http://journal.rmutp.ac.th/

การตรึงอะโซโตแบคเตอร์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศด้วยวัสดุธรรมชาติและผลต่อการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้งในดิน

พิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร[1]* ธิดารัตน์ เทียมมงคล[2] และ นารีรัตน์ คงอนันต์[3]

[1,2,3] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

[1] 450 ถนนสุพรรณบุรี-ชัยนาท ตำบลย่านยาว อำเภอสามชุก จังหวัดสุพรรณบุรี 72130

[2,3] 60 หมู่ 3 ถนนสายเอเชีย ตำบลหันตรา อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000

รับบทความ 20 ตุลาคม 2563 แก้ไขบทความ 7 พฤษภาคม 2564 ตอบรับบทความ 4 มิถุนายน 2564

บทคัดย่อ

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เมื่อมีการปลูกพืชติดต่อกันเป็นระยะเวลายาวนานส่งผลให้ไนโตรเจนในดินลดลงและไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช วิธีการทางชีวภาพในการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในดินวิธีหนึ่ง คือการใช้แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอิสระในอากาศให้อยู่ในดิน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาวัสดุธรรมชาติที่เหมาะสำหรับตรึงอะโซโตแบคเตอร์ เมื่อนำวัสดุธรรมชาติ 10 ชนิดมาตรวจสอบโครงสร้างทางกายภาพ และศึกษาความสามารถของวัสดุธรรมชาติในการตรึงอะโซโตแบคเตอร์ ผลการทดลองพบว่า ก้านผักตบชวาและชานอ้อยสามารถตรึงอะโซโตแบคเตอร์ได้ 2.43×10^8 และ 1.94×10^8 CFU ต่อกรัมวัสดุธรรมชาติตามลำดับ จากนั้นนำอะโซโตแบคเตอร์ที่ถูกตรึงในผักตบชวาและชานอ้อย มาทดสอบการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด คือ 1) ชุดที่ผสมก้านผักตบชวาที่ตรึงอะโซโตแบคเตอร์ 2) ชุดที่ผสมชานอ้อยที่ตรึงอะโซโตแบคเตอร์ 3) ชุดที่ใส่อะโซโตแบคเตอร์อย่างเดียว และ 4) ชุดควบคุม (ดินอย่างเดียว) ผลการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยของความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง จากชุดที่ผสมก้านผักตบชวาที่ตรึงอะโซโตแบคเตอร์ มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งไนโตรเจนทั้งหมดที่ตรวจพบในดินเพิ่มขึ้น 1.4 เท่า ดังนั้น ก้านผักตบชวาจึงเป็นวัสดุธรรมชาติทางเลือกสำหรับตรึงอะโซโตแบคเตอร์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศเพื่อเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

คำสำคัญ : อะโซโตแบคเตอร์; แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศ; ผักตบชวา; การตรึงแบคทีเรีย; ผักกวางตุ้ง

** ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร: +668 0459 2479, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: pitchya.t@rmutsb.ac.th*

Immobilized Free Nitrogen-Fixing Bacteria *Azotobacter* in Natural Materials and Its Effect on Growth of *Brassica Chinensis* in Soil

Pitchya Tangsombatvichit[1]* Thidarat Tiammongkol[2] and Nareerat Konganan[3]

[1,2,3] Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi
[1] 450 Suphanburi-Chainat Road, Yanyaw, Samchook, Suphanburi 72130
[2,3] 60 Moo. 3 Asian Highway, Huntra, Phranakhon Si Ayutthaya 13000

Received 20 October 2020; Revised 7 May 2021; Accepted 4 June 2021

Abstract

Nitrogen is an essential nutrient for plant growth. When the plants have been grown for a long-term, effect to decreased nitrogen in soil and insufficiency of the plant growth. One biological method for increasing the nitrogen content in soil is utilize of free nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter*. Therefore, the objective of this research was to search natural material suitable for *Azotobacter* fixation. The 10 natural materials were observed physical structure and investigated the ability of natural materials for *Azotobacter* fixation. The results showed that water hyacinth and bagasse stalks were fixed the *Azotobacter* of 2.43×10^8 and 1.94×10^8 CFU per gram of each natural material, respectively. After that, the selected fixed *Azotobacter* of water hyacinth and bagasse stalks were studied the growth of *Brassica Chinensis*. This experiment was designed to 4 treatments. The first treatment was mixed of water hyacinth stalks and the *Azotobacter*. Second treatment was mixed of bagasse stalks and the *Azotobacter*. The third treatment was the *Azotobacter* only. The last treatment was soil only. The results indicated that the average of plant growth include height, leaf number, root length, fresh weight and dry weight of the mixed of water hyacinth stalks and the *Azotobacter* had significantly higher growth rates than other treatments. The total nitrogen was also increased 1.4 fold in the soil. All results suggest that the water hyacinth stalk is alternative for the fixation of the free nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter* as induce nitrogen in the soil and plant growth promotion.

Keywords : *Azotobacter*; Free Nitrogen-fixing Bacteria; Water Hyacinth; Immobilized Bacteria; *Brassica Chinensis*

**** Corresponding Author. Tel.: +668 0459 2479, E-mail Address: pitchya.t@rmutsb.ac.th***

1. บทนำ

ธาตุไนโตรเจน เป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช ไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ตั้งแต่การงอกของเมล็ดจนถึงผลิดอกออกผล ถ้าพืชขาดไนโตรเจนจะทำให้ใบเหลืองหรือการเจริญเติบโตของพืชจะหยุดชะงักลง เกษตรกรที่ปลูกพืชจึงหาวิธีแก้ไขและปรับปรุงคุณภาพดิน โดยการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในรูปแบบปุ๋ยเคมี แต่การใช้ปุ๋ยเคมีทำให้เกิดปัญหาดินเสีย ดินเค็ม ทำให้การระบายน้ำในดินไม่ดี [1], [2] นอกจากการใช้ปุ๋ยเคมีแล้ว การเพิ่มไนโตรเจนให้กับดินอีกวิธีหนึ่ง คือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เป็น

จุลินทรีย์ทางการเกษตร จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งสำหรับการทำเกษตรปลอดภัยในปัจจุบัน การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการเกษตรได้รับความสนใจศึกษาค้นคว้า และพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) เพิ่มขึ้น จนสามารถนำไปใช้เพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้ผลดีและเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรในปัจจุบัน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ถูกนำไปใช้ในรูปของปุ๋ยชีวภาพ จุลินทรีย์ที่ช่วยเพิ่มธาตุอาหารพืชในดินได้แก่ กลุ่มจุลินทรีย์แปรสภาพไนโตรเจน ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สะสมอยู่ในดิน ให้อยู่ในรูปของไนโตรเจนที่พืชนำไปใช้ได้ จุลินทรีย์ในดินที่มีบทบาทในการย่อยได้แก่ กลุ่ม *Bacillus Streptomyces Nitrobacter* และ *Nitrosomonas* นอกจากนี้จุลินทรีย์ในดินบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีประโยชน์ต่อพืชได้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามลักษณะความสัมพันธ์กับพืช ได้แก่ 1) แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยกัน (Symbiotic N-fixing Bacteria) เช่น *Rhizobium* sp. กับพืชตระกูลถั่ว 2) แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบอิสระ (N_2-fixing Associated Bacteria) เช่น *Azospirillum* พบในพืชตระกูลหญ้า อ้อย ข้าวฟ่าง และข้าวโพด 3) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดินและบริเวณรากพืช (Free-living N_2-fixing bacteria) เช่น *Azotobacter* และ *Beijerinckia* [3]-[5] มีงานวิจัยรายงานว่า แบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* และ *Azotobacter chroococcum* สามารถผลิตฮอร์โมนออกซินส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเพิ่มผลผลิตโดยผ่านกลไกซับซ้อน ต่างๆ เช่น กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen Fixation) จากชั้นบรรยากาศ เปลี่ยนไนโตรเจนเป็นรูปเป็นประโยชน์ต่อพืช [6] การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในอากาศ *A. chroococcum* มาเติมลงในดินเพื่อสนับสนุนการเจริญของพืช หลังจากเติมเชื้อแบคทีเรีย 4 สัปดาห์ พบว่าขนาดและน้ำหนักของพืชเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีผลต่อการลดความเค็มของดินได้ด้วย [7] แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนในจีนัสต่าง ๆ สามารถคัดแยกได้จากแหล่งดินที่เพาะปลูกพืชผลทางการเกษตร เช่น ไร่อ้อย โดยเฉพาะดินบริเวณรอบรากพืช (Rhizosphere) และคัดแยกได้จากโครงสร้างต่างๆ ของพืช เช่น รากและลาต้นพืช เป็นต้น แบคทีเรียที่คัดแยกได้เหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ แทนการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้ [5], [8] อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีวิตอยู่แบบอิสระในดินนั้นมีปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องที่สำคัญ คือ เมื่อฝนตกทำให้จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในดินดำรงชีวิตอยู่ได้ไม่นาน ถูกชะไปตามน้ำ ในปัจจุบัน จึงมีการศึกษาวิธีการที่จะช่วยให้จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนดำรงชีวิตรอดอยู่ได้ในดิน ด้วยการใช้วัสดุธรรมชาติ เช่น วัชพืช หรือขยะธรรมชาติ มาเป็นตัวกลางให้จุลินทรีย์ยึดเกาะอาศัยอยู่ เพื่อเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดิน ส่งเสริมการเจริญเติบโตและแข็งแรงของต้นพืช [9] แต่ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเรื่องนี้อยู่น้อย วัสดุตรึงเซลล์ที่ถูกนำมาใช้มีทั้งวัสดุจากธรรมชาติและวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่า การใช้วัสดุธรรมชาติ มีข้อดีคือ มีปริมาณสารอาหารในวัสดุที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ที่ตรึง รวมทั้งวัสดุธรรมชาติไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สามารถย่อยสลายได้ตามกลไกทางกายภาพ-เคมีอีกด้วย [10]

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงสนใจนำวัสดุธรรมชาติ คือ ใบธูปฤาษี, ก้านบัวหลวง, กาบกล้วย, ชานอ้อย, กาบมะพร้าว, เปลือกส้ม, ก้านบัวเมซอน, ก้านมะละกอ, ลำต้นผักตบชวา และ ลำต้นพุทธรักษา วัสดุเหล่านี้เป็นวัสดุอินทรีย์เหลือทิ้ง ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อดินและสิ่งแวดล้อม วัสดุตัวกลางชีวภาพเหล่านี้จึงถูกนำมาทดสอบความสามารถในการตรึงอะโซโตแบคเตอร์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศ เริ่มต้นศึกษาโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุธรรมชาติทั้ง 10 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ จากนั้นศึกษาความสามารถในการยึดเกาะวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ โดยตรวจสอบการมีอยู่ของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ ในวัสดุธรรมชาติ และทำการตรึงเซลล์แบคทีเรียกับวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิด จากนั้นตรวจสอบการคงอยู่ของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ ที่ตรึงเซลล์ไว้กับวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วคัดเลือกวัสดุธรรมชาติที่แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ ยึดเกาะได้ดี 2 อันดับ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการตรึงแบคทีเรียอะโซโตแบค

เตอร์ในวัสดุธรรมชาตินั้นต่อการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง รวมทั้งตรวจวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในดิน ก่อนปลูกและหลังปลูกผัก

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเตรียมหัวเชื้ออะโซโตแบคเตอร์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศ การศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Berk'N Free จากนั้น Cross Streak เชื้อแบคทีเรีย บนอาหารวุ้นแข็ง Berk'N Free นำแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่บริสุทธิ์แล้ว จำนวน 1 ลูป มาใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว Berk'N Free 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ คือ การเคลื่อนที่ เอนไซม์คะตะเลส (Catalase Test) เอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase Test) ปฏิกิริยา *IMViC* test ได้แก่ Indole Test, Methyl Red Test, Voges-Proskauer Test และ Citrate Test ดัดแปลงจาก Bisen *et al.* [11] และ Holt *et al.* [12]

2.2 การศึกษาโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุธรรมชาติ

วัสดุธรรมชาติ 10 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ใบธูปฤาษี (Cattail Leaf Stalk), ก้านบัวหลวง (Lotus Stalk), กาบกล้วย (Banana Stalk), ชานอ้อย (Sugarcane Bagasse), กาบมะพร้าว (Coconut Bract), เปลือกส้ม (Orange Peel), ก้านบัวอเมซอน (Texas Mud Baby Stalk), ก้านมะละกอ (Papaya leaf Stalk), ลำต้นผักตบชวา (water Hyacinth Stalk) และ ลำต้นพุทธรักษา (Canna Stalk) มาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นตัดวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดให้มีขนาด 10×10 มิลลิเมตร แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 วัสดุธรรมชาติแต่ละชนิด นำมาศึกษาโครงสร้างภายในโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอกำลังขยาย 40 เท่า อีกส่วนหนึ่ง วัสดุธรรมชาติแต่ละชนิด นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แบ่งชิ้นส่วนของวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดที่อบแห้งแล้ว มาศึกษาโครงสร้างภายในโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอกำลังขยาย 40 เท่า อีกครั้ง จากนั้น วัสดุธรรมชาติที่อบแห้งแล้ว จะถูกเก็บไว้ในโถดูดความชื้น เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ต่อไป [13]-[15]

2.3 การตรึงเซลล์แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์บนวัสดุธรรมชาติ

เริ่มจากนำวัสดุธรรมชาติที่อบแห้งแล้ว มาตรวจนับการมีอยู่ของแบคทีเรียก่อนการตรึงเซลล์ โดยนำชิ้นส่วนของวัสดุธรรมชาติที่อบแห้งแล้ว 10 กรัม มาเจือจางใน 0.85% NaCl จากนั้นเลือกที่ระดับความเจือจาง 10 เท่า ที่ 10^{-2} ถึง 10^{-5} นำมาเกลี่ยลงบนอาหารวุ้นแข็ง Berk'N free บ่มที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ขั้นตอนการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ ทำโดยชั่งวัสดุธรรมชาติปริมาณ 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหารเหลว Berk'N Free ปริมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเทส่วนของสารละลายออกเบาๆจนเกือบหมด เพื่อนำไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะบนวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิด [9]

2.4 การตรวจนับการคงอยู่ของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์หลังการตรึงเซลล์ของบนวัสดุธรรมชาติ

ชั่งชิ้นส่วนของวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในถุงสำหรับตีบดที่มี สารละลายร้อยละ 0.85 NaCl ปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วนำไปตีบดด้วยเครื่อง stomacher ทำการเจือจาง 10 เท่า จนถึงความเจือจาง 10^{-5} เลือกความเจือจางที่ 10^{-3} ถึง 10^{-5} มา spread plate ความเจือจางละ 3 ซ้ำ ลงบนอาหารวุ้นแข็ง Berk'N Free บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนของวัสดุธรรมชาติที่ไม่มีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย นับจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรึงเซลล์บนวัสดุชีวภาพแต่ละชนิด จากนั้น

คัดเลือกวัสดุธรรมชาติที่แบคทีเรียสามารถยึดเกาะได้ดีที่สุด 2 อันดับ เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป [9]

2.5 การทดสอบวัสดุธรรมชาติตรึงเซลล์แบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง

การทดสอบวัสดุธรรมชาติที่มีความสามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้งที่ปลูกลงดิน มีชุดการทดลองดังนี้ คือ ชุดทดลองที่ 1 ชุดควบคุม บรรจุดิน 500 กรัม ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ลงในกระถาง ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ชุดทดลองที่ 2 บรรจุดิน 500 กรัมที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์อิสระ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในกระถาง ชุดทดลองที่ 3 บรรจุดิน 500 กรัมที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับวัสดุธรรมชาติที่สามารถยึดเกาะได้ดีอันดับ 1 ปริมาณ 10 กรัม ลงในกระถาง ชุดทดลองที่ 4 บรรจุดิน 500 กรัมที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับวัสดุธรรมชาติที่สามารถยึดเกาะได้ดีอันดับ 2 ปริมาณ 10 กรัม ลงในกระถาง วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) เริ่มจากการเพาะเม็ดกวางตุ้งในพีทมอส เป็นเวลา 7 วันก่อน แล้วย้ายปลูกต้นกล้าที่มีอายุ ขนาดต้น ความสูง จำนวนใบ ใกล้เคียงกัน มาใส่ในกระถาง กระถางละ 3 ต้น ชุดการทดลองละ 5 กระถาง จำนวน 5 ซ้ำ แล้วรดน้ำ ทุกวัน วัดการเจริญเติบโตของต้นกวางตุ้งในแต่ละชุดการทดลองโดย วัดความสูงต้น และจำนวนใบ ทุก 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ และในสัปดาห์ที่ 5 ทำการวัดความยาวราก น้ำหนักสดทั้งต้น น้ำหนักแห้งทั้งต้น [16]

2.6 การตรวจสอบปริมาณไนโตรเจนในดินก่อนปลูกและหลังปลูกผักกวางตุ้ง

ก่อนปลูกนำดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด หลังการปลูกผักกวางตุ้งแล้วนำดินแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดอีกครั้ง ด้วยวิธี Kjeldahl method ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

2.7 การวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดย วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ในแผนการทดลองแบบ RCBD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p<0.05$)

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์

แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบ ทึบแสง โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าของอาหารเล็กน้อย (รูปที่ 1) เซลล์แบคทีเรีย มีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศ (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุทธวรรณ และคณะ [9] และการระบุบ่งชี้แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ [11], [12]

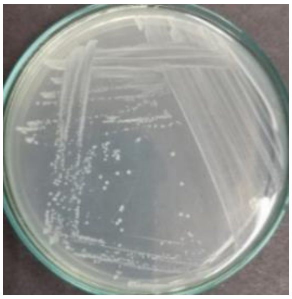
3.2 ผลการศึกษาโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุธรรมชาติ

วัสดุธรรมชาติแต่ละชนิด คือ ใบธูปฤาษี, ก้านบัวหลวง, กาบกล้วย, ชานอ้อย, กาบมะพร้าว, เปลือกส้ม, ก้านบัวอเมซอน, ก้านมะละกอ, ลำต้นผักตบชวา และลำต้นพุทธรักษา เมื่อนำมาศึกษาโครงสร้างทางกายภาพภายใต้กล้องสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า ก่อนอบแห้ง แสดงดังรูปที่ 2 และหลังอบ แสดงดังรูปที่ 3 พบว่า วัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดมีช่องว่างรูพรุนภายในโครงสร้างที่แตกต่างกัน มีพื้นที่ผิวที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 Biochemical characteristics of free nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter*, in triplicate

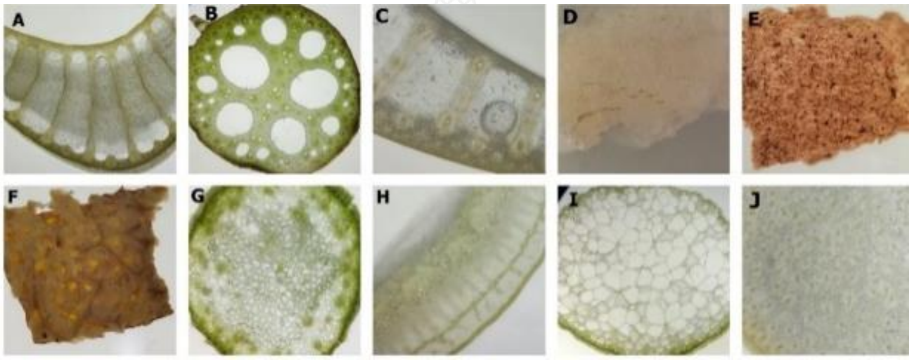
Biochemical test	*Azotobacter* In this experiment	*Azotobacter* Holt *et al.* [12]
Gram’s stain	negative	negative
Indole Production	-	-
Methyl Red	-	-
Voges Proskauer	-	-
Citrate Utilization	+	+

Motility	+	+
Catalase	+	+

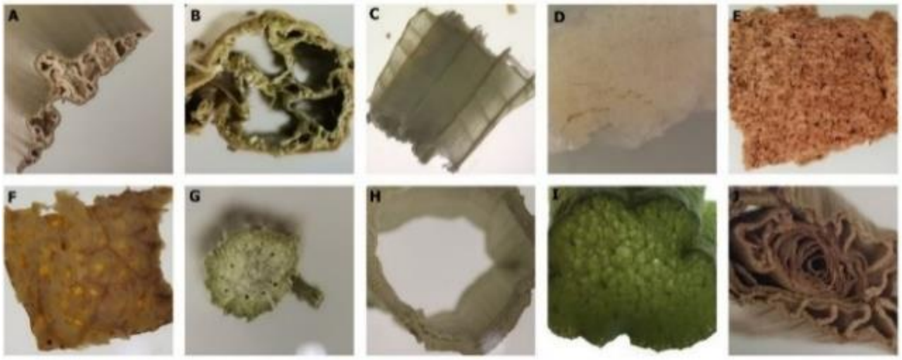


รูปที่ 1 Morphology of free nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter* on Berk N'free agar

มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุพยุงจากขยะธรรมชาติสำหรับตรึงเซลล์จุลินทรีย์ คือ ธูปฤาษี ซังข้าวโพด ชานอ้อย และขี้เลื่อย พบว่าโครงสร้างทางกายภาพของเส้นใยภายในวัสดุธรรมชาติมีแตกต่างกัน มีขนาดช่องว่างและพื้นที่หน้าตัดแตกต่างกัน โดยวัสดุที่จุลินทรีย์แทรกตัวอยู่ภายในโครงสร้างได้ดีที่สุดคือ ชานอ้อย [15] ซึ่งวัสดุตรึงเซลล์ที่ดีควรมีความเป็นรูพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้ในการเกาะยึด ไม่ละลายน้ำ หรือละลายน้ำได้ช้า ทนต่อสภาวะการทำปลอดเชื้อได้ดี ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 121 องศาเซลเซียส และทนต่อความดันสูงได้ ที่สำคัญวัสดุตรึงเซลล์ที่ใช้ต้องไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์จุลินทรีย์ที่มาเกาะยึดและสิ่งแวดล้อมด้วย [17]



รูปที่ 2 Structure of natural materials under stereo microscope (magnification 40X) before dried (A) Cattail leaf stalk, (B) Lotus stalk, (C) Banana stalk, (D) Sugarcane bagasse, (E) Coconut bract, (F) orange peel, (G) Taxas mud baby stalk, (H) Papaya leaf stalk, (I) Water hyacinth stalk, (J) Canna stalk



รูปที่ 3 Structure of natural materials under stereo microscope (magnification 40X) dried (A) Cattail leaf stalk, (B) Lotus stalk, (C) Banana stalk, (D) Sugarcane bagasse, (E) Coconut bract, (F) orange peel, (G) Taxas mud baby stalk, (H) Papaya leaf stalk, (I) Water hyacinth stalk, (J) Canna stalk

3.3 ผลการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์บนวัสดุธรรมชาติ

เมื่อตรวจนับการมีอยู่ของจุลินทรีย์ก่อนตรึงเซลล์แบคทีเรีย และหลังตรึงเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบนวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิด ผลการทดลองพบว่า ก่อนตรึง

เซลล์แบคทีเรีย ไม่พบแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ บนอาหารวุ้นแข็ง Berk N'free (ตารางที่ 2)

3.4 ผลการคงอยู่ของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ หลังการตรึงเซลล์ของบนวัสดุธรรมชาติ

เมื่อตรึงเซลล์แบคทีเรียแล้ว ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ หลังตรึงเซลล์ พบว่า แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ สามารถเกาะยึดบนวัสดุธรรมชาติในช่วง 10^5 - 10^8 CFU/กรัมของวัสดุธรรมชาติ แสดงในตารางที่ 2 วัสดุธรรมชาติที่แบคทีเรียสามารถเกาะยึดไว้ได้ดีที่สุดคือ ลำต้นผักตบชวา โดยตรึงเซลล์แบคทีเรียได้เท่ากับ 2.43 x10^8 CFU/กรัมของวัสดุธรรมชาติ อันดับที่ 2 คือ ชานอ้อย โดยตรึงเซลล์แบคทีเรียได้เท่ากับ 1.86 x10^8 CFU/กรัมของวัสดุธรรมชาติ ในขณะที่วัสดุธรรมชาติที่ไม่สามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียได้ คือ เปลือกส้ม (ตารางที่ 2) เช่นเดียวกับ งานวิจัยของ สุทธวรรณ และคณะ [9] พบว่า ผักตบชวาซึ่งเป็นวัสดุตัวกลางชีวภาพมีคุณสมบัติในการตรึงเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ดีเท่ากับ 5.4 x10^4 CFU/mL โดยงานวิจัยนี้ก้านผักตบชวามีความสามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า งานวิจัยของสุทธวรรณ และคณะ [9] เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางกายภาพของ ผักตบชวาและชานอ้อย ก่อนอบแห้งและหลังอบแห้ง ยังคงมีโครงสร้างไม่แตกต่างกันมาก แสดงว่าพืชทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถทนต่อสภาวะการทำปลอดเชื้อได้ [17]

ตารางที่ 2 The total of *Azotobacter* bacteria immobilized in natural material on Berk's N-free agar

Natural materials	*Azotobacter* immobilized in natural materials (CFU/g)	
	Before	After
Water hyacinth stalk	0	2.43 x10^8
Sugarcane bagasse	0	1.94 x10^8
Canna stalk	0	9.40 x10^7
Lotus stalk	0	8.97 x10^7
Cattail leaf stalk	0	8.90 x10^7
Coconut bract	0	8.13 x10^7
Papaya leaf stalk	0	4.27 x10^7
Taxas mud baby stalk	0	8.33 x10^6
Banana stalk	0	6.60 x10^5
Orange peel	0	ND

ND = Not detected

ตารางที่ 3 The average of growth of *Brassica chinensis* under different treatments at 35 days planting

Treatment	Height (cm)	Leave number	Root length (cm)
T1	3.87±1.66^d	3.73±1.48^d	2.27±0.89^d
T2	5.80±0.18^c	5.00±0.0^c	4.67±0.24^c
T3	9.83±0.20^a	6.60±0.37^a	7.93±0.55^a
T4	6.73±0.28^b	5.49±0.28^b	6.00±0.41^b

Mean value ± standard deviation
^{abcd} different letters in a column are significantly different (p<0.05) according to DMRT
Remark: T1 is Soil (control), T2 is Soil + *Azotobacter*, T3 is Soil + immobilized *Azotobacter* in water hyacinth and T4 is Soil + immobilized *Azotobacter* in sugarcane bagasse

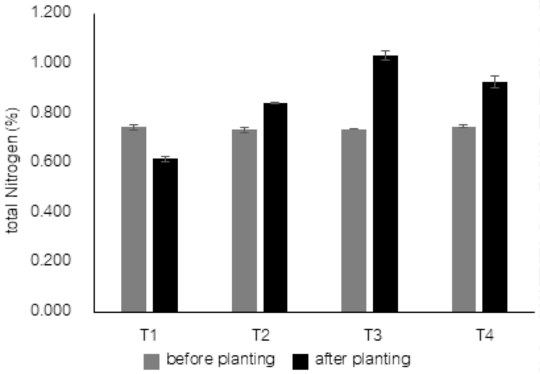
ตารางที่ 4 The average of fresh weight and dry weight of *Brassica chinensis* under different treatments at 35 days planting

Treatment	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
T1	3.14± 0.61^d	0.36± 0.04^d
T2	4.47± 0.44^c	0.57± 0.03^c
T3	14.60± 0.39^a	3.06± 0.30^a
T4	7.68± 0.54^b	1.56± 0.30^b

Mean value ± standard deviation
^{abcd} different letters in a column are significantly different (p<0.05) according to DMRT
Remark: T1 is Soil (control), T2 is Soil + *Azotobacter*, T3 is Soil + immobilized *Azotobacter* in water hyacinth and T4 is Soil + immobilized *Azotobacter* in sugarcane bagasse

3.5 ผลการทดสอบวัสดุธรรมชาติตรึงเซลล์แบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง

เมื่อนำวัสดุธรรมชาติที่มีความสามารถตรึงอะโซโตแบคเตอร์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ดีที่สุด 2 อันดับ คือ ก้านผักตบชวา และ ชานอ้อย มาทดสอบการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้งและทำการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในดินก่อนและหลังปลูกพืช ผลการทดลอง พบว่า ชุดการทดลองที่ 3 คือ ดินผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับก้านผักตบชวาแห้ง มีค่าเฉลี่ยของความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และ น้ำหนักแห้งดีที่สุด เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4) ในขณะที่ ชุดการทดลองที่ 4 คือ ดินผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับชานอ้อยแห้ง มีค่าเฉลี่ยของความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และ น้ำหนักแห้งดี มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดการทดลองที่ 2 คือ ดินผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์อิสระ และชุดควบคุม (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4)



รูปที่ 4 The average of percentage of total nitrogen in soil before and after planting in each of treatment following T1 is Soil (control), T2 is Soil + *Azotobacter*, T3 is Soil + immobilized *Azotobacter* in water hyacinth and T4 is Soil + immobilized *Azotobacter* in sugarcane bagasse, in duplicate

3.6 การตรวจสอบปริมาณไนโตรเจนในดินก่อนปลูกและหลังปลูกผักกวางตุ้ง

เมื่อวัดไนโตรเจนทั้งหมด พบว่า หลังผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับก้านผักตบชวาแห้งในดิน และ แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับชานอ้อยแห้งในดิน พบว่า มีไนโตรเจนทั้งหมดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากกว่า แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์อิสระในดิน (รูปที่ 4) สอดคล้องกับ การศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางชีวภาพคือผักตบชวาผสมดิน ต่อการปลูกผักคะน้า ส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักคะน้า ทำให้ความสูงของต้น ความยาวของใบผักคะน้าเจริญเติบโตได้ดีกว่า ที่เติมเฉพาะแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในดิน [4], [9]

4. สรุป

แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ จัดอยู่ในแบคทีเรียในดินกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ดี สำหรับโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุธรรมชาติพบว่า วัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดมีพื้นที่ผิวภายในและขนาดช่องว่างในการเกาะยึดของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน สามารถเรียงลำดับการตรึงแบคทีเรียจากดีที่สุด ไปจนถึงไม่สามารถตรึงแบคทีเรียได้ ดังนี้คือ ลำต้นผักตบชวา ชานอ้อย ลำต้นพุทธรักษา ก้านบัวหลวง ใบธูปฤาษี กาบมะพร้าว ก้านมะละกอ ก้านบัวอเมซอน กาบกล้วย และเปลือกส้ม ตามลำดับ ดังนั้นลำต้นผักตบชวา และชานอ้อย ที่ตรึงแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ จึงถูกเลือกมาศึกษาการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้งจะเห็นได้ว่า อะโซโตแบคเตอร์ที่เกาะยึดอยู่กับลำต้นผักตบชวามีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ อะโซโตแบคเตอร์ที่เกาะยึดอยู่กับชานอ้อย ซึ่งวัสดุธรรมชาติทั้ง 2 ชนิดนี้ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้งได้ดีกว่า ที่เติมเฉพาะแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์อิสระ ดังนั้นการทดลองนี้เป็นแนวทางที่น่าสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรสำหรับต้นแบบการเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดิน ใช้วัสดุธรรมชาติที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์ ลดต้นทุนการผลิต เพราะการใช้วัสดุธรรมชาติเกาะยึดแบคทีเรียตรึงไนโตนเจนในอากาศช่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดิน

ให้อยู่ได้นาน และไม่ถูกชะออกจากดิน ข้อเสนอแนะในการศึกษาต่อไปควรศึกษาโครงสร้างทางกายภาพภายในของผักตบชวาและชานอ้อยสำหรับอะโซโตแบคเตอร์ยึดเกาะด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน หรือศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีเพื่อสนับสนุนผลการตรึงแบคทีเรียไว้ในโครงสร้างพืชได้ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนวิจัย ประเภททุนวิจัยเพื่อยกระดับปริญญาพิพนธ์สู่งานวิจัย เงินกองทุนส่งเสริมงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2563 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ขอขอบพระคุณ ดร.ชัยบัณฑิต ลือลาภ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ขอบคุณหลักสูตรจุลชีววิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.สุวรรณภูมิ ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ ขอบคุณคุณกานดาวดี โนชัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลองทางจุลชีววิทยา

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Y. Osotspa, A. Wongmaneeroj and Ch. Hongprayoon, *Fertilizers for sustainable agriculture*, 2 nd ed. Bangkok: Kasetsart University Press, 2011.

[2] Y. Osotspa, *Plant nutriention*, 4 th ed. Bangkok: Kasetsart University Press, 2015.

[3] S. Torpee, "Selection of free living aerobic nitrogen fixing bacteria and *Bacillus* sp. to use as inoculums for nitrogen and phosphorus fertilizer in straw medium," Prince of Songkla University Thesis, 2009.

[4] A. Chanchaichaovivat, S. Kirdtabtim and S. Phornphisutthimas, "Application of microorganisms in sustainable agriculture," *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*, vol. 7, no. 2, pp. 398-413, Dec. 2016.

[5] S. Mahdi, H. Mukhtar, H. Bashir and A. Nawaz, "Optimization of growth conditions for Azotobacter species and their use as biofertilizer," *Journal of Bacteriology & Mycology*, vol. 6, no. 5, pp. 274-278, Sep. 2013.

[6] N.A. Thazin, S. Nourmohammadi, E.M. Sunitha and M. Myint, "Isolation of endophyticbacteria from green gram and study on their plant growth promoting activities," *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, vol. 2, no. 3, pp. 525-537, Jul. 2011.

[7] D. Rojas-Tapias, A. Moreno-Galvan, S. Pardo-Diaz, M. Obando, D. Rivera and R. Bonilla, "Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*)," *Applied Soil Ecology*, vol. 61, pp. 264 – 272, Oct. 2012.

[8] A. Beneduzia, F. Moreirab, P. B. Costa, L. K. Vargas, B. B. Lisboa, R. Favreto, J. I. Baldani and L. M. P. Passaglia, "Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil," *Applied Soil Ecology*, vol. 63, pp. 94 – 104, Jan. 2013.

[9] S. Suphan, P. Prajankett and S. Pongsawat, "Using Nitrogen Fixing Bacteria with Biological Supporting Media for Promoting the Plant Growth," *Science and Technology RMUTT Journal*, vol. 6, no. 2, pp. 17-28, Dec. 2016.

[10] J. C. Santos, S. I. Mussatto, G. Dragone, A. Converti and S. S. Siva, "Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate," *Biochemistry Engineer Journal*, vol. 23, no. 1, pp. 1-9, Mar. 2005.

[11] P. S. Bisen, M. Debnath and G. B. K. S. Prasad, Microbes: Concepts and Applications. 1 st ed. Malden: Wiley-Blackwell Publishing, 716 p., 2012.

[12] J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S.T. Williams, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, PA., 2000.

[13] C. Kaewkrajay and P. Sinthunawa, "Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* to Sugarcane Bagasse for Fuel Ethanol Production," *Burapha Science Journal*, vol. 20, no. 2, pp. 96-111, Aug. 2015.

[14] O. Suttinun, W. Kaewtip and E. Luepromchai, *Phenol degradation by mixed culture of Methylobacterium sp.NP3 and Acinetobacter sp. PK1 immobilized on oil palm residues*, Prince of Songkla University, 2010.

[15] W. Soontornchaiboon and R. Pawongrat, "Utilization of natural wastes as supporting materials for cell immobilization and Its application for ethanol production," *Veridian E-Journal, SU*, vol. 6, no. 1, pp. 795-807, Jan.-Apr. 2013.

[16] P. Tangsombatvichit and D. Ketrot, "The quality of vermicompost from sweet potato crop wastes and its impact on growth promotion of *Brassica chinensis*," *RMUTSB Academic Journal*, vol. 6, no. 2, pp. 124-133, Sep. 2018.

[17] Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I. M. Banat, R. Marchant and A. A. Koutinas, "Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review," *Food Microbiology*, vol. 21, no. 4, pp. 377–397, Aug. 2004.