	10^{-8}(65)	10^{-8}(48)	10^{-7}(65)	10^{-7}(89)	10^{-6}(96)
วิธีใส่เชื้อในดินบริเวณราก	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-1}(76)	10^{-5}(76)	10^{-1}(75)	10^{-3}(58)	10^{-2}(46)
	Az. largimobile	10^{-8}(63)	10^{-6}(62)	10^{-4}(58)	10^{-8}(65)	10^{-6}(67)
	A. vinelandii	10^{-1}(54)	10^{-1}(81)	10^{-1}(56)	10^{-4}(87)	10^{-4}(62)
	A. vinelandii+Az. largimobile	10^{-10}(67)	10^{-8}(65)	10^{-7}(89)	10^{-5}(85)	10^{-4}(59)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ระดับการเจือจางต่ำสุดที่ให้ผล ARA เป็นบวก และจำนวนโคโลนีบนอาหารสูตร LG ที่มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ *A. vinelandii* และ antibody การทดลองที่ 1

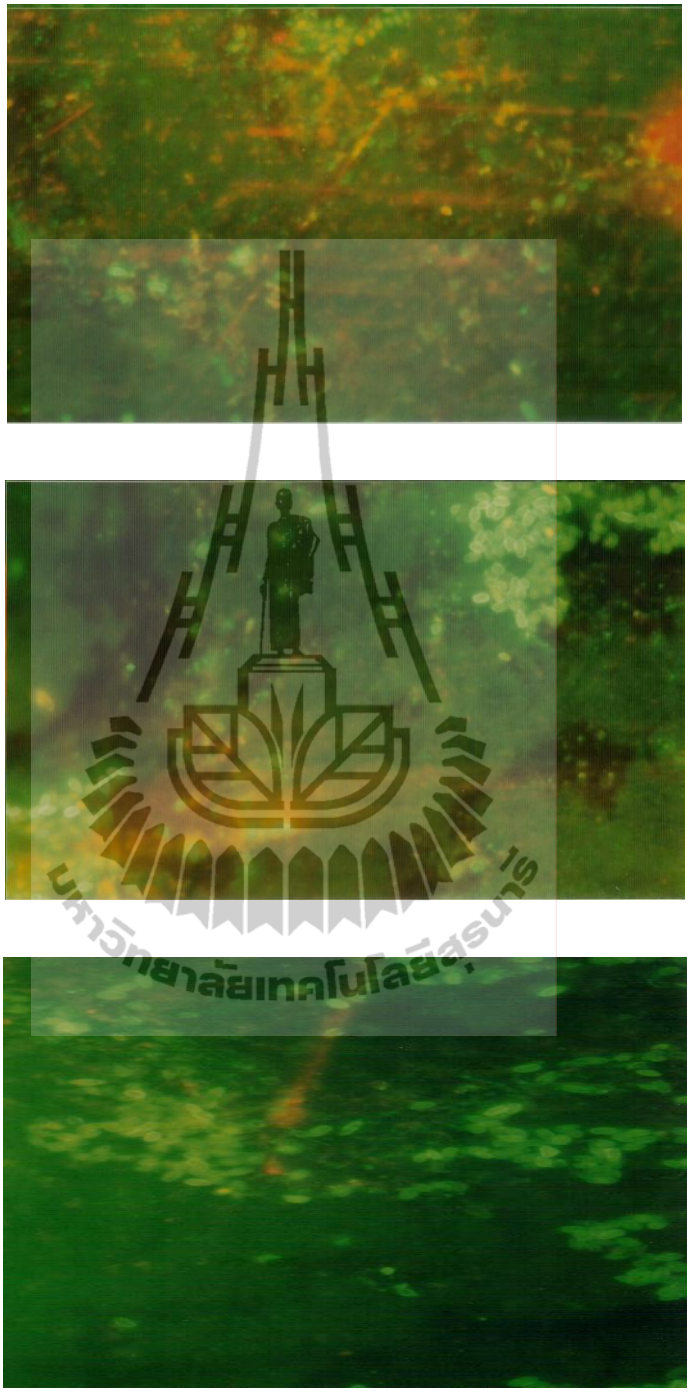
กรรมวิธีการทดลอง		ระดับการเจือจางและจำนวนโคโลนีที่มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ *A. vinelandii* และ antibody				
		5 DAP	10 DAP	15 DAP	30 DAP	60 DAP
วิธีแช่เมล็ดข้าวข้ามคืน	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-2} (42)	10^{-2}(43)	10^{-2}(59)	10^{-3}(62)	10^{-3}(84)
	Az. largimobile	10^{-1}(80)	10^{-1}(83)	10^{-1}(44)	10^{-4}(62)	10^{-4}(72)
	A. vinelandii	10^{-8}(68)	10^{-8}(57)	10^{-4}(63)	10^{-5}(74)	10^{-5}(90)
	A. vinelandii+Az. largimobile	10^{-9}(74)	10^{-8}(81)	10^{-9}(66)	10^{-4}(81)	10^{-4}(47)
วิธีแช่รากกล้าข้ามคืน	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-1}(67)	10^{-4}(66)	10^{-1}(84)	10^{-1}(86)	10^{-1}(56)
	Az. largimobile	10^{-1}(60)	10^{-1}(55)	10^{-1}(78)	10^{-4}(81)	10^{-4}(67)
	A. vinelandii	10^{-8}(64)	10^{-7}(52)	10^{-5}(85)	10^{-5}(47)	10^{-5}(85)
	A. vinelandii+Az. largimobile	10^{-9}(80)	10^{-10}(56)	10^{-8}(55)	10^{-8}(64)	10^{-5}(64)
วิธีใส่เชื้อในดินบริเวณราก	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-1}(78)	10^{-3}(98)	10^{-3}(43)	10^{-3}(42)	10^{-2}(62)
	Az. largimobile	10^{-1}(65)	10^{-1}(66)	10^{-1}(67)	10^{-4}(79)	10^{-4}(49)
	A. vinelandii	10^{-10}(58)	10^{-8}(78)	10^{-5}(97)	10^{-9}(45)	10^{-7}(26)
	A. vinelandii+Az. largimobile	10^{-10}(90)	10^{-9}(91)	10^{-9}(88)	10^{-5}(56)	10^{-6}(95)

ตารางภาคผนวกที่ 3 ระดับการเจือจางต่ำสุดที่ให้ผล ARA เป็นบวก และจำนวนโคโลนี ที่มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อและ antibody การทดลองที่ 2 ในระดับกระถาง

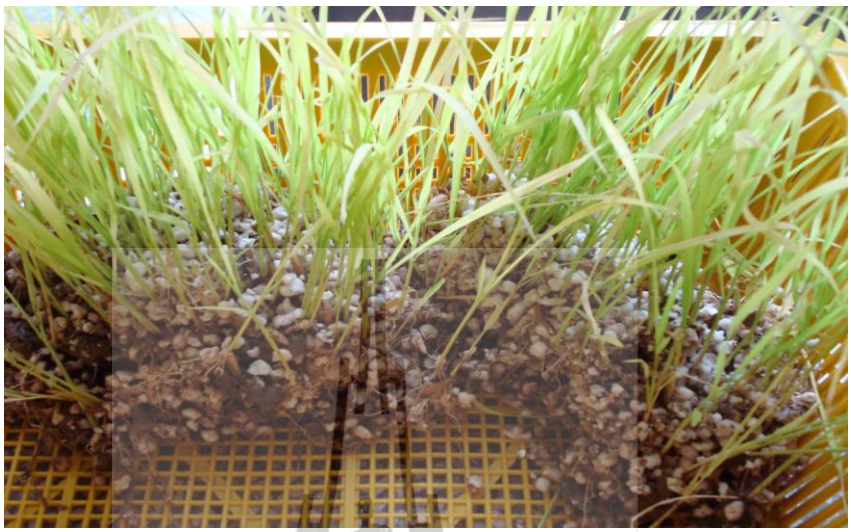
กรรมวิธีการทดลอง		ระดับการเจือจางและจำนวนโคโลนีที่มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ antibody							
		Az.largimobile				*A.vinelandii*			
		ระยะกล้า	แตกกอ	ออกรวง	เก็บเกี่ยว	ระยะกล้า	แตกกอ	ออกรวง	เก็บเกี่ยว
CS	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-3}(13)	10^{-3}(24)	10^{-2}(10)	10^{-4}(31)	10^{-3}(20)	10^{-4}(32)	10^{-4}(12)	10^{-4}(22)
	Az.largimobile	10^{-2}(58)	10^{-5}(57)	10^{-5}(80)	10^{-5}(74)	10^{-4}(32)	10^{-4}(24)	10^{-4}(14)	10^{-4}(50)
	A. vinelandii	10^{-4}(26)	10^{-4}(40)	10^{-2}(38)	10^{-4}(43)	10^{-4}(68)	10^{-5}(84)	10^{-4}(54)	10^{-5}(81)
	Az. largimobile+A. vinelandii	10^{-6}(57)	10^{-5}(50)	10^{-6}(64)	10^{-5}(60)	10^{-5}(65)	10^{-4}(75)	10^{-6}(60)	10^{-4}(58)
SRI	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-5}(20)	10^{-4}(34)	10^{-4}(20)	10^{-5}(30)	10^{-4}(20)	10^{-5}(32)	10^{-5}(34)	10^{-5}(40)
	Az.largimobile	10^{-10}(70)	10^{-9}(64)	10^{-9}(80)	10^{-2}(55)	10^{-5}(25)	10^{-5}(30)	10^{-5}(40)	10^{-5}(30)
	A. vinelandii	10^{-5}(38)	10^{-5}(10)	10^{-5}(50)	10^{-4}(34)	10^{-8}(60)	10^{-9}(58)	10^{-8}(67)	10^{-2}(80)
	Az. largimobile+A. vinelandii	10^{-8}(54)	10^{-8}(67)	10^{-8}(68)	10^{-7}(67)	10^{-9}(50)	10^{-8}(64)	10^{-8}(70)	10^{-8}(60)

ตารางภาคผนวกที่ 4 ระดับการเจือจางต่ำสุดที่ให้ผล ARA เป็นบวก และจำนวนโคโลนี ที่มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ antibody การทดลองที่ 2 ในระดับแปลงทดลอง

กรรมวิธีการทดลอง		ระดับการเจือจางและจำนวนโคโลนีที่มีการจับระหว่าง Antigen ของเชื้อ และ antibody							
		Az.largimobile				*A.vinelandii*			
		ระยะกล้า	แตกกอ	ออกรวง	เก็บเกี่ยว	ระยะกล้า	แตกกอ	ออกรวง	เก็บเกี่ยว
CS	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-6}(24)	10^{-6}(20)	10^{-4}(30)	10^{-6}(25)	10^{-5}(30)	10^{-6}(40)	10^{-6}(24)	10^{-6}(32)
	Az.largimobile	10^{-7}(62)	10^{-8}(50)	10^{-8}(40)	10^{-8}(43)	10^{-4}(28)	10^{-5}(30)	10^{-5}(45)	10^{-6}(35)
	A. vinelandii	10^{-8}(30)	10^{-6}(35)	10^{-6}(20)	10^{-6}(40)	10^{-5}(50)	10^{-6}(74)	10^{-5}(68)	10^{-6}(60)
	Az. largimobile+A. vinelandii	10^{-9}(70)	10^{-8}(50)	10^{-9}(65)	10^{-8}(50)	10^{-6}(50)	10^{-5}(55)	10^{-7}(56)	10^{-6}(60)
SRI	ไม่ใส่เชื้อ	10^{-7}(40)	10^{-7}(30)	10^{-4}(40)	10^{-6}(35)	10^{-5}(40)	10^{-6}(32)	10^{-6}(24)	10^{-6}(50)
	Az.largimobile	10^{-10}(30)	10^{-10}(40)	10^{-9}(34)	10^{-9}(25)	10^{-6}(68)	10^{-6}(50)	10^{-6}(54)	10^{-6}(67)
	A. vinelandii	10^{-6}(30)	10^{-6}(40)	10^{-6}(34)	10^{-5}(25)	10^{-9}(68)	10^{-9}(50)	10^{-9}(54)	10^{-8}(67)
	Az. largimobile+A. vinelandii	10^{-9}(60)	10^{-9}(58)	10^{-9}(64)	10^{-8}(50)	10^{-9}(50)	10^{-10}(56)	10^{-8}(60)	10^{-9}(56)

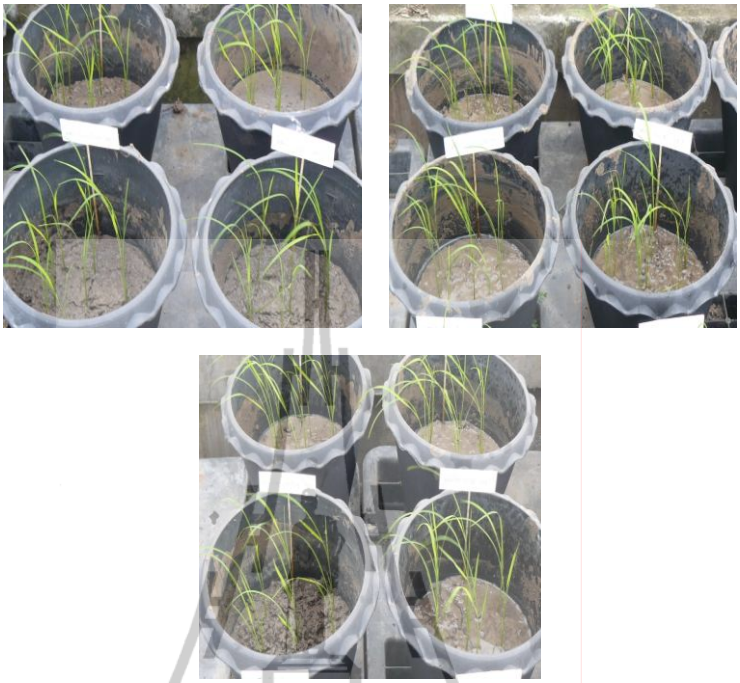


ภาพภาคผนวกที่ 2 การจับระหว่าง Antigen ของเชื้ออื่น และ antibody



ภาพภาคผนวกที่ 3 การเพาะกล้าในการปลูกข้าวในระบบประณีต

ภาพภาคผนวกที่ 4 การเพาะกล้าในการปลูกข้าวในระบบดั้งเดิม



ภาพภาคผนวกที่ 5 การปลูกข้าวทดสอบการใส่เชื้อโดยวิธีการแช่เมล็ด แช่รากกล้า และใส่เชื้อลงไปในดิน

ภาพภาคผนวกที่ 6 การปลูกข้าวในระบบ SRI และระบบ CS ในระดับกระถาง

ภาพภาคผนวกที่ 7 การปลูกข้าวในระบบ SRI และระบบ CS ในระดับแปลงทดลอง

สูตรคำนวณ MPN

$$X = \frac{(m \times d)}{v}$$

เมื่อ m คือ ค่า Number จากตาราง

d คือ ระดับการเจือจางต่ำสุดที่ใช้

v คือ น้ำหนักตัวอย่าง

สูตรคำนวณ ARA

$$\text{Nitrogenase activity} = \frac{\text{Ethylene produced}}{\text{Time (h)} \times \text{no. of hill}}$$

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอาภากร หล่องทองหลาง เกิดเมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2519 ได้เริ่มศึกษาชั้นประถมที่โรงเรียนวัดหนองพลวง และชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 ที่โรงเรียนจักราชวิทยา จังหวัดนครราชสีมา และเมื่อปี พ.ศ.2541 ได้สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และเริ่มทำงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตำแหน่งผู้ช่วยวิจัย ในโครงการ การพัฒนาหัวเชื้อผสม PGPR สำหรับปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพคุณภาพสูง

ปี พ.ศ.2550 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยขณะศึกษาได้รับทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและเป็นผู้ช่วยวิจัยโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาหัวเชื้อผสม PGPR สำหรับปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพคุณภาพสูง และโครงการ การพัฒนาคุณภาพในการ ผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพจาก วัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล

ผลงานวิจัย : ได้เสนอบทความเข้าร่วมในการประชุมวิชาการ The 16th Asian agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology ประจำปี พ.ศ.2553 เรื่อง Effects of Rice Growing Systems and PGPR on Nitrogen Fixation and Rice Yield การประชุมวิชาการ ASA, CSSA, and SSSA 2010 International Annual Meetings ประจำปี พ.ศ. 2553 เรื่อง Nitrogen Fixation Efficiency of *Azospirillum largimobile* in System of Rice Intensification: SRI และการประชุมวิชาการ โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 5 ประจำปี พ.ศ. 2554 เรื่อง Nitrogen Fixation Efficiency of *Azospirillum largimobile* and *Azotobacter vinelandii* in System of Rice Intensification:SRI