ผลของวัสดุชีวภาพในการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่มีคุณสมบัติตรึงไนโตรเจนในอากาศต่อการเจริญเติบโตของผักกินใบ

Effects of biomaterials for immobilization of free nitrogen fixing bacteria *Azotobacter* on growth of vegetable

ผศ.ดร.พิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร

ดร.ปวีณา สุขสอาด

นางสาวธิดารัตน์ เทียมมงคล

นางสาวนารีรัตน์ คงอนันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

ศูนย์พระนครศรีอยุธยา หันตรา

เงินกองทุนส่งเสริมงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2563

เดือน มีนาคม 2564

ผลของวัสดุชีวภาพในการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่มีคุณสมบัติตรึงไนโตรเจนในอากาศต่อการเจริญเติบโตของผักกินใบ

Effects of biomaterials for immobilization of free nitrogen fixing bacteria *Azotobacter* on growth of vegetable

ผศ.ดร.พิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

ดร.ปวีณา สุขสอาด

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

นางสาวธิดารัตน์ เทียมมงคล

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

นางสาวนารีรัตน์ คงอนันต์

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

ศูนย์พระนครศรีอยุธยา หันตรา

เงินกองทุนส่งเสริมงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2563

เดือน มีนาคม 2564

EFFECTS OF BIOMATERIALS FOR IMMOBILIZATION OF FREE NITROGEN FIXING BACTERIA *AZOTOBACTER* ON GROWTH OF VEGETABLE

Asst.Prof.Dr. Pitchya Tangsombatvichit

Dr. Paweena Suksaard

Miss Thidarat Tiammongkol

Miss Nareerat Konganan

THIS RESEARCH SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF RESEARCH PROJECT

FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SUVARNABHUMI

PHRANAKHON SI AYUTTHAYA HUNTRA CAMPUS

March, 2021

ชื่อเรื่อง ผลของวัสดุชีวภาพในการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่มีคุณสมบัติตรึงไนโตรเจนในอากาศต่อการเจริญเติบโตของผักกินใบ

ผู้วิจัย ผศ.ดร.พิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ดร.ปวีณา สุขสอาด สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
นางสาวธิดารัตน์ เทียมมงคล สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
นางสาวนารีรัตน์ คงอนันต์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

แหล่งทุน เงินกองทุนส่งเสริมงานวิจัย
พ.ศ. 2563

บทคัดย่อ

ไนโตรเจน ธาตุอาหารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช การปลูกพืชเป็นระยะเวลานานส่งผลให้ไนโตรเจนในดินลดลงและไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในดินสามารถใช้แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ช่วยตรึงไนโตรเจนในอากาศให้อยู่ในดิน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาว่าวัสดุธรรมชาติที่เหมาะสำหรับตรึงอะโซโตแบคเตอร์ ขั้นตอนแรกทำการทดลองโดยการนำวัสดุธรรมชาติ 10 ชนิดตรวจสอบความสามารถในการตรึงอะโซโตแบคเตอร์ ผลการทดลองพบว่า ก้านผักตบชวาและชานอ้อยสามารถตรึงอะโซโตแบคเตอร์ได้ $2.43x10^8$ และ $1.94 x10^8$ CFU ต่อกรัมวัสดุธรรมชาติตามลำดับ จากนั้นนำอะโซโตแบคเตอร์ที่ถูกตรึงในวัสดุธรรมชาติมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป โดยในขั้นตอนนี้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด คือ 1) ชุดที่ผสมก้านผักตบชวาที่ตรึงอะโซโตแบคเตอร์ 2) ชุดที่ผสมชานอ้อยที่ตรึงอะโซโตแบคเตอร์ 3) ชุดที่ใส่อะโซโตแบคเตอร์ และ 4) ชุดควบคุม จากนั้นค่าเฉลี่ยของความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ถูกนำไปวิเคราะห์ ผลการทดลองพบว่า ชุดที่ผสมก้านผักตบชวาที่ตรึงอะโซโตแบคเตอร์มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งไนโตรเจนทั้งหมดที่ตรวจพบในดินเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้น ก้านผักตบชวาจึงเป็นวัสดุธรรมชาติทางเลือกสำหรับตรึงอะโซโตแบคเตอร์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศเพื่อเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

คำสำคัญ : อะโซโตแบคเตอร์ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศ ผักตบชวา การตรึงแบคทีเรีย ผักกวางตุ้ง

Title Effects of biomaterials for immobilization of free nitrogen fixing bacteria *Azotobacter* on growth of vegetable

Researchers Asst.Prof.Dr. Pitchya Tangsombatvichit Department of Science
Faculty of Science and Technology
Dr. Paweena Suksaard Department of Science
Faculty of Science and Technology
Miss Thidarat Tiammongkol Department of Science
Faculty of Science and Technology
Miss Nareerat Konganan Department of Science
Faculty of Science and Technology

Source of Fund Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi

Year 2020

Abstract

Nutrient nitrogen is essential for plant growth. Long-term transplantation resulted in decreased soil nitrogen and insufficiency of the plant's needs. From the preliminary study, *Azotobacter* was found that it can be used to fix airborne nitrogen in the soil and increase the nitrogen content in the soil. The aim of this research is to find out whether the natural material suitable for the fixation of the *Azotobacter*. In this research the first step was performed by using 10 natural materials to verify the fixation ability of the *Azotobacter*. The results showed that water hyacinth and bagasse stalks were able to fix the *Azotobacter* at $2.43x10^8$ and $1.94\ x10^8$ CFU per gram of natural material, respectively. Immobilized *Azotobacter* in natural materials were then tested in next step. At this step, the growth of *Brassica Chinensis* was studied. The experiments were divided into 4 treatments. The first treatment was the mixes of water hyacinth stalks and the *Azotobacter*. Second treatment was the mixes of bagasse stalks and the *Azotobacter*. The third treatment contained the *Azotobacter* only. The last treatment was a control. The mean of plant growth include height, leaf number, root length, fresh weight and dry weight were analyzed. The results of the experiment showed that the water hyacinth stalk containing *Azotobacter* had significantly higher growth rates than other treatments. The total nitrogen was also increased

in the soil. Therefore, 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*

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ ได้รับอนุมัติทุนอุดหนุนวิจัย ประเภททุนวิจัยเพื่อยกระดับปริญญาพิพนธ์สู่งานวิจัย จากกองทุนส่งเสริมงานวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ประจำปีงบประมาณ 2563 ขอขอบพระคุณ ดร.ชัยบัณฑิต ลือลาภ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ขอบคุณหลักสูตรจุลชีววิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำการทดลอง ขอบคุณ คุณกานดาวดี โนชัย นักวิทยาศาสตร์ ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำ และดูแลกำกับนักศึกษาในการดำเนินการทดลองจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

พิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร
ปวีณา สุขสอาด
ธิดารัตน์ เทียมมงคล
นารีรัตน์ คงอนันต์

สารบัญ

			หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย			ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ			ข
กิตติกรรมประกาศ			ง
สารบัญ			จ
สารบัญตาราง			ช
สารบัญภาพประกอบ			
บทที่ 1	**บทนำ**		1
	1.1	ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
	1.2	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	1.3	ขอบเขตของการวิจัย	2
	1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**		4
	2.1	ธาตุอาหารของพืช	4
	2.2	ความสำคัญของธาตุไนโตรเจนกับจุลินทรีย์	7
	2.3	จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน	8
	2.4	วัสดุตัวกลางชีวภาพ	11
	2.5	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**		25
	3.1	วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย	25
	3.2	ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	27
	3.3	สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	29
บทที่ 4	**ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย**		30
	4.1	การศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์	30
	4.2	การศึกษาโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุชีวภาพ	31
	4.3	การตรวจนับการมีอยู่ของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ก่อนตรึงและหลังตรึงเซลล์	33
	4.4	การใช้แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงในวัสดุธรรมชาติต่อการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง	34

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัย**	37
	5.1 สรุปผลการวิจัย	37
	5.2 ข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม		39
ภาคผนวก		43
	ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	44
	ข สารเคมี	47
ประวัติคณะผู้วิจัย		50

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	Biochemical characteristics of free nitrogen fixing bacteria *Azotobacter*, in triplicate	31
4.2	The total of Azotobacter bacteria immobilized in natural material (before and after) on Berk's N-free agar	34
4.3	The average of growth of *Brassica chinensis* under different treatments at 35 days planting	35

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	จุลินทรีย์ที่มีภาวะอยู่ร่วมกัน (symbiosis) กับสิ่งมีชีวิต	9
2.2	*Azotobacter* จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่ดารงชีพแบบอิสระ	9
2.3	ลักษณะแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กาลังขยาย 1,000 เท่า	11
2.4	ผักตบชวา	12
2.5	โครงสร้างภายในลำต้นผักตบชวา	12
2.6	บัวอเมซอน	13
2.7	พุทธรักษา	13
2.8	ธูปฤาษี	14
2.9	กล้วย	16
2.10	กาบกล้วย	16
2.11	มะพร้าว	17
2.12	กาบมะพร้าว	17
2.13	อ้อย	18
2.14	ชานอ้อย	18
2.15	บัวหลวง	18
2.16	ก้านบัวหลวง	18
2.17	ส้ม	19
2.18	เปลือกส้ม	19
2.19	มะละกอ	20
4.1	Morphology of free nitrogen fixing bacteria *Azotobacter* on Berk N'free agar in this experiment	30
4.2	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	32

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.3	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	32
4.4	The average of percentage of total nitrogen in soil before and after planting in each of treatment following (T1=treatment 1) Soil (control) (T2=treatment 2) Soil+*Azotobacter* (T3=treatment 3) Soil+immobilized *Azotobacter* in water hyacinth (T4=treatment 4) Soil+immobilized *Azotobacter* in sugarcane bagasse, in duplicate	36

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ธาตุไนโตรเจน เป็นธาตุอาหารชนิดหนึ่งที่เป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชซึ่งธาตุไนโตรเจนนี้มีอยู่ในดินร่วนปลูกที่ยังไม่ผ่านการใช้งาน เมื่อดินถูกใช้ในการปลูกพืชชนิดต่างๆเป็นระยะเวลาหนึ่ง ส่งผลให้ธาตุไนโตรเจนในดินพื้นที่การเกษตรลดลง หรืออาจไม่มีอยู่เลย ธาตุไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ตั้งแต่การงอกของเมล็ดจนผลิดอกออกผล ถ้าพืชขาดธาตุไนโตรเจนจะทำให้ใบเหลืองหรือการเจริญเติบโตของพืชจะหยุดชะงักลง (ยงยุทธ, 2558) เกษตรกรที่ปลูกพืชจึงหาวิธีแก้ไขโดยการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ซึ่งปุ๋ยไนโตรเจนแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ 1) ปุ๋ยไนโตรเจนอินทรีย์ เป็นปุ๋ยที่ได้จากสิ่งมีชีวิต คือ ปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยคอก แต่มีข้อด้อยคือมีปริมาณธาตุไนโตรเจนต่ำ 2) ปุ๋ยไนโตรเจนอนินทรีย์หรือปุ๋ยเคมี ได้แก่ ปุ๋ยแอมโมเนีย ปุ๋ยยูเรีย เป็นต้น ปุ๋ยเคมีเป็นที่นิยมใช้ในการปลูกพืชมากกว่าปุ๋ยหมัก เนื่องจากเกษตรกรเห็นผลผลิตชัดเจนในระยะเวลาที่รวดเร็ว แต่การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนประเภทอนินทรีย์ทำให้เกิดปัญหาดินเสื่อม เช่น ดินมีความเป็นกรดมากขึ้น โครงสร้างของดินเสื่อมสภาพ และเกิดการสะสมของไนเตรตในดินและแล้วยังส่งผลให้เกิดการสะสมของไนเตรตในพืชผัก หากมนุษย์ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของไนเตรตจะส่งผลกระทบให้ร่างกายเกิดความเสี่ยงในการเกิด โรคเมทีโมโกลบินีเมีย ซึ่งจะมีอาการ ภาวะตัวเขียวคล้ำ ปวดศีรษะ หัวใจเต้นเร็ว วิงเวียน เหนื่อยหอบ และคลื่นไส้อาเจียน

จุลินทรีย์ทางการเกษตร เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการทำเกษตรปลอดภัยต่อเกษตรกรผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อระบบการเกษตรแบบยั่งยืนได้รับการพัฒนาจนสามารถนำไปใช้เพิ่มผลผลิตอย่างได้ผลและเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรในปัจจุบัน โดยทั่วไปนิยมนำจุลินทรีย์ไปใช้ในรูปของปุ๋ยชีวภาพ ในการศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรกรรม จุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนที่มีการศึกษาวิจัยกันมาก คือ *Rhizobium* sp., *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. แต่ในการใช้จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนนั้นมีปัจจัยของสภาพอากาศเข้ามาเกี่ยวข้องการเกิดฝนตกเป็นระยะเวลานานทำให้จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนดำรงชีวิตอยู่ได้ไม่นาน ดังนั้นการที่จะช่วยให้จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนดำรงชีวิตรอดอยู่ได้ คือการใช้วัสดุตัวอย่างทางชีวภาพมาเป็นตัวกลางให้จุลินทรีย์ยึด

เกาะอาศัยอยู่ เช่น ผักตบชวา โดยการใช้วัสดุชีวภาพนั้น มีความสามารถในการย่อยสลายทางธรรมชาติได้ ไม่เป็นมลพิษกับสิ่งแวดล้อมและภายในมีช่องว่างในการกักเก็บจุลินทรีย์ ซึ่งนำมาใช้ในการผสมร่วมกับดินมีประโยชน์ในการเพิ่มความคงทนในการยึดเกาะของจุลินทรีย์ในดินและเพิ่มความชื้นของดินได้อีกด้วย

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาวัสดุชีวภาพในการตรึงแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงไนโตรเจนในอากาศ เปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเซลล์แบคทีเรียถูกตรึงบนวัสดุชีวภาพกับเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ถูกตรึงไว้กับวัสดุชีวภาพโดยทดสอบการเจริญเติบโตของผัก วัสดุชีวภาพที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ต้นธูปฤาษี ก้านบัว หยวกกล้วย ชานอ้อย กาบมะพร้าวเปลือกส้ม บัวอเมซอน ก้านมะละกอ ผักตบชวา และต้นพุทธรักษา โดยทำการทดสอบการคงอยู่ของเชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไว้กับวัสดุชีวภาพต่างๆ ภายใต้สมมติฐานว่า 1) วัสดุชีวภาพจากพืชต่างชนิดกันจะมีโครงสร้างเซลล์/สัณฐานที่แตกต่างกัน ดังนั้นความสามารถในการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ไว้มีความแตกต่างกัน จึงทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของวัสดุชีวภาพจากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจำนวนแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์เมื่อผ่านขั้นตอนการตรึงเซลล์กับวัสดุชีวภาพแล้ว 2) เซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงบนวัสดุชีวภาพ มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อการปลูกผักใบได้ดีกว่า เซลล์แบคทีเรียที่ไม่ถูกตรึง หรือไม่ พิจารณาจากการเจริญเติบโตของผัก และปริมาณไนโตรเจนในดิน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวัสดุชีวภาพที่เหมาะสมต่อการตรึงแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงไนโตรเจนในอากาศ

2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเซลล์แบคทีเรียตรึงกับวัสดุชีวภาพกับเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ตรึงกับวัสดุชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของผัก

ขอบเขตของการวิจัย

1. เลือกวัสดุชีวภาพจากธรรมชาติ จำนวน 10 ชนิด นำมาศึกษาโครงสร้างภายนอก และโครงสร้างภายในเซลล์ นำวัสดุชีวภาพแต่ละชนิดมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

2. นำเชื้อแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเฉพาะ N-free media agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา วิเคราะห์ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนด้วยปฏิกิริยาของสาร Nessler's reagent

3. นำเชื้อแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่เพาะเลี้ยงมาตรึงบนวัสดุชีวภาพแต่ละชนิด ทำการนับจำนวนแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ ด้วยวิธีเจือจาง 10 เท่า และ spread plate บนอาหารแข็งสูตรเฉพาะ n-free media agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงบนวัสดุชีวภาพชนิดที่ดีที่สุด ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกินใบ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สร้างกระบวนการทำงานเชิงวิทยาศาสตร์ให้นักศึกษาเพื่อส่งเสริมการผลิตบัณฑิตนักปฏิบัติให้มีคุณภาพและมีความรับผิดชอบต่อสังคม และสภาพแวดล้อม

2. ได้องค์ความรู้การใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่มีประสิทธิภาพ สามารถถ่ายทอดต่อบุคคลที่สนใจเพื่อใช้ในการทำการเกษตรปลูกผักเศรษฐกิจต่อไป

3. ได้สร้างงานวิจัยเพื่อใช้สนับสนุนการเรียนการสอนในรายวิชาเฉพาะในหลักสูตร

4. ผลงานวิจัยที่ได้สามารถนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการในระดับชาติ หรือ เผยแพร่ในรูปแบบสื่อประชาสัมพันธ์ ให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร หรือ เผยแพรในวารสารวิจัย

5. ได้วัสดุชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการตรึงแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ที่มีต้นทุนต่ำ ใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ธาตุอาหารของพืช

สิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศดำรงชีพด้วยอาหารที่สร้างขึ้นเองหรือที่หามาได้ แต่พืชสร้างอาหารเองและเป็นผู้ผลิตปฐมภูมิของระบบนิเวศ เนื่องจากพืชมีคลอโรฟิลล์จึงสังเคราะห์แสงเพื่อเปลี่ยนพลังงานแสงมาเป็นพลังงานในรูปน้ำตาลและใช้น้ำตาลไปสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่จำเป็นต่างๆ เช่น โปรตีน ลิพิด กรดนิวคลีอิค และ วิตามิน อาหารที่พืชต้องการเพื่อดำรงชีวิต คือ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สออกซิเจน และ แร่ธาตุต่างๆ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม (ยงยุทธ, 2558) ซึ่งธาตุเหล่านี้มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืชหากขาดอย่างรุนแรงพืชจะแสดงอาการผิดปกติและจะตายก่อนครบวงจรชีวิตและมีบทบาทโดยตรงต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืชโดยธาตุอาหารของพืชจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

2.1.1 ธาตุอาหารมหัพภาค หมายถึง ธาตุที่พืชต้องการในปริมาณมาก ซึ่งมีในพืชแห้งมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมการปลูกพืชในสารละลายธาตุอาหารต้องใช้ในความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม (ยงยุทธและคณะ, 2554)

ธาตุไนโตรเจน ปกติจะมีอยู่ในอากาศในรูปของก๊าซไนโตรเจนเป็นจำนวนมาก แต่ไนโตรเจนในอากาศในรูปของก๊าซนั้น พืชนำเอาไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ (ยกเว้นพืชตระกูลถั่วที่มีระบบรากพิเศษ สามารถแปรรูปก๊าซไนโตรเจนจากอากาศ เอามาใช้ประโยชน์ได้) ธาตุไนโตรเจนที่พืชทั่วๆ ไปดึงดูดขึ้นมาใช้ประโยชน์ได้นั้น จะต้องอยู่ในรูปของแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และไนเทรตไอออน (NO_3^-) ธาตุไนโตรเจนในดินที่อยู่ในรูปเหล่านี้จะมาจากการสลายตัวของสารอินทรียวัตถุในดิน โดยจุลินทรีย์ในดินจะเป็นผู้ปลดปล่อย ซึ่งธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญมาก ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เมื่อได้รับธาตุนี้จะทำให้ ใบจะมีสีเขียวสด มีความแข็งแรง โตเร็ว และทำให้พืชออกดอกและผลที่สมบูรณ์ หากพืชได้รับไนโตรเจนมากเกินไปอาจเกิดผลเสียได้ เช่น จะทำให้พืชอวบน้ำมาก ต้นอ่อน ล้มง่าย โรคและแมลงเข้ารบกวนทำลายได้ง่าย คุณภาพ ผลิตผลของพืชบางชนิดก็จะเสียไปได้ เมื่อพืชขาดไนโตรเจนจะแคระแกร็น โตช้า ใบเหลือง โดยเฉพาะใบล่างๆ จะแห้ง ร่วงหล่นเร็ว ทำให้แลดูต้นโกร๋น การออกดอกออกผลจะช้า และไม่ค่อยสมบูรณ์

นัก ดินโดยทั่วๆ ไปมักจะมีไนโตรเจนไม่เพียงพอกับความต้องการของพืช ดังนั้นเวลาปลูกพืชจึงควรใส่ปุ๋ยคอก หรือปุ๋ยเคมีเพิ่มเติม

ธาตุฟอสฟอรัส ในดินมีกำเนิดมาจากการสลายตัวผุพังของแร่บางชนิดในดิน การสลายตัวของสารอินทรียวัตถุในดิน ก็จะสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาเป็นประโยชน์ต่อพืชที่ปลูกได้เช่นเดียวกับไนโตรเจน ดังนั้น การใช้ปุ๋ยคอก นอกจากจะได้ธาตุไนโตรเจนแล้ว ก็ยังได้ฟอสฟอรัสอีกด้วย ธาตุฟอสฟอรัสในดินที่จะเป็นประโยชน์ต่อพืชได้ จะต้องอยู่ในรูปของฟอสเฟตไอออน ($H_2PO_4^-$และHPO_4^-) ซึ่งจะต้องละลายอยู่ในน้ำ ในดิน สารประกอบของฟอสฟอรัสในดินมีอยู่เป็นจำนวนมาก แต่ส่วนใหญ่ละลายน้ำยาก ดังนั้นจึงมักจะมีปัญหาเสมอว่าดินถึงแม้จะมีฟอสฟอรัสมากก็จริง แต่พืชก็ยังขาดฟอสฟอรัส นอกจากนั้นแร่ธาตุต่างๆ ในดินที่จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ ดังนั้นปุ๋ยฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้เมื่อ ใส่ลงไปในดินประมาณ 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จะทำปฏิกิริยา กับแร่ธาตุในดินกลายเป็นสารประกอบที่ละลาย น้ำยากไม่อาจเป็นประโยชน์ต่อพืชได้ ดังนั้นการ ใส่ปุ๋ยฟอสเฟตจึงไม่ควรคลุกเคล้าให้เข้ากับดิน เพราะยิ่งจะทำให้ปุ๋ยทำปฏิกิริยากับแร่ธาตุต่างๆ ในดินได้เร็วยิ่งขึ้น แต่ควรจะใส่แบบเป็นจุดหรือโรยเป็นแถบให้ลึกลงไปในดินในบริเวณรากของพืช ปุ๋ยฟอสเฟตนี้ถึงแม้จะอยู่ใกล้ชิดกับรากก็จะไม่ เป็นอันตรายแก่รากแต่อย่างใด ปุ๋ยคอกจะช่วย ป้องกันไม่ให้ปุ๋ยฟอสเฟตทำปฏิกิริยากับแร่ธาตุใน ดินและสูญเสียความเป็นประโยชน์ต่อพืชเร็วจน เกินไป พืชเมื่อขาดฟอสฟอรัสจะมีต้นแคระแกร็น ใบมีสีเขียวคล้ำ ใบล่างๆ จะมีสีม่วงตามบริเวณขอบใบ รากของพืชชะงักการเจริญเติบโต พืชไม่ออกดอกและผล พืชที่ได้รับฟอสฟอรัสอย่างเพียงพอ จะมีระบบรากที่แข็งแรงแพร่กระจายอยู่ในดินอย่างกว้างขวาง สามารถดึงดูดน้ำและธาตุอาหารได้ดี การออกดอกออกผลจะเร็วขึ้น

ธาตุโพแทสเซียมในดินที่พืชนำเอาไปใช้เป็นประโยชน์ได้ มีกำเนิดมาจากการสลายตัวของหินและแร่หลายชนิดในดิน โพแทสเซียมที่อยู่ในรูปอนุมูลบวก หรือโพแทสเซียมไอออน (K^+) เท่านั้น พืชจะดึงดูดไปใช้เป็นประโยชน์ได้ ถ้าธาตุโพแทสเซียมอยู่ในรูปของสารประกอบ ยังไม่แตกตัวออกมาเป็นอนุมูลบวก (K^+) พืชไม่สามารถดึงดูดไปใช้เป็นประโยชน์ได้ อนุมูลโพแทสเซียมในดินอาจจะอยู่ในน้ำ ในดิน หรือยึดอยู่ที่พื้นผิวของอนุภาคดินเหนียวเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นดินที่มีเนื้อดินละเอียด เช่น ดินเหนียว จึงมีปริมาณของธาตุนี้สูงกว่าดินพวกเนื้อหยาบ เช่น ดินทราย และดินร่วนปนทราย ถึงแม้โพแทสเซียมไอออน จะยึดอยู่ที่อนุภาคดินเหนียว รากพืชก็สามารถดึงดูดธาตุนี้ไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายๆ พอกันกับ เมื่อมันละลายอยู่ในน้ำ ในดิน ดังนั้นการใส่ปุ๋ยโพแทสเซียมอาจจะใส่แบบคลุกเคล้าให้เข้ากับดินก่อนปลูกพืชได้หรือจะใส่โดยโรยบนผิว

ดิน แล้วพรวนกลบก็ได้ถ้าปลูกพืชไว้ก่อนแล้วธาตุโพแทสเซียมมีความสำคัญในการสร้างและการ เคลื่อนย้ายอาหารพวกแป้งและน้ำตาลไปเลี้ยง ส่วนที่กำลังเติบโต และส่งไปเก็บไว้เป็นเสบียงที่ หัวหรือที่ลำต้น ดังนั้นพืชพวกอ้อย มะพร้าว และ มัน จึงต้องการโพแทสเซียมสูงมาก ถ้าขาดโพแทสเซียมหัวจะลีบ มะพร้าวไม่มันและอ้อยก็ไม่ค่อยมีน้ำตาล พืชที่ขาดโพแทสเซียมมักเหี่ยวง่าย แคระแกร็น ใบล่างเหลือง และเกิดเป็นรอยไหม้ตามขอบใบ พืชที่ปลูกในดินทรายที่เป็นกรดรุนแรงมักจะมีปัญหาขาดโพแทสเซียม แต่ถ้าปลูกในดินเหนียวมักจะมีโพแทสเซียมพอเพียง และไม่ค่อยมีปัญหาที่จะต้องใส่ปุ๋ยนี้เท่าใดนัก (สรสิทธิ์, 2537)

2.1.2 ธาตุอาหารจุลภาค หมายถึงธาตุอาหารเสริมเป็นธาตุที่พืชใช้ปริมาณน้อย โดยทั่วไปจะมีในพืชแห้งต่ำกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เช่น โบรอน คลอรีน ทองแดงและเหล็ก

โบรอน เป็นธาตุกึ่งโลหะ ซึ่งรากพืชดูดโบรอนรูปที่เป็นประโยชน์โดยใช้โปรตีนขนส่งที่เยื่อหุ้มเซลล์แล้วลำเลียงไปยังส่วนต่างๆเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ดินทั่วไปมีโบรอนทั้งหมด 20 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ส่วนมากไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช สำหรับส่วนที่เป็นประโยชน์ ซึ่งสกัดได้ด้วยน้ำร้อนมีเพียง 0.4 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่านั้น บทบาทของโบรอนมีความยุ่งยากกว่าจุลธาตุอื่นๆ เนื่องจากธาตุนี้ไม่ได้เป็นองค์ประกอบในเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ บทบาทที่เด่นของโบรอนมี 2 ด้าน คือ การสังเคราะห์และสร้างความสมบูรณ์ให้ผนังเซลล์ อันเนื่องจากการสังเคราะห์สารเชิงซ้อนโบรอน-เพ็กทิน และบูรณภาพของเยื่ออันเกี่ยวข้องกับการรวมตัวของโบรอนกับไกลโคลิพิดในเยื่อ ในพืชแต่ละชนิดมีระดับวิกฤตขาดแคลนแตกต่างกันไป สาเหตุที่ทำให้พืชแต่ละชนิดต้องการโบรอนแตกต่างกัน คือ ปริมาณที่ใช้ในผนังเซลล์ นอกจากนี้พืชที่เจริญในที่ซึ่งมีความเข้มของแสงสูงจะไวต่อการขาดธาตุจึงต้องการในปริมาณที่มากกว่าปกติ การขาดโบรอนของพืชจะเริ่มปรากฏใน 2 ส่วน คือ ปลายยอดอ่อนและโฟลเอ็มของลำต้น ความผิดปรกติของยอดอ่อนคือ ยอดเล็ก ใบอ่อนผิดรูปทรง ต่อมาปลายยอดตาย มีการแตกต่างตาข้างเป็นกิ่งขนาดเล็กค่อนข้างแน่น ลำต้นแตกโฟลเอ็มตาย ใบร่วงก่อนกำหนด หากมีดอกและผลก็ร่วงเช่นเดียวกัน (ยงยุทธ, 2558)

คลอรีน ธาตุนี้มักพบในรูปของสารประกอบของเกลือโซเดียม โดยเฉพาะดินเค็มในแถบชายฝั่งทะเล และดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยคลอรีนมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ช่วยให้พืชแก่เร็วขึ้น พืชที่ขาดธาตุคลอรีนจะมีใบซีด เหี่ยว และใบมีสีเหลือง แต่พืชได้รับคลอรีนมากขอบใบจะแห้ง ใบเหลืองก่อนกำหนด

ทองแดง เป็นจุลธาตุที่มีความสำคัญต่อพืชธาตุหนึ่งถึงแม้พืชจะดูดดึงไปใช้น้อยกว่าพวกเหล็ก แมงกานีส และสังกะสี ก็ตามเนื่องจากธาตุทองแดงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการสร้างคลอโรฟิลล์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ เอนไซม์หลายชนิด เช่นกรดแอคคอบิก (ascorbic acid) และออกซิเดส (oxidase) มีบทบาทสำคัญต่อขบวนการเปลี่ยนแปลงของรากแร่ที่มีธาตุทองแดงเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ได้แก่ เท็นโอไรต์ (tenorite : CuO) มาลาไคต์ [malachite : $Cu_2 (OH)_2 CO_3$)] และบอไนส์ (bornite : Cu_5FeS_4) เป็นต้น เนื่องจากทองแดงจะถูกตรึงให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืชอาการของพืชที่ขาดธาตุทองแดง ใบม้วนงอยอดของต้นพืชจะมีอาการยอดแห้งตาย พืชจะไม่ออกรวง ถ้าออกรวงเมล็ดจะลีบพืชจะไม่เจริญเติบโตเต็มที่ ถ้าปริมาณธาตุทองแดงในดินมีปริมาณมากจนเป็นพิษพืชจะแคระแกรน การแตกกิ่งจะน้อยลง และทำให้เกิด คลอโรซีส หน้าที่ของธาตุทองแดง มีผลต่อพืชโดยอ้อมในการสร้างส่วนที่เป็นสีเขียวของพืชช่วยเพิ่มโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ และป้องกันการถูกทำลายส่วนสีเขียว นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบของน้ำย่อยในพืชซึ่งมีผลต่อการปรุงอาหารยังผลต่อการเจริญเติบโตและการติดดอกออกผล ธาตุทองแดงยังช่วยให้ต้นพืชสามารถดูดเอาธาตุเหล็กที่อยู่ในดินนำมาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

2.2 ความสำคัญของธาตุไนโตรเจนกับจุลินทรีย์

ธาตุไนโตรเจน ปกติจะมีอยู่ในอากาศในรูปของก๊าซไนโตรเจนเป็นจำนวนมาก แต่ไนโตรเจนในอากาศในรูปของก๊าซนั้น พืชนำเอาไปใช้ประโยชน์อะไรไม่ได้ (ยกเว้นพืชตระกูลถั่วเท่านั้น ที่มีระบบรากพิเศษ สามารถแปรรูปก๊าซไนโตรเจนจากอากาศ เอามาใช้ประโยชน์ได้) ธาตุไนโตรเจนที่พืชทั่วๆ ไปดึงดูดขึ้นมาใช้ประโยชน์ได้นั้น จะต้องอยู่ในรูปของ แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และไนเทรตไอออน (NO_3^-) ธาตุไนโตรเจนในดินที่อยู่ในรูปเหล่านี้จะมาจากการสลายตัวของสารอินทรียวัตถุในดิน โดยจุลินทรีย์ในดินจะเป็นผู้ปลดปล่อย ซึ่งธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญมาก ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของพืช เมื่อได้รับธาตุนี้จะทำให้ ใบจะมีสีเขียวสด มีความแข็งแรง โตเร็ว และทำให้พืชออกดอกและผลที่สมบูรณ์ เมื่อพืชได้รับไนโตรเจนมากๆ บางครั้งก็ทำให้เกิดผลเสียได้เหมือนกัน เช่น จะทำให้พืชอวบน้ำมาก ต้นอ่อนล้มง่าย โรคและแมลงเข้ารบกวนทำลายได้ง่าย คุณภาพ ผลิตผลของพืชบางชนิดก็จะเสียไปได้ เมื่อพืชขาดไนโตรเจนจะแคระแกร็น โตช้า ใบเหลือง โดยเฉพาะใบล่างๆ จะแห้ง ร่วงหล่นเร็ว ทำให้แลดูต้นโกร๋น การ

ออกดอกออกผลจะช้า และไม่ค่อยสมบูรณ์นัก ดินโดยทั่วๆ ไปมักจะมีไนโตรเจนไม่เพียงพอกับความต้องการของพืช ดังนั้นเวลาปลูกพืชจึงควรใส่ปุ๋ยคอก หรือปุ๋ยเคมี เพิ่มเติมให้กับพืชด้วย

จุลินทรีย์เพิ่มธาตุอาหารพืชในดิน ได้แก่ กลุ่มจุลินทรีย์แปรสภาพไนโตรเจน ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ย่อยสลายอินทรีย์ไนโตรเจนที่สะสมอยู่ในดิน ให้อยู่ในรูปของไนโตรเจนที่พืชนำไปใช้ได้ จุลินทรีย์ในดินที่มีบทบาทในการย่อยได้แก่ กลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus*) อาโธรแบคเตอร์ (*Arthrobacter*) สเตรปโตมัยสีท (*Streptomyces*) แอสเพอร์จิลลัส (*Aspergillus*) ไนโตรแบคเตอร์ (*Nitrobacter*) และไนโตรโซโมแนส (*Nitrosomonas*) นอกจากนี้จุลินทรีย์ในดินบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีประโยชน์ต่อพืชได้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้แบ่งย่อยได้เป็น 3 ประเภทตามลักษณะความสัมพันธ์กับพืช ได้แก่ 1) แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis N_2-fixing bacteria) เช่น เชื้อไรโซเบียม (*Rhizobium* sp.) กับพืชตระกูลถั่ว 2) แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบอิสระ (N_2-fixing associated bacteria)เช่น อะโซสไปริลลัม *(Azospirillum*) พบในพืชตระกูลหญ้า อ้อย ข้าวฟ่าง และข้าวโพด 3) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดินและบริเวณรากพืช (Free-living N_2-fixing bacteria) เช่น อะโซโตแบคเตอร์ (*Azotobacter*) และ ไบเจอริงเคีย (*Beijerinckia*) นอกจากแบคทีเรียแล้วสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) จัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถสังเคราะห์แสงและตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่น้ำขัง เช่น ในนาข้าว (สัลวา, 2552)

2.3 จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน

2.3.1 ชนิดของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน

จุลินทรีย์ในธรรมชาติบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนที่มีมากมายในอากาศ แต่พืชมาสามารถใช้ได้ต้องกลายให้เป็นแอมโมเนียมโดยกระบวนการที่เรียกว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจน แอมโมเนียมที่เกิดขึ้นเป็นไนโตรเจนพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย การตรึงไนโตรเจนโดนจุลินทรีย์มี 2 กลุ่ม คือ

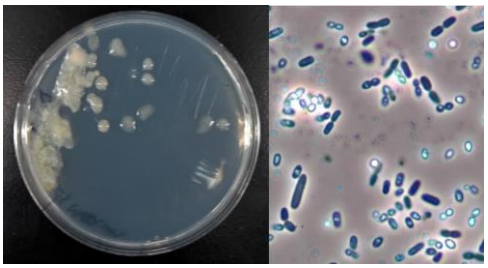
1. จุลินทรีย์ที่มีภาวะอยู่ร่วมกัน (symbiosis) กับสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่มีภาวะอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นมีอยู่หลายชนิด เช่น ไรโซเบียม (*Rhizobium*) (ภาพที่ 2.1) เป็นแบคทีเรียทำให้เกิดปมรากถั่ว แฟรงเกีย (*Frankia*) เป็นแบคทีเรียประเภทแอคติโนมัยซีส ที่อยู่ร่วมกับพืชที่มิใช่พืชตระกูลถั่วบางชนิด อะนา-บีนา (*Anabaena*) เป็นแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับแหนแดง แต่ก็สามารถดำรงชีวิตอย่างอิสระและ

ตรึงไนโตรเจนได้ด้วย สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนและถูกนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพเป็นเวลานานแล้ว ได้แก่ ไรโซเบียม (ยงยุทธ, 2554)

ภาพที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่มีภาวะอยู่ร่วมกัน (symbiosis) กับสิ่งมีชีวิต

ที่มา: https://thai.alibaba.com/product-detail/inoculum-rhizobium-131673580.html

2. จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระ บทบาทในการตรึงไนโตรเจนโดยไม่ต้องอาศัยอยู่ในปมรากพืชตระกูลอาจดำรงชีวิตอย่างอิสระในดินหรืออาศัยอยู่กับรากพืชที่ไม่จำเป็นต้องพืชตระกูลถั่วเท่านั้น เช่น *Azotobacter*, *Azopirillum* และ *Burkholderia* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียต้องการอากาศในการตรึงไนโตรเจนและนอกจากนี้ยังมีกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้แล้ว ยังสามารถสังเคราะห์แสงได้อีกด้วย เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 *Azotobacter* จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระ

ที่มา: www.fertnz.co.nz/azotobacter

2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

1. ออกซิเจน แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีพ แต่ระดับออกซิเจนจะมีผลต่อการตรึง ไนโตรเจน ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นเมื่อออกซิเจนลดลง และจะหยุดชะงักเมื่อมี ออกซิเจนสูง ทั้งนี้เพราะก๊าซออกซิเจนจะไปยับยั้งการตรึงไนโตรเจน

2. ความเป็นกรด -ด่าง ดินที่เป็นกรดจะมีผลต่อปริมาณและการกระจายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ที่ 6.8 – 7.8 เล็กน้อยหรือช่วงเป็นกลางถึงด่าง

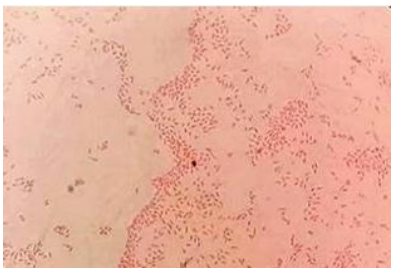
3. แร่ธาตุอาหาร โดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต้องการธาตุอาหารต่าง ๆ เพื่อการเจริญเติบโต และการตรึงไนโตรเจน ธาตุอาหารที่มีบทบาท สำคัญนอกเหนือจาก Ca และ P แล้ว Mo, Co และ Fe นอกจากนี้แล้วการมีไนโตรเจนอนินทรีย์ ในดินปริมาณมาก จะยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสและลดการตรึงไนโตรเจนด้วย

4. อุณหภูมิ สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญเติบโตได้น้อยมากเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 24 องศาเซลเซียส และไม่มีการเจริญเติบโตเลย เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส ในขณะเดียวกันอุณหภูมิสูงกว่า 42 องศาเซลเซียส จะไม่มีการตรึงไนโตรเจน ส่วนการเจริญเติบโตจะน้อยมาก (อรุณี, 2556 และธงชัย, 2456)

การตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนที่มีการแปรสภาพไนโตรเจนจากรูปที่พืชที่ไม่สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากมีแก๊สไนโตรเจนในอากาศประมาณ 78 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตร แต่พืชไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ จึงต้องมีการแปรสภาพให้อยู่ในรูปอื่น การตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์นำแก๊สไนโตรเจนจากอากาศมาสร้างอินทรีย์ไนโตรเจน กระบวนการนี้จะต้องมีเอนไซม์ ซึ่งก็คือเอนไซม์ไนโตรจีเนส (สัลวา, 2552) กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยเอนไซม์ไนโทรจีเนส ในขั้นแรก Fe-protein จะถูกรีดิวส์โดย ferredoxin จากนั้น Fe-protein จะมาจับกับ ATP และไปรีดิวส์ molybdenum-iron protein แล้วให้อิเล็กตรอนกับ N_2 จนเกิดเป็น HN=NH แล้วจะถูกรีดิวส์ไปเรื่อยๆ โดยรับอิเล็กตรอนจาก ferredoxin จนกลายเป็น $2NH_3$ ดังนั้นการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต (Biological N_2 fixation) จึงเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญมากในการเพิ่มไนโตรเจนให้แก่ดิน

2.3.3 แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์

Azotobacter เป็นแบคทีเรียที่มีรูปเซลล์แบบกลมรี สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ จัดอยู่ในวงศ์ *Azotobacteraceae* แบคทีเรียในวงศ์นี้มีอยู่ 2 สกุล คือ *Azotobacter* และ *Azomonas* โดยทั่วไปมีรูปร่างไข่ขนาดใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-2.0 ไมโครเมตร หรือใหญ่กว่า รูปร่างสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่เป็นแท่งถึงกลมรีขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและอายุเซลล์ อยู่กันเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม ไม่สร้างเอนโดรสปอร์ (endospore) แต่สร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าซีสต์ (cyst) ติดสีแกรมลบ ดังภาพที่ 2.3 บางชนิดเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา บางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ใช้น้ำตาล แอลกอฮอลล์และเกลือของกรดอินทรีย์ในการเจริญเติบโตได้ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยทั่วไปตรึงไนโตรเจนได้อย่างน้อย 10 มิลลิกรัมของไนโตรเจนต่อกรัมของกลูโคส ต้องการโมลิบดีนัมในการตรึงไนโตรเจน แต่อาจใช้วานาเดียมแทนที่บางส่วนได้ด้วย ไม่ย่อยโปรตีน สามารถใช้ไนเตรท แอมโมเนียและกรดอะมิโนบางชนิดเป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ พีเอชที่เหมาะสมที่มีเกลืออยู่ด้วยอยู่ในช่วง 4.8-8.5 แต่พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการตรึงไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 7.0-7.5 พบในดินและน้ำและมีชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ที่รากพืช แบคทีเรียในสกุล *Azotobacter* แบ่งออกได้ 6 ชนิด คือ *A. beijerinkii, A. chroococcum, A. paspali, A.vinelandii, A. nigricans* และ *A. armeniacus* (ภารุจีร์, 2556)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ที่มา: นารีรัตน์ และ ธิดารัตน์ (2562)

2.4 วัสดุตัวกลางชีวภาพ

2.4.1 ผักตบชวา มีชื่อทางพฤษศาสตร์ว่า *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms ชื่อสามัญว่า Water Hyacinth อยู่ในวงศ์ *Pontederiaceae* เป็นพืชน้ำประเภทใบเลี้ยงเดี่ยว มีลำต้นสั้นแตกใบเป็นกอลอยไปตามน้ำ ซึ่งเกิดตามซอกใบแล้วเจริญเป็นต้นอ่อนที่ปลายไหล ถ้าน้ำตื้นก็จะหยั่งรากลงดิน ใบเป็นใบ

เดี่ยวรูปไข่หรือเกือบกลมคล้ายรูปหัวใจเป็นมันหนาก้านใบกลมอวบน้ำตรงกลางพองออกภายในมีลักษณะเป็นรูพรุนช่วยพยุงลำต้นให้ลอยน้ำได้โดยไม่ต้องมีที่ยึดเกาะ ดังภาพที่ 2.4 มีดอก สีม่วงอ่อนคล้ายช่อดอกกล้วยไม้ดอกเกิดเป็นช่อที่ปลายยอดมีดอกย่อย 3-25 ดอก สีม่วงอ่อน มีกลีบดอก 6 กลีบ กลีบบนสุดขนาดใหญ่กว่ากลีบอื่นๆ และมีจุดเหลืองที่กลางกลีบ ดังภาพที่ 2.5 สามารถแพร่พันธุ์ได้รวดเร็วมากการขยายพันธุ์โดยวิธีการแยกต้นอ่อนที่ปลายไหลไปปลูก สามารถอยู่ได้ทุกสภาพน้ำ มีถิ่นกำเนิดในแถบลุ่มน้ำอะเมซอนประเทศบราซิล ในทวีปอเมริกาใต้ และแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วจนกลายเป็นวัชพืชที่ร้ายแรงในแหล่งน้ำทั่วไป (สุชาดา, 2542)

ภาพที่ 2.4 ผักตบชวา

ที่มา: www.travelin8riew.com

ภาพที่ 2.5 โครงสร้างภายในลำต้นผักตบชวา

ที่มา: www.green.we2god.com

2.4.2 บัวอเมซอน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Echinodorus cordifolius* (L.) *Griseb* หรือชื่อสามัญว่า burthead เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปี ลำต้นเป็นเหง้าสั้นๆอยู่ใต้ดินมีรากยึดไว้ลำต้นเหนือดินเป็นกอมีใบแบบแตกรอบๆประมาณ 10 ใบ ใบเดี่ยวหนาแข็งแผ่นใบคล้ายรูปหัวใจฐานใบหยักเว้าใบ ยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร กว้างประมาณ 8-15 เซนติเมตร ผิวใบเรียบเป็นมัน ขอบใบเรียบ เส้นใบ 3-7 เส้นเห็นได้ชัดเจนก้านใบแข็งแรงลักษณะกลมเรียวยาวโคนก้านใบแผ่กว้างหุ้มประกบกันไว้ดอกออกเป็นช่อแบบช่อประกอบซึ่งมีดอกย่อยจำนวนมากเจริญอยู่ทั้งบนก้านและช่อดอกใหญ่และก้านช่อดอกย่อย ดอกย่อยออกเป็นคู่หรือมากกว่านั้นมีใบประดับสีเขียวรองรับเป็นระยะไป ส่วนของดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียว 3 กลีบ กลีบดอกสีขาว 3 กลีบ บางและร่วงง่ายขนาดกว้างประมาณ 2 เซนติเมตร เกสรเพศผู้มีเป็นจำนวนมากสีเหลืองสด เกสรเพศเมียภายในมีรังไข่ขนาดเล็กเมื่อเจริญเป็นผลมีลักษณะเหมือนเป็นผลเดี่ยว รูปทรงโตประมาณ 1 เซนติเมตรแต่เมื่อแยกออกเป็นผลย่อยแล้วพบว่ามีขนาดเล็กมาก 1 ดังภาพที่ 2.6 ผลมีเมล็ด

เพียงหนึ่งเมล็ดเท่านั้นพืชชนิดนี้ถูกนำมาปลูกเป็นไม้ประดับริมขอบสระหรือในอ่างน้ำตื้นๆ (สุชาดา, 2542) ภายในของลำต้นมีลักษณะเป็นช่องกว้าง

ภาพที่ 2.6 บัวอเมซอน

ที่มา: http://501secretgarden.blogspot.com

2.4.3 พุทธรักษา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Canna indica* L.. เป็นพืชล้มลุกที่มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า ลำต้นเหนือดินสูงประมาณ 80-100 เซนติเมตร ประกอบด้วยกลุ่มของก้านใบที่แผ่เป็นกาบหุ้มประกบกันไว้ ใบเดี่ยวประกอบด้วยกาบใบและแผ่นใบ แผ่นใบรูปหอก ขนาดยาวประมาณ 40 เซนติเมตรกว้างประมาณ 9-11 เซนติเมตรขอบใบสีจาง ดอกออกเป็นช่อแบบดอกย่อยเกิดเรียงอยู่บนก้านช่อดอกย่อยเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดังภาพที่ 2.7 ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 3 กลีบร่วงง่ายยาวประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร กลีบดอก 3 กลีบเรียวยาวปลายแหลมสีขาวขุ่นอมเหลืองเกสรเพศผู้ที่เป็นหมันขนาดใหญ่เหมือนเป็นกลีบสีขาวขุ่น 3 อัน ขนาดเล็กอีก 1 อันและเกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์ 1 อันก้านชูยอดเกสรเพศเมียลักษณะเล็กเรียวยาวตั้งตรงยอด เกสรเพศเมียขนาดเล็ก พบตามหนองน้ำหรือริมคูน้ำที่โล่งแจ้งทั่วไป (สุชาดา, 2542)

ภาพที่ 2.7 พุทธรักษา

ที่มา: www.dmc.tv

2.4.4. ธูปฤาษี ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Typha angustifolia* L. และมีชื่อสามัญว่า narrow-leaved cattail พืชล้มลุกที่มีอายุหลายปีลำต้นเป็นเหง้าแข็ง ลำต้นเหนือดินชูตั้งตรงประกอบด้วยกลุ่มใบที่แตกแบบสลับกับเป็น 2 แถวด้านข้างใบเดี่ยวและลักษณะแบนแคบเรียวยาวประมาณ 2 เมตร กว้างประมาณ 2 เซนติเมตร ผิวใบเรียบเกลี้ยง โคนใบอวบหนากว้างกว่าปลายใบ ดอกออกเป็นช่อมีก้านช่อดอกแข็งตั้งตรงชูช่อดอกสูงเท่าๆกับใบ ช่อดอกมองดูเหมือนเป็นธูปขนาดใหญ่ ดอกแยกเพศแต่อยู่บนช่อเดียวกัน ดอกเพศเมียอยู่ตอนล่างของช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อยเรียงตัวอัดกันแน่นเป็นรูปทรงกระบอกสีน้ำตาล ยาวประมาณ 20 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2 เซนติเมตร ดอกเพศผู้อยู่ส่วนบนของช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อยอยู่กันหลวมๆ รอบก้านช่อดอกมีสีน้ำตาลอมเขียว ยาวกว่าช่อดอกเพศเมียเล็กน้อย แต่ความกว้างน้อยกว่ามาก ส่วนของดอกย่อยประกอบด้วยกลีบรวมลักษณะเป็นขนเรียว ยาวดอกเพศผู้มีเกสรเพศผู้ 2-5 อัน ดอกเพศเมียมีรังไข่ที่มีไข่อ่อนเพียง 1 ใบ ดังในภาพที่ 2.8 ผลขนาดเล็กยาวประมาณ 6 มิลลิเมตร ประกอบด้วยขนบางๆเป็นกระจุกทำให้ปลิวไปตามลมได้ไกลๆ พบตามแหล่งน้ำทั่วไปหรือตามที่ลุ่มน้ำขังและชายขอบพรุโดยเฉพาะในที่รกร้างว่างเปล่า นับว่าเป็นวัชพืชชนิดหนึ่งมี 2 ชนิดด้วยกันคือต้นใหญ่ใบยาวและต้นเล็กใบสั้น (สุชาดา, 2542)

ภาพที่ 2.8 ธูปฤาษี

ที่มา: www.clgc.agri.kps.ku.ac.th

2.4.5 กล้วย เป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีราคาถูก หาซื้อได้ทั่วไป ประกอบกับเป็นพืชที่ปลูกง่ายเจริญเติบโตได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย และได้ผลเร็วจึงเป็นที่นิยมปลูกกันทั่วไป นอกจากจะใช้บริโภคในประเทศแล้วยังส่งจำหน่ายต่างประเทศ นับว่าเป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งกล้วยเป็นไม้ล้มลุกขนาดใหญ่ มีอายุหลายปี เมื่อโตเต็มที่อาจมีความสูง 2–9 เมตร ต้นแท้จริงของกล้วยเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน ส่วนลำต้นที่มองเห็นเป็นลำต้นเทียมประกอบด้วยกาบใบที่อัดกันแน่นทรงพุ่ม ส่วนบนของลำต้น

ประกอบด้วยใบและช่อดอกที่เกิดจากจุดเจริญของเหง้า ดังภาพที่ 2.9 รากที่ทำหน้าที่จะเป็นระบบรากฝอย รากฝอยของกล้วยจะอยู่ในระดับเพียง 15 เซนติเมตรจากผิวดินลำต้นที่แท้จริงของกล้วย เป็นเหง้าที่มีขนาดใหญ่ อาจมีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 30 เซนติเมตร บนเหง้าจะมีข้อและปล้องเป็นจำนวนมาก เนื้อเหยื่อของเหง้าเต็มไปด้วยแป้งจุดเจริญที่เหง้าจะเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดใบ และช่อตามลำดับใบกล้วยมีขนาดใหญ่ แผ่นใบกว้าง 70-100 เซนติเมตร ยาว 150-400 เซนติเมตรสัดส่วนของใบ (Leaf Ratio) หรือความยาวต่อความกว้างประมาณ 2.0-4.5 ช่อดอก จุดเจริญของใบจะพัฒนาเป็นจุดเจริญของช่อดอกเมื่อต้นอายุได้ 7-9 เดือน ช่อดอกกล้วยมีขนาดใหญ่ มีช่อดอกย่อย (Spike) เกิดเป็นกลุ่ม ช่อดอกย่อยมีจำนวน 8-15 ดอก ช่อดอกข้อแรกถึงข้อที่ 10 จะเป็นดอกตัวเมีย ข้อที่ 11-15 จะเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ส่วนปลายช่อดอกจะเป็นดอกตัวผู้ รูปร่างดอกไม่ได้สมมาตร กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกกันไม่ชัดเจน คือ ชั้นกลีบ รวม 5 กลีบ และกลีบชั้นอิสระ 1 กลีบ เกสรตัวผู้และดอกสมบูรณ์เพศ มี 5 อัน เกสรตัวเมียในดอกตัวเมียจะพัฒนาอย่างดี รังไข่มี 3 ช่อง ผลกล้วยเป็นแบบ Berry กล้วย 1 เครือ ประกอบด้วยผล จำนวน 5-15 หวี กล้วย 1 หวี ประกอบด้วยผล 5-20 ผล ขนาดผลเมื่อแก่มีความกว้าง 2.5-5.0 เซนติเมตร ยาว 6-35 เซนติเมตร ลำต้นของกล้วย ลำต้นเทียม (Pseudo stem) คือส่วนที่ยึดตัวของหน่อ ประกอบด้วยกาบใบ (Leaf Sheath) ที่ประกบกันแน่นเจริญจากลำต้นแท้ขึ้นมาอยู่เหนือผิวดินมีลักษณะค่อนข้างกลมทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-25 เซนติเมตร สูง 1-3 เมตร ส่วนโคนใหญ่ ผิวลำต้นเรียบเป็นมันสีเขียว ม่วงแดง สลับขาว ตามอายุและลักษณะพันธุ์ ระหว่างการเจริญเติบโต กาบใบจะค่อยๆ คลี่ออกทีละกาบ ริมกาบใบที่ขนานกันจะค่อยๆเรียวเข้าหากันที่ปลายจนกลายเป็นก้านใบที่แข็งแรง ใบเล็กที่เกิดตอนแรก ๆ จะตายใบแล้วเกิดใบใหม่ ใบใหม่จะเกิดที่ปลายยอดของลำต้นเทียมชูสูงขึ้นไปโดยไม่มีกิ่งก้านสาขา (สารานุกรมสมุนไพรไทย, 2558)

กาบกล้วย ลำต้นเทียมหรือกาบลำต้น ดังภาพที่ 2.10 ใช้ทำเส้นใยหรือทำเชือกทอผ้า ทำอาหารสัตว์ เช่น อาหารของสุกรและยังเป็นอาหารของคนอีกด้วย เช่น แกงหยวกกล้วย กาบกล้วยยังใช้เป็นสมุนไพรได้เช่นกัน ส่วนน้ำคั้นจากลำต้นก็ยังสามารถนำมาทากันผมร่วงหรือเร่งทำให้ผมขึ้นได้อีกด้วย แล้วยังใช้ทำกระทงแทนโฟม ใช้ปักดอกไม้ ช่วยในการลอยตัวของกระทง จักเป็นเส้นตากแห้งใช้สานเป็นเครื่องใช้ เช่น ตะกร้า กระเช้า (ชลธิชา, 2553)

ภาพที่ 2.9 กล้วย

ที่มา: www.thaigoodview.com

ภาพที่ 2.10 กาบกล้วย

ที่มา: www.swscience.files.wordpress.com

2.4.6 มะพร้าว (Coconut) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cocos nucifera* Linn. เป็นพืชยืนต้นใบเลี้ยงเดี่ยว ชนิดหนึ่ง อยู่ในตระกูลปาล์ม นอกจากมะพร้าวแล้ว อินทผลัม ปาล์มน้ำมัน ตาลโตนด จาก หมาก สาคู ลาน และหวาย ต่างก็เป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูลปาล์ม มะพร้าวมีระบบรากเป็นรากฝอยแผ่กระจายออกรอบลำต้น มีลำต้นเดียว ไม่แตกแขนง มีรอยแผลจากการหลุดร่วงของใบตลอดลำต้น (สามารถคำนวณอายุของต้นมะพร้าวได้จากรอยแผลนี้ คือ ในหนึ่งปีมะพร้าวจะสร้างใบประมาณ 12 ถึง 14 ใบ ดังนั้นในหนึ่งปีจะมีรอยแผลที่ลำต้น 12-14 รอยแผล ลักษณะของใบจะเป็นใบประกอบ ออกอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของลำต้น ประกอบด้วยก้านทาง มีขนาดใหญ่และยาว และมีใบย่อยบนก้านทางประมาณ 200 ถึง 250 ใบ ดอกจะออกเป็นช่อ มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อเดียวกัน ดอกมี 6 กลีบ สีครีมหรือสีเหลืองนวล ไม่มีก้านดอกย่อย ดังภาพที่ 2.11 สำหรับผลมะพร้าวจะมีขนาดโตเต็มที่หลังจากที่มีการผสมเกสรแล้ว 6 เดือน และหลังจากนั้นอีก 6 เดือน ผลก็จะสุกแก่พร้อมที่จะเก็บเกี่ยว ลักษณะของผลเป็นแบบไฟบรัส (Fibrous drupe) เรียกว่า นัท (Nut) มีเปลือก 3 ชั้น คือ เปลือกชั้นนอก (Exocarp) เป็นเส้นใยที่เหนียวและแข็ง เมื่อแก่อาจมีสีเขียว แดง เหลืองหรือน้ำตาล เปลือกชั้นกลาง (Mesocarp) เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากเปลือกนอกเข้ามาเป็นชั้นของเส้นใยที่เรียกว่า กาบมะพร้าว ดังภาพที่ 2.12 มี ความหนาประมาณ 4 ถึง 8 เซนติเมตร เปลือกชั้นใน (Endocarp) เป็นชั้นในสุดที่มีกาบมะพร้าวหุ้มล้อมรอบ เมื่อผลแก่จะมีลักษณะแข็ง สีน้ำตาลดำที่เรียกว่ากะลา (Husk or shell) ซึ่งภายในกะลามะพร้าวจะมีเมล็ดมะพร้าว หรือที่เรียกว่า เนื้อมะพร้าว (Endosperm) ประกอบด้วย Seed coat เป็นแผ่นบางๆ สีน้ำตาลคั่นอยู่ระหว่างกะลากับเนื้อมะพร้าว ซึ่ง

Seed coat นี้จะติดแน่นกับเนื้อมะพร้าวเนื้อมะพร้าวโดยทั่วไปจะมีความหนาเฉลี่ยประมาณ 1 ถึง 2 เซนติเมตร สีขาวและมีน้ำมันอยู่มาก (พัชราภา, 2559)

ภาพที่ 2.11 มะพร้าว

ที่มา: www.palangkaset.com

ภาพที่ 2.12 กาบมะพร้าว

ที่มา: www.nanagarden.com

2.4.7 อ้อย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum* L. อยู่ในวงศ์ *Gramineae* มีชื่อสามัญ Sugar cane และชื่ออื่นว่า อ้อยขม อ้อยดำ เป็นไม้ล้มลุก สูง 2 ถึง 5 เมตร ลำต้นสีม่วงแดง มีไขสีขาวปกคลุม ไม่แตกกิ่งก้าน ใบเดี่ยว เรียงสลับ กว้าง 1.5 ถึง 5 เซนติเมตร ยาว 0.5 ถึง 1 เมตร ดอกช่อ ออกที่ปลายยอด สีขาว ผลเป็นผลแห้ง ขนาดเล็ก ดังภาพที่ 2.13 อ้อยมีหลายพันธุ์แตกต่างกันที่ความสูง ความยาวของข้อและสีของลำต้น อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่เกษตรกรนิยมปลูกกันมาก อ้อยที่นำมาคั้นน้ำสำหรับดื่มเป็นอ้อยที่ปลูกบริเวณที่ราบลุ่ม พื้นที่ดินเหนียว ประชาชนเรียกว่า อ้อยเหลือง หรือ อ้อยสิงคโปร์ นิยมปลูกกันมากในบริเวณจังหวัดอ่างทอง พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี และนครปฐม เป็นต้น

ชานอ้อย เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ได้จากต้นอ้อย ซึ่งหลังจากบีบเอาน้ำตาลออกแล้ว จะเหลือแต่ส่วนที่เป็นกากใย ดังภาพที่ 2.14 โรงงานน้ำตาลบางโรงนำชานอ้อยนี้ไปใช้ประโยชน์เป็นเชื้อเพลิงในโรงงาน (วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2540)

ภาพที่ 2.13 อ้อย

ที่มา: www.maestrouzy.com

ภาพที่ 2.14 ชานอ้อย

ที่มา: www.community.akanek.com

2.4.8 บัว เป็นไม้น้ำที่มีดอกสวยงามทั้งสีสันและรูปร่าง ดังภาพที่ 2.15 นำ มาปลูกประดับในบริเวณบ้าน หรือตัดดอกเพื่อนำมาบูชาพระ และประดับแจกัน ถ้ากล่าวถึงดอกบัว คนโบราณมักจะนึกถึงบัวหลวงและบัวสาย แต่ความจริงบัวที่ปลูกเป็นไม้ดอก ไม้ประดับ ปัจจุบันมีหลายชนิด ได้แก่ บัวหลวง บัวผัน บัวสาย บัวฝรั่ง จงกลนี และบัวกระดัง เป็นต้น (สุชาดา, 2542)

ก้านบัว เกษตรกรจะตัดดอกบัวและฝักบัวขาย หลังจากที่เก็บเกี่ยวแล้วส่วนของก้านก็จะเหลือทิ้ง อาจทำให้แหล่งน้ำเกิดการเน่าเสียเป็นวัชพืชแก่แหล่งน้ำธรรมชาติ ดังภาพที่ 2.16

ภาพที่ 2.15 บัวหลวง

ที่มา: https://termsuk.oonvalley.com

ภาพที่ 2.16 ก้านบัวหลวง

ที่มา: https://adnakiw.files.wordpress.com

2.4.9 ส้ม (Orange) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus aurantium* Linn. อยู่ในวงค์ Rutaceae ส้มเป็นผลไม้ยอดนิยม มีหลายสายพันธุ์หลายชนิด เป็นไม้ยืนต้น กิ่งมีหนามยาวเล็กน้อย ผลมีลักษณะทรงกลมแป้น ผิวเปลือกนอกเรียบ ผลมีสีเขียวหรือสีเหลือง ดังภาพที่ 2.17 เนื้อฉ่ำน้ำมีสีเหลือง อยู่ข้างในแยกเป็นกลีบๆ มีรสชาติเปรี้ยวหรือหวาน ตามสายพันธุ์ มีกลิ่นหอม มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นที่

นิยมปลูกกันมากในหลายประเทศ ส้มที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มโอ ส้มบางมด ส้มเกลี้ยง ส้มเช้ง เป็นต้น มีคุณประโยชน์และสรรพคุณทางยาหลายอย่าง นำมาประกอบอาหารเมนูต่างๆ มากมายหลายเมนู ทำเป็นเครื่องดื่มต่างๆ (Jom, 2560)

ภาพที่ 2.17 ส้ม

ที่มา: http://sukkap-d.com

ภาพที่ 2.18 เปลือกส้ม

ที่มา: www.doo-deedee.com

2.4.10 มะละกอ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Carica papaya* Linn. เป็นพืชใบเลี้ยงคู่อยู่ในวงศ์ *Caricacea* เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดแถบอเมริกากลาง ลักษณะทั่วไปของมะละกอ เป็นไม้ล้มลุก ขนาดกลาง ความสูงระหว่าง 5 - 20 ฟุต ลำต้นอวบน้ำ ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว 5-9 แฉก เกาะกลุ่มอยู่ด้านบนสุดของลำต้น ดังภาพที่ 2.19 ภายในก้านใบและ ใบมียางเหนียวสีขาวอยู่ มะละกอบางต้นอาจมีดอกเพียงเพศเดียว แต่บางต้นอาจมีดอกได้ทั้งสองเพศ ก็ได้ มะละกอเป็นพืชปลูกง่ายโตเร็ว ให้ผลเร็ว ให้ผลผลิตได้ตลอดทั้งปี ผลเป็นรูปรี อาจหนักได้ถึง 9 กิโลกรัม ผลดิบมีสีเขียว และมีน้ำยางสีขาวสะสมอยู่ที่เปลือก ส่วนผลสุก เนื้อในจะมีสีเหลืองถึงส้ม มีเมล็ดสีดำเล็ก ๆ อยู่ภายในกินไม่ได้ มะละกอ มีประโยชน์ต่อร่างกายทั้งในรูปของผลมะละกอดิบ และผลมะละกอสุก โดยผลมะละกอดิบมีสรรพคุณทางยาสามารถใช้เป็นพืชสมุนไพรช่วยขับปัสสาวะ เป็นยาระบายอ่อนๆ นอกจากนี้ผลมะละกอดิบยังนำไปใช้ทำเป็นเครื่องดื่มสมุนไพร คือชามะละกอที่มีสรรพคุณในการช่วยล้างลำไส้ทำให้ระบบดูดซึมสารอาหารของลำไส้ทำงานได้อย่างเต็มที่

นอกจากผลมะละกอแล้ว ยางมะละกอจะมีสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เรียกกันว่า “ปาเปน” ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมเคมี เนื้อกระป๋อง ปลากระป๋อง อุตสาหกรรมเบียร์ และการฟอกหนัง เป็นต้น รวมทั้งยังใช้เป็นยา โดยส่วนต่างๆของมะละกอนำมาใช้เป็นยาได้ เช่นต้นมะละกอใช้เป็นยาช่วยขับประจำเดือนและลดไข้ ดอกเป็นยาช่วยขับปัสสาวะ รากช่วยแก้กลากและเกลื้อน และยางช่วยกัดแผลตา

ปลาและหูด และฆ่าพยาธิ เป็นต้น (เอกรัตน์และคณะ, 2553) ส่วนก้านมะละกอนั้นจะมีลักษณะเป็นรูกลวงยาวไม่นิยมนำมาใช้ประโยชน์จึงเป็นส่วนที่เหลือทิ้งในทางเกษตร

ภาพที่ 2.19 มะละกอ

ที่มา: https://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/may11/papaya.htm

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุทธวรรณ และคณะ (2559) ศึกษาการใช้แบคทีเรียร่วมกับวัสดุชีวภาพเพื่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งใช้ ในการปลูกคะน้า ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากดิน สามารถคัดแยกได้ 6 ไอโซเลต ได้แก่ RD01, RD02, RD03, RD04, RD05, RD06 โดยไอโซเลต RD02 มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด และนำเชื้อ RD02 มาใช้กับวัสดุชีวภาพ ซึ่งก็คือ ผักตบชวา โครงสร้างภายในของผักตบชวามีลักษณะเป็นช่องล้อมรอบด้วยรูพรุนจำนวนมาก จึงทำให้เซลล์แบคทีเรียสะสมอยู่ได้ แล้วยังพบว่า การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุชีวภาพในการปลูกคะน้า สามารถช่วยให้ความสูงของลำต้นคะน้าตั้งแต่ที่สัปดาห์ที่ 2 และขนาดความยาวของใบคะน้าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7

ภารุจีร์ (2556) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสำหรับปลูกอ้อย ปัญหาดินเสื่อมคุณภาพจากการใช้ปุ๋ยเคมีทำให้ความนิยมในการใช้ปุ๋ยชีวภาพเพื่อการปรับปรุงคุณภาพของดินและพืชได้รับความความสนใจมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณการผลิตหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในรากพืช รวมถึงลดต้นทุนการผลิตโดยใช้กับน้ำตาลผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ จากการศึกษา

หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในถังหมักขนาด 50 ลิตรพบว่าเชื้อเจริญได้สูงสุดที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอัตราการกวน 150 รอบต่อนาทีอัตราการให้อากาศ 2 vvm ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 โดยที่สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตเชื้อได้ปริมาณ 7.50×10^9 CFU/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำหัวเชื้อที่ผลิตได้ไปทดสอบกับการปลูกอ้อยในระดับปฏิบัติการโดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเตรียมท่อนอ้อย ดินที่ปลูกและการรดปุ๋ยน้ำชีวภาพอ้อย พบว่าการทดลองที่ 12 (อ้อยแช่ปุ๋ย- ดินวันดี+กับหม้อกากหม้อ-รดปุ๋ย) ต้นอ้อยมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 136.35 เซนติเมตร ในขณะที่การทดลองที่ 1 (ท่อนอ้อยไม่แช่-ดินวันดี-รดน้ำ) ความสูงของอ้อยเฉลี่ยต่ำสุด 74.80 เซนติเมตร หลังจากการทดลองปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน นำรากอ้อยทดสอบและดินบริเวณใกล้รากไปศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 พบว่าอ้อยจากการทดลองที่ 10 (อ้อยแช่น้ำ-ดินวันดี+หม้อกรอง-รดปุ๋ย) แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีนัสสูงที่สุด 37.70 mmolC_2H_2/g/hr ในขณะที่รากอ้อยจากการทดลองที่ 7 ท่อนอ้อยไม่แช่-ดินวันดี+หม้อกรอง-รดน้ำ) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีนัสต่ำสุด 14.86 mmolC_2H_2/g/hr นอกจากนี้ยังพบว่ารากและดินที่รดด้วยปุ๋ยน้ำชีวภาพมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีนัสสูงกว่าตัวอย่างที่ลดด้วยน้ำธรรมดา ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในปุ๋ยน้ำช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนบริเวณรากอ้อยและส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย ดังนั้นการประยุกต์ใช้ปุ๋ยชีวภาพในการเพาะปลูกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีเป็นการลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรอีกทางด้วย

ประดับรัฐ และคณะ (2558) ศึกษาการคัดแยกและใช้หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพื่อการปรับปรุงคุณภาพดิน โดยในการศึกษามีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์สำหรับนำมาใช้ในการเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดิน ผลการคัดแยกได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน 5 ไอโซเลท ได้แก่ RT01 RT02 RT03 RT04 และ RT05 ลักษณะโคโลนีของทุกไอโซเลทเป็นเมือก สีขาวขุ่น เซลล์รูปรี ติดสีแกรมลบ เมื่อนำเชื้อแต่ละไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระและศึกษาการเจริญในอาหาร Nitrogen free medium พบว่า RT05 มีความสามารถในการเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด โดยตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนได้ 2.47 mg/L จากนั้นนำ RT05 มาศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพื่อเพิ่มธาตุอาหารในดินเสื่อมสภาพ พบว่าการเติมหัวเชื้อ RT05 เพียง

ครั้งเดียวให้ประสิทธิภาพการเพิ่มไนโตรเจนในดินหลังการเติมเชื้อเป็นเวลา 24 วัน โดยตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนและไนเตรท-ไนโตรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 3.82 mg/L และ 3.32 mg/L ซึ่งให้ผลมากกว่าการเติมหัวเชื้อเป็นระยะๆ นอกจากนี้ยังพบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียยังคงมีชีวิตและเพิ่มจำนวนอยู่ในดินที่ทำการทดสอบได้ การจำแนกสายพันธ์ของ RT05 ด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Azotobacter tropicalis* จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมาช่วยในการปรับปรุงคุณภาพดินได้

ขนิษฐา และคณะ (2558) งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae TISTR 5339 บนลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพเพื่อการผลิตเอทานอล และศึกษาประสิทธิภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป พบว่าการตรึงลำต้นแก่นตะวันที่ผ่านการปรับสภาพ 1 กรัม ที่เวลา 180 นาที มีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.48±0.07x108 เซลล์ต่อกรัมของวัสดุ และการอบเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที สามารถลดความชื้นในวัสดุตรึงรูปเหลือเพียงร้อยละ 40.47±3.61 โดยยังมีประสิทธิภาพการหมักสูง (ร้อยละ 84.72) การผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปนี้ พบว่ามีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุดที่ความเข้มข้นของเอทานอล (P) 9.98±0.19 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอล (Qp) 0.67±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตเอทานอล (Yp/s) 0.47±0.01 กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาล และร้อยละประสิทธิภาพการหมัก (Ey) 91.49±2.40 ที่ระยะเวลาการหมัก 15 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์ตรึงรูปนี้สามารถนำกลับมาใช้ได้อย่างน้อย 3 ครั้ง ด้วยวิธีการหมักแบบกะฐ้า โดยประสิทธิภาพในการหมักยังสูงกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นลำต้นแก่นตะวันจึงเป็นวัสดุที่สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงรูปสำหรับเซลล์ยีสต์ และเป็นวัสดุที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเอทานอลได้

ชุติมา และพัชรี (2558) ผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ST-541 ด้วยวิธีตรึงเซลล์และวิธีเซลล์อิสระในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 160 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์เอ็กแทรกซ์ 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 พบว่าการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยชานอ้อยให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 72 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าอัตราการ

ผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 88.04 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ส่วนการหมักเอทานอลด้วยเซลล์อิสระให้ค่าเอทานอลใกล้เคียงกับวิธีตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย ให้ค่าเอทานอลเท่ากับ 71 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 86.82 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ในขณะที่วิธีตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนทให้ค่าเอทานอลน้อยกว่าสองวิธีข้างต้นคือให้เอทานอลเท่ากับ 67 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้ค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 81.93 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อน าวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยชานอ้อยไปศึกษาการหมักแบบรีพิท-แบตช์ พบว่าการหมักรอบแรกให้เอทานอลสูงสุดโดยให้เอทานอลเท่ากับ 73 กรัมต่อลิตร การหมักรอบที่สองให้เอทานอล 67 กรัมต่อลิตร และการหมักในรอบที่สามให้ปริมาณเอทานอล 63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เห็นได้ว่าการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยชานอ้อย นอกจากยีสต์หมักเอทานอลได้สูงแล้วยังสามารถน าเซลล์ยีสต์กลับมาใช้หมักได้ใหม่อันเป็นการลดระยะเวลาการเตรียมเซลล์ยีสต์มีผลให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลลดลง

เวสารัช และรัชพล (2556) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ประโยชน์จากขยะธรรมชาติเป็นวัสดุพยุงสำหรับการตรึงเซลล์ Saccharomyces cerevisiae TISTR 5339 และเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของเซลล์ตรึงสำหรับการผลิตเอทานอล โดยนำขยะธรรมชาติ4 ชนิด (ธูปฤาษี ซังข้าวโพด ชานอ้อย และขี้เลื่อย) มาบดให้ได้ขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วใช้เป็นวัสดุพยุงส าหรับการตรึงเซลล์ในการหมักภายใต้สภาวะคงที่ โดยไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชานอ้อยให้การผลิตเอทานอลสูงสุดทั้งก่อนและหลังการแช่วัสดุพยุง โดยมีค่าเท่ากับ 14.86±0.55 และ 17.11±0.25 กรัมต่อลิตร ตามล าดับเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุพยุงที่เหลือ ($p< 0.05$) จึงเหมาะสำหรับใช้ในการผลิตเอทานอล นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุพยุง ทั้ง 4 ชนิด ปลดปล่อยสารอาหารที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ ผลของการศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตเอทานอลและการใช้ประโยชน์จากขยะทางการเกษตรในอนาคต

Mahato and Asmita (2018) ศึกษาการเปรียบเทียบเชื้ออะโซโตแบคเตอร์ที่มีและไม่มีปุ๋ยอื่นๆในการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวสาลีในเนินเขาทางทิศตะวันตกของเนปาลโดยทำการทดลองในกระถาง โดยวางแผนการทดลองที่มีแผนแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ แบ่งออกเป็น 7 ทรีเมนต์ ดังนี้ T1 เป็นตัวควบคุม คือ

ไม่มีการใส่เชื้อและปุ๋ย ,T2 ใส่ปุ๋ย NPK(120:80:80), T3 ใส่เชื้อ อะโซโตแบคเตอร์ , T4 ใส่เชื้ออะโซโตแบคเตอร์ซึ่งคัดแยกมาจากดิน ,T5 ใส่เชื้ออะโซโตแบคเตอร์กับ ปุ๋ย NPK(120:80:80,T6 ใส่เชื้อ อะโซโตแบคเตอร์ กับ ปุ๋ยคอก T7 ใส่เชื้อ อะโซโตแบคเตอร์,ปุ๋ย NPK(120:80:80)และปุ๋ยคอก ทำการศึกษาความยาวราก,น้ำหนักราก, น้ำหนักของต้นอ่อน ความสูงของพืช, น้ำหนักของช่อดอก, น้ำหนักของข้าว, ผลผลิตข้าว, มวลชีวภาพรวมและผลผลิตทางชีวภาพ พบว่า การใส่เชื้ออะโซโตแบคเตอร์ ให้ผลผลิตมากกว่าตัวควบคุมที่ไม่การใส่เชื้อและปุ๋ยอื่นๆ ดังนั้นเชื้ออะโซโตแบคเตอร์สามารถใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพซึ่งให้ผลผลิตมากและจะทำให้ผลผลิตมากขึ้นอีกซึ่งทำได้ด้วยเชื้ออะโซโตแบคเตอร์รวมกับปุ๋ยคอกและปุ๋ย NPK

Basel (2010) ศึกษาผลของ *Azotobacter chroococcum* ซึ่งเป็นปุ๋ยชีวภาพช่วยในการเจริญเติบโตและผลผลิตของแตงกวาในสภาวะเรือนกระจก ซึ่งทำการปลูกแตงกวาโดยแบ่งออกเป็น 7 สิ่งทดลอง ดังนี้ ตัวควบคุม,ปุ๋ยชีวภาพเท่านั้น,ปุ๋ยอินทรีย์เท่านั้น,ปุ๋ยเคมีเท่านั้น, ปุ๋ยอินทรีย์ + ปุ๋ยชีวภาพ , ปุ๋ยเคมี + ปุ๋ยชีวภาพ และ ปุ๋ยชีวภาพ ใช้ระยะเวลา 3 เดือน โดยทำการวัดความยาวรากและลำต้น,น้ำหนักแห้งและเปียกของราก, น้ำหนักแห้งและเปียกของลำต้น,จำนวนใบ และ ผลผลิตของแตงกวา ในการทดลองพบว่า ในการใส่เชื้อ *Azotobacter chroococcum* ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวควบคุม เพราะฉะนั้น *Azotobacter chroococcum* เป็นปุ๋ยชีวภาพที่สำคัญในการเพิ่มผลผลิตของแตงกวา

Hamid *et al*. (2018) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *Azotobacter* และการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งใช้เชื้อ *Azotobacter vinelandii* NRRL-14641 และ เชื้อ *Azotobacter* ที่แยกได้จากดิน แยกได้ 5 ไอโซเลต ได้แก่ IIB-1, IIB-2, IIB-3, IIB-4 และ IIB-5 พบว่า *Azotobacter vinelandii* NRRL-14641 และ *Azotobacter* IIB-3 เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ M2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 8 นอกจากนี้ยังเจริญได้ดีในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แล้วยังทำการทดลองศึกษาในการใช้ *Azotobacter* เป็นปุ๋ยชีวภาพ โดยทดลองกับข้าวโพดที่ปลูกในกระถาง พบว่าข้าวโพดที่มีการใส่เชื้อ *Azotobacter* เจริญได้ดีกว่าข้าวโพดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.1 Crystal violet

3.1.2 Iodine

3.1.3 95% Ethyl alcohol

3.1.4 Safranin O

3.1.5 Methyl red

3.1.6 5% Naphthol

3.1.7 40% KOH

3.1.8 Kovac's reagent

3.1.9 1% Tetramethl paraphenylenediamine dihydrochloride

3.1.10 H_2O_2

3.1.11 0.85% NaCl

3.1.12 Glucose

3.1.13 Lactose

3.1.14 Berk'N free medium

3.1.15 1% Peptone broth

3.1.16 MR-VP broth

3.1.17 Simmon'citrate Agar

3.1.18 SIM Agar

3.1.19 Trytone

3.1.20 Yeast extract

3.1.21 Agar

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound light microscope)

3.2.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscopes)

3.2.3 เครื่องเขย่า (incubator shaker)

3.2.4 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

3.2.5 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.2.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)

3.2.7 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.2.8 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

3.2.9 เครื่องชั่ง (balance)

3.2.10 เครื่องวัด pH (pH meter)

3.2.11 เครื่องตีบด (stomacher)

3.2.12 เครื่องนับจำนวนจุลินทรีย์ (colony counter)

3.2.13 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.2.14 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet)

3.2.15 ขวดรูปชมพู่ (*erlenmeyer* flask)

3.2.16 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

3.2.18 จานเพาะเชื้อ (petri dish plate)

3.2.19 บีกเกอร์ (beaker)

3.2.20 แผ่นสไลด์ (slide) และกระจกปิดสไลด์ (cover slide)

3.2.21 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

3.2.22 ปิเปตแก้ว (pipette)

3.2.23 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader)

3.2.24 กระบอกตวง (cylinder)

3.2.25 หยอดหยดสาร (dropper)

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมหัวเชื้อ *Azotobacter*

นำเชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter* มาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร n-free media นำเซลล์แบคทีเรีย *Azotobacter* ที่บริสุทธิ์ มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร n-free media ที่ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน และปรับให้หัวเชื้อแบคทีเรียมีค่า OD_{600} = 1 เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ (สุทธวรรณ และคณะ, 2559)

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติชีวเคมีบางประการ

นำหัวเชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter* มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การเตรียมวัสดุชีวภาพธรรมชาติ

นำวัสดุชีวภาพ ได้แก่ ต้นธูปฤาษี ก้านบัว หยวกกล้วย ชานอ้อย กาบมะพร้าว เปลือกส้ม บัวอเมซอน ก้านมะละกอ ผักตบชวา และ ต้นพุทธรักษา เป็นรูปสี่เหลี่ยม อบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน แล้วไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น นำชิ้นส่วนของวัสดุชีวภาพ มาศึกษาโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. การตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Azotobacter* บนวัสดุชีวภาพ

นำวัสดุชีวภาพแต่ละชนิด ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 5 กรัม จากนั้นเติมหัวเชื้อ *Azotobacter* ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเทหัวเชื้อแบคทีเรียออกแล้วล้างแบคทีเรียส่วนเกินโดยใช้ สารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตรแล้วเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที เทสารละลาย 0.85% NaCl ออก ทำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดบนวัสดุชีวภาพ ให้ปริมาณเชื้อที่ถูกตรึงบนวัสดุชีวภาพ มีประมาณ 10^8 ถึง 10^9 (สุทธวรรณ และคณะ, 2559)

5 นับจำนวนแบคทีเรีย *Azotobacter* บนวัสดุชีวภาพ

ทำการชั่งชิ้นส่วนของวัสดุชีวภาพ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มี 0.85 เปอร์เซ็น NaCl 90 มิลลิลิตร แล้วนำไปตีบด ให้เป็นความเจือจาง 10^{-1} จากนั้น เจือจาง 10 เท่าด้วยสารละลาย 0.85

เปอร์เซ็น NaCl ให้ถึงความเจือจาง 10^{-9} เลือกความเจือจางที่ 10^{-6} ถึง 10^{-9} มาทำการ Spread plate ความเจือจางละ 3 ซ้ำ ลงบนอาหารแข็ง n-free media agar บ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ เทียบกับชุดควบคุม คือ ชิ้นส่วนของวัสดุชีวภาพที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์จากนั้นทำการคัดเลือกวัสดุชีวภาพที่ให้การยึดเกาะแบคทีเรียสูง เพื่อนำไปปลูกพืช

6. การใช้แบคทีเรีย *Azotobacter* ที่ตรึงบนวัสดุชีวภาพในการปลูกผัก (สุทธวรรณ และคณะ, 2559)

6.1 บรรจุดินลงในภาชนะที่ใช้ปลูกในแต่ละชุดดังต่อไปนี้

-ชุดทดลองที่ 1 นำดินร่วน ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้ระยะเวลานึ่ง 15 นาที และเติมแบคทีเรีย *Azotobacter* ที่เพาะเลี้ยงใน n-free media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

-ชุดทดลองที่ 2 นำดินร่วน ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้ระยะเวลานึ่ง 15 นาที เติมแบคทีเรีย *Azotobacter* ตรึงกับวัสดุชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการกักเก็บเซลล์ ปริมาณ 50 กรัม

-ชุดควบคุม นำดินร่วน ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้ระยะเวลานึ่ง 15 นาที แต่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย *Azotobacter*

6.2 เติมเมล็ดผักใส่ในชุดทดลอง ชุดละ 5 เมล็ด แล้วรดน้ำ ทุกวันในแต่ละชุดการทดลอง

7. การตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Azotobacter* ที่ถูกตรึงบนวัสดุชีวภาพ

7.1 ทำการเก็บตัวอย่าง ต้นผักในแต่ละชุดการทดลอง การทดลองละ 5 ต้น นำมาวัดความสูงลำต้นและจำนวนใบ หาค่าเฉลี่ย เก็บตัวอย่างทุก 7 วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

7.2 วัดปริมาณไนโตรเจนในดินก่อนปลูก-หลังปลูก ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปโดยมีวิธีดังนี้

-ใส่ดินตัวอย่างที่เตรียมไว้ 1 ถ้วยแล้วใส่น้ำ 5 ถ้วยลงในภาชนะที่สะอาด เพื่อผลลัพธ์ที่ดีควรใช้น้ำสะอาดในการทดสอบผสมให้เข้ากันแล้วปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งตกตะกอน

-จากนั้นใช้หลอดน้ำหยดดูดน้ำที่ใสแล้ว ลงไปในช่องสำหรับใส่ดินทดสอบจนถึงระดับที่กำหนดไว้ ระวังอย่าไปกวนตะกอนขึ้นมา

-ใส่แคปซูลทดสอบลงในช่องดินทดสอบ แล้วเขย่าให้ส่วนผสมเข้ากันดี จากนั้นปล่อยไว้ให้สารเคมีทำปฏิกิริยาประมาณ 10 นาที

-เปรียบเทียบสีของน้ำที่ได้กับสีชาร์ตหน้ากล่อง เพื่อผลลัพธ์ที่ดีควรสังเกตค่าสีในที่มีแสงสว่าง แต่ไม่ควรส่องโดยตรงกับแสงอาทิตย์ บันทึกค่าที่ได้เพื่อการอ้างอิงต่อไป

8. การวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

ขั้นตอนในการทำวิจัยและผลการทดลองจากการวิจัย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ส่วนการศึกษาการปลูกพืช ทำการทดลอง 4 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์พระนครศรีอยุธยา หันตรา

2. ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์สุพรรณบุรี

3. โรงเรือนปลูกผัก คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์พระนครศรีอยุธยา หันตรา

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์

แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม ขอบและผิวหน้าโคโลนีเรียบ ทึบแสง โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าของอาหารเล็กน้อย (ภาพที่ 4.1) เซลล์แบคทีเรีย มีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศ (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสุทธวรรณและคณะ (2559) และการระบุบ่งชี้แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ (Holt *et al*., 2000)

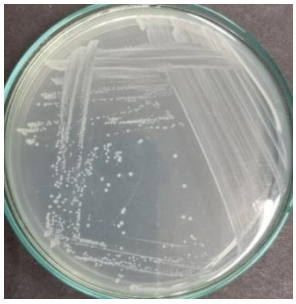


Figure 4.1 Morphology of free nitrogen fixing bacteria *Azotobacter* on Berk N'free agar in this experiment

Table 4.1 Biochemical characteristics of free nitrogen fixing bacteria *Azotobacter*, in triplicate

Biochemical test	***Azotobacter*** **In this experiment**	***Azotobacter*** **(Holt et a., 2000)**
Gram's stain	negative	negative
Indole Production	-	-
Methyl Red	-	-
Voges Proskauer	-	-
Citrate Utilization	+	+
Motility	+	+
Catalase	+	+

4.2 การศึกษาโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุชีวภาพ

วัสดุธรรมชาติแต่ละชนิด คือ ใบธูปฤาษี ก้านบัวหลวง กาบกล้วย ชานอ้อย กาบมะพร้าว เปลือกส้ม ก้านบัวอเมซอน ก้านมะละกอ ลำต้นผักตบชวา และ ลำต้นพุทธรักษา เมื่อนำมาศึกษาโครงสร้างทางกายภาพภายใต้กล้องสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า ก่อนอบแห้ง แสดงดังภาพที่ 4.2 และหลังอบ แสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่า วัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดมีช่องว่างภายในโครงสร้างที่แตกต่างกัน มีพื้นที่ผิวที่แตกต่างกัน มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุพยุงจากขยะธรรมชาติสำหรับตรึงเซลล์จุลินทรีย์ คือ ธูปฤาษี ซังข้าวโพด ชานอ้อย และขี้เลื่อย พบว่ามีโครงสร้างองค์ประกอบทางชีวเคมีของเส้นใย มีขนาดช่องว่างและพื้นที่หน้าตัดแตกต่างกัน โดยวัสดุที่จุลินทรีย์แทรกตัวอยู่ได้ดีที่สุดคือ ชานอ้อย (เวสารัช และ รัชพล, 2556)

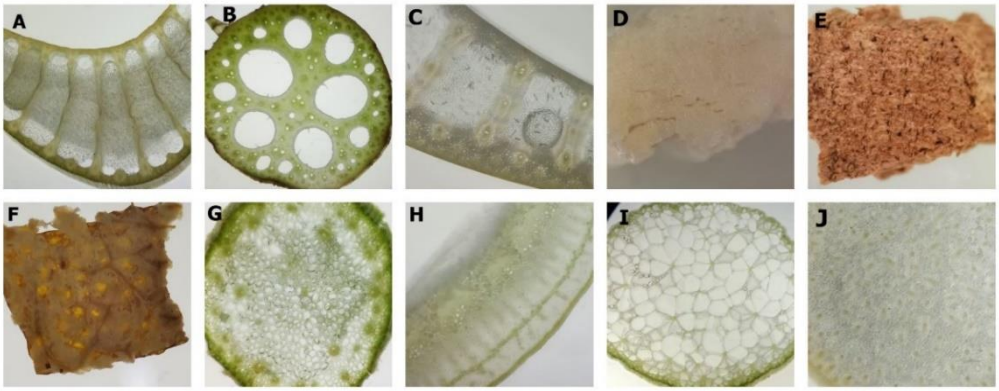


Figure 4.2 Structure of natural materials under stereo microscope (magnification 40X) before dried (A) Cattail leaf stalk, (B) Lotus stalk, (C) Banana stalk, (D) Sugarcane bagasse, (E) Coconut bract, (F) orange peel, (G) Taxas mud baby stalk, (H) Papaya leaf stalk, (I) Water hyacinth stalk, (J) Canna stalk

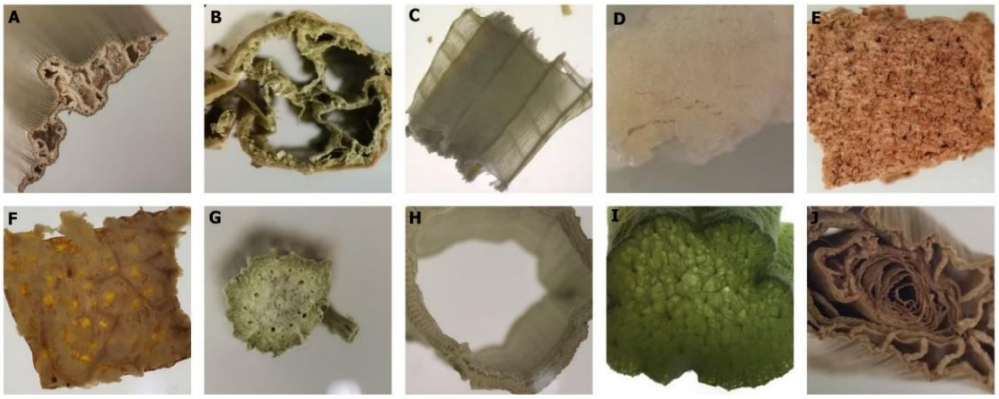


Figure 4.3 Structure of natural materials under stereo microscope (magnification 40X) dried (A) Cattail leaf stalk, (B) Lotus stalk, (C) Banana stalk, (D) Sugarcane bagasse, (E) Coconut bract, (F) orange peel, (G) Taxas mud baby stalk, (H) Papaya leaf stalk, (I) Water hyacinth stalk, (J) Canna stalk

4.3 การตรวจนับการมีอยู่ของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ก่อนตรึง และหลังตรึงเซลล์

เมื่อทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ ผลการทดลองพบว่า ก่อนตรึงเซลล์แบคทีเรีย ไม่พบแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Berk N'free agar (ตารางที่ 4.2) เมื่อทำการตรึงเซลล์แบคทีเรียแล้ว ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ หลังตรึงเซลล์ พบว่า แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ สามารถเกาะยึดบนวัสดุธรรมชาติในช่วง 10^5 - 10^8 CFU/กรัมของวัสดุธรรมชาติ แสดงดังตารางที่ 4.2 วัสดุธรรมชาติที่แบคทีเรียสามารถเกาะยึดไว้ได้ดีที่สุดคือ ลำต้นผักตบชวา โดยตรึงเซลล์แบคทีเรียได้เท่ากับ 2.43 x10^8 CFU/กรัมของวัสดุธรรมชาติ อันดับที่ 2 คือ ชานอ้อย โดยตรึงเซลล์แบคทีเรียได้เท่ากับ 1.86 x10^8 CFU/กรัมของวัสดุธรรมชาติ ในขณะที่วัสดุธรรมชาติที่ไม่สามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียได้ คือ เปลือกส้ม (ตารางที่ 4.2) เช่นเดียวกับ งานวิจัยของ สุทธวรรณและคณะ (2559) พบว่า ผักตบชวาซึ่งเป็นวัสดุตัวกลางชีวภาพมีคุณสมบัติในการตรึงเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ดีเท่ากับ 5.4 x10^4 CFU/mL โดยงานวิจัยนี้ ก้านผักตบชวามีความสามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า งานวิจัยของ สุทธวรรณและคณะ (2559)

Table 4.2 The total of Azotobacter bacteria immobilized in natural material (before and after) on Berk's N-free agar

Natural materials	Azotobacter bacteria immobilized in natural material (before and after) (CFU/g)	
	Before immobilization	After Immobilization
Water hyacinth stalk	0	2.43×10^8
Sugarcane bagasse	0	1.94×10^8
Canna stalk	0	9.40×10^7
Lotus stalk	0	8.97×10^7
Cattail leaf stalk	0	8.90×10^7
Coconut bract	0	8.13×10^7
Papaya leaf stalk	0	4.27×10^7
Taxas mud baby stalk	0	8.33×10^6
Banana stalk	0	6.60×10^5
Orange peel	0	ND

ND = Not detected

4.4 การใช้แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงในวัสดุธรรมชาติต่อการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง

เมื่อนำวัสดุธรรมชาติที่มีความสามารถตรึงอะโซโตแบคเตอร์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ดีที่สุด 2 อันดับ คือ ก้านผักตบชวา และ ชานอ้อย มาทดสอบการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้งและทำการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในดินก่อนและหลังปลูกพืช ผลการทดลอง พบว่า ชุดการทดลองที่ 3 คือ ดินผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับก้านผักตบชวาแห้ง มีค่าเฉลี่ยของความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และ น้ำหนักแห้งดีที่สุด เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.3) ในขณะที่ ชุดการทดลองที่ 4 คือ ดินผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับ

ชานอ้อยแห้ง มีค่าเฉลี่ยของความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และ น้ำหนักแห้งดี มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดการทดลองที่ 2 คือ ดินผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์อิสระ และชุดควบคุม เมื่อทำการวัดไนโตรเจนทั้งหมด พบว่า หลังผสมแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับก้านผักตบชวาแห้งในดิน และ แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ตรึงกับชานอ้อยแห้งในดิน พบว่า มีไนโตรเจนทั้งหมดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากกว่า แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์อิสระในดิน (ภาพที่ 4.4) สอดคล้องกับ การศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางชีวภาพคือผักตบชวาผสมดิน ต่อการปลูกผักคะน้า ส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักคะน้า ทำให้ความสูงของต้น ความยาวของใบผักคะน้าเจริญเติบโตได้ดีกว่า ที่เติมเฉพาะแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในดิน (สุทธวรรณ และคณะ, 2559; อรุณ และคณะ, 2559)

Table 4.3 The average of growth of *Brassica chinensis* under different treatments at 35 days planting

Treatment	Height (cm.)	Leave number	Root length (cm.)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
1. Soil (control)	3.87±1.66^{d}	3.73±1.48^{d}	2.27±0.89^{d}	3.14± 0.61^{d}	0.36± 0.04^{d}
2. Soil+*Azotobacter*	5.80±0.18^{c}	5.00±0.0^{c}	4.67±0.24^{c}	4.47± 0.44^{c}	0.57± 0.03^{c}
3. Soil+immobilized *Azotobacter* in water hyacinth	9.83±0.20^{a}	6.60±0.37^{a}	7.93±0.55^{a}	14.60± 0.39^{a}	3.06± 0.30^{a}
4. Soil+immobilized *Azotobacter* in sugarcane *bagasse*	6.73±0.28^{b}	5.49±0.28^{b}	6.00±0.41^{b}	7.68± 0.54^{b}	1.56± 0.30^{b}

Mean value ± standard deviation

^{abcd} different letters in a column are significantly different level (p<0.05) according to Duncan's multiple range test

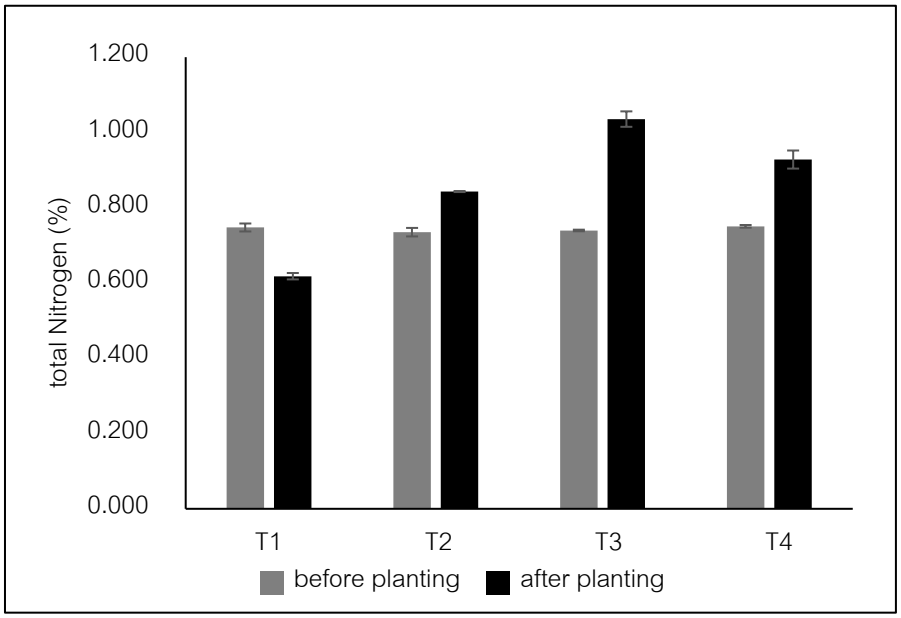


Figure 4.4 The average of percentage of total nitrogen in soil before and after planting in each of treatment following (T1=treatment 1) Soil (control) (T2=treatment 2) Soil+*Azotobacter* (T3=treatment 3) Soil+immobilized *Azotobacter* in water hyacinth (T4=treatment 4) Soil+immobilized *Azotobacter* in sugarcane bagasse, in duplicate

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ที่ทใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ คือ มีโคโลนีรูปร่างกลม และนูนโค้งสูงจากผิวหน้าของอาหารเล็กน้อย ขอบโคโลนีเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเรียบ และโคโลนีทึบแสง ติดสีแกรมลบ มีรูปร่างท่อน มีคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ จัดอยู่ในแบคทีเรียในดินกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ดี สำหรับโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุธรรมชาติพบว่า วัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดมีพื้นที่ผิวภายในและขนาดช่องว่างในการเกาะยึดของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน สามารถเรียงลำดับจากตรึงแบคทีเรียได้ดีที่สุดจนถึงไม่สามารถตรึงแบคทีเรียได้ ดังนี้คือ ลำต้นผักตบชวา ชานอ้อย ลำต้นพุทธรักษา ก้านบัวหลวง ใบธูปฤาษี กาบมะพร้าว ก้านมะละกอ ก้านบัวอเมซอน กาบกล้วย และเปลือกส้ม ตามลำดับ เมื่อเลือกลำต้นผักตบชวา และชานอ้อยมาตรึงแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์ และใช้ในการปลูกผักกวางตุ้ง เห็นได้ว่า แบคทีเรียที่เกาะยึดอยู่กับลำต้นผักตบชวาที่ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง รองลงมาคือ แบคทีเรียที่เกาะยึดอยู่กับชานอ้อย ซึ่งวัสดุธรรมชาติทั้ง 2 ชนิด ส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้งได้ดีกว่า ที่เติมเฉพาะแบคทีเรียอะโซโตแบคเตอร์อิสระ ดังนั้นการทดลองนี้เป็นแนวทางที่น่าสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตร สำหรับต้นแบบการเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดิน ใช้วัสดุธรรมชาติที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์ ลดต้นทุนการผลิต เพราะการใช้วัสดุธรรมชาติเกาะยึดแบคทีเรียตรึงไนโตนเจนในอากาศช่วยเก็บ รักษาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดินให้อยู่ได้นาน และไม่ถูกชะออกจากดิน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1 ในการคัดเลือกวัสดุชีวภาพมาตรึงแบคทีเรีย ควรเลือกวัสดุชีวภาพที่มีลักษณะที่เป็นรูพรุนจำนวนมาก มีพื้นที่ผิวมากใช้ในการเกาะติด และวัสดุชีวภาพที่ใช้ต้องไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์จุลินทรีย์ หาได้ง่ายในธรรมชาติ

2 ควรมีการศึกษาโครงสร้างภายในของวัสดุชีวภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และ ศึกษาองค์ประกอบของวัสดุชีวภาพ แต่ละชนิด

3 ในการเพาะต้นกล้าของกวางตุ้งนั้นจะต้องเพาะในถาดเพาะเมล็ด และทำการย้ายต้นกล้าด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันการบอบช้ำของต้นกล้า

4 ควรทดสอบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ตรึงเซลล์บนวัสดุชีวภาพในลำดับอื่นๆ ต่อการเจริญเติบโตของผักกินใบ

บรรณานุกรม

กนกวรรณ ทองศรี. 2561. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการตรึงไนโตรเจนในอากาศจากปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน และการประเมินผลของจุลินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของกวางตุ้ง. โครงงานวิจัยด้านจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.

ชุติมา แก้วกระจาย และ พัชรี สินธุนาวา. 2558. การตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยชานอ้อย เพื่อการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 20(2): 96-111.

ชลธิชา เหล็กแจ้ง. 2553. การพัฒนากระดาษใยกล้วย. งานวิจัยสาขาวิศวกรรมสิ่งทอ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

โชคชัย วนภู. 2550. การผลิตอัลจิเนทโดยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* และ การประยุกต์ใช้ในการตรึงเอนไซม์เพื่ออุตสาหกรรม. ทุนอุดหนุนการวิจัย. มหาวิทยาลับเทคโนโลยีสุรนารี.

ณปภัช พิมพ์ดี. 2560. ปุ๋ย. [Online] แหล่งที่มาhttps://www.scimath.org/lessonchemistry/item/7124-2017-06-04-07-32-46. (วันที่สืบค้น 14 กุมภาพันธ์ 2562).

ทัศนีย์ กองแก้ว. 2546. เปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วเพื่อแจงนับจุลินทรีย์รวมและ Total Colifrom & *Escherichia coli* ในไก่ กุ้ง ซูริมิแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธงชัย มาลา. 2546. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตการใช้ประโยชน์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดับรัฐ ประจันเขตต์, สุทธวรรณ สุพรรณ และ ทายาท ศรียาภัย. 2558. การคัดแยกและการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพื่อการปรับปรุงคุณภาพดิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 31:191-203.

พัชราภา มากคช. 2559. มะพร้าว. [online] แหล่งที่มา http://putcharapafern0110.blogspot.com. (วันที่สืบค้น 3 กุมภาพันธ์ 2562).

ภารุจีร์ ภูมิไกล. 2556. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสำหรับปลูกอ้อย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2558. ธาตุอาหารพืช. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยงยุทธ โอสถสภา, อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์ และ ชวลิต ฮงประยูร. 2554. ปุ๋ยเพื่อเกษตรยั่งยืน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2540. การนำชานอ้อยมาใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ. [online] แหล่งที่มา www.siweb.dss.go.th/journal. (วันที่สืบค้น 13 กุมภาพันธ์ 2562).

สารานุกรมสมุนไพรไทย. 2558. กล้วย. [online] แหล่งที่มา http://xno3cdbaevbumi7e7euch-5pc3gc.blogspot.com/2012/03/blog-post_7274.html. (วันที่สืบค้น 2 กุมภาพันธ์ 2562).

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2542. พรรณไม้น้ำในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

สุวิมล แก้วแดง. 2546. การประยุกต์ใช้ระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุมในการผลิตอาหารของโรงครัวโรงพยาบาลชุมชน: กรณีศึกษาโรงพยาบาลระโนด จังหวัดสงขลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาสงขลานครินทร์.

สุทธวรรณ สุพรรณ, ประดับรัฐ ประจันเขตต์ และ สิริแข พงษ์สวัสดิ์. 2559.การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับวัสดุตัวกลางชีวภาพเพื่อการส่งเสริมการเจริญของพืช. วารสารวิทยาศาสตร์ราชมงคลธัญบุรี. 6:17-28.

สุพรรณิการ์ จันทร์ทิม. 2559. การตรึง *Pseudomonas* sp. J801 ในกาบมะพร้าวเพื่อกำจัดฟีแนนทรีน ในดิน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สรสิทธิ์ วัชโรทยาน. 2537. ดินและปุ๋ย. [online] แหล่งที่มา http://saranukromthai.or.th/sub/book/book.php?book=18&chap=8&page=chap8.htm. (วันที่สืบค้น 2 กุมภาพันธ์ 2562).

สัลวา ตอปี. 2552. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระในสภาวะมีอากาศและ *Bacillus* sp. เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเลี้ยงฟางข้าว. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เวสารัช สุนทรชัยบรูณ์ และ รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2556. การใช้ประโยชน์วัสดุพยุงจากขยะธรรมชาติสำหรับการตรึงเซลล์ และประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. Veridian E-Journal, SU. 6(1): 795-807.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, สุวินัย เกิดทับทิม และ สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. 2559. การนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในระบบเกษตรกรรมแบบยั่งยืน. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้. 7(2).

อรุณี คงสอน. 2556. การศึกษาการสร้างฮอร์โมนออกซิน และการตรึงไนโตรเจนโดยเชื้ออะโซโตแบคเตอร์. งบประมาณกองทุนส่งเสริมงานวิจัย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.

อรุณี คงสอน, ศศิธร บุญกอง และ ศุภชัย อาคา. 2557. การศึกษาการสร้างฮอร์โมนออกซิน และการตรึงไนโตรเจน โดยเชื้ออะโซโตแบคเตอร์. ว.มทรส. 2(1): 1-8

อรมาศ สุทธินุ่น, วิชญา แก้วทิพย์ และ เอกวัล ลือพร้อมชัย. 2553. การย่อยสลายฟีนอลโดยเชื้อผสม *Methylobacterium* sp.NP3 และ *Acinetobacter* sp. PK1 ตรึงบนวัสดุเหลือใช้ปาล์มน้ำมัน. ทุนพัฒนานักวิจัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรประภา อนุกูลประเสริฐ และ ภานุมาศ ฤทธิไชย. 2558. ผลของการใช้ปุ๋ยอินทรีย์คุณภาพสูงต่อการให้ผลผลิตและคุณภาพของผักกาดหอม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 4(1).

เอกรัตน์ เอกศาสตร์, ชคัตตรัย รยะสวัสดิ์ และ จิรพัฒน์ โทพล. 2553. การถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมะละกอแก่เกษตรกรในจังหวัดนครราชสีมา. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

Basel M. Salhia. (2010). The effect of *Azotobacter chrococcum* as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of cucumis sativus. The degree of master of biological sciences. The Islamic university.

Hamid Mukhtar, Hina Bashir, Ali Nawaz and Ikramulltaq. 2018. Optimization of growth conditions for Azotobacter species and their use as biofertilizer. Journal of Bacteriology & Mycology. 6(5): 274-278.

Jom Kornberger. 2560. ส้ม. [online] แหล่งที่มา www.thai-thaifood.com. (วันที่สืบค้น 13 กุมภาพันธ์ 2562).

Sanjay Mahato and Asmita hafle. 2018. Comparative study of *Azotobacter* with or without ferfilizers on growth and yield of wheat in Western hills of Nepal. Annals of Agrarian Science. 16: 250-256.

Tchan, Y.T. 1984. Azotobacteriaceae. In: krieg. N.R., Host, J.G, Bergey's Manual of systematic Bacteriology, vol.1. Springer – Verlag, New York, LLC: 219-234.

Yu, J., Zhang, X., & Tan, T. (2007). An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. Journal of Biotechnology, 129, 415-420.

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, M.I., Marchant, R. and Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food Microbiology 21: 377–397.

Obuekwe, C. O. and Al-Muttawa, E. M., 2001. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. Biotechnology Letters 23: 1025–1032.

Quek, E., Ting, Y. P. and Tan, H. M. 2006. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. Bioresource Technology 97: 32–38.

Y. L. Ng, R. Yan, G. Chen, W. D. Gould, D. T. Liang and L. C. Koe . 2004. Use of activated carbon as a support medium for H2 S biofiltration and effect of bacterial immobilization on available pore surface. Journal of Microbiol Biotechnol . 66: 259-265.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Burk’s Medium

Magnesium sulphate	0.20 กรัม
Dipotassium phosphate	0.80 กรัม
Monopotassium phosphate	0.20 กรัม
Calcium sulphate	0.13 กรัม
Iron () chloride	0.00145 กรัม
Sodium Molybdate	0.000253 กรัม
Sucrose	20.00 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 21.3 กรัมในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือดเพื่อละลาย agar จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

2. Simmon’s citrate agar

Manganese sulfate	0.2 กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate	1.0 กรัม
Dipotassium phosphate	1.0 กรัม
Sodium Chloride	5.0 กรัม
Sodium citrate	2.0 กรัม
Bromthymol blue	0.08 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
pH 6.0	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือดเพื่อละลาย agar จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

3. MR- VP medium

Polypeptone หรือ Buffer peptone	7.0 กรัม
Glucose	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
pH 6.9	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

4. Motility medium (semi- solid medium)

Tryptose	10 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
pH 7.2 ± 0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือดเพื่อละลาย agar จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

5. Tryptone broth

Tryptone หรือ Tryptose	5 กรัม
Sodium chloride	10 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
pH 7.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

6. Plate count agar (PCA)

Tryptone	5 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Glucose	1 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

ภาคผนวก ข.

สารเคมี

1. สารละลาย Sodium Chloride (NaCl) 0.85%

Sodium Chloride (NaCl)	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น แล้วปรับความเป็นกรดเบสให้ได้ 7.0

2. สารละลาย Kovac's reagent

Pentanol red

p-Diamethyl aminobenzaldehyde

HCl (conc.)

ละลายอัลดีไฮด์ในแอลกอฮอลล์ จากนั้นเติมกรดลงไปอย่างช้าๆ เก็บไว้ในตู้เย็น ข้อควรระวัง เนื่องจาก Pentanol และ HCl เป็นสารระเหยง่ายโดยไอของสารทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง และระบบทางเดินหายใจ จึงควรทำการทดลองในตู้ดูดควัน

3. สารละลาย Methyl red

Methyl red	0.1	กรัม
Ethyl alcohol 95%	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500	มิลลิตร

ละลาย Methyl red ในเอทานอล จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลาย Voges-Proskauer test for acetyl-me\thylcarbinol or acetoin

ส่วนประกอบ Reagent A

Alpha-napthol (6%) ละลายใน absolute ethyl alcohol 3 กรัม

ส่วนประกอบ Reagent B

Potassium hydroxide (KOH) (40%) ที่มี 0.3% Creatine หรือ 16% KOH

5. Safanin O

Safanin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

ละลายสี Safranin O ในแอลกอฮอลล์ (95%Ethyl alcohol) อย่างช้าๆจนกระทั่งละลายหมด หากนำไปใช้ต้องมีการเจือจางเป็น 1:10 เท่า (Stock solution 10 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร) หากมีตะกอนต้องกรองก่อนใช้ทุกครั้ง

6. Iodine solution

Iodine	0.1	กรัม
Potassium iodide	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลาย Iodine และ Potassium iodide ลงในน้ำกลั่นอย่างช้าๆ จนละลายเข้ากันหมด

7. Crystal violet solution

สารละลาย A

Crystal violet (85%dye)	2	กรัม
Ethyl alcohol (95%)	20	กรัม

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
Distilled water	80	มิลลิลิตร

ละลาย Ammonium oxalate ในน้ำกลั่นจนละลายเข้ากัน จากนั้นผสมสารละลาย A และ B ให้เข้ากัน หากมีตะกอนต้องนำไปกรองก่อนใช้งาน

8. Alcohol-acetone (Decolorizer)

Ethyl alcohol (95%)	250	มิลลิลิตร
Acetone	250	มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้งสองชนิดมาผสมเข้าด้วยกัน

9. Oxidase test

Tetramethyl-p-phenylenediamide (TPD)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมเข้าด้วยกันแล้วเก็บไว้ในขวดป้องกันแสง

10. Catalase test

Hydrogenperoxide (H_2O_2)	1	กรัม

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวพิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Pitchya Tangsombatvichit

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

   เวลาที่ใช้ทำวิจัย (5 ชั่วโมง : สัปดาห์)

3. หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

   สถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก 450 ถนนสุพรรณบุรี-ชัยนาท ต.ย่านยาว อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี 72130

   หมายเลขโทรศัพท์ 080-4592479 E-mail: pitchya.t@rmutsb.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	สาขา	ชื่อสถานศึกษา
ปริญญาเอก	Biochemical Technology	King Mongkut's University of Technology Thonburi
ปริญญาโท	Applied radiation and Isotopes	Kasetsart University
ปริญญาตรี	Agricultural Sciences	Kasetsart University

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   -Biotechnology

   -Applied yeast Technology and yeast genome database

   -Environmental Science

   -Agricultural Technology and waste management

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย, แหล่งทุน

1. การสร้างคุณค่าและมูลค่าเพิ่มของสินค้าที่ไม่ใช่อาหาร (non-food) ชาติพันธุ์มอญ จากภูมิปัญญาท้องถิ่น แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สกสว.) ปีงบประมาณ 2562

2. คุณภาพของปุ๋ยมูลไส้เดือนดินจากส่วนเหลือทิ้งในการปลูกมันเทศของชุมชนทับน้ำ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สกสว.) ปีงบประมาณ 2560

6.2 งานวิจัยที่ทำแล้วเสร็จและนำไปเผยแพร่

1. **พิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร** กานดาวดี โนชัย ดารานัย รบเมือง และอุทาน บูรณศักดิ์ศรี. 2564. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวเกรียบจากมันฝรั่งต้มที่เหลือในกระบวนการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทอง. การประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 5 วันที่ 15-16 มกราคม 2564 จัดโดย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์พระนครศรีอยุธยา หันตรา
2. **Pitchya Tangsombatvichit**, Kanjana Pisapak, and Paweena Suksaard. 2020. The natural lipolytic yeast *Candida* sp. RMUTSB-27 isolated from pineapple for treatment of cooking oil contaminated wastewater. EnvironmentAsia. Vol. 13 No. 3 : 70-79.
3. ญาณิศา สุขสมบูรณ์ วิไลวรรณ รอสูงเนิน กาญจนา พิศาภาค **พิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร** นฎาภัสส์ คุ้มกลาง และวิชนี มัธยม. 2563. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสะเดา ไทยด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมทรี. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ครั้งที่ 4 วันที่ 15-16 กรกฎาคม 2563 จัดโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์พระนครศรีอยุธยา หันตรา หน้า 480.
4. **พิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร** และ อุทาน บูรณศักดิ์ศรี. 2562. ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน: เทคโนโลยีชีววิถีเพื่อการอนุรักษ์ดินและการจัดการขยะอินทรีย์ในประเทศไทย. วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 14 ฉบับที่ 2 หน้า 170-181.

5. **Pitchya Tangsombatvichit**, Daranai Robmuang and Wichanee Mathayom. 2561. Enhanced organic fertilizer quality from sweet potato crop wastes of Tup-Nam village via vermicomposting technology using *Eudrilus eugeniae*. การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ครั้งที่ 3 และการประชุมวิชาการระดับชาติเครือข่ายวิจัยประชาชื่น ครั้งที่ 4 พระนครศรีอยุธยา หน้า 1757-1764.
6. **พิชญ์ ตั้งสมบัติวิจิตร** และ ดาวจรัส เกตุโรจน์. 2561. คุณภาพปุ๋ยมูลไส้เดือนดินจากเถามันเทศเหลือทิ้งต่อการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง. วารสารวิชาการ มทร.สุวรรณภูมิ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 6 ฉบับที่ 2 หน้า 124-133.
7. **Tangsombatvichit, P**., Buranasaksee, U., and Tumthong, S. 2018. YeastSCI: A Web Tool Integrating Zinc Cluster Protein Information of Saccharomyces and Candida. In Proceedings of the 2018 6th International Conference on Bioinformatics and Computational Biology (pp. 23-27). ACM.
8. **Tangsombatvichit, P**., Chupong, S., Ketrot, D. and Boonlerthirun, K. 2016. The management of organic wastes produced vermicompost using earthworm *Eudrilus eugeniae* and effects of vermicompost on growth of *Helianthus annuus*. 5th International conference on food, Agricultural and Biological Sciences (ICFABS-2016), Dec 25-26, 2016, Thailand.
9. **Tangsombatvichit, P.**, Semkiv, M., Sibirny, A., Jensen, L., Ratanakhanokchai, K. and Soontorngun, N., 2015 "Zinc cluster protein Znf1, a novel transcription factor of non-fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*", FEMS Yeast Research. Vol. 15, No. 2, pp 1-16.
10. Soontorngun, N., Baramee, S., **Tangsombatvichit, C**., Thepnok, P., Chevathanarak, S., Robert, F. and Turcotte, B. 2012, Genome-wide lacation analysis reveals an important overlap between the targets of the yeast transcriptional regulators Rds2 and Adr1, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 423, No. 4, pp. 632-637.

11. **Tangsombatvichit, P.**, Buranasaksee, U., and Tumthong, S. 2018. YeastSCI: A Web Tool Integrating Zinc Cluster Protein Information of Saccharomyces and Candida. In Proceedings of the 2018 6th International Conference on Bioinformatics and Computational Biology (pp. 23-27). ACM.
12. **Tangsombatvichit, P.**, Chupong, S., Ketrot, D. and Boonlerthirun, K. 2016. The management of organic wastes produced vermicompost using earthworm *Eudrilus eugeniae* and effects of vermicompost on growth of *Helianthus annuus*. 5th International conference on food, Agricultural and Biological Sciences (ICFABS-2016), Dec 25-26, 2016, Thailand.
13. Soontorngun, N., **Tangsombatvichit, P.**, Semkiv, M. and Sibirny, A. 2015. The unexpected function of an unknown S. cerevisiae Zinc cluster transcription factor Znf1 in alternative carbon source utilization and bioethanol production. 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB), September 6-12, 2015, Levico Terme, Trento, Italy.

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวปวีณา สุขสอาด

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Paweena Suksaard

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์

เวลาที่ใช้ทำวิจัย (5 ชั่วโมง : สัปดาห์)

3. หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

สถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก 4/52 ถ.อู่ทอง ต.หัวรอ อ.พระนครศรีอยุธยา จ.พระนครศรีอยุธยา 13000

หมายเลขโทรศัพท์ 086-5565044 E-mail: paweena.s@rmutsb.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	สาขา	ชื่อสถานศึกษา
ปริญญาเอก	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปริญญาโท	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปริญญาตรี	ชีววิทยา (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Actinomycetes Diversity and Taxonomy
- Microbial Application in Agriculture and Industry

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

6.1 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย, แหล่งทุน

1. โครงการวิจัยเรื่องความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทและแนวทางการใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตร (ปีงบประมาณ 2560) แหล่งทุน: ศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพ

6.2 งานวิจัยที่ทำแล้วเสร็จและนำไปเผยแพร่

1. **Suksaard, P.,** Srisuk, N., and Duangmal, K. 2018. *Saccharopolyspora maritima* sp. nov., an Actinomycete Isolated from Mangrove Sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 68(9)*, 3022–3027.

ผู้ร่วมวิจัย (นักศึกษา)

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาวธิดารัตน์ เทียมมงคล

   ระดับการศึกษา ปริญญาตรี ชั้นปี 4

   สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ (จุลชีววิทยา) คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

2. ชื่อ-นามสกุล นางสาวนารีรัตน์ คงอนันต์

   ระดับการศึกษา ปริญญาตรี ชั้นปี 4

   สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ (จุลชีววิทยา) คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี