วิทยานิพนธ์

เรื่อง

อิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก

EFFECT OF ASSOCIATIVE NITROGEN FIXING BACTERIA INOCULATION ON THE GROWTH OF VETIVER GRASS

นายประทีป เอี๊ยบเจริญ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วิทยานิพนธ์เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา ตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2542

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่ พืชไร่

สาขาวิชา ภาควิชา

เรื่อง อิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก

EFFECT OF ASSOCIATIVE NITROGEN FIXING BACTERIA INOCULATION ON THE GROWTH OF VETIVER GRASS

นามผู้วิจัย นายประทีป เอี่ยบเจริญ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....

(ดร. เศรษฐา ศิริพินทุ์)

วันที่ 3 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 2542

กรรมการที่ปรึกษา .....

(ดร. อภิชัย ธีรธร)

วันที่ 3 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 2542

กรรมการที่ปรึกษา .....

(อาจารย์ อนันต์ ปินตารักษ์)

วันที่ 3 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 2542

หัวหน้าภาควิชา .....

(อาจารย์ อนันต์ ปินตารักษ์)

วันที่ 3 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 2542

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัฐมา สิทธิชัย)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 9 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 2542

บทคัดย่อ

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่

อิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก

โดย

นายประทีป เอี๊ยบเจริญ

พฤษภาคม 2542

ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ดร.เศรษฐา ศิริพินทุ์

ภาควิชา/คณะ : ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร

การศึกษาอิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก นั้นมีวัตถุประสงค์ในการศึกษา 4 ประการดังนี้

1. เพื่อศึกษาการแยก และคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชจากรากหญ้าแฝกในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ และ จังหวัดเชียงราย 2. เพื่อศึกษาศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแต่ละ isolates ที่คัดเลือกได้ 3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝกในสภาพแวดล้อมต่างกัน 4. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่างกันต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ผลการทดลองที่ 1. พบว่าสามารถแยก และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช จากรากหญ้าแฝกซึ่งสุ่มเก็บจากพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดเชียงราย ได้ทั้งหมดจำนวน 17 isolates ดังนี้ : ต.ห้วยลาน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ (HL) ได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 isolates จากสถานีพัฒนาที่ดิน อ.เมือง จ.เชียงราย (LDS) ได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 isolates จากบ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ.เมือง จ.เชียงราย (CR) ได้แบคทีเรียจำนวน 4 isolates จากบ้านโป่งปูเฟื่อง อ.แม่สรวย จ.เชียงราย (CR) ได้แบคทีเรียจำนวน 2 isolates จากบ้านตีนดอย อ.แม่สรวย จ.เชียงราย (CR) ได้แบคทีเรียจำนวน 2 isolates การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยอาศัยหลักการตามหนังสือ Bergey 's Manual of

Determinative Bacteriology ซึ่งอาศัยแหล่งอาหาร และพลังงานของเชื้อแบคทีเรียเป็นบรรทัดฐาน พบว่า isolates ที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน มีความคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ *Azotobacteraceae* กลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่มของ *Enterobacteriaceae* และกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ malic acid เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่มของ *Spirillaceae* โดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้งหมด มีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยที่แบคทีเรีย isolates CR 10 สามารถวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจน โดยเทคนิควิธี Acetylene Reduction Activity (ARA) ได้สูงที่สุดเท่ากับ 469.51 nmol C_2H_4/sample/day แบคทีเรียต่าง isolates กันมีคุณสมบัติและคุณลักษณะทางสรีรวิทยา (physiology) และลักษณะทางสันฐานวิทยา (morphology) ของโคโลนีและเซลของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้

การทดลองที่ 2. พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates ให้กับหญ้าแฝกในทุกทดลองย่อย ที่มีอายุการเก็บเกี่ยว และสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป ทำให้หญ้าแฝกมีการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต, การสะสมมวลชีวภาพ เช่น การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ ตลอดจนศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่สูงกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน สามารถยืนยันได้ว่าการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย isolates ต่าง ๆ นั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญระดับหนึ่งสำหรับหญ้าแฝกเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

การทดลองที่ 3. พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกทำให้หญ้าแฝกมีการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต การสะสมมวลชีวภาพ เช่น การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ ตลอดจนศักยภาพการตรึงไนโตรเจนสูงมากกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ผลของการให้ปุ๋ยไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 ppm. ร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืชแก่หญ้าแฝกภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน พบว่าในส่วนของการพัฒนาด้านความสูงและจำนวนต้นต่อกอ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวราก และการสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใส่ปุ๋ยที่ระดับ 30 และ 10 ppm. จะเห็นได้ว่าการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในระดับต่ำ คือ 10 และ 20 ppm. ร่วมกับการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะช่วยส่งเสริมให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตที่ดี แต่ถ้าระดับปุ๋ยไนโตรเจนสูงเกินไปก็อาจจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของหญ้าแฝกได้

ABSTRACT

Abstract of Thesis Submitted to The Graduate School of Maejo University in Partial Fulfillment of The Requirement for The Degree of Master of Science in Agronomy

EFFECT OF ASSOCIATIVE NITROGEN FIXING BACTERIA INOCULATION ON THE GROWTH OF VETIVER GRASS

BY

PRATEEP AIBCHAROEN

MAY 1999

Chaiman : Dr. Settha Siripin

Department/Faculty : Agronomy, Faculty of Agricultural Production

The study on the effect of associative nitrogen fixing bacteria inoculation on the growth of vertiver grass had four objectives: (1) to screen and classify the free living and associative nitrogen fixing bacteria which were from roots of vetiver grass in areas around Chiangmai and Chiangrai provinces; (2) to study the nitrogen fixing activity potential of bacteria; (3) to study the effect of nitrogen fixing bacteria inoculation on the growth and nitrogen fixing activity of vetiver grass in different conditions; and (4) to determine the effect of nitrogen fertilizer application in different concentration levels and nitrogen fixing bacteria inoculation on the growth and nitrogen fixing activity of vetiver grass.

The results of Experiment I showed that 17 isolates of associative nitrogen fixing bacteria were screened from the roots of vetiver grass in Chiangmai and Chiangrai provinces. These included five isolates collected from Huaylarn (HL), Sankampang district (Chiangmai); four isolates collected from Land Development Station (LDS), Maung district (Chiangrai); four isolates collected from Ban Meakaotomloung (CR), Maung disrict (Chiangrai); two isolates collected from Ban Pongpufaung (CR), Maesuay district (Chiangrai); and two isolates collected from Ban Teendoi (CR), Maesuay disrict

(Chiangrai). All isolates were classified using the Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology. The nitrogen fixing bacteria were classified into three groups namely: Group I, using glucose as carbon source and showing similarity to *Azotobacteraceae*: Group II, using sucrose as carbon source and showing similarity to *Enterobacteriaceae*: and Group III, using malic acid as carbon source and showing similarity to *Spirillaceae*. All isolates were found to have difference in nitrogen fixing activity potential. The highest nitrogen fixing ability was shown by CR 10 isolate at 469.51 nmol C_2H_4/sample/day Most isolates were also found to have difference in the physiology and morphology of their colonies and cells.

The results of Experiment II showed that nitrogen fixing bacteria inoculation increased the growth of vetiver grass and total biomass i.e. root and leaf dry weight. The potential of nitrogen fixing ability was also better than the uninoculated vetiver grass. All isolates of bacteria were nitrogen source for growth of vetiver grass.

The results of Experiment III revealed that inoculated vetiver grass showed better growth, biomass and potential of nitrogen fixing ability than the uninoculated vetiver grass. Nitrogen fertilizer application, in the from of ammonium-sulfate at different rates 0, 10, 20, and 30 ppm, showed that 20 ppm level was able to promote root length and the total dry weight of vetiver grass.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ท่านอาจารย์ ดร. เศรษฐา ศิริพินทุ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ท่านอาจารย์ ดร. อภิชัย ธีรธร ท่านอาจารย์ อนันต์ ปินตารักษ์ กรรมการที่ปรึกษา ที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำ ตลอดจนช่วยเหลือตรวจแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดียิ่ง

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ ฉันทนา สีผึ้ง กรรมการตรวจรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำ แก้ไข ปรับปรุงรูปเล่มวิทยานิพนธ์ จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ท่านอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำห้องบัณฑิตวิทยาลัยทุก ๆ ท่าน ที่คอยให้ความสะดวกในการติดต่องานราชการ ตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำ ต่าง ๆ ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ท่านอาจารย์ประจำภาควิชาพืชไร่ ภาควิชาดินและปุ๋ย และภาควิชาอุตสาหกรรม ที่เอื้อเฟื้อสนับสนุนเครื่องมือ และอุปกรณ์ ที่เกี่ยวข้องในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (กปร.) ที่มอบเงินทุนอุดหนุนในการวิจัย และการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และ น้อง ๆ ที่ทำงานร่วมกัน ทุก ๆ ท่านที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณบุญฤทธิ์ สินค้างาม เพื่อนที่แสนดีเป็นอย่างมาก ที่คอยให้คำแนะนำแนวทางในการทำงาน คอยช่วยเหลือผลักดันให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตลอดจนให้กำลังใจจึงทำให้การทำงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เหนือสิ่งอื่นใดยิ่ง ผู้วิจัยขอกราบบูชา รำลึกถึงพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องทุก ๆ ท่านที่คอยให้กำลังใจ สนับสนุนให้ผู้วิจัยได้ศึกษา และทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จตามความมุ่งหวัง

นายประทีป เอี๊ยบเจริญ

พฤษภาคม 2542

สารบาญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญเรื่อง	(8)
สารบาญตาราง	(10)
สารบาญภาพ	(13)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
การตรวจเอกสาร	4
ความสำคัญของธาตุไนโตรเจน	4
ขอบเขตและความหมายของกระบวนการตรึงไนโตรเจน	4
ประเภทและลักษณะการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ดินบางชนิด	5
ความสำคัญของกระบวนการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช	6
ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช	8
ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช	10
เทคโนโลยีชีวภาพกับการตรึงไนโตรเจน	13
โครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน	13
พันธุวิศวกรรมกับการตรึงไนโตรเจน	15
ลักษณะทางพฤกษศาตร์ของหญ้าแฝก	18
ความแตกต่างของหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอน	20
การใช้ประโยชน์จากหญ้าแฝก	21
อุปกรณ์และวิธีการ	23
อุปกรณ์	23
วิธีการ	24

สารบาญเรื่อง(ต่อ)

	หน้า
ขั้นตอนการดำเนินงาน	30
การบันทึกข้อมูล	32
สถานที่ดำเนินการทดลอง	34
ระยะเวลาการดำเนินงาน	34
แผนการดำเนินงาน	35
ผลการทดลอง	36
ผลการทดลองที่ 1.	36
วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1.	49
ผลการทดลองที่ 2.	53
ผลการทดลองย่อยที่ 1	53
ผลการทดลองย่อยที่ 2	63
ผลการทดลองย่อยที่ 3	73
ผลการทดลองย่อยที่ 4	84
วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2.	96
ผลการทดลองที่ 3.	99
วิจารณ์ผลการทดลองที่ 3.	131
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	134
สรุป	134
ข้อเสนอแนะ	135
เอกสารอ้างอิง	136
ภาคผนวก	146

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหารพืช (nutrient solution)	32
2	แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน จำนวน isolates และศักยภาพการตรึงไนโตรเจน ตลอดจนจำนวนเซลต่อมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชที่คัดแยกได้จากรากหญ้าแฝกตามแหล่งต่างกัน	40
3	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการใช้แหล่งอาหารและพลังงานของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชที่คัดเลือกได้	43
4	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝกในสภาพปลอดเชื้อ	61
5	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความสูง (ซม.) และจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ในแต่ละสัปดาห์ ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน	64
6	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความยาวราก (ซม.) การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝกในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน	69
7	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝกในแต่ละสัปดาห์ ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน	74
8	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝกในแต่ละสัปดาห์ ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน	75
9	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความยาวราก (ซม.) การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝกในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน	80
10	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝกในแต่ละสัปดาห์ การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์ อายุเก็บเกี่ยว 120 วัน	85

สารบาญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ), ความยาวราก (ซม.), การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน	92
12	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 1 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	101
13	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 2 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	101
14	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 3 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	105
15	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 4 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	105
16	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 5 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	106
17	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 1 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	111
18	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 2 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	111
19	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 3 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	115
20	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 4 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	115
21	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 5 สัปดาห์ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	117
22	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความยาวราก (ซม.) ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	122
23	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งราก (กรัม) ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	122

สารบาญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
24	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งของต้นและใบ (กรัม) ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	125
25	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (กรัม) ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	125
26	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจน ในต้นหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	129
27	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดใน ในต้นหญ้าแฝก (กรัมไนโตรเจน) ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	129

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชจากรากหญ้าแฝก ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน	38
2	แสดงการเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ (single colony)	39
3	เปรียบเทียบศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน isolates แตกต่างกัน	42
4	เปรียบเทียบลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช isolates แตกต่างกัน	47
5	แสดงลักษณะรูปร่างเซลของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช isolates แตกต่างกัน	48
6	เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก การทดลองในสภาพปลอดเชื้อ	54
7	เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของรากหญ้าแฝกที่เกิดขึ้นใหม่ และการแตกรากฝอย ในการทดลองสภาพปลอดเชื้อ a) Control b) HL 1 c) LDS 3 d) CR 1 e) CR 3	56
8	เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของรากหญ้าแฝก และบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ในการทดลองสภาพปลอดเชื้อ	57
9	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ ของหญ้าแฝก ในการทดลองสภาพปลอดเชื้อ	62
10	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน) ของหญ้าแฝก	62
11	เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน	65
12	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการสะสมน้ำหนักแห้ง (กรัม) ในส่วนต่าง ๆ ของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน	70

สารบาญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน	71
14	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน) ของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน	72
15	เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก ในสภาพการทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน	76
16	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการสะสมน้ำหนักแห้ง (กรัม) ในส่วนต่าง ๆ ของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน	81
17	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝกในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน	82
18	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน) ของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน	83
19	เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน	86
20	เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณและความยาวของรากหญ้าแฝก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน	88
21	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการสะสมน้ำหนักแห้ง ในส่วนต่าง ๆ ของหญ้าแฝก ทดลองในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน	93
22	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝกในแต่ละระดับความยาวราก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน	94
23	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบหญ้าแฝก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์	95
24	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน) หญ้าแฝก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์	95

สารบาญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง ของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 1 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	102
26	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูงของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 2 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	102
27	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูงของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 3 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	107
28	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูงของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 4 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	107
29	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูงของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 5 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	108
30	เปรียบเทียบผลของการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกันต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก ภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ในสภาพกระถางทดลอง (a) uninoculation (b) CR 1 (c) CR 3 (d) LDS 3 (e) HL 2	109
31	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 1 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	112
32	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 2 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับที่ต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	112
33	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 3 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับที่ต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	116
34	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 4 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับที่ต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	116
35	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 5 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับที่ต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	118
36	เปรียบเทียบผลของการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกันต่อปริมาณและความยาวรากของรากหญ้าแฝกภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ในสภาพกระถางทดลอง (a) uninoculation (b) CR 1 (c) CR 3 (d) LDS 3 (e) HL 2	119

สารบาญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
37	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อความยาวราก ของหญ้าแฝกขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	123
38	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งของรากหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	123
39	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งของต้นและใบ ของหญ้าแฝกขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	126
40	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	126
41	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบ ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	130
42	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง	130

MAEJO UNIVERSITY

บทนำ

ในการเพาะปลูกพืชเพื่อให้ครบวัฏจักรของการเจริญเติบโตของพืช พืชทุก ๆ ชนิดจะต้องได้รับธาตุอาหารที่จำเป็นครบทั้ง 16 ธาตุ ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญมากธาตุหนึ่งสำหรับการเจริญเติบโตของพืชและหญ้าแฝก ซึ่งพืชต้องการในปริมาณที่มาก โดยที่ธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์พืชทุกชนิด เช่น กรดนิวคลีอิก, กรดอะมิโน ชนิดต่าง ๆ โคเอนไซม์, รงควัตถุหลาย ๆ ชนิด, ฮอร์โมนบางชนิด, ไวตามิน และโปรตีนฯลฯ (สมบุญ, 2538) แต่ส่วนใหญ่พืชยังขาดธาตุไนโตรเจน เพราะธรรมชาติของธาตุไนโตรเจนจะอยู่ในดินได้ในปริมาณที่ไม่มากนักและจะสูญเสียจากดินได้ง่ายโดยการชะล้าง (leaching) และกระบวนการ Denitrification แหล่งของธาตุไนโตรเจนที่มีในปริมาณมากคือ อยู่ในบรรยากาศในรูปของก๊าซไนโตรเจน (N_2) ถึง 78 เปอร์เซนต์ พืชจะไม่สามารถใช้ประโยชน์จากก๊าซไนโตรเจนได้โดยตรง เนื่องจากพืชจะใช้ไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์โดยพืชส่วนใหญ่จะดูดไนเตรท และแอมโมเนียที่อยู่ในดินเข้าไปในรากพืช โดยทั่วไปแล้วในการเพาะปลูกพืชสามารถที่จะเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้แก่ดินโดยการใส่ปุ๋ยเคมี แต่พืชสามารถใช้ประโยชน์จากธาตุไนโตรเจนได้เพียงบางส่วนเท่านั้นส่วนที่พืชไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ก็จะสูญเสียไปโดยกระบวนดังกล่าวข้างต้น ในปัจจุบันราคาของปุ๋ยเคมีมีราคาสูงทำให้ต้นทุนในการผลิตของเกษตรกรสูงขึ้น เกษตรกรจึงลดการใช้ปุ๋ยเคมีจึงทำให้คุณภาพของผลผลิตและผลผลิตลดต่ำลง จึงมีการคิดหาแนวทางที่จะลดต้นทุนการผลิตโดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจน เพื่อเพิ่มผลผลิตของพืชและทดแทนการใส่ปุ๋ยเคมี ได้แก่ การคลุกเชื้อไรโซเบียมในการปลูกถั่ว, การเลี้ยงแหนแดงในนาข้าว หรือการนำแหนแดงไปใช้เป็นปุ๋ยพืชสดเพื่อเพิ่มไนโตรเจนให้แก่พืชปลูก ออมทรัพย์ (2539) รายงานว่ามีจุลินทรีย์ในดินหลายชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นธาตุไนโตรเจนในเซลล์พืช ส่วนหนึ่งของธาตุไนโตรเจนก็ได้จากการที่จุลินทรีย์สามารถดูดซับธาตุด้วยตัวเอง อีกส่วนหนึ่งจะปลดปล่อยในรูปไนเตรท (nitrate) เพื่อให้พืชนำไปใช้ได้จุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจนร่วมกับพืชจึงมีประโยชน์มากในการผลิตพืช เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถที่จะนำเอาไนโตรเจนจำนวนมากจากบรรยากาศลงสู่ดินและพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ งานวิจัยในเรื่องนี้ได้มีการตั้งสมมุติฐานว่าหญ้าแฝกน่าจะมีจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนบางชนิดอาศัยอยู่ร่วมกับรากหญ้าแฝกโดยอาศัยแหล่งพลังงานและอาหาร จากรากหญ้าแฝก และจุลินทรีย์กลุ่มนี้ก็สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศให้กับพืชหรือต้นหญ้าแฝก และดินได้

วัตถุประสงค์

การศึกษาอิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแฝกมีวัตถุประสงค์ของการทดลองดังนี้ :-

1. เพื่อศึกษาคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช ซึ่งพบจากตัวอย่างรากหญ้าแฝก

2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพการตรึงไนโตรเจน ของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืชชนิดต่าง ๆ ที่คัดเลือกได้มาจากรากหญ้าแฝกโดยอาศัยเทคนิควิธี Acetylene Reduction Activity (ARA)

3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช ต่างชนิดกันต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก

4. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่มีระดับเข้มข้นต่างกัน ต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับหญ้าแฝก

2. ทราบถึงข้อมูลต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของหญ้าแฝกภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้จากรากหญ้าแฝกในสภาพธรรมชาติ

3. ผลจากการศึกษาทดลองที่ได้นี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ ในการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ในการทำปุ๋ยชีวภาพ จากเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเหล่านี้

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างรากหญ้าแฝก และทำการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชจากรากของหญ้าแฝกในสภาพธรรมชาติ ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย

2. นำเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ใส่ให้แก่หญ้าแฝกเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของหญ้าแฝกในด้านต่าง ๆ เช่น การพัฒนาด้านความสูง, จำนวนต้นต่อกอ และการพัฒนาด้านการสะสมมวลชีวภาพ ตลอดจนศักยภาพการตรึงไนโตรเจน ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญของธาตุไนโตรเจน

ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารพืชที่มีความสำคัญมากที่สุดธาตุหนึ่ง และดินส่วนใหญ่ของประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนชื้นมักขาดธาตุไนโตรเจน หรือมีปริมาณธาตุไนโตรเจนที่ค่อนข้างต่ำมาก เนื่องจากธาตุไนโตรเจนสูญเสียไปจากดินได้ง่าย โดยกระบวนการทางชีวะเคมีที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ดิน การชะล้างไปจากดิน สูญเสียไปกับการเก็บเกี่ยวผลผลิตของพืช และการทำการเกษตรกรรมโดยขาดการปรับปรุงโครงสร้างและความอุดมสมบูรณ์ของดิน ในบรรยากาศของโลกมีธาตุไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของก๊าซ มากถึง 78 เปอร์เซนต์ ซึ่งพืชและหญ้าแฝกไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงต้องอาศัยจุลินทรีย์ดินกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนในรูปที่พืชและหญ้าแฝกสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อการเจริญเติบโต กระบวนการดังกล่าวนี้เรียกว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (biological nitrogen fixation)

ขอบเขตและความหมายของกระบวนการตรึงไนโตรเจน

ไพเราะ (2520) กล่าวถึงกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพนั้นหมายถึง กระบวนการทางชีวะเคมีที่จุลินทรีย์ดินเปลี่ยนแปลงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นแอมโมเนียมไอออน โดยใช้พลังงานในรูปของ ATP และ Reducing Power มีเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แอมโนเนียมที่ผลิตได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนจะถูกใช้เป็นแหล่งกำเนิดของโปรตีนของสิ่งมีชีวิตในโลก ณัฐพร (2534) ได้กล่าวถึงการตรึงไนโตรเจนว่าเป็นกระบวนการที่สลับซับซ้อน อาศัยปฏิกิริยาที่สำคัญหลายปฏิกิริยา เช่น การสร้าง ATP, จากการขนส่งอิเลคตรอน และการตรึงไนโตรเจนเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจน (N_2) ให้เป็นอนุมูลแอมโมเนียโดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) และสมศักดิ์ (2541) ให้ความหมายของกระบวนการตรึงไนโตรเจน คือ การเปลี่ยนแปลงรูปของไนโตรเจนจากก๊าซไนโตรเจน (N_2) ในบรรยากาศ ในดิน และในน้ำ ให้อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ ไนโตรจีเนส (nitrogenase) โดยสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกส่วนใหญ่จะเป็นกรดอะมิโน (amino acid) ซึ่งได้แก่

แอสปาราจิน (asparagin) กลูตามิน (glutamin) แต่บางชนิดของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนอาจอยู่ในรูปของยูริไอด์ (ureide)

ประเภทและลักษณะของการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ดินบางชนิด

มีจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีเอนไซม์ไนโตรจีเนส สามารถใช้พลังงานในรูปของ ATP และ Reducing Power จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นพวก Prokaryote ได้แก่ แบคทีเรีย, สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน, แอคติโนมัยซีส และไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยรวมแล้วประมาณ 70 ล้านตันต่อปี มีปริมาณการผลิตมากกว่าโรงงานอุตสาหกรรม ถึง 3 เท่า บรรหาร และคณะ (2528) กล่าวถึงการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพในพืชตระกูลถั่ว ซึ่งเป็นผู้สร้างและรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินมาตั้งแต่เริ่มแรกของการทำกสิกรรม ตั้งแต่มีการปรับปรุงเทคนิคในการวิเคราะห์ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน เช่น การกลั่น, การใช้ ^{15}N และการใช้เทคนิควิธี Acetylene Reduction Activity ทำให้เราทราบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มากขึ้น จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้นั้นได้แก่ แบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แบคทีเรียชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช เช่น ไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว, แอคติโนมัยซีสกับสนปฏิพัทธ์ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อาศัยร่วมกับพืชในลักษณะอยู่บริเวณรากพืช, บนต้น, บนใบพืช และอยู่ร่วมกัน เช่น lichen (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกับรา) การอยู่ร่วมกันในลักษณะที่เป็นปรกติ คือที่จะใช้ธาตุไนโตรเจน แต่มีความแตกต่างกันในเรื่องของส่วนประกอบทางกายภาพ และลักษณะทางกรรมพันธุ์ของเชื้อและพืช

จุลินทรีย์ดินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มีทั้ง แบคทีเรีย, สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และ แอคติโนมัยซีส (เศรษฐา, 2529) จุลินทรีย์เหล่านี้ถ้าจะแบ่งตามลักษณะความสัมพันธ์ของกระบวน การตรึงไนโตรเจนกับพืชสามารถที่แบ่งได้ 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1. กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้ต่อเมื่ออาศัยร่วมกับพืช (symbiotic nitrogen fixation) เช่น เชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว, สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกับแหนแดง และแอคติโนมัยซีส กับสนปฏิพัทธ์

กลุ่มที่ 2. กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (free living nitrogen fixation) เช่น *Azotobacter sp*, ฯลฯ

กลุ่มที่ 3. กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนแบบสัมพันธ์กับพืช (associative nitrogen fixation) เช่น *Azospirillum sp*. กับพืชตระกูลหญ้า (Dobereiner and Day 1976 ; Patriqiun *et al*., 1983)

เศรษฐา (2529) ได้ให้ความหมายของการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และการตรึงไนโตรเจน แบบสัมพันธ์กับพืช ดังนี้

การตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (free living nitrogen fixation) หมายถึง กระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศโดยแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งมีชีวิตอยู่อย่างอิสระโดยไม่ต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Dobereiner and Day, 1975)

การตรึงไนโตรเจนแบบสัมพันธ์กับพืช (associative nitrogen fixation) หมายถึง กระบวนการตรึงไนโตรเจนซึ่งมีความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระกับรากพืช โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะอาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบ ๆ ราก และบนผิวของราก หรือในเนื้อเยื่อของรากพืช การอาศัยอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระกับรากพืชที่ไม่มีโครงสร้างพิเศษ (เกิดเป็นปม) เหมือนกับเช่นเชื้อไรโซเบียมกับปมรากพืชตระกูลถั่ว (Dobereiner and Day, 1976 ; Patriquin *et al*., 1983)

กระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพของหญ้าแฝก น่าจะเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ดินในกลุ่มที่มีการตรึงไนโตรเจนแบบสัมพันธ์กับพืช และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ โดยมีการให้ความหมายของกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพของหญ้าแฝก (associative biological nitrogen fixation in vetiver grasses) หมายถึง กระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวะเคมีที่แบคทีเรียในกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบ ๆ ราก, บนผิวรากและในเนื้อเยื่อของรากหญ้าแฝกแล้วทำการเปลี่ยนแปลงก๊าซไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียมไอออนหรือสารประกอบไนโตรเจนซึ่งเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก ความสัมพันธ์และการอยู่อาศัยร่วมกับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับรากหญ้าแฝกนั้นไม่มีโครงสร้างพิเศษ (การสร้างปม) เหมือนเช่นความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับปมรากพืชตระกูลถั่ว นอกจากนั้นแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวยังสามารถสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตให้แก่รากหญ้าแฝกอีกด้วย (เศรษฐา และคณะ, 2539)

ความสำคัญของกระบวนการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช

การศึกษาค้นคว้าถึงกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพแบบสัมพันธ์กับพืชในระบบการปลูกพืชนั้นมีวัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้ปุ๋ยสำหรับการเกษตรกรรมของประเทศที่พัฒนาแล้ว และเพิ่มประมาณธาตุไนโตรเจนสำหรับการปลูกพืชของประเทศเกษตรกรรมที่กำลังพัฒนาซึ่งมีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงเล็กน้อย หรือไม่มีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนเลย

ตลอดจนเป็นการลดปัญหาทางด้านมลพิษที่เกิดจากปุ๋ยเคมีไนโตรเจนต่อสิ่งแวดล้อม และสุขภาพของมนุษย์ ถึงแม้ผลงานการศึกษาทางด้านการตรึงไนโตรเจนของธัญพืช และพืชตระกูลหญ้าที่มีอยู่ในขณะนี้ไม่มากพอที่จะทำให้เราเข้าใจถึงระบบการตรึงไนโตรเจนได้อย่างละเอียดเหมือนเช่นความสัมพันธ์ระหว่างพืชตระกูลถั่วกับเชื้อไรโซเบียม แต่ในปัจจุบันได้มีการระดมกำลังความคิดเพื่อศึกษาค้นคว้าถึงการตรึงไนโตรเจนของธัญพืชและพืชตระกูลหญ้าให้มากขึ้น เพื่อที่เราจะได้เข้าใจถึงระบบดังกล่าวได้มากขึ้น

Vose (1983) รายงานว่าใน 17 เปอร์เซนต์ของธาตุไนโตรเจนที่อยู่ในน้ำหนักแห้งของอ้อยในประเทศบราซิลนั้นได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน จึงประมาณการว่ากระบวนการชดเชยค่าใช้จ่ายสำหรับซื้อปุ๋ยไนโตรเจนทั้งประเทศไม่น้อยกว่า 26.5 ถึง 39 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี ในทำนองเดียวกันมีรายงานว่าประเทศในแถบร้อนและร้อนชื้นที่สามารถผลิตข้าวฟ่าง และมิลเลท ถึง 60 และ 90 เปอร์เซนต์ ของผลผลิตทั้งหมดในโลกซึ่งคิดเป็นพื้นที่ปลูกประมาณ 70 ล้านเฮกตาร์ แม้พืชทั้ง 2 ชนิด จะตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน แต่ในสภาพความเป็นจริงแล้วผลผลิตที่ได้เกือบทั้งหมดไม่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน หรือใช้เพียงเล็กน้อย พืชอาศัยแต่เพียงธาตุไนโตรเจนที่สะสมอยู่ในอินทรีย์วัตถุของดิน รวมทั้งกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพเท่านั้น ถ้าระบบการตรึงไนโตรเจนในพื้นที่ปลูกข้าวฟ่าง และมิลเลท สามารถใช้ปุ๋ยไนโตรเจนได้ 10 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ แล้วชาวไร่ในประเทศอินเดียก็สามารถประหยัดเงินซื้อปุ๋ยไนโตรเจนถึง 5.3 ล้านเหรียญสหรัฐ และหาก 10 เปอร์เซนต์ของไนโตรเจนที่พืชได้มาจากการตรึงไนโตรเจนจะสามารถลดค่าใช้จ่ายในการซื้อปุ๋ยไนโตรเจนได้ถึง 3 พันล้านเหรียญสหรัฐ

ข้าวซึ่งปลูกในประเทศแถบทวีปเอเชีย โดยเฉพาะเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ไม่มีการใช้ปุ๋ย ไนโตรเจนเลยหรือใช้เพียงเล็กน้อยแต่ผลผลิตข้าวก็ไม่ได้ลดต่ำลง แม้ว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พวกที่ตรึงไนโตรเจนได้จะมีความสำคัญอย่างมากกับดินปลูกข้าว แต่กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นกับรากข้าว ซึ่งสามารถตรวจวัดได้นั้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช ที่พบจากรากข้าวก็มีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตข้าว (Watanabe and Lee, 1977) Yoshida and Ancajas (1971) รายงานว่า ข้าวมีการตรึงไนโตรเจนได้ตั้งแต่ 3 ถึง 63 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ต่อฤดูปลูก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Balandreau *et al.* (1976) ที่ว่าข้าวตรึงไนโตรเจนได้ถึง 70 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์

หญ้าบาเฮีย (*Paspalum notatum*) สามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 60 กิโลกรัมไนโตรเจน ต่อเฮกตาร์ต่อปี (Dobereiner and Day, 1976) และจากการศึกษาของ Wright (1980) พบว่าในพื้นที่ปลูกหญ้าเลี้ยงสัตว์ในมลรัฐเท็กซัสนั้นมีการตรึงไนโตรเจนถึง 33 กิโลกรัม

ไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ ในเวลา 100 วัน เช่นเดียวกับ Vose *et al.* (1982) รายงานว่า 30 เปอร์เซนต์ของปริมาณไนโตรเจนที่สะสมในหญ้าซูดาน ได้มาจากการตรึงไนโตรเจนคิดเป็นปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนต่อพื้นที่ได้ถึง 17 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ นอกจากนี้ Day *et al.* (1975) รายงานเกี่ยวกับการพบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในรากของหญ้าอาหารสัตว์ในประเทศต่าง ๆ เช่น พบในหญ้า *Pennisetum purpureum* ในประเทศบราซิล และหญ้า *Andropogus gayanus* ในประเทศไนจีเรีย

จากการศึกษาและคาดคะเนถึงระบบการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืชดังกล่าวมาข้างต้น ทำให้มองเห็นถึงความสำคัญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับระบบการผลิตทาง การเกษตรกรรม และสิ่งแวดล้อม เพราะปุ๋ยเคมีไนโตรเจนมีแนวโน้มว่าราคาจะสูงขึ้นอีกตลอดจน ผลกระทบของการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนกับสิ่งแวดล้อม การนำเอาแบคทีเรียกลุ่มนี้มาพัฒนาและประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ จึงมีคุณค่าทางเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อมอย่างมาก แม้ว่าหญ้าแฝกไม่มีผลกระทบทางตรงต่อมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์การเกษตร แต่ในทางอ้อมหรือผลกระทบทางด้าน อื่น ๆ นั้นหญ้าแฝกเป็นตระกูลหญ้าชนิดหนึ่งที่เรียกว่า พืชมหัศจรรย์ ที่จำเป็นต้องวิจัยศึกษาค้นคว้าอย่างยิ่งไม่เพียงแต่เฉพาะกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพของหญ้าแฝกเท่านั้น โครงการต่าง ๆ ที่ได้ดำเนินงานที่ผ่านตลอดจนที่จะดำเนินงานในอนาคตนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อระบบการผลิตพืช, ระบบการปลูกพืช, การอนุรักษ์ดินและน้ำ, รวมถึงการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติของประเทศไทยและในโลก

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช

1. *Azotobacter sp.* เป็นแบคทีเรียที่มีเซลขนาดใหญ่ รูปร่างกลมรี สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อมและอายุของเซล เซลอยู่เป็นคู่หรือเป็นกลุ่มก้อน เซลมีการสร้าง cysts ในการเคลื่อนที่จะใช้ flagella แบบ peritrichous ส่วนการหายใจเป็นแบบ aerobic เซลย้อมติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ใช้สารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำตาล แอลกอฮอล์ และเกลืออินทรีย์ ในการเจริญเติบโต มีการตรึงไนโตรเจนเป็นแบบ non-symbiotic มีช่วง pH ของการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 4.8-8.5 เซลของเชื้อ *Azotobacter sp.* จะสร้างโคโลนี เป็นสีเหลืองหรือ สีน้ำตาล หรือสีดำ เราสามารถพบเชื้อ *Azotobacter sp.* ได้ทั้งในน้ำและดินสามารถแบ่งเชื้อ *Azotobacter sp.* ออกได้เป็น 6 species ได้แก่ *A. beijerinckii, A. chroococcum, A. paspali, A. vinelandii, A. nigricans* และ *A. armeniacus* (John *et al.*, 1994)

2. *Beijerinckia sp.* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเซลกลมรี หรือเป็นท่อนสั้น ๆ เซลอาจเป็นเซลเดี่ยว ๆ หรือเป็นเซลคู่ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella บางครั้งเคลื่อนที่ไม่ได้ เซลย้อมติดสีแกรมลบ เซลเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน จะมีการสร้างเมือก (slime) เหนียวและยืดหยุ่น ผิวหน้าโคโลนีอาจเรียบหรือพับไปมาเป็นริ้ว ๆ สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose, fructose และ sucrose เป็นแหล่งอาหาร และพลังงาน พบในเขตร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส เซลของเชื้อสามารถทนทานต่อความเป็นกรดจัด ที่มี pH 3 หรือความเป็นด่างจัด pH 10 ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อ *Beijerinckia sp.* ออกได้เป็น 4 Species ได้แก่ *B. indica, B. derxii, B. mobilis* และ *B. fluminensis* (John *et al.*, 1994)

3. *Azospirillum sp.* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างเซลกลมรี แท่งสั้น ๆ หรือโค้งงอจนถึงเป็นเกลียว สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella ที่อยู่ด้านท้ายเซล เซลย้อมติดสีแกรมลบ เซลเมื่อมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนสีโคโลนีเป็นสีต่าง ๆ เช่น ชมพู, แดง, เหลือง และสีขาว เชื้อ *Azospirillum sp.* นี้จะอาศัยอยู่บริเวณรากพืช หรืออยู่ร่วมกับรากพืช (rhizosphere) โดยเฉพาะพืชตระกูลหญ้าพบในดินเขตร้อนมากกว่าเขตอบอุ่น (Dobereiner and De-Polli,1980) ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อ *Azospirillum sp.* ออกได้เป็น 5 species ได้แก่ *A. brasilenes, A. lipoferum, A. irakense, A. amazomense* และ *A. halopraeferens* (John *et al.*, 1994)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Azospirillum sp.* คือ ระหว่าง 34-37 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมของเชื้อบางชนิดเจริญเติบโตได้ที่ pH 7.0 เชื้อบางชนิดชอบสภาพที่เป็นกรด การตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย

Bothe *et al.* (1985) รายงานว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจน และกระบวนการ Denitrification ซึ่งเกิดขึ้นจากกิจกรรมของเชื้อ *Azospirillum sp.* จะเกิดขึ้นได้ดีนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับระดับของออกซิเจน แล้วยังขึ้นอยู่กับระดับของไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อเชื้ออีกด้วย

4. *Klebsiella sp.*เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างลักษณะเป็นท่อน เป็นเซลเดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ ๆ หรืออาจเป็นสายสั้น ๆ เซลมีการสร้าง capsule เซลย้อมติดสีแกรมลบ ไม่มีการเคลื่อนที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตประมาณ 37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (KCN) ได้ ซึ่งส่วนใหญ่พบในมูลสัตว์, ดิน, น้ำ และเมล็ดพันธุ์พืช เราสามารถแบ่งเชื้อ *Klebsiella* ออกได้เป็น 6 spceies ได้แก่ *K. oxytoca, K. pneumoniae, K. terrigena,*

K. planticola, *K. pneumoniae subsp. rhinoseleromatis* และ *K. pneumoniae subsp. ozaenae* (John *et al.*, 1994)

5. *Azomonas sp.* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างลักษณะของเซลกลม และกลมรี มักพบเป็นเซลเดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ บางครั้งพบเป็นกลุ่ม เซลย้อมติดสีแกรมลบ เชื้อ *Azomonas sp.* จะไม่สร้าง endospore หรือ flagella โคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนเป็นสีขาวใส โดยเฉพาะอยู่ภายใต้แสง Ultraviolet เราสามารถแบ่งเชื้อ *Azomonas sp.* ออกได้เป็น 3 species ด้วยกันคือ *A. insignis*, *A. agilis* และ *A. macrocytogenes* (Buchanan and Gibbons, 1974 ; John *et al.*, 1994)

6. *Enterobacter sp.* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรง เซลย้อมติดสีแกรมลบ การเคลื่อนที่จะใช้ flagella ที่เป็นแบบ peritrichous (ยกเว้น *E. asburiae*) การหายใจเป็นแบบ facultativily anaerobic อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต อยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส สามารถที่จะย่อยสลาย glucose และคาร์โบไฮเดรตอีกหลายชนิดได้พร้อมกัน ทุกสายพันธุ์ส่วนใหญ่จะพบกระจายทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในน้ำจืด, ดิน, น้ำเสีย, พืช, ผัก, สัตว์ และแม้กระทั่งในมูลคน พบว่ามีอยู่หลาย species ที่เป็นพาหะของโรคในคน เช่น *E. cloacae*, *E. sakazakii*, *E. areogenes*, *E. agglomerans* และ *E. gergoviae* (John *et al.*, 1994)

ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช

Azotobacter sp.

พบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพอิสระโดยเฉลี่ยประมาณ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนจากก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศต่อการใช้คาร์โบไฮเดรต 1 กรัม (Buchanan and Gibbons, 1974) เศรษฐา และคณะ (2528) รายงานว่าเชื้อ *Azotobacter sp.* ที่คัดเลือกได้จากบริเวณรากอ้อยสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 480-1,210 nmol C_2H_4/mg. protein/day Tilak *et al.* (1982) รายงานว่าการใส่เชื้อ *Azotobacter chroococcum* ให้กับข้าวโพดทำให้ผลผลิตของข้าวโพดเพิ่มขึ้น 16.1 เปอร์เซนต์ การใส่เชื้อ *Azotobacter sp.* ให้กับข้าวโพดทำให้ปริมาณไนโตรเจน, พื้นที่ใบ, ปริมาณ chlorophyll, carotenoid ในใบและน้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพดทั้งหมดเพิ่มขึ้น

(Zora *et al.*, 1984) Wong and Stenberg (1979) รายงานว่ารากข้าวฟ่างมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ระหว่าง 11-61 nmol C_2H_4/กรัมรากแห้ง/ชั่วโมง การใส่เชื้อ *Azotobacter chroococcum* ให้แก่ข้าวฟ่างทำให้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น 6.2 เปอร์เซนต์ และจากรายงานผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Azotobacter sp.* ที่แยกได้จากบริเวณรากข้าวโพดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ ในส่วนของหญ้า *Paspalum notatum* มีเชื้อ *Azotobacter paspali* อาศัยอยู่บริเวณราก และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 15-93 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ต่อปี ในประเทศไทยได้ทำการทดลองพบว่าการใช้เชื้อ *Azotobacter sp.* ร่วมกับการปลูกข้าวโพดทั้งในสภาพกระถางทดลองและแปลงทดลองข้าวโพดเจริญเติบโตได้ดีกว่าการไม่ใส่เชื้อ ส่วนการปลูกข้าวฟ่างและข้าวเมื่อใส่เชื้อ *Azotobacter sp.* แล้ว ผลผลิตก็จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน (บรรหาร และคณะ, 2528)

Beijerinckia sp.

พบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 18 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อการใช้น้ำตาลกลูโคส 1 กรัม (Becking, 1978) เศรษฐา และคณะ (2528) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Beijerinckia sp.* ที่คัดเลือกได้จากบริเวณรากอ้อยสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 28-1,102 nmol C_2H_4/mg. protein/day สำหรับในประเทศบราซิล พบว่าบริเวณรากขนอ่อนของอ้อยมีเชื้อ *Beijerinckia sp.* อาศัยอยู่จะมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ 1-5 nmol C_2H_4/mg. protein/day /กรัมดิน หรือ 5.5 nmol C_2H_4/กรัมรากสด/ชั่วโมง (Doberiener *et al.*, 1972a) ประเมินได้ว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 2 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ต่อปีในบริเวณรากอ้อย Manjunath *et al.* (1981) พบว่าการใส่เชื้อ *Beijerinckia sp.* ให้กับต้นหอม (*Allium cepa*) ทำให้น้ำหนักแห้งและปริมาณธาตุไนโตรเจนของต้นหอมเพิ่มขึ้น มีรายงานว่าพบเชื้อ *Beijerinckia sp.* ค้นพบครั้งแรกในปี 1939 โดย Starkey and De โดยมีทดลองการใส่เชื้อ *Bijerinckia sp.* ให้กับข้าวร่วมกับการใส่ปุ๋ยยูเรีย (Balasundaram and Sen, 1971)

Azomonas sp.

พบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนจากก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศอย่างต่ำได้ประมาณ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อการใช้คาร์โบไฮเดรต 1 กรัม (Buchanan and Gibbons, 1974) เศรษฐา และคณะ (2528) รายงานว่ามีเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อ *Azomonas sp.* มีการตรึงไนโตรเจน อยู่ระหว่าง 8.84 - 15.54 nmol C_2H_4/mg. protein/day

Azospirillum sp.

ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อนี้ Dobereiner and De-Polli (1980) รายงานว่าเชื้อ *Azospirillum lipoferum* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 20-50 มิลลิกรัมไนโตรเจนจากก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศต่อการใช้น้ำตาลกลูโคส 1 กรัม ส่วนเชื้อ *Azospirillum brasilense* สามารถตรึงไนโตรเจน ได้ประมาณ 15-90 มิลลิกรัมไนโตรเจน จากก๊าซไนโตรเจนต่อการใช้ lactate 1 กรัม เชื้อ *Azospirillum brasilense* สามารถตรึงไนโตรเจนซึ่งวัดโดยวิธี Acetylene Reduction Activity อยู่ระหว่าง 26-1,018 nmol C_2H_4/mg. protein/day ส่วนเชื้อ *Azospirillum lipoferum* มักจะอาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชที่มีการสังเคราะห์แสงแบบ C-4 และ C-3 เช่น ข้าว ข้าวสาลี และ หญ้า (Wong and Stenberg, 1979 ; Nur *et al.*, 1980) Singh *et al.* (1980) รายงานว่าการคลุกเชื้อ *Azospirillum sp.* ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30, 45 และ 90 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ ให้กับข้าวฟ่างจะให้ผลผลิตสูงกว่าการใส่ปุ๋ยเพียงอย่างเดียว Reynder and Vlassak (1982) รายงานว่าการคลุกเชื้อ *Azospirillum brasilense* ให้แก่ข้าวสาลีจะทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 9.14 ถึง 14.8 เปอร์เซนต์ แต่ก็แตกต่างที่พันธุ์ของข้าวสาลีด้วย Rinaudo *et al.* (1981) รายงานว่า ผลของการใส่เชื้อ *Azospirillum sp.* ที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าว จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ, พันธุ์ข้าว และชนิดของดินด้วย การใส่เชื้อ *Azospirillum sp.* ให้แก่ข้าวโพดนั้นทำให้น้ำหนักแห้งปริมาณไนโตรเจนทั้งของต้นข้าวโพดมีปริมาณมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (Nur *et al.*, 1980 ; O ' Hara *et al.*, 1981) Lin *et al* . (1983) พบว่าเชื้อ *Azospirillum sp.* ช่วยทำให้ข้าวโพดสามารถใช้ไนเตรท, โปแตสเซียม และฟอสฟอรัส มากกว่าการไม่ใส่เชื้อถึง 30-50 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีผลทำให้ผลผลิตคิดเป็นน้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพดเพิ่มขึ้น 20-30 เปอร์เซนต์

Schank *et al.* (1981) รายงานว่าการคลุกเชื้อ *Azospirillum sp.* ให้แก่หญ้า Digit grass (*Digitaria sp.*) ทำให้น้ำหนักแห้งของหญ้าเพิ่มขึ้น 8.5-23 เปอร์เซนต์ Smith *et al.* (1976) พบว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum sp.* ให้หญ้า Guinea (*Panicum miaximum*) และ Pearl millet (*Pennisetum americamum*) มีผลผลิตน้ำหนักต้นหญ้าที่เพิ่มมากขึ้น แม้ว่าในบางครั้งอัตราการตรึงไนโตรเจนของหญ้าไม่สูงก็ตาม ซึ่งผลผลิตของหญ้าที่เพิ่มมากขึ้นนั้นอาจจะเกิดจากสารเร่งการเจริญเติบโตที่เชื้อสร้างขึ้น Malik and Zafar (1985) พบว่า 50-70 เปอร์เซนต์ของไนโตรเจนทั้งหมดที่อยู่ในต้นหญ้า Kallar นั้นได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azospirillum sp.* ซึ่งใส่ให้แก่หญ้า Kallar

เทคโนโลยีชีวภาพกับการตรึงไนโตรเจน

เทคโนโลยีชีวภาพ หมายถึง การนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์สาขาต่างๆ เช่น พันธุศาสตร์ จุลชีววิทยา ชีวเคมี เกษตรศาสตร์ และอื่นๆ มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อคุณภาพชีวิตและสิ่งแวดล้อมของมนุษย์ชาติ

เทคโนโลยีชีวภาพกับการเกษตรโดยเฉพาะทางด้านพืช ส่วนใหญ่นำมาใช้ในด้านงานปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งหมายถึง การใช้ความรู้หรือเทคนิควิธีเพื่อรักษาสิ่งมีชีวิต ชิ้นส่วนของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะสารพันธุกรรม (DNA, deoxyribonucleic acid) หรือยีน (gene) หรือ โครโมโซม (chromosome) ตลอดจนเซลพืช มาชักนำให้เกิดการรวมตัวกับสารพันธุกรรมของเซลพืชอีกชนิดหนึ่งหรือต่างชนิดกัน เพื่อสร้างเป็นสายพันธุ์พืชขึ้นใหม่ โดยมีเป้าหมายว่าสามารถให้ผลผลิตตลอดจนคุณภาพทางการเกษตรดีขึ้นกว่าเดิม เทคโนโลยีชีวภาพกับงานทางด้านชีววิทยาก็เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้งแบบอาศัยร่วมกับพืช (symbiotic nitrogen fixer) แบบอิสระ (free living nitrogen fixer) และแบบสัมพันธ์กับพืช (associative nitrogen fixer) ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาได้มีการศึกษาทดลองกันอย่างจริงจัง เพื่อที่จะเปรียบเทียบพันธุกรรมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเหล่านี้ ให้มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนให้มากยิ่งขึ้น เพื่อจะได้มีประโยชน์ต่อพืชปลูกต่อไป

โครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ปัจจัยสำคัญทางพันธุกรรมของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน คือ ยีนตรึงไนโตรเจน (nif gene) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างปมราก (nod gene) ซึ่งยีนทั้ง 2 ชนิดนี้จะต้องมีโครงสร้าง (structure) การแสดงออก (expression) และการควบคุม (regulation) ที่แตกต่างกัน

1. โครงสร้างของยีนตรึงไนโตรเจน (nif gene) ในช่วงเวลา 20 ปีที่ผ่านมาการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับยีนที่ตรึงไนโตรเจนกันมาก พบว่ามียีนตรึงไนโตรเจนทั้งหมด 19 ยีนซึ่งมีความสัมพันธ์กันในระหว่างการแปรรหัส (transcription) สามารถแบ่งออกได้ 8 หน่วย รวมความยาว 8 Kb ในบรรดา 19 ยีนมีอยู่ 6 ยีน ได้แก่ nif W, S, U, X และ Y ที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอนและ nif Z ยีนผลิตสารควบคุมการทำงาน (maturation) ของโปรตีน MoFe นั้นก็ยังไม่สามารถยืนยันได้ เนื่องจากชนิดของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมีมายมาย โครงสร้างของยีนจึงแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็

ตามจะมี nif H, D และ K เป็นโครงสร้างพื้นฐานอยู่เสมอในกระบวนการตรึงไนโตรเจน ส่วนยีนชนิดอื่น ๆ ก็จะแตกต่างไปตามชนิดของแบคทีเรีย

2. การแสดงออกของยีนตรึงไนโตรเจน การตรึงไนโตรเจนจะมีเอนไซม์อยู่ 2 ชนิด คือ dinitrogenase (MoFe protein, molybdoredoxin) และ dinitrogenase reductase (Fe protein, azoferredoxin) dinitrogase คือตำแหน่งที่เกิด NH_3 และ reduction โดยเกิดจากการรวมตัวของ nif D สองตัวเกิดเป็น peptide (แอลฟ่า : α) และ nif K สองตัวเกิดเป็น peptide (เบต้า : β) เรียงต่อเป็น แอลฟ่าสอง เบต้าสอง ($\alpha_2 \beta_2$) นอกจากนี้ยังมี MoFe cofactor เป็นตังเร่งปฏิริยา MoFe cofactor เกิดจากการรวมตัวระหว่าง Mo Fe และ S ในอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วเข้าสู่ปฏิกิริยา dinitrogenase โดยผ่านยีน 5 ชนิดคือ nif Q, B, U, E และ N เป็นตัวควบคุม dinitrogenase reductase เกิดจาก nif H สองยีนรวมตัวกันเป็น peptide และผ่านสารประกอบจากยีน nif M แล้ว modification ให้อยู่ในรูป activate modification นั้นเกิดจากโปรตีนที่มี Fe และ S เป็นตัวช่วยในระหว่างการตรึงไนโตรเจนจำต้องมีอิเล็คตรอน 6 ตัว รวมกับโปรตรอน 6 ตัว เพื่อเกิด N_2 แล้วค่อยปล่อยเป็น NH_3 ใน *K. pneumoniae* อิเล็คตรอนได้จาก pyruvate แล้วผ่านสารประกอบ pyruvate flovodoxin oxidoreductase จากยีน nif J และผ่าน flavodoxin จากยีน nif F หลังจากนั้นผ่านขั้นตอนต่าง ๆ อีก 8 ขั้นตอน แต่ละขั้นตอนใช้ ATP 2 โมเลกุล แล้วเปลี่ยนเป็น dinitrogenase reductase และ dinitrogenase ในที่สุดจึงให้ N_2

3. ยีนควบคุม (gene regulation) แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะแสดงการตรึงไนโตรเจนหรือไม่นั้นเกิดจากปริมาณ NH_3 หรือ O_2 ในสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยสำคัญดังนี้

3.1 RNA polymerase การแสดงออกของยีนตรึงไนโตรเจนตรึงแบคทีเรียไนโตรเจนส่วนมากจะมีลำดับของกรดนิวคลีอิกที่คล้าย ๆ กัน โดยเฉพาะที่ตำแหน่งต้น ๆ ของยีนตรึงไนโตรเจน ระหว่าง 12 bp – 24 bp เรียกว่า -12 GC และ - 24 GC RNA polymerase ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ประกอบด้วยส่วนประกอบที่พิเศษคือ $_{6}54$ (เป็นสารประกอบจากยีน ntr A) เมื่อผ่าน $_{6}54$ สามารถบอกได้ว่าลำดับยีนตรึงไนโตรเจนอยู่บนตำแหน่งใด จากการศึกษาพบว่ายีน nif A ไม่มีผลกระทบจากความเข้มข้นของ NH_3 หรือ O_2 ระหว่างการตรึงไนโตรเจน ดังนั้น RNA polymerase ไม่ได้เป็นตัวควบคุมยีนตรึงไนโตรเจนทั้งหมด

3.2 ตัวกระตุ้น (activator) ยีน nif A และ nif L ที่ตำแหน่งต้น ๆ ของยีนตรึงไนโตรเจน ระหว่าง 100-200 bp จะมีบริเวณที่สำคัญคือ TGT- N_{10}-ACA เรียกว่าลำดับตัวกระตุ้นด้านบน (upstream activator sequence , UAS) พบว่ามีความสัมพันธ์กับยีนตรึงไนโตรเจนอย่างลึกซึ้ง ยีน A, UAS และ $_{6}$54 จะเป็นตัวเริ่มต้นของยีนตรึงไนโตรเจน แต่ในระหว่างที่ nif LA เริ่มทำงานตัวเริ่มต้นดังกล่าวจะถูกควบคุมโดยกลุ่มยีนอีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ gln A, ntr B และ ntr C, gln A จะทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ glutamine synthetase รับผิดชอบการดูดซึม NH^{+}_{4} ในขณะที่ภายนอกขาดแคลน NH_3 ยีน ntr B จะทำให้ยีน ntr C เกิด phosphorylation แล้วจึงมากระตุ้น nif LA ให้เริ่มต้นยีนตรึงไนโตรเจน (วิเชียร , 2533)

พันธุวิศวกรรมกับการตรึงไนโตรเจน

เป็นเวลามากกว่า 50 ปีมาแล้ว ได้มีการศึกษาวิจัยงานในด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เกิดขึ้นอย่างมากมาย ผลจากการศึกษาและวิจัยด้านนี้ทำให้เกิดการพัฒนาอย่างมากด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (molecular genetic) ซึ่งจะมีการนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงอย่างมากทางด้านชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ ความสำเร็จทางด้านพันธุวิศวกรรมเกิดจากการมีผู้ค้นพบวิธีการต่างๆขึ้นมากมาย เช่น สามารถแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ สามารถตัดและต่อดีเอ็นเอที่จุดจำเพาะได้ในหลอดทดลอง (in vitro) และสามารถเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลได้ในหลอดทดลอง

พันธุวิศวกรรม หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ เพื่อให้ได้สิ่งมีชีวิตใหม่ ซึ่งมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ โดยวิธีการที่สามารถทำให้เกิดตามขั้นตอนที่วางไว้และทำให้เกิดได้ในหลอดทดลอง โดยปกติมักทำโดยนำยีนจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปเข้าสู่สิ่งมีชีวิตหนึ่ง ซึ่งเมื่อยีนเข้าไปแล้วสามารถจะถ่ายแบบ (replication) และถ่ายทอดไปยังลูกหลานของสิ่งมีชีวิตใหม่ได้ในบางกรณีนอกจากยีนนั้นจะถ่ายแบบและถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้แล้วแต่ยีนนั้นยังสามารถผลิต polypeptide ออกมาตามชนิดของยีนที่เข้าไปได้ เช่น การใส่ยีนของอินซูลิน (insulin gene) ของคนเข้าสู่แบคทีเรียเป็นเหตุให้แบคทีเรียนั้นสามารถผลิตอินซูลินออกมาได้ นอกจากนี้คำว่าพันธุ-วิศวกรรม ยังสามารถเรียกได้อีกหลายคำเช่น recombinant DNA technology หรือ gene manipulation กล่าวคือเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ ซึ่งทำโดยการเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวของสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ ในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเสียใหม่ โดยการตัดต่อดีเอ็นเอหรือยีนของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งเข้าไป การตัดต่อดีเอ็นเอนี้จะทำในหลอดทดลอง โดยใช้

เอนไซม์บางชนิดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากตัดต่อดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตสองชนิดเข้าด้วยกันแล้ว จะได้ ดีเอ็นเอใหม่ที่เรียกว่า recombinant DNA จากนั้นจึงย้ายดีเอ็นเอสายผสมที่ได้เข้าสู่แบคทีเรีย ต่อไปกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังกล่าวมานี้เรียกว่า cloning

พันธุวิศวกรรมที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรียที่มีการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช พันธุวิศวกรรมกับการตรึงไนโตรเจนในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคต่าง ๆ ทางพันธุวิศวกรรมมาศึกษาอย่างจริงจังกับการตรึงไนโตรเจนโดยเฉพาะกับเชื้อ *Rhizobium sp.* กับพืชตระกูลถั่วซึ่งเป็นการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพา ซึ่งแม้ว่าจะมีการศึกษากันอย่างจริงจังก็ตาม แต่ก็ยังขาดข้อมูลที่สำคัญ ๆ ที่จะนำผลการทดลองที่ได้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่นเดียวกับการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช ซึ่งถือได้ว่าเป็นกลุ่มที่มีประชากรตรึงไนโตรเจนที่ใหญ่ที่สุด ซึ่งก็ได้มีการศึกษาโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ทางด้านพันธุวิศวกรรมมานานแล้ว ซึ่งพอสรุปพอสังเขปตามชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มได้ดังนี้

Azotobacter sp.

ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *Azotobacter sp.* ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับยีนตรึงไนโตรเจน เพื่อทำเป็นแผนที่ยีน (map gene) โดยเฉพาะกับเชื้อ *A. chroococcum* ที่ถือได้ว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่ซับซ้อนที่เดียว

การควบคุมของ nif gene ในเชื้อ *Azotobacter sp.* ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ความเป็นประโยชน์ของไนโตรเจนหรือความเข้มข้นของออกซิเจน ล้วนแต่มีผลต่อการแสดงออกของ nif gene ซึ่งสามารถทำการเปรียบเทียบได้โดยการนำเอาลักษณะที่ดีเกี่ยวกับยีนที่ควบคุม nif ในเชื้อ *K. pneumonias* มาใส่ให้แก่เชื้อ *Azotobacter sp.* โดยอาศัยเทคนิค recombinant plasmid ซึ่งจะทำให้ได้ nif gene ที่มีการแสดงออกใหม่ ๆ ในเชื้อ *Azotobacter sp.* เช่นว่าในเชื้อ *A. vinelandii* UW1 จะมี nif A ของเชื้อ *K. pneumoniae* อยู่บน plasmid pCK1 ในทางตรงกันข้าม การทำ gene nif L ของเชื้อ *K. pneumoniae* nif L ซึ่งเป็นตัวระงับหรือ nif repressor บน plasmid pMD 132 ไปใส่ให้แก่เชื้อ *A. vinelandii* พบว่าจะไม่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนแต่อย่างไร แสดงให้เห็นว่า nif A ในเชื้อ *Azotobacter sp.* ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างระหว่าง nif gene ทั้ง 2 ชนิดนี้

นอกจากนี้ Kennedy (1992) ยังได้ทำการศึกษาถึงการปลดปล่อยแอมโมเนียมภายหลังการทำ nif L mutant กับเชื้อ *A. vinelandii* เกี่ยวกับ nif L gene สามารถที่จะพบได้ในเชื้อ *K. pneumoniae* และเชื้อ *A. vinelandii* ซึ่งพบว่า nif L gene นี้จะทำงานร่วมกับ nif A โดยที่

nif A นั้นเปรียบเสมือนเป็นตัวกระตุ้น (activator) กับการแสดงออกของ gene nif ตัวอื่นๆ นอกจากนี้ nif L ยังตอบสนองต่อปริมาณไนโตรเจนในบรรยากาศด้วย สำหรับในเชื้อ *K. pneumoniae* นั้น nif L จะทำหน้าที่ตรงกับ nif A เช่นว่าจะคอยยับยั้งการตรึงไนโตรเจนขณะที่มีออกซิเจนอยู่ เช่นเดียวกับในเชื้อ *A. vinelandii* nif L จะทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ nif A โดยเฉพาะต่อปริมาณออกซิเจนจากผลที่ได้รับข้างต้นเกิดจากการศึกษา homology ระหว่าง nif L และ nif A ของทั้ง 2 ชนิด เกี่ยวกับ nif L นี้ยังได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของแอมโมเนียม กับ nif mutant ของเชื้อ *A. vinelandii* โดยพบว่ามีการปลดปล่อยแอมโมเนียมออกมามากในระหว่างที่มีการตรึงไนโตรเจน ซึ่งในระยะ exponential phase นั้นสามารถพบแอมโมเนียมได้ถึง 10 mM NH^+_3 ในขณะที่ nif mutant ของเชื้อ *K. pneumoniae* จะมีการปลดปล่อยออกมาน้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบว่ามีผลทำให้ pH เพิ่มขึ้นถึง 8.5 ด้วย

เกี่ยวกับเอนไซม์ไนโตรจิเนสของเชื้อ *Azotobacter sp.* ก็มีการศึกษาเช่นกันโดย Zhong *et al.* (1995) กล่าวคือมีการศึกษาถึงยีน nif Z ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมเอนไซม์ไนโตรจิเนส โดยเฉพาะกับโปรตีน MoFe ใน *A. vinelandii* ภายหลังจากการนำยีน nif Z ออกเพื่อดูการทำงานของ MoFe ใช้ plasmid DJ194 ซึ่งเป็นพาหะพบว่าเชื้อ *A. vinelandii* มีการเจริญเติบโตลดลงในสภาพที่มีการตรึงไนโตรเจน และซึ่งทำการเปรียบเทียบกับเชื้อ *A. vinelandii* wild type ซึ่งมี MoFe ปกติ

Azospirillum sp.

สำหรับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ต้องการออกซิเจนน้อย (semiaerobic) ในการเจริญเติบโตก็มีการใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมเข้ามาศึกษาด้วยเช่นกันโดยเฉพาะเชื้อ *Azospirillum sp.* ยิ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญมากในการตรึงไนโตรเจนร่วมกับพืชตระกูลหญ้าในเขตร้อน Okon *et al.* (1995) ได้นำเทคโนโลยีสมัยใหม่มาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมกับเชื้อ *Azospirillum sp.* เริ่มจากการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานและนิเวศวิทยาของเชื้อ *Azospirillum sp.* ใช้เทคนิค 16S และ 23S rRNA homology, RFLP, RAPD ซึ่งจากการใช้เทคนิคเหล่านี้ทำให้ทราบถึง colonization และการทำงานใน rhizosphere อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการใช้ phylogenetic oligonucleotide probe เพื่อศึกษาใน *Azospirillum* Sp. 7 และ Sp.245 ด้วย เพื่อทราบถึงรูปแบบของ colonization ภายหลังจากการปลูกเชื้อร่วมกับพืช เช่น ข้าวสาลีเป็นต้น ผลการศึกษาพบว่า strain Sp. 245 จะเข้าสู่ central vascular system หลังจาก 2 สัปดาห์และ strain Sp. 7 จะอยู่บริเวณผิวรากภายหลังการปลูกเชื้อ ในส่วนของยีนได้ศึกษาเกี่ยวกับ reporter gene ได้แก่ GUS และ lac Z (nif HA-GUS A fusion) เพื่อที่จะศึกษาถึงตำแหน่ง colonization บน

รากขนอ่อน และตำแหน่งในการเข้าสู่รากแขนง (lateral root) ตลอดจนการตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมออกซิเจน

Klebsiella sp.

เป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัด (semianaerobic) เช่นเดียวกับเชื้อ *Azospirillum sp.* สำหรับงานวิจัยทางด้านพันธุ-วิศวกรรมกับเชื้อ *Klebsiella* sp. นั้นถือได้ว่าเป็นพื้นฐานของการศึกษาของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุกชนิดก็ว่าได้ การศึกษา transcription nif gene ในเชื้อ *K. pneumoniae* เทคนิคที่ใช้คือการ recombinant DNA เริ่มจากการสร้าง plasmid ลูกผสมใน E.*coli* ซึ่งจะมี nif gene ของเชื้อ *K. pneumoniae* อยู่แล้วยังศึกษาถึงตำแหน่งที่เกิดการ transcription จาก promotors ซึ่งทราบได้ก็ต่อเมื่อมีการใส่ตัว transposon (Tn5) เข้าไปแล้ว จากการทดลองสามารถทราบได้ว่าตำแหน่งของ nif gene ใน *Klebsiella* นั้นมีอยู่ 15 ตำแหน่ง จากการทำแผนที่ยีนมียีนที่น่าสนใจคือ nif K และ nif Y ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมาก นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของยีน โดยการเพิ่ม nif B เข้ามาและเปลี่ยนแปลงความยาวของ nif F ด้วย ผลจากการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้ทราบถึง การควบคุมการ transcription nif gene ในเชื้อ *Klebsiella sp.* สำหรับการใช้เอนไซม์ EcoRI ในการตัดที่ตำแหน่ง nif gene (nif A, nif B, nif L) เมื่อต้องการทราบถึง gene product ของ nif A, nif L (nif A_{gp}, - nif L_{gp}) ผลที่ได้พบว่าเริ่มต้นการ transcription จาก Pcm (promotor) ซึ่งจะอยู่ก่อนหน้า nif A และ nif L ซึ่ง nif นี้จะเป็นตัวสุดท้ายของการ transcription เพราะฉะนั้นจึงทำให้ทราบได้ว่าทั้ง nif A และ nif L จะทำหน้าที่เป็นยีนควบคุมนั่นเอง สำหรับ nif A_{gp} gene นี้ เชื่อว่าน่าจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น (activator) ขณะเดียวกันก็ทราบว่า nif L_{gp} gene นี้ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการ activator ในสภาพที่การตรึงไนโตรเจนไม่สมบูรณ์ เช่นออกซิเจนต่ำสามารถที่จะทราบได้หลังจากการตัด nif L ออกไป

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหญ้าแฝก

หญ้าแฝกมีชื่อสามัญว่า Vetiver grass เป็นพืชตระกูลหญ้า (Gramineae) ชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับ ข้าวโพด, ข้าวฟ่าง, อ้อย และ ตะไคร้ จัดอยู่ใน Tribe Andropgoneae สกุล *Vetiveria* มีอยู่ 16 ชนิด 3 พันธุ์ (Chase and Niles, 1962) สำหรับหญ้าแฝกที่นำเข้ามาปลูกเพื่อการอนุรักษ์ดิน และน้ำ เป็นชนิด *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash และ *Vetiveria nemoralis* A. Canmus

1. ลำต้น (culm) หญ้าแฝกเป็นหญ้าที่ขึ้นเป็นกอ มีลักษณะเป็นพุ่ม ใบยาวตั้งตรงขึ้นสูง มักพบขึ้นเป็นกลุ่มใหญ่หรือกระจายกันอยู่ไม่ไกลนัก กอแฝกจะมีขนาดค่อนข้างใหญ่ โคนกอเบียดกันแน่นเป็นลักษณะเฉพาะอันหนึ่งที่แตกต่างจากหญ้าชนิดอื่นค่อนข้างชัดเจน ส่วนโคนของลำต้นจะแบนเกิดจากส่วนของโคนใบที่จัดเรียงทับกัน ลำต้นแท้จะมีขนาดเล็กซ่อนอยู่ในกาบใบบริเวณคอดิน

2. ใบ (leaf) ใบของหญ้าแฝกแตกจากโคนกอ มีลักษณะแคบยาว ขอบขนานปลายสอบแหลม แผ่นใบกร้านคายโดยเฉพาะใบแก่ขอบใบและเส้นใบจะมีหนามละเอียด (spinulose) หนามที่ส่วนโคนและกลางแผ่นใบจะมีน้อยแต่จะมีมากที่บริเวณปลายใบมีลักษณะตั้งทะแยงปลายหนามชี้ขึ้นไปทางปลายใบ

ด้านท้องใบจะมีสีจางกว่าด้านหลังใบ ส่วนผิวจะปกคลุมด้วยเซลผนังบางชั้นเดียว ตอนกลางของแผ่นใบจะมีช่องว่างขนาดใหญ่ ปรากฏชัดเจนอยู่ทั่วไป ทำหน้าที่เก็บก๊าซ O_2 และ CO_2 เพื่อช่วยในขบวนการสังเคราะห์แสง และหายใจ บนด้านหลังใบจะมีเซลปากใบมากกว่าด้านท้องใบ

3. ราก (root) เป็นส่วนสำคัญและเป็นลักษณะพิเศษของหญ้าแฝกที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์เป็นหลัก หญ้าส่วนใหญ่โดยทั่วไปจะมีรากเป็นระบบรากฝอย (fibrous root) แตกออกจากส่วนของลำต้นใต้ดินกระจายแผ่กว้างเพื่อยึดพื้นดินตามแนวนอน (horizontal) ระบบรากในแนวดิ่ง (vertical) ไม่ลึกมาก แต่ระบบรากของหญ้าแฝกจะแตกต่างจากรากหญ้าส่วนใหญ่ทั่วไป คือมีรากที่สานกันแน่นหยั่งลึกในแนวดิ่งลงในดินไม่แผ่ขยาย มีรากแกน รากแขนง โดยเฉพาะมีรากฝอยมาก

หญ้าแฝกที่มีอายุประมาณ 18 เดือน รากจะเจริญเต็มที่ รากแกนที่ส่วนโคนกอจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางโตประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผนังด้านนอกจะแข็งตัว มีลักษณะอวบคล้ายนวม เมื่อรากแก่มากก็จะตายไปและถูกแทนที่ด้วยเซลผิวที่อยู่ถัดไป จะทำหน้าที่เพิ่มความหนา ความแข็งแรง ดูดซับน้ำและความชื้น โดยเฉพาะป้องกันส่วนลำเลียงน้ำและอาหารที่อยู่ภายใน

4. ช่อดอก (inflorescence) หญ้าแฝกมีช่อดอกตั้งมีลักษณะเป็นรวง ก้านช่อดอกและรวงสูงประมาณ 100-150 เซนติเมตร แต่ในต้นที่สมบูรณ์จะสูงจากพื้นดินเกินกว่า 200 เซนติเมตร เฉพาะช่อดอกหรือรวงสูงประมาณ 20-30 เซนติเมตร แผ่กว้างเต็มที่ 10-15 เซนติเมตร

ช่อดอกของหญ้าแฝกหอมส่วนใหญ่มีสีม่วงซึ่งเป็นลักษณะปกติประจำแต่ละชนิดพันธุ์ ในพืชสกุลหญ้า ลักษณะของช่อดอกจัดเป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกพันธุ์ แต่ในหญ้าแฝกลักษณะนี้อาจทำให้เกิดความสับสนโดยเฉพาะเมื่อใช้ความยาว ความกว้างและสีของรวงเป็นลักษณะจำแนก เพราะแท้จริงแล้วช่อดอกของหญ้าแฝกจะเปลี่ยนรูปและสีไปได้ตามขั้นตอนของการผสมเกสร

5. ดอกหญ้า (spikelet) หญ้าแฝกจะมีดอกหญ้าเรียงตัวอยู่ด้วยกันเป็นคู่ ๆ ดอกหญ้าแฝกมีลักษณะคล้ายกระสวย ขอบขนานรูปไข่ ปลายสอบขนาดดอกกว้าง 1.5-2.5 มิลลิเมตร ยาว 2.5-3.5 มิลลิเมตร ผิวบนด้านหลังขรุขระมีหนามแหลมขนาดเล็ก (spinulose) โดยเฉพาะบริเวณขอบจะเห็นได้ชัดเจน เมื่อส่องดูด้วยแว่นขยาย

6. เมล็ดและต้นอ่อน (seed and seedling) เมื่อดอกหญ้าแฝกได้รับการผสมแล้ว ดอกที่ไม่มีก้านดอกซึ่งเป็นดอกสมบูรณ์จะติดเมล็ด เมล็ดจะมีสีน้ำตาลอ่อน เป็นรูปกระสวยผิวเรียบ หัวท้ายมน ขนาดโตกว้าง 1-1.5 มิลลิเมตร ยาว 2.5-3 มิลลิเมตร เมล็ดมีผนังบางเนื้ออ่อนแบบเมล็ดสาคู มีส่วนประกอบของแป้งและน้ำมันอยู่มาก เมล็ดหญ้าแฝกมีความสามารถในการงอก (vitality) อยู่ในช่วงระยะเวลาจำกัดเพียงช่วงสั้น ๆ ในสภาพธรรมชาติ เมล็ดทั่วไปเมล็ดจะถูกทิ้งไว้คารวงและจะค่อยหลุดร่วงไปโดยที่ส่วนใหญ่ได้สูญเสียความสามารถในการงอกไปแล้ว เมล็ดส่วนที่เหลือก็แทบจะไม่มีโอกาศที่จะงอกได้นอกจากมันจะตกลงในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในทันที เมล็ดหญ้าแฝกมีความไวในการตอบสนองต่อปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี จึงสูญเสียความสามารถในการงอกได้ง่าย เมื่อประสบกับสภาพความแห้งแล้ง ลมแรง และแดดจัด แม้ช่วงระยะเวลาสั้น ๆ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2541)

ความแตกต่างของหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอน

1. ลักษณะโดยทั่วไปของหญ้าแฝกหอม (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) หญ้าแฝกหอมเป็นพืชที่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ลำต้นแตกกอแน่นโตเต็มที่สูงประมาณ 2 เมตร หรือมากกว่า นี้เป็นพืชที่มีอายุหลายปี ดอกเป็นช่อ (inflorescence) ยาว 15-30 เซนติเมตร ดอกสีเหลือง ปนเทา หรือสีม่วง (วีรชัย, 2533) ดอกที่ไม่มีก้านเป็นดอกแบบสมบูรณ์เพศ (มีทั้งเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย) ส่วนดอกที่มีก้านเป็นดอกตัวผู้ มีรากยาวและแข็งแรงมากปลายรากมีโครงสร้างพิเศษคล้ายฟองน้ำห่อหุ้ม บางพันธุ์มีกลิ่นหอม หญ้าแฝกจากแหล่ง

ธรรมชาติ มีลำต้นหนาปานกลาง รากสั้นแต่มีการแตกแขนงและกิ่งก้านของรากมาก ส่วนหญ้าแฝกที่รากมีกลิ่นหอมจะมีลำต้นหนามาก รากมีความยาวมากกว่า แต่รากไม่มีการแตกแขนงและกิ่งก้าน

2. ลักษณะทั่วไปของหญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis* A. Camus.) พบได้โดยทั่วไปในที่ค่อนข้างแห้ง หรือที่ดินที่ระบายน้ำได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะในป่าเต็งรัง แต่จะมีน้อยในภาคใต้ จากการศึกษาเอกสาร Grasses of the Malaya โดย Gilliland (1971) พบว่าหญ้าแฝกชนิดนี้เป็นพืชที่มีชีวิตอยู่ได้ข้ามปี ลำต้นมีการแตกกอแน่น มีความสูง 75 เซนติเมตร กาบใบบริเวณโคนใบแบนหลวม (ไม่ติดแน่นกับลำต้น) มีข้อห่าง ไม่มีขน ปลายใบยาว 15-30 เซนติเมตร กว้าง 5 เซนติเมตร ใบแคบ และปลายใบแหลม มักจะม้วน ใบไม่มีขน ขอบใบคม ช่อดอกเป็นแบบ Panicle ยาวประมาณ 12 เซนติเมตร กว้าง 6 เซนติเมตร ช่อดอกที่มีก้านเป็นดอกตัวผู้ เกสรตัวเมียมี 3 เกสร เกสรตัวผู้มี 2 เกสร

การใช้ประโยชน์จากหญ้าแฝก

1. การใช้หญ้าแฝกในการอนุรักษ์ดินและน้ำ แนวหญ้าแฝกซึ่งปลูกเป็นแถวขวางความลาดชันของพื้นที่ สามารถทำให้พื้นที่นั้นปรับสภาพลดความลาดชันลงเป็นพื้นที่ขั้นบันไดดิน (bench terrace) สูง 3-4 เมตร จึงสามารถได้ว่าหญ้าแฝกเป็นแนวนำ (guide line) ในการสร้างขั้นบันไดดินได้โดยธรรมชาติ โดยลักษณะค่อยเป็นค่อยไป ผสมผสานกับเทคนิคการเตรียมดินและการปลูกพืชหมุนเวียน (cultural pracyises) ซึ่งจะต้องอาศัยเวลา หญ้าแฝกมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถแตกกอ โดยการแตกหน่อที่ข้อของลำต้น หรือเหง้าเหนือดิน (rhizome) ได้ตลอดเวลา เมื่อตะกอนดินมาทับถมแนวหญ้าแฝก สามารถลดการชะล้างพังทายได้ถึง 3 - 5 เท่า จากการที่ไม่มีแนวหญ้าแฝก ขณะเดียวกันระบบรากฝอยที่หยั่งลึกลงไปตามความลึกของดิน เกาะยึดดินทำให้เกิดความแข็งแรง (deep ground anchor) สามารถช่วยลดการสูญเสียน้ำได้ 25-70 % หญ้าแฝกมีการเจริญย่างปล้องออกดอกได้ตลอดปี ทำให้แนวหญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตในลักษณะยกตัวสูงขึ้นเหนือระดับผิวดินที่สูงขึ้นตลอดเวลา ทำให้ความลาดชันของพื้นที่ลดน้อยลง

คุณสมบัติของหญ้าแฝกอีกอย่างหนึ่งคือลักษณะการแผ่ขยายของรากที่ออกทางด้านข้างน้อย ทำให้การปลูกไม้ยืนต้นบริเวณใกล้ ๆ กับหญ้าแฝกจึงไม่เกิดการแข่งขันกันระหว่างพืชปลูกกับหญ้าแฝก (กรมพัฒนาที่ดิน, 2537)

2. การใช้ต้นและใบของหญ้าแฝกทำปุ๋ยหมัก ส่วนของลำต้นและใบหญ้าแฝกที่ถูกตัดเพื่อให้แตกกอเจริญเติบโตได้ดีขึ้น สามารถที่จะนำใบหญ้าแฝกใช้ในการคลุมดินหรือการทำปุ๋ยหมัก ปรัชฌา (2537) ได้ศึกษากรรมวิธีในการทำปุ๋ยหมักจากหญ้าแฝกสามารถจะสรุปได้ว่าสัดส่วนของปริมาณของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ของปุ๋ยหมักจากหญ้าแฝกจะลดลงจาก 91-125 ก่อนการหมักเป็น 38.9-47.5 อัตราการย่อยสลายลดลงอย่างช้าๆ ในช่วง 60-120 วัน ต้นและใบของหญ้าแฝกสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ปุ๋ยหมัก 1 ตัน จากหญ้าแฝกเทียบเท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟต 43 กิโลกรัม โดยมีแนวโน้มว่าปุ๋ยหมักที่ได้จากหญ้าแฝกจะมีปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แคลเซียม และแมงกานีส ในปริมาณค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.86, 0.29, 0.12, 0.55 และ 0.41 % ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด เป็นด่าง เท่ากับ 7.0 และยังพบว่า ปุ๋ยหมักที่ได้จากต้นและใบหญ้าแฝก ยังให้สารปรับปรุงดิน (humic acid) อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หญ้าแฝกหอมสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี
2. เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช
3. สารละลายธาตุอาหารพืช (nutrient solution)
4. ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต
5. กระถางพลาสติกขนาด 10x12 นิ้ว และท่อซีเมนต์ขนาด 35 x120 เซนติเมตร
6. ทรายน้ำจืดที่ล้างสะอาดแล้ว
7. จุกยางสองชั้น (double rubber stopper), เข็มฉีดยา (syringe)
8. เครื่องบดตัวอย่างพืช
9. เครื่องชั่งน้ำหนัก
10. เครื่องวัด pH meter
11. ตู้อบตัวอย่างแห้งพืช
12. เครื่องแก้วและสารเคมีที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
13. เครื่อง Gas Chromotography (ยี่ห้อ shimuassu GC - 14B)
14. เครื่อง Autoclave (หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ)
15. เครื่องเขย่า (shaker)
16. กล้องจุลทรรศน์
17. Gas Ethylene, Acetylene, Hydrogen และ Nitrogen

วิธีการทดลอง

การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช ที่อาศัยบริเวณรากหญ้าแฝก (การทดลองที่ 1.)

สำหรับในการทดลองที่ 1. นี้จะเป็นการสำรวจคัดเลือกหาแหล่งของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช ในสภาพธรรมชาติ จากรากของหญ้าแฝกในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย เพื่อนำเชื้อแบคทีเรียมาใช้ในการทดลองที่ 2. และ 3. ต่อไป โดยมีขั้นตอนและวิธีการดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่าง สุ่มเก็บตัวอย่างรากหญ้าแฝก จากแหล่งธรรมชาติในเขตจังหวัดเชียงใหม่ และ เชียงราย ฯลฯ โดยใช้จอบขุดรอบๆ บริเวณต้นหญ้าแฝก เพื่อให้ได้ต้นหญ้าแฝกที่มีรากติดขึ้นมาด้วย รวมทั้งดินบางส่วน นำมาใส่ถุงพลาสติกแล้วใช้ยางรัดปากถุงให้แน่น นำตัวอย่างมาแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่อาศัยบนรากหญ้าแฝก และดินในห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชไร่ ตึกกำจรบุญแปง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2. การแยกเชื้อ นำรากหญ้าแฝกที่เก็บมาที่ยังมีชีวิตอยู่นำมาตัดรากให้มีขนาดความยาวประมาณ 1 นิ้ว วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ปราศจากไนโตรเจน (nitrogen free agar ; NFA) ซึ่งมี glucose หรือ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน (Dobereiner *et al.*, 1972a,b) อาหาร NFA สูตร ก. (ภาคผนวก) อาหารเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter sp. Beijerinckia sp.*ฯลฯ และอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum sp.* ดัดแปลงสูตรของ Dobereiner *et al.* (1976) ; Okon *et al.* (1977) สูตร ค.(ภาคผนวก) ที่มี malic acid เป็นแหล่งคาร์บอนบรรจุอยู่ในจานอาหาร (petridish) ซึ่งทั้งอาหารและ petridish นั้นนำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว จากนั้นนำรากหญ้าแฝกมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่างรากหญ้าแฝกที่เก็บมาจากธรรมชาติ บ่มเลี้ยงรากหญ้าแฝกบนอาหารสูตรเลี้ยงเชื้อ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ถึง 7 วัน จึงทำการสุ่ม และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชที่มีความสัมพันธ์กับรากหญ้าแฝกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการคัดเลือกจะอาศัยรูปร่างลักษณะสี ตลอดจนการสร้างเมือกที่ผิวหน้าโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน

3. การทำให้เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบริสุทธิ์ นำเอาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกไว้ได้จากการแยกเชื้อ มาทำให้บริสุทธิ์โดยการนำเชื้อไปเขี่ยเชื้อ (streak) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NFA สูตร ก. (ที่เติม glucose และ sucrose) และอาหารสูตรดัดแปลง สูตร ค. (ที่เติม malic acid) จนได้เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำ stock culture โดยเก็บเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (isolates) ซึ่งบริสุทธิ์แล้วใน slant agar ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก. และสูตรดัดแปลงสูตร ค. ที่ใส่ yeast extract 0.05 เปอร์เซนต์

4. การหาศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยอาศัยเทคนิควิธี Acetylene Reduction Activity (ARA) เพื่อใช้ทดสอบศักยภาพการตรึงไนโตรเจน หรือกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากใน stock culture ที่บรรจุในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำเป็น slant agar ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เชื้อแต่ละชนิดทำอย่างละ 4 ซ้ำ บ่มเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน แล้วปิดปากหลอดแก้วด้วยจุกยางสองชั้น ดูดอากาศออกจากหลอดแก้วด้วยเข็มฉีดยา 10 เปอร์เซนต์ แล้วฉีดก๊าซ acetylene (C_2H_2) เข้าไปแทนที่อากาศในหลอดในปริมาณเท่าที่ดูดออกมาบ่มเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดเอาก๊าซในหลอดเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตรเก็บไว้ในหลอดสูญญากาศเก็บก๊าซ นำเอาก๊าซที่เก็บได้แต่ละตัวอย่างของเชื้อไปหาก๊าซ ethylene (C_2H_4) ซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์ก๊าซ acetylene โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ จากนั้นนำก๊าซที่เก็บไว้ในหลอดสูญญากาศเก็บก๊าซ ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromotography (GC) เมื่อฉีดก๊าซเข้าเครื่อง GC แล้วเราจะได้เส้นกราฟ ทำให้เราทราบถึงปริมาณของก๊าซ ethylene โดยเปรียบเทียบความสูงของกราฟ ซึ่งเราได้จากก๊าซ ethylene มาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว เมื่อเราศึกษาว่าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระตัวอย่างไหนมีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูง เราก็จะนำไปศึกษาจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อต่อไป

สูตรการคำนวณหาศักยภาพการตรึงไนโตรเจนหรือกิจกรรมไนโตรจีเนสของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ มีหน่วยเป็นจำนวนนาโนโมของก๊าซ ethylene ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อหน่วยเวลาที่ใช้บ่มด้วยก๊าซ acetylene ดังต่อไปนี้

$$ARA = 10^6 \times \frac{1}{2,245} \times \frac{1}{22.4} \times \frac{\text{ความสูงของกราฟตัวอย่าง(b)} \times \text{ปริมาตรของหลอดทดลอง(v)}}{\text{ความสูงของกราฟก๊าซ ethylene มาตรฐาน(a)}}$$

ARA = Acetylene Reduction Activity

a = ความสูงของกราฟที่เกิดจากก๊าซ Ethylene มาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว

b = ความสูงของกราฟที่เกิดจากก๊าซตัวอย่างที่ Attennator เดียวกับก๊าซมาตรฐาน

v = ปริมาตรของหลอดแก้ว หรือ ขวดแก้วที่ใช้บ่มเลี้ยงเชื้อ

2,245 = ปริมาตรของขวดแก้วที่ใช้ทำก๊าซ ethylene มาตฐาน

การทำ ethylene มาตรฐาน โดยดูดเอาก๊าซ ethylene 1 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดก๊าซ ethylene ลงไปในขวดกรวยแก้วที่มีปริมาตร 2,245 มิลลิลิตร แล้วดูดเอาก๊าซ ethylene มาตรฐานในขวดกรวยแก้ว ฉีดเข้าเครื่อง GC 1 มิลลิลิตร เราจะได้กราฟของ ethylene มาตรฐาน ความสูงของกราฟที่ได้ที่เครื่อง GC อ่านได้คือ a

5. การศึกษาจำแนกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน นำเอาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูงที่คัดเลือกได้แล้วไว้มาศึกษาจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยการใช้แหล่งอาหารและพลังงาน หรือแหล่งคาร์บอน (carbon source) ตลอดจนลักษณะทางสรีระวิทยาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียตามหลักการจากหนังสือ Bergey ' s Manual of Determinative Becteriology (Buchanan and Gibbons,1974 ; John *et al.*, 1994) และยังอาศัยลักษณะโคโลนี, การเกิด pigment ของโคโลนี, เมือกที่แบคทีเรียสร้างขึ้น, การย้อมติดสีแกรม, รูปร่าง, ขนาด และลักษณะของเซลล์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยทำการดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน NFA สูตร ก. (ภาคผนวก) ซึ่งจะทำการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่แบคทีเรียใช้เป็นแหล่งพลังงานหรือแหล่งคาร์บอน (carbon source) ที่แบคทีเรียแต่ละชนิดจะใช้แตกต่างกัน เช่น glucose, sucrose, moltose, malonate, rhamnose, lactose propanal, acetate, benzoate, malate, arabinose, peptoneและ citrate ตามสูตร ก. และ ข. (ภาคผนวก)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

6. การหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ

6.1. การทำเชื้อตั้งต้น (starter inoculum) นำเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระที่คัดเลือกไว้เลือกไว้แล้ว มาเลี้ยงบนอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน (nitrogen free broth ; NFB) ตามสูตร ก. และ ค. บรรจุอยู่ในขวดกรวยแก้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ขนาดขวดกรวยแก้วคือ 250 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาพอุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า (shaker) ที่มีอัตราความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ทำการหาจำนวน หรือปริมาณของเซลแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธีการ dilution plate counts โดยการดูดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ไปเจือจางในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ จำนวน 9 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน จากนั้นดูดเอาสารที่เจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเข้มข้นใส่ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NFA สูตร ก. และ ค. ซึ่งใส่ yeast extract 0.05 เปอร์เซ็นต์ เกลี่ยเชื้อ (spread plate) ให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petridish) โดยแท่งแก้วปลายรูปสามเหลี่ยม บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหาร แล้วหารด้วย 0.1 คูณด้วยอัตราส่วนกลับของระดับความเจือจาง ก็จะได้เป็นจำนวนเซลแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร

6.2. การหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย นำเอาเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแต่ละชนิดที่คัดเลือกไว้ที่ใช้ในการทำเชื้อตั้งต้น เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนแบบเหลว NFB สูตร ก. และ ค. ปริมาณ 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดกรวยแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า (shaker) ด้วยอัตราความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อมิลลิลิตร โดยวิธี plate counts ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน

การศึกษาเปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ต่อการเจริญเติบโต และกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก (การทดลองที่ 2.)

สำหรับการทดลองที่ 2. เป็นการทดลองโดยการนำเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ในการทดลองที่ 1. ทำการทดลองโดยการใส่ (inoculation) ให้กับหญ้าแฝกในสภาพแวดล้อม ระยะเวลา และวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็นการทดลองย่อย 4 การทดลอง ดังนี้

การทดลองย่อยที่ 1. ทำการทดลองในสภาพปลอดเชื้อ (ขวดทดลอง) วัสดุปลูกเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน ระยะเวลาการทดลองประมาณ 30 วัน

วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) มีทั้งหมดจำนวน 7 สิ่งทดลอง (treatment) 4 ซ้ำ (replication)

1) Treatment 1 Uninoculation (control) ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย
2) Treatment 2 (HL 1) เชื้อจาก ต.ห้วยลาน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่
3) Treatment 3 (HL 2) เชื้อจาก ต.ห้วยลาน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่
4) Treatment 4 (HL 3) เชื้อจาก ต.ห้วยลาน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่
5) Treatment 5 (LDS 3) เชื้อจากสถานีพัฒนาที่ดิน อ.เมือง จ.เชียงราย
6) Treatment 6 (CR 1) เชื้อจากบ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ.เมือง จ.เชียงราย
7) Treatment 7 (CR 3) เชื้อจากบ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ.เมือง จ.เชียงราย

การทดลองย่อยที่ 2. ทำการทดลองในภาชนะปลูกกระถางพลาสติก วัสดุปลูกเป็นทรายผสมขี้เถ้าแกลบ ระยะเวลาการทดลองประมาณ 35 วัน

วางแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized complete block design) มีทั้งหมดจำนวน 12 สิ่งทดลอง (treatment) 4 ซ้ำ (replication) ดังนี้

1) Treatment 1 Uninoculation (control) ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย
2) Treatment 2 (HL 1) เชื้อจาก ต.ห้วยลาน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่
3) Treatment 3 (LDS 1) เชื้อจากสถานีพัฒนาที่ดิน อ.เมือง จ.เชียงราย
4) Treatment 4 (CR 1) เชื้อจากบ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ.เมือง จ.เชียงราย
5) Treatment 5 (CR 2) เชื้อจาก จ.เชียงราย
6) Treatment 6 (SMG 5) เชื้อ *Azospirillum brasilense* Sp. 245
7) Treatment 7 (HL 2) เชื้อจาก ต.ห้วยลาน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่
8) Treatment 8 (LDS 2) เชื้อจากสถานีพัฒนาที่ดิน อ.เมือง จ.เชียงราย
9) Treatment 9 (CR 3) เชื้อจากบ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ.เมือง จ.เชียงราย
10) Treatment 10 (CR 4) เชื้อจาก จ.เชียงราย
11) Treatment 11 (CR 5) เชื้อจาก จ.เชียงราย
12) Treatment 12 (SMG10) เชื้อ *Klebsiella oxytoca*

การทดลองย่อยที่ 3. ทำการทดลองในภาชนะปลูกกระถางพลาสติก วัสดุปลูกเป็นทรายผสมขี้เถ้าแกลบ ระยะเวลาการทดลองประมาณ 70 วัน

วางแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized complete block design) มีทั้งหมดจำนวน 12 สิ่งทดลอง (treatment) 4 ซ้ำ (replication) โดยสิ่งทดลองที่ในการทดลองจะใช้เหมือนกับการทดลองย่อยที่ 2

การทดลองย่อยที่ 4 ทำการทดลองในภาชนะปลูกกระถางท่อซีเมนต์ วัสดุปลูกเป็นดินพื้นที่เปิดใหม่ผสมขี้เถ้าแกลบและปุ๋ยหมักฮิวโมส ระยะเวลาการทดลองประมาณ 120 วัน

วางแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized complete block design) มีทั้งหมดจำนวน 12 สิ่งทดลอง (treatment) 4 ซ้ำ (replication) โดยสิ่งทดลองที่ในการทดลองจะใช้เหมือนกับการทดลองย่อยที่ 2 และ 3

การศึกษาการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและปุ๋ยไนโตรเจนระดับความเข้มข้นต่างกันต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก (การทดลองที่ 3.)

ทำการทดลองในภาชนะปลูกกระถางพลาสติก วัสดุปลูกเป็นทรายผสมขี้เถ้าแกลบ ระยะเวลาการทดลองประมาณ 35 วัน มีการวางแผนการทดลองแบบ Spilt plot design in RCBD มีจำนวน 4 ซ้ำ (replication) 20 สิ่งทดลอง (treatment)

Main plot คือ ระดับปุ๋ยไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต มี 4 ระดับ

1. 0 ppm. (N0)
2. 10 ppm. (N1)
3. 20 ppm. (N2)
4. 30 ppm. (N3)

Sub plot คือ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลอง

1. Uninoculation (A0)
2. CR 1 เชื้อแบคทีเรียจากบ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ.เมือง จ.เชียงราย (A1)
3. CR 3 เชื้อแบคทีเรียจากบ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ.เมือง จ.เชียงราย (A2)
4. LDS 3 เชื้อแบคทีเรียจากสถานีพัฒนาที่ดิน อ.เมือง จ.เชียงราย (A3)
5. HL 2 เชื้อแบคทีเรียจาก ต.ห้วยลาน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ (A4)

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่จะใส่ให้แก่หญ้าแฝก โดยการเลี้ยงขยายปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว NFB ทั้งสูตร ก. และ ค. จนกระทั่งเชื้อมีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 10^{8} เซลต่อมิลลิลิตร จึงนำมาใส่ให้แก่หญ้าแฝกที่ทำการทดลอง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ใส่ให้กับหญ้าแฝก ในการทดลองย่อยที่ 2, 3, 4 และการทดลองที่ 3. ปริมาณ 250 มิลลิลิตรต่อต้น ส่วนการทดลองย่อยที่ 1 จะใส่เชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. การเตรียมวัสดุปลูกหญ้าแฝก สำหรับการทดลองย่อย 2, 3 และการทดลองที่ 3. จะใช้ทรายน้ำจืด ดังนั้นต้องนำทรายน้ำจืดมาล้างน้ำให้สะอาดพยายามเอาเศษวัสดุ, เศษดิน, เศษอินทรีย์วัตถุและกรวดที่มีขนาดใหญ่ออกจากทรายน้ำจืดให้มากที่สุดจากนั้นนำทรายน้ำจืดไปอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที อัตราส่วนของ ทราย : ขี้เถ้าแกลบ : ปุ๋ยหมักฮิวโมส ในอัตราส่วน 83 : 15 : 2 ในการทดลองย่อยที่ 4 จะเป็นดินที่นำมาจากพื้นที่ที่เปิดทำการเพาะปลูกครั้งแรก ซึ่งมีวัสดุปลูกประกอบด้วย ดิน, ขี้เถ้าแกลบ, และปุ๋ยหมักฮิวโมส ในอัตราส่วน 83 : 15 : 2 สำหรับขี้เถ้าแกลบและปุ๋ยหมักฮิวโมส แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อ เช่นเดียวกับทรายน้ำจืด สำหรับการทดลองย่อยที่ 1 วัสดุปลูกจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนกึ่งแข็ง (semi solid) (ภาคผนวก) ที่ลดการใส่วุ้นให้น้อยลงทำให้รากหญ้าแฝกสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าสภาพวุ้นแข้ง

3. การคัดเลือกกล้าหญ้าแฝก โดยนำกล้าหญ้าแฝก ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นหญ้าแฝกหอมพันธุ์สุราษฎร์ธานีโดยนำต้นกล้าออกจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาปลูกลงในถุงดำขนาด 4 x 6 นิ้ว ที่มีขี้เถ้าแกลบผสมกับปุ๋ยหมักฮิวโมสในอัตราส่วน 3 เปอร์เซนต์ โดยปลูกกล้าหญ้าแฝก 1 ต้นต่อถุง ปลูกกล้าหญ้าแฝก 20-25 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกต้นที่มีความสูงประมาณ 40 เซนติเมตร และจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) 4 หน่อ ให้ใกล้เคียงกันมากที่สุดนำไปปลูกทดลองต่อไป

4. การเตรียมภาชนะในการปลูกหญ้าแฝก สำหรับการทดลองย่อยที่ 1. ภาชนะปลูกจะใช้ขวดทดลองรูปกรวยแก้วที่มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร การทดลองย่อยที่ 2, 3 และการทดลองที่ 3. ใช้กระถางพลาสติกขนาด 10 x 12 นิ้ว เป็นภาชนะปลูก ส่วนการทดลองย่อยที่ 4. ใช้ท่อซีเมนต์

เป็นภาชนะปลูก โดยจะแยกออกจากกันเป็น 2 ซีก เราต้องนำมาประกบคู่กันแล้วใช้ลวดขนาดเบอร์ 0 มัดให้แน่น ทำการอุดรอยรั่วบริเวณรอยที่ประกบกันให้สนิทจากนั้นรองก้นท่อซีเมนต์ด้วยกระสอบปุ๋ย ท่อซีเมนต์จะมีความสูง 120 เซนติเมตร กว้าง 30 เซนติเมตร

5. การปลูกและพร้อมกับการใส่เชื้อแบคทีเรีย นำกล้าหญ้าแฝกที่คัดเลือกไว้ปลูกในวัสดุปลูกในแต่ละการทดลองพร้อมกับการนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงขยายปริมาณจนได้จำนวนเซลในช่วง 10^{8} เซลต่อมิลลิลิตร มาใส่ให้กับหญ้าแฝกที่ปลูกต้นละ 250 มิลลิลิตร ในการทดลองย่อยที่ 2, 3, 4 และการทดลองที่ 3. ยกเว้นการทดลองย่อยที่ 1 จะใส่เชื้อแบคทีเรียประมาณ 1 มิลลิลิตร การใส่จะใส่บริเวณรอบ ๆ โคนต้นหญ้าแฝก

6. การให้น้ำกับหญ้าแฝก การทดลองย่อยที่ 2, 3 และการทดลองที่ 3. จะให้น้ำ 2 วันต่อครั้ง ๆ ละ 500 มิลลิลิตร ส่วนการทดลองย่อยที่ 4 จะให้น้ำ 1,000 มิลลิลิตรต่อครั้ง

7. การให้สารละลายธาตุอาหารพืชแก่หญ้าแฝก สารละลายธาตุอาหารพืชที่ให้กับหญ้าแฝกเป็นการดัดแปลงตามสูตรของ Munns (1968) (ดังตารางที่ 1) การให้สารละลายธาตุอาหารพืชแก่หญ้าแฝกจะให้ 7 วันต่อครั้งๆ ละ 250 มิลลิลิตรต่อต้นโดยรดบริเวณรอบๆ โคนต้นหญ้าแฝก

ตารางที่ 1. องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหารพืช (nutrient solution)

ชนิดของสารละลาย	สารเคมี	ความเข้มข้น		ปริมาณของสารละลายที่ใช้ต่อลิตร
1	KH_2PO_4	34	g/liter	1 ml.
2	$MgSO_4.7H_2O$	123	g/liter	1 ml.
3	K_2SO_4	65	g/liter	1 ml.
4	$CaSO_4.2H_2O$			0.1 g.
5	$FeCl_3.6H_2O$	1.4	g/liter	
	Na_2H_2EDTA	1.7	g/liter	1 ml.
6	KCl.	124	mg/liter	
	$MnSO_4.H_2O$	65	mg/liter	
	$ZnSO_4.7H_2O$	46	mg/liter	
	$CuSO_4.5H_2O$	10	mg/liter	
	$H_2MoO_4(88\%MoO_3)$	2	mg/liter	1 ml.

ปรับสารละลายธาตุอาหารพืช ให้มี pH 6.5 ด้วยการเติม 1 N. KOH.

การบันทึกข้อมูล

1. ความสูงของหญ้าแฝก วัดความสูงหญ้าทุก 7 วัน (ในการทดลองย่อยที่ 2, 3, 4 และการทดลองที่ 3.) โดยเริ่มวัดตั้งแต่แล้วการใส่เชื้อจนกระทั่งถึงวันเก็บเกี่ยว (สิ้นสุดการทดลอง) โดยจะวัดจากโคนต้นที่ติดผิวดินจนถึงปลายใบของหญ้าแฝก ส่วนการทดลองย่อยที่ 1. จะวัดในวันเก็บเกี่ยวครั้งเดียว

2. จำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ต่อกระถาง ทำการนับจำนวนต้นต่อกอ ตั้งแต่ปลูกจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง

3. การวัดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของรากหญ้าแฝก ในการทดลองย่อยที่ 2, 3 และการทดลองที่ 3. จะสุ่มตัดแบ่งรากหญ้าแฝกออกประมาณ 50 กรัม ส่วนการทดลองย่อยที่ 4 จะแบ่งรากหญ้าแฝกออกเป็น 3 ระยะของความยาวราก ระยะที่ 1 0-30 เซนติเมตร ระยะที่ 2 31-60 เซนติเมตร และระยะที่ 3 ตั้งแต่ 61 เซนติเมตรขึ้นไป จากนั้นนำเอารากจากการสุ่มตัดแบ่งมานำไปใช้ในการวัดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Activity (ARA) นำรากหญ้าแฝกที่ตัดไว้ ใส่ลงในขวดกรวยแก้ว ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง 2 ชั้นให้สนิท ทำการติดฉลากไว้ด้านข้างขวดกรวยแก้ว เพื่อให้สะดวกในการเก็บข้อมูล จากนั้นทำการดูดเอาอากาศในขวดกรวยแก้วออกมา 10 เปอร์เซนต์ (Hardy *et al.*, 1968 ; Ruschel and Ruschel, 1978) โดยดูดเอาอากาศออกมา 25 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ก๊าซ Acetylene เข้าในแทนที่เท่ากับจำนวนที่ดูดอากาศออกมาบ่มรากหญ้าแฝกที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมงภายในขวดกรวยแก้ว จะเกิดการรีดิวซ์ก๊าซ acetylene โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนซึ่งอยู่ร่วมกับรากหญ้าแฝกให้เป็นก๊าซ ethylene จากนั้นทำการดูดเอาก๊าซ ethylene จากขวดกรวยแก้วจำนวน 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในหลอดสูญญากาศเก็บก๊าซ เพื่อนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromotography (GC) เพื่อวัดปริมาณของก๊าซ ethylene ที่เกิดขึ้นโดยศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของรากหญ้าแฝกจะมีหน่วยเป็น nmol C_2H_4 /g. root dry weight /day

4. การหาน้ำหนักรากแห้ง นำรากหญ้าแฝกไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักรากแห้งทั้งหมดของหญ้าแฝกมีหน่วยเป็นกรัม

5. การหาน้ำหนักต้นแห้ง นำต้นหญ้าแฝกไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำชั่งหาน้ำหนักต้นแห้งทั้งหมดของต้นหญ้าแฝกโดยมีหน่วยเป็นกรัม

6. การหาน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (total biomass) โดยการนำเอาน้ำหนักต้นแห้งมารวมกับน้ำหนักรากแห้ง โดยมีหน่วยเป็นกรัม

7. การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นหญ้าแฝก นำต้นหญ้าแฝกไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาบดด้วยเครื่องบดจนเป็นผงละเอียดชั่งผงที่บดละเอียดตัวอย่างละ 0.5 กรัม นำไปใส่ในหลอดแก้วขนาด 75 มิลลิลิตร แล้วเติมสาร digest mixture ซึ่งมีส่วนผสมของ H_2SO_4 (ml) : Na_2SO_4 (g) : Se (g) เท่ากับ 1000 : 100 : 1 จำนวน

6 มิลลิลิตร นำหลอดแก้วไปตั้งบน block digestor ใน fume hood ย่อยสลายที่อุณหภูมิประมาณ 300-400 องศาเซลเซียส จนได้เป็นสารสีใสจึงยกออกจาก block digester ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แยกให้สารละลายผสมกันจนทั่วแล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาดหมายเลข 1 เก็บสารละลายในขวดพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

สถานที่ดำเนินการทดลอง

- ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- โรงเรือนบริเวณด้านข้างตึกกำจรบุญแปง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- ภาควิชาดินและปุ๋ย คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาดำเนินการทดลอง

เริ่มดำเนินกจรทดลอง เดือน กันยายน พ.ศ. 2539
สิ้นสุดการดำเนินการทดลอง เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2541

แผนการดำเนินงาน

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1.

การแยก และการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช จากรากหญ้าแฝกในพื้นที่ 2 จังหวัด คือ เชียงใหม่ และ เชียงราย

1. ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากรากหญ้าแฝกในพื้นที่ปลูกตามธรรมชาติ ในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย สามารถทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ 17 isolates (ตารางที่ 2, ภาพที่ 1 และ 2) โดยแบ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 5 isolates และแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากจังหวัดเชียงรายจำนวน 12 isolates

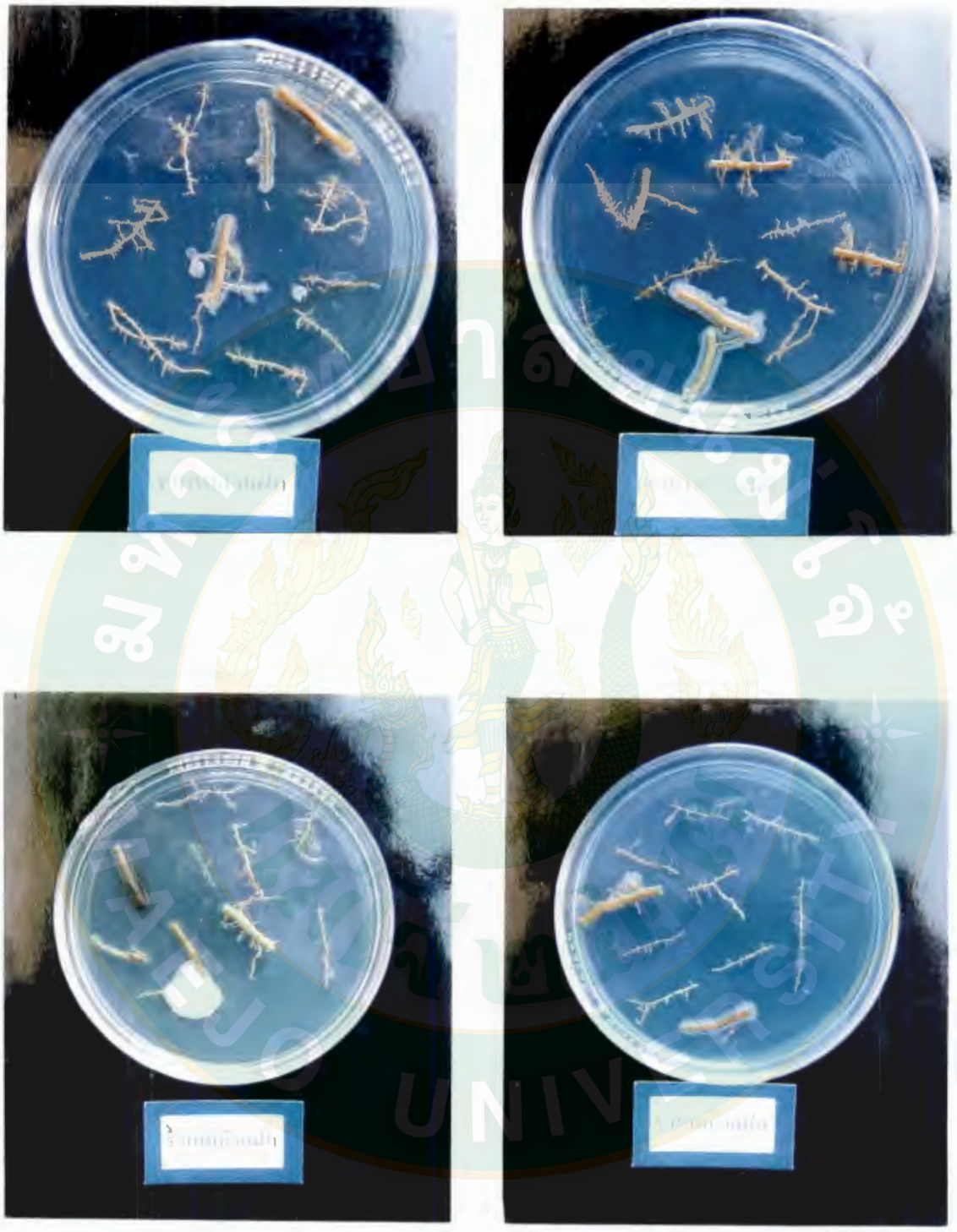
2. ผลการแยก และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตามการใช้แหล่งอาหาร และพลังงาน (carbon source) ตามหลักการของหนังสือ Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology สามารถจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ใช้ glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน จัดอยู่ในกลุ่มของ *Azotobacteraceae* ตัวอย่าง เช่น เชื้อ *Azotobacter sp. Beijerinckia sp.*จากการทดลองสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้ 12 isolates ได้แก่ HL 1, HL 1-2, HL 1-3, LDS 1, LDS 2, LDS 3, CR 2, CR 3, CR 4, CR 8, CR 9, และ CR 10 กลุ่มที่ 2. ใช้ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน จัดอยู่ในกลุ่มของ *Enterobacteriaceae* ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Klebsiella sp.* จากการทดลองสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้ 4 isolates ได้แก่ HL 1-1, HL 2, CR 1 และ CR 5 กลุ่มที่ 3. ใช้ malic acid เป็นแหล่งอาหารและพลังงานจัดอยู่ในกลุ่มของ *Spirillaceae* ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Azospirillum sp.* จากการทดลองสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ malic acid เป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้ 1 isolate คือ LDS 4 (ตารางที่ 2)

3. ผลการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยอาศัยเทคนิควิธี Acetylene Reduction Activity (ARA) ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 3 พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ทั้ง 17 isolates นั้นมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกันออกไป ตั้งแต่ไม่สามารถวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้ จนสามารถวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้ถึง 469.51 nmol C_2H_4/sample/day คือเชื้อ isolate CR 10 ซึ่งจากการทดลองนี้ มีเพียง 7 isolates

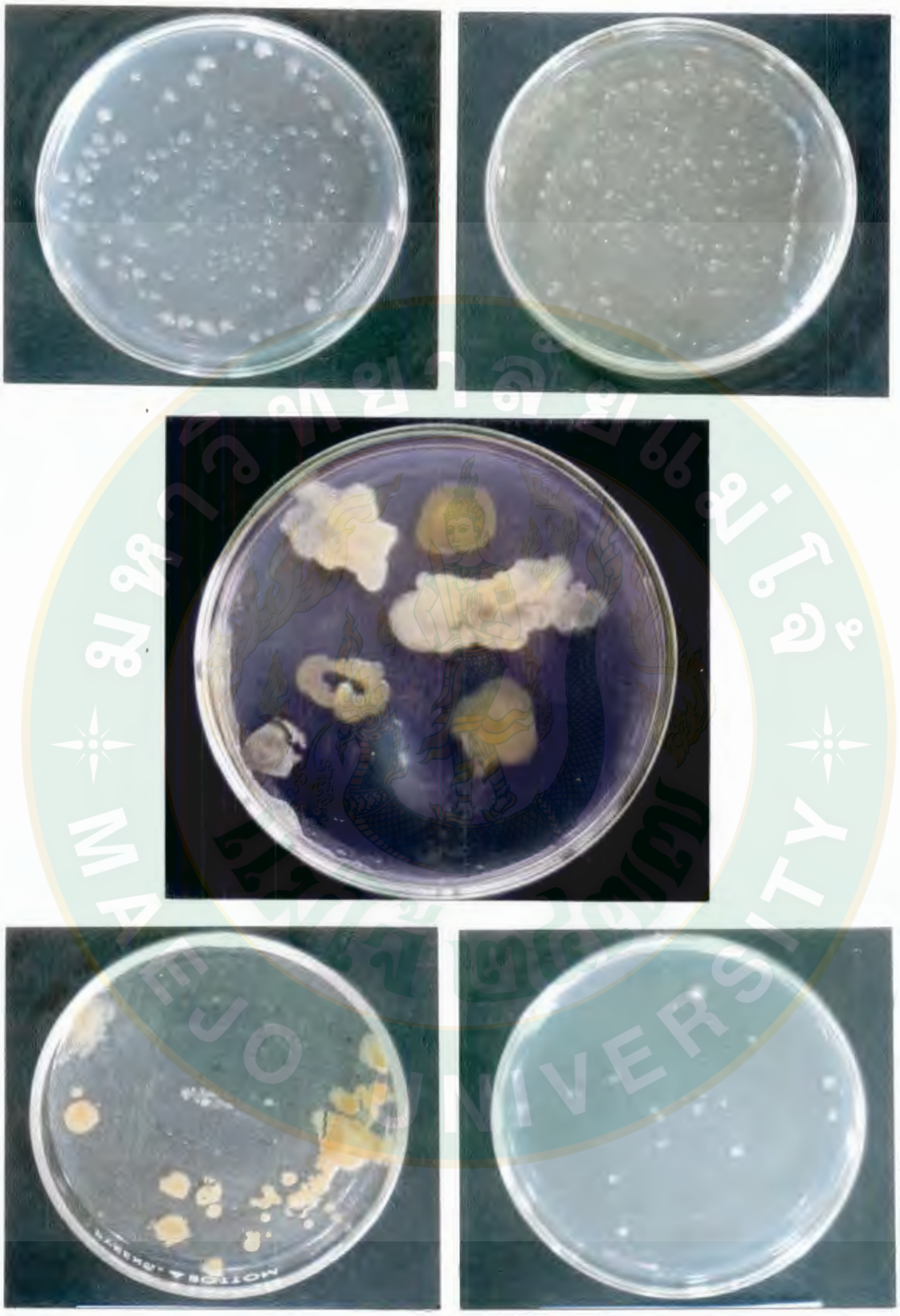
ที่สามารถวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้ และที่เหลืออีก 10 isolates มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนที่ต่ำมาก

4. ผลการหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรือจำนวนเซลของเชื้อแบคทีเรีย (เซลต่อมิลลิลิตร) โดยการนำเอาเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนที่มีแหล่งอาหารและพลังงาน (carbon source) ที่แตกต่างกันออกไป จากนั้นทำการหาจำนวนเซลแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีจำนวนเซลที่แตกต่างกันออกไป อยู่ระหว่าง 10^5-10^8 เซลต่อมิลลิลิตร ที่สามารถหาจำนวนเซลแบคทีเรียได้มีอยู่ 8 isolates ได้แก่ HL 2, LDS 1, LDS 2, LDS 3, LDS 4, CR 1, CR 3, และ CR 10 ส่วนที่เหลืออีก 9 isolates ที่ไม่พบว่ามีจำนวนเซลแบคทีเรีย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเกิดโคโลนีน้อยมากไม่สามารถที่จะนับและนำมาคำนวณเป็นจำนวนเซลแบคทีเรียได้ (ตารางที่ 2)

5. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ทั้ง 17 isolates ซึ่งอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยา (physiology) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของโคโลนี ตลอดจนรูปร่างของเซลแบคทีเรีย โดยลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมีรูปร่างค่อนข้างกลมจนถึงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบ และ ขรุขระ บางชนิดผิวหน้าโคโลนีย่นพับไปมา ผิวหน้าโคโลนีด้านจนถึงเป็นมันวาว บางชนิดมีการสร้างเมือก (slime) เนื้อของโคโลนีมีความเหนียว และไม่เหนียว หรือโคโลนีมีการสร้างสี (pigment) โดยการเกิด pigment จะมีการเปลี่ยนแปลงตามอายุของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างเช่น สีขาวขุ่น, สีน้ำตาล, สีเหลือง หรือสีชมพู ตามชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ในส่วนลักษระรูปร่างของเซลเชื้อแบคทีเรียก็มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป เช่น เป็นท่อนสั้น ๆ หรือท่อนยาว หรือกลม และคุณสมบัติในการย้อมติดสีของเซลแบคทีเรีย พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุก isolates ที่คัดเลือกได้ย้อมติดสีแกรมลบ (gram negative) ซึ่งเป็บลักษณะของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนดังรายละเอียดที่แสดงไว้ใน ตารางที่ 2 (ภาพที่ 2, 4 และ 5)



ภาพที่ 1. แสดงลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช จากรากหญ้าแฝก ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน



ภาพที่ 2. เปรียบเทียบลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ (single colony)

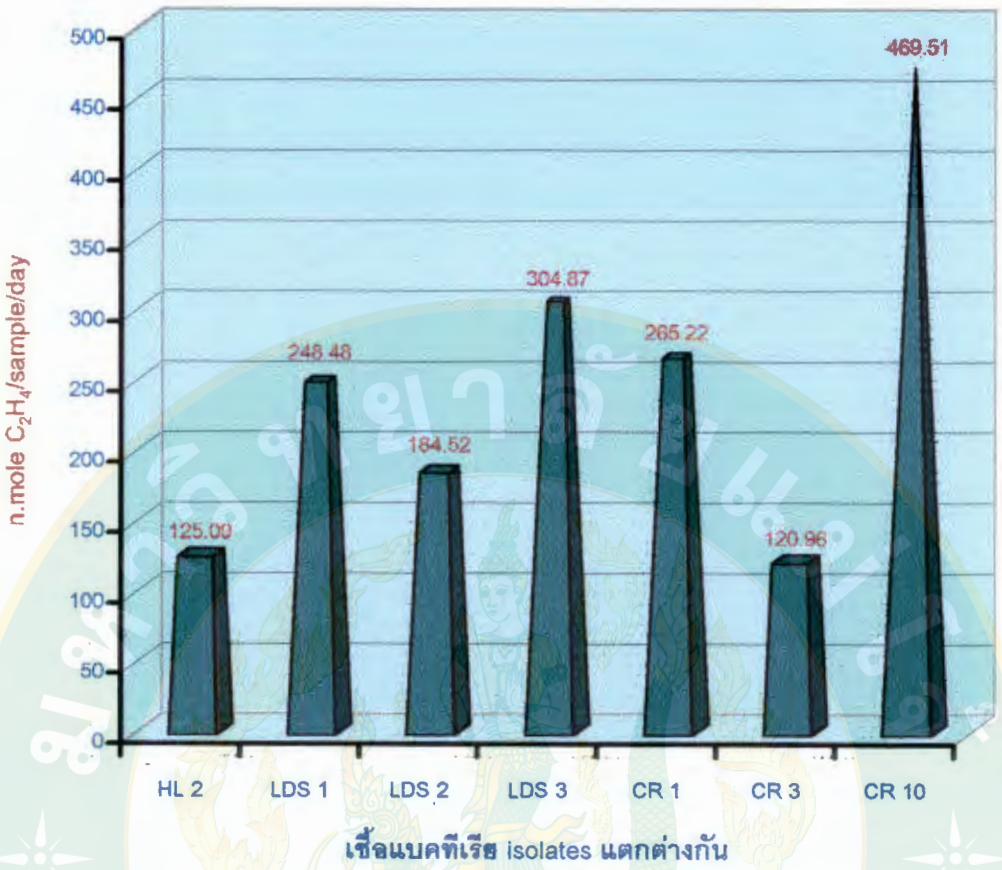
ตารางที่ 2. แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน จำนวน isolates และศักยภาพการตรึงไนโตรเจน ตลอดจนจำนวนเซลต่อมิลลิลิตรของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชที่คัดแยกได้จากรากหญ้าแฝกตามแหล่งต่างกัน

สถานที่เก็บตัวอย่างรากหญ้าแฝก	จำนวน isolates	แหล่งคาร์บอน	ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรีย (nmol C_2H_4/sample/day)	จำนวนเซลต่อมิลลิลิตร
1. บ้านห้วยลาน อ.สันกำแพง				
จ.เชียงใหม่ (HL)	5			
1.1 HL 1		glucose	-	-
1.2 HL 1/1		sucrose	-	-
1.3 HL 1/2		glucose	-	-
1.4 HL 1/3		glucose	-	-
1.5 HL 2		sucrose	125.09	7.00×10^5
2. สถานีพัฒนาที่ดิน อ.เมือง				
จ.เชียงราย (LDS)	4			
2.1 LDS 1		glucose	249.48	1.60×10^6
2.2 LDS 2		glucose	184.52	3.02×10^6
2.3 LDS 3		glucose	304.87	6.10×10^6
2.4 LDS 4		malic acid	-	2.20×10^6
3. บ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ.เมือง				
จ.เชียงราย (CR)	4			
3.1 CR 1		sucrose	265.22	2.46×10^8
3.2 CR 3		glucose	120.96	2.45×10^6
3.3 CR 8		glucose	-	-
3.4 CR 10		glucose	469.51	1.42×10^5
4. บ้านโป่งปูเฟื่อง อ.แม่สรวย				
จ.เชียงราย (CR)	2			
4.1 CR 2		glucose	-	-
4.2 CR 5		sucrose	-	-

ตารางที่ 2. (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่างรากหญ้าแฝก	จำนวน isolates	แหล่งคาร์บอน	ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรีย (nmol C_2H_4/sample/day)	จำนวนเซลต่อมิลลิลิตร
5. บ้านตีนดอย อ.แม่สรวย จ.เชียงราย (CR)	2			
5.1 CR 4		glucose	-	-
5.2 CR 9		glucose	-	-

หมายเหตุ isolates ที่ไม่พบว่ามีศักยภาพการตรึงไนโตรเจน แสดงว่ามีค่าศักยภาพการตรึงไนโตรเจนน้อยมาก และจำนวนเซลต่อมิลลิลิตรค่อนข้างต่ำ



ภาพที่ 3. เปรียบเทียบศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรีย isolates แตกต่างกัน

MAEJO UNIVERSITY

ตารางที่ 3. แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการใช้แหล่งอาหารและพลังงานของเชื้อแบคเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชที่คัดเลือกได้

isolate	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย
HL 1	เซลย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างของเซลเป็นท่อนสั้น ๆ ลักษณะของโคโลนีค่อนข้างกลม ขนาดเล็ก ผิวหน้าโคโลนีเรียบเป็นมันวาว ขอบเรียบ สีของโคโลนีในช่วงแรก ๆ จะมีสีขาวใส หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นเมื่อมีอายุมากขึ้น ไม่เหนียว ใช้ glucose หรือ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน แต่เจริญได้ดีใน glucose
HL 1-1	เซลย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างของเซลเป็นทรงกลมขนาดเล็ก ลักษณะของโคโลนีกลม ขนาดเล็ก ผิวหน้าย่นเล็กน้อย เป็นมันวาว ไม่เรียบ โคโลนีโค้งนูนขึ้น สีของโคโลนีในช่วงแรก ๆ จะมีสีขาวขุ่น ๆ เมื่อมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน ไม่เหนียว ใช้ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน
HL 1-2	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นท่อนสั้น ๆ ลักษณะของโคโลนีกลม ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว โค้งนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ เหนียวเล็กน้อย สีขาวขุ่น ใช้ glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน
HL 1-3	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นท่อน ๆ ลักษณะของโคโลนีกลม ขนาดเล็ก ผิวหน้าโคโลนีไม่เรียบ โค้งนูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ไม่เหนียว สีขาวขุ่น สามารถใช้ทั้ง glucose และ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน แต่เจริญได้ดีใน glucose
HL 2	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลทรงกลมขนาดเล็ก ลักษณะของโคโลนีค่อนข้างกลม ขนาดใหญ่ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว โค้งนูนขึ้นชัดเจน ขอบโคโลนีไม่เรียบ ค่อนข้างเหนียว สีขาวขุ่น ใช้ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน

ตารางที่ 3. (ต่อ)

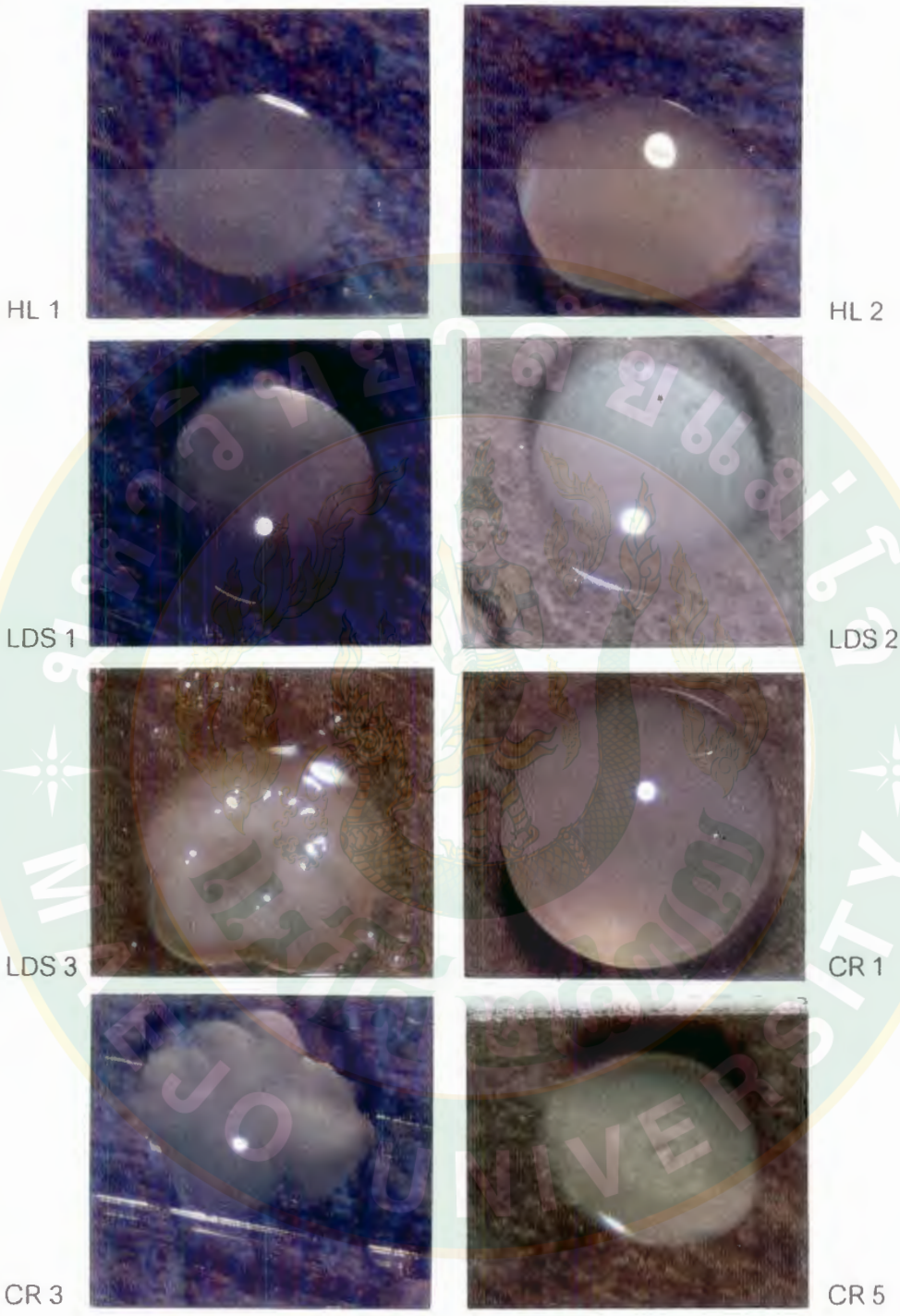
isolate	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย
LDS 1	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นทรงกลมขนาดเล็ก ลักษณะของโคโลนีค่อนข้างกลม มีขนาดใหญ่ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ขอบของโคโลนีเรียบ โค้งนูนเล็กน้อย ไม่เหนียว สีขาวใส สามารถใช้ทั้ง glucose และ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน แต่เจริญได้ดีใน glucose
LDS 2	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นท่อนสั้น ๆ ลักษณะของโคโลนีกลม มีขนาดใหญ่ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว โค้งนูนเล็กน้อย ขอบโคโลนีเรียบ มีความเหนียวเล็กน้อย สีของโคโลนีในช่วงแรกจะมีสีขาวใส เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีขาวขุ่น สามารถใช้ได้ทั้ง glucose และ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน แต่เจริญได้ดีใน glucose
LDS 3	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นท่อนสั้น ๆ ลักษณะของโคโลนีค่อนข้างกลม มีขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีย่นพับไปพับมา ขอบไม่เรียบ โค้งนูนขึ้นชัดเจน มีความเหนียวมาก ในช่วงแรกจะมีสีขาวขุ่น เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีสีเหลืองอ่อน สามารถใช้ทั้ง glucose และ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน แต่เจริญได้ดีใน glucose
LDS 4	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นทรงกลมขนาดเล็ก ลักษณะของโคโลนีกลม มีขนาดเล็กมาก ผิวหน้าไม่เรียบ เป็นมันวาว ขอบโคโลนีไม่เรียบเป็นรอยย่น โค้งนูนขึ้นเล็กน้อย มีความเหนียวพอสมควร สีขาวใส สามารถใช้ malic acid และ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน แต่เจริญได้ดีใน malic acid

ตารางที่ 3. (ต่อ)

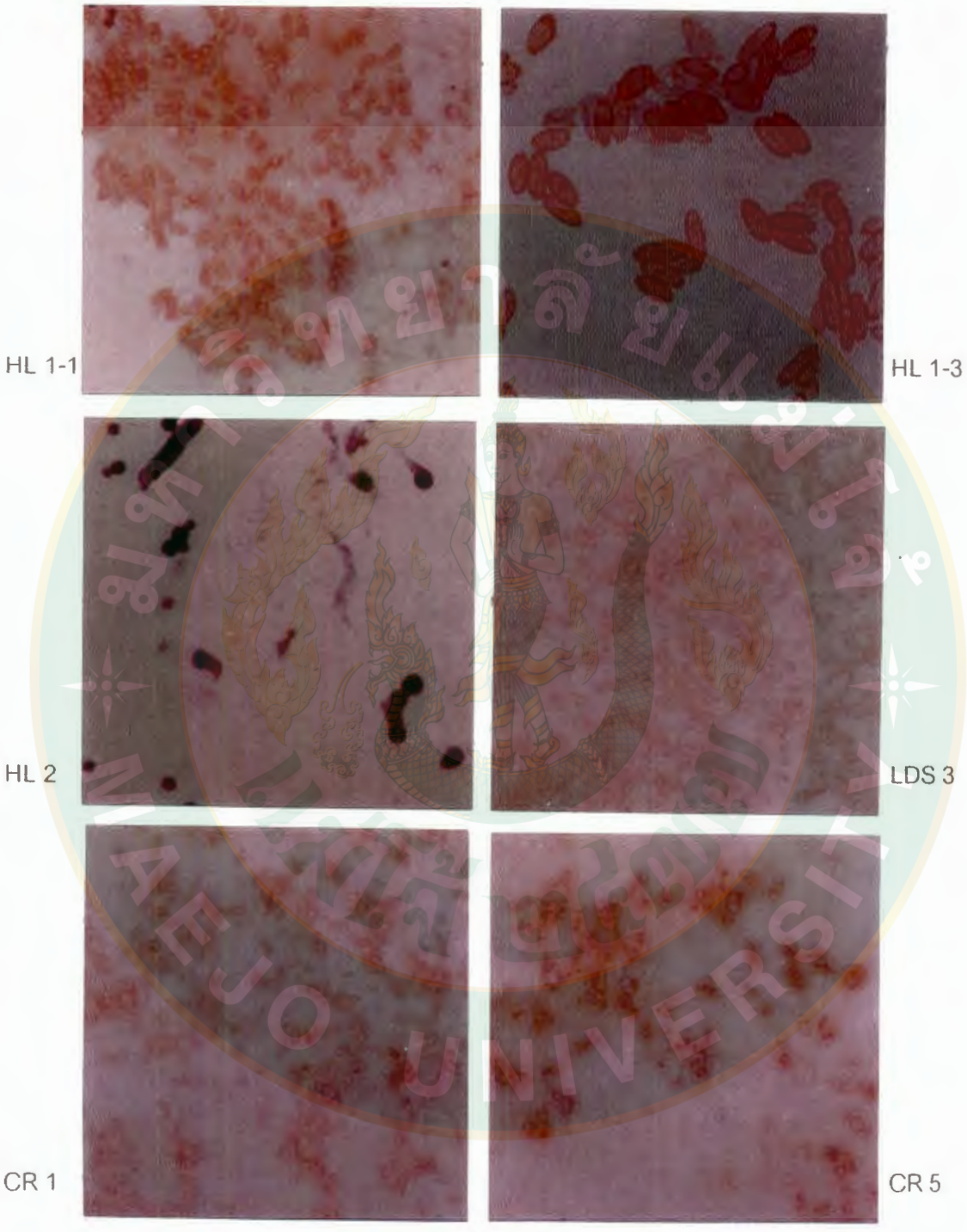
isolate	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย
CR 1	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นท่อนสั้น ๆ ลักษณะของโคโลนีกลม มีขนาดใหญ่ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว มีเมือกปกคลุมผิวหน้าโคโลนี โคโลนีโค้งนูนชัดเจนมาก มีความเหนียวมาก สีขาวขุ่น ใช้ทั้ง sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน
CR 2	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นท่อนสั้น ๆ ลักษณะของโคโลนีกลม มีขนาดเล็ก ผิวหน้าโคโลนีเรียบเป็นมันวาว ขอบเรียบ โค้งนูนขึ้นเล็กน้อย ไม่เหนียว สีของโคโลนีในช่วงแรก ๆ จะมีสีขาวใส เมื่อมีอายุมากขึ้นจะเป็นสีขาวขุ่น ใช้ glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน
CR 3	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นท่อนสั้น ๆ ลักษณะของโคโลนีค่อนข้างกลม มีขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีไม่เรียบ เป็นมันเล็กน้อย ขอบโคโลนีไม่เรียบ โค้งนูนขึ้นชัดเจน สีของโคโลนีในช่วงแรก ๆ จะมีสีขาวใส เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือน้ำตาล สามารถใช้ได้ทั้ง glucose และ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน แต่เจริญได้ดีใน glucose
CR 4	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลค่อนข้างกลมขนาดเล็ก ลักษณะของโคโลนีค่อนข้างกลมมีขนาดเล็ก ผิวหน้าโคโลนีเรียบเป็นมันวาว ขอบเรียบ โค้งนูนเล็กน้อย ไม่เหนียว สีขาวขุ่น ใช้ glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน
CR 5	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลกลมขนาดเล็กมาก ลักษณะของโคโลนีกลม มีขนาดเล็ก ผิวหน้าโคโลนีไม่เรียบเป็นมันวาว ขอบเรียบ โค้งนูนเล็กน้อย ไม่เหนียว สีของโคโลนีสีขาวขุ่นและจะชัดเจนมากขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น ใช้ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน

ตารางที่ 3. (ต่อ)

isolate	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย
CR 8	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลค่อนข้างกลมขนาดเล็ก ลักษณะของโคโลนีกลม มีขนาดเล็ก ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ขอบไม่เรียบ โค้งนูนขึ้นเล็กน้อย ค่อนข้างเหนียว ใช้ glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน
CR 9	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นท่อนสั้น ๆ ขนาดเล็กมาก ลัษณะของโคโลนีค่อนข้างกลม ขนาดเล็ก ผิวหน้าโคโลนีไม่เรียบ มันวาว ขอบไม่เรียบ โค้งนูนเล็กน้อย ผิวหน้าโคโลนีมีเมือกปกคลุม ค่อนข้างเหนียว สีขาวขุ่น ใช้ glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน
CR 10	เซลย้อมติดสีแกรมลบ ลักษณะของเซลเป็นท่อน ลักษณะของโคโลนีค่อนข้างกลม ขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีไม่เรียบ มันวาวเล็กน้อย ขอบเรียบ โคโลนีโค้งนูนชัดเจน มีความเหนียวมาก สีขาวขุ่น ใช้ glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน



ภาพที่ 4. เปรียบเทียบลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช isolates แตกต่างกัน



ภาพที่ 5. แสดงลักษณะรูปร่างของเซลเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช isolates แตกต่างกัน

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1.

ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืชจากรากหญ้าแฝก ในพื้นที่ 2 จังหวัดคือ จังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างรากหญ้าแฝกใน 5 พื้นที่ ซึ่งในแต่ละพื้นที่มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป เช่น พื้นที่ป่าที่ยังไม่มีการบุกรุกหรือมีการปลูกพืชอื่นๆ มาก่อน คือ บ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ. เมือง จ. เชียงราย พื้นที่ที่มีการเพาะปลูกพืชอย่างต่อเนื่อง เช่น ปลูกข้าว, ข้าวโพด,และถั่วเหลือง ได้แก่พื้นที่ ต. ห้วยลาน อ. สันกำแพง จ. เชียงใหม่, บ้านโป่งปูเพื่อง อ. แม่สรวย จ. เชียงราย และบ้านตีนดอย อ. แม่สรวย จ. เชียงราย และพื้นที่ที่มีการปลูกพืชเป็นแปลงทดลองของสถานีพัฒนาที่ดิน อ. เมือง จ. เชียงราย สามารถทำการแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ 17 isolates ดังตารางที่ 2 ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ เศรษฐา และคณะ (2539) ที่ดำเนินการทดลองในลักษณะคล้ายคลึงกัน และสามารถทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้จำนวน 49 สายพันธุ์ จากรากหญ้าแฝก จากการคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้นี้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเหล่านี้สามารถที่จะอาศัยร่วมกับรากหญ้าแฝกและมีกิจกรรมร่วมกัน มีรายงานวิจัยที่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชได้ในพืชตระกูลหญ้าอื่นๆ เช่นในหญ้าอาหารสัตว์ (Schank *et al.*, 1981 ; Malik and Zafer, 1985) อ้อย (เศรษฐา และคณะ, 2539 ; Dobereiner, 1988) ข้าว (Rinaudo *et al.*, 1981 ; Kazuo, 1996) ข้าวสาลี (Nur *et al.*, 1980) และข้าวฟ่าง (Singh *et al.*, 1980) การที่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช มีความสัมพันธ์กับหญ้าแฝกและพืชตระกูลหญ้านั้น มีรายงานว่าปัจจัยที่สำคัญคือ สารประกอบอินทรีย์ที่หญ้าแฝกหรือพืชตระกูลหญ้าปลดปล่อยออกมาทางรากที่เรียกว่า root exudates แล้วแบคทีเรียเหล่านี้ก็จะสามารถใช้ประโยชน์จากสารประกอบอินทรีย์ในการเจริญเติบโต โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะอาศัยอยู่บริเวณรอบ ๆ รากของหญ้าแฝกและพืชตระกูลหญ้าที่เรียกว่า rhizosphere จากนั้นแบคทีเรียจะทำการตรึงไนโตรเจนแล้วจะปลดปล่อยออกมาให้หญ้าแฝกหรือพืชตระกูลหญ้าใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตต่อไป

ผลจากการคัดเลือกที่ได้เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ทั้งชนิดและปริมาณที่แตกต่างกัน จากพื้นที่ต่าง ๆ ที่ทำการสุ่มเก็บรากหญ้าแฝก ที่มีสภาพแวดล้อมและสภาพของดินที่หญ้าแฝกเจริญเติบโตแตกต่างกันออกไป แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ สามารถที่จะปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้หลากหลายเหตุผลอาจเนื่องมาจากลักษณะทางสรีระวิทยา และคุณสมบัติพิเศษบางประการของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ยกตัวอย่าง เช่นเชื้อ *Azotobacter sp.*

เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น อุณหภูมิสูงเกินไปเชื้อแบคทีเรียจะสร้าง cyst เพื่อห่อหุ้มตัวเอาไว้ (John *et al.*,1994)

ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนนั้นได้อาศัยหลักการตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1974 ; John *et al.*,1994) โดยการอาศัยการใช้แหล่งอาหารและพลังงาน (carbon source) ของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเป็นปัจจัยในการแบ่งกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 2) โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน (nitrogen free agar : NFA) ซึ่งประกอบด้วยแหล่งอาหารและพลังงานที่แตกต่างกัน เช่น glucose และ sucrose เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter sp. Beijerinckia sp.* และ *Klebsiella sp.* ฯลฯ ตามสูตรอาหารของ Dobereiner *et al.* (1972 a,b) สำหรับสูตรอาหารที่มี malic acid เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum sp.* ดัดแปลงจากสูตรของ Dobereiner *et al.* (1976) ; Okon *et al.* (1977) สำหรับเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน เชื้อแบคทีเรียนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Azotobacteraceae* ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Azotobacter sp.* ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน เชื้อแบคทีเรียนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Enterobacteriaceae* ตัวอย่างเช่นเชื้อ *Klebsiella sp.* และ *Enterobacter sp.* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rennie (1980) และแบคทีเรียที่เจริญได้ดีบนอาหารที่มี malic acid เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน เชื้อแบคทีเรียนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Spirillaceae* ตัวอย่างเช่นเชื้อ *Azospirillum sp.* (Dobereiner and Baldani, 1979 ; Rennie ,1980) และยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้ง glucose และ sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน จัดแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ในกลุ่มของ *Azobacteraceae* ตัวอย่างเช่นเชื้อ *Beijerinckia sp.*และ *Derxia sp.* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dobereiner (1968)

สำหรับการศึกษาศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยเทคนิควิธี Acetylene Reduction Activity (ARA) โดยการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนชนิดเหลว (nitrogen free broth ; NFB) ผลการ วัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolates มีความแตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 2, ภาพที่ 3.) คือตั้งแต่ไม่สามารถวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้ จนสามารถวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้ถึง 469.51 nmol C_2H_4/sample/day ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืชจากแหล่งเพาะปลูกที่มีสภาพแวดล้อม

ที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าเชื้อแบคทีเรียจะมีลักษณะใกล้เคียงกันหรือเหมือนกันก็อาจมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกันออกไป (Day *et al.*, 1975 ; Dobereiner *et al.*,1976 ; Patiquin, 1983) สำหรับในบาง isolates ที่ไม่สามารถวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้เนื่องจากทำการวัดแล้วมีค่าต่ำมาก ทั้ง ๆ ที่ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolates มีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น อุณหภูมิ ความชื้น สภาพความเป็นกรดด่างของดิน หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ ชีวปัจจัย และอื่นๆ ปัจจัยเหล่านี้สอดคล้องกับสภาพพื้นที่ที่สุ่มเก็บรากหญ้าแฝกในการทดลองนี้ เช่น จากสถานีพัฒนาที่ดินเป็นแปลงทดลองปลูกพืชจึงมีการบำรุงดินและดูแลรักษาที่ดีทำให้ดินมีคุณสมบัติที่เหมาะสม พื้นที่บ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ. เมือง จ. เชียงราย มีลักษณะเป็นพื้นที่ป่าที่ไม่เคยถูกรบกวนมาก่อน และไม่มีการทำการเกษตรมาก่อนดังนั้นคุณสมบัติและความอุดมสมบูรณ์ของดินจึงเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ส่วนในพื้นที่ที่เหลือเป็นพื้นที่ที่มีการทำการเกษตรเพาะปลูกพืช ดินจึงถูกรบกวน ทำให้คุณสมบัติของดินเสียไป หรือมีการใช้สารเคมีต่างๆกับพืชที่เพาะปลูก จึงทำให้เกิดมีสารพิษตกค้างในดินจึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบาง isolates ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมานั้นจะส่งผลถึงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกได้ ตลอดจนความสามารถในการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกันด้วย

ในการศึกษาถึงจำนวนเซลแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ (ตารางที่ 2) ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลแบคทีเรียต่อศักยภาพการตรึงไนโตรเจน จากการทดลองพบว่าจำนวนเซลของเชื้อแบคทีเรียจะมีอยู่ในช่วง 10^5 - 10^8 เซลต่อมิลลิลิตร สำหรับในบาง isolates ที่ไม่พบว่ามีจำนวนเซลนั้น เนื่องจากลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาดเล็กมาก และจำนวนโคโลนีมีจำนวนน้อยไม่สามารถนับจำนวนได้ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลแบคทีเรียกับศักยภาพการตรึงไนโตรเจน isolates LDS 4 นั้นพบว่ามีจำนวนเซลแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่ามีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่ต่ำมาก แสดงให้เห็นว่า isolate ดังกล่าวสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนแต่มีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่ต่ำ

จากผลการทดลองที่ 1. ที่ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ สามารถเจริญเติบโตหรือมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกันออกไป จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีการเจริญเติบโตที่ดีและมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่สูงไปทำการทดลองใส่ให้กับหญ้าแฝกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป เช่น แสง, อุณหภูมิ, วัสดุปลูก, ภาชนะปลูก และระยะเวลาดำเนินการทดลอง เพื่อที่จะศึกษาการเจริญเติบโต และศักยภาพ

การตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝกต่อไป แม้ว่าแบคทีเรีย isolates CR 10 จะมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด เมื่อตรวจวัดด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Activity (ARA) แต่ก็ไม่ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย isolates CR 10 ใช้ในการทดลองทั้งนี้ได้มีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolates ที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจนเพื่อใส่ให้แก่หญ้าแฝก ก่อนที่จะมีการตรวจวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตาม isolates ที่ได้คัดเลือกไว้ก็ถือว่ามีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนที่สูง และผลของการทดลองก็น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

ผลการทดลองที่ 2.

การศึกษาเปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช ต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก

การทดลองย่อยที่ 1 การทดลองในสภาพปลอดเชื้อที่ควบคุมสภาพแวดล้อมได้ วัสดุปลูกเป็นวุ้นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ปราศจากไนโตรเจน (nitrogen free agar : NFA) แบบกึ่งแข็ง (semi-solid) อายุการเก็บเกี่ยว 30 วัน ผลการทดลองมีดังนี้

1. การพัฒนาด้านความสูง

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก isolates ทำให้หญ้าแฝกมีการพัฒนาด้านความสูงมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยเฉพาะการใส่เชื้อ HL 2 นั้น ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงถึง 20.90 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าการใส่เชื้อ CR 3, HL 1 และการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 6) แต่การใส่เชื้อ HL 2 จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ LDS 3, HL 3 และ CR 1 โดยการใส่เชื้อ LDS 3, HL 3 และ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 19.23, 18.58 และ 18.30 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ CR 3, HL 1 และการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 16.62, 16.53 และ 14.50 เซนติเมตร ตามลำดับ

2. การพัฒนาด้านจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ)

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก isolates ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) มากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4) โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) มากที่สุดเท่ากับ 3.00 ต้น รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ HL 1, HL 2, LDS 3, CR 1 และ HL 3 หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 2.75, 2.50, 2.50, 2.25 และ 2.25 ต้น ตามลำดับ การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 0.50 ต้น

ภาพที่ 6. เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก ในสภาพปลอดเชื้อ

MAEJO UNIVERSITY

3. การพัฒนาด้านความยาวราก

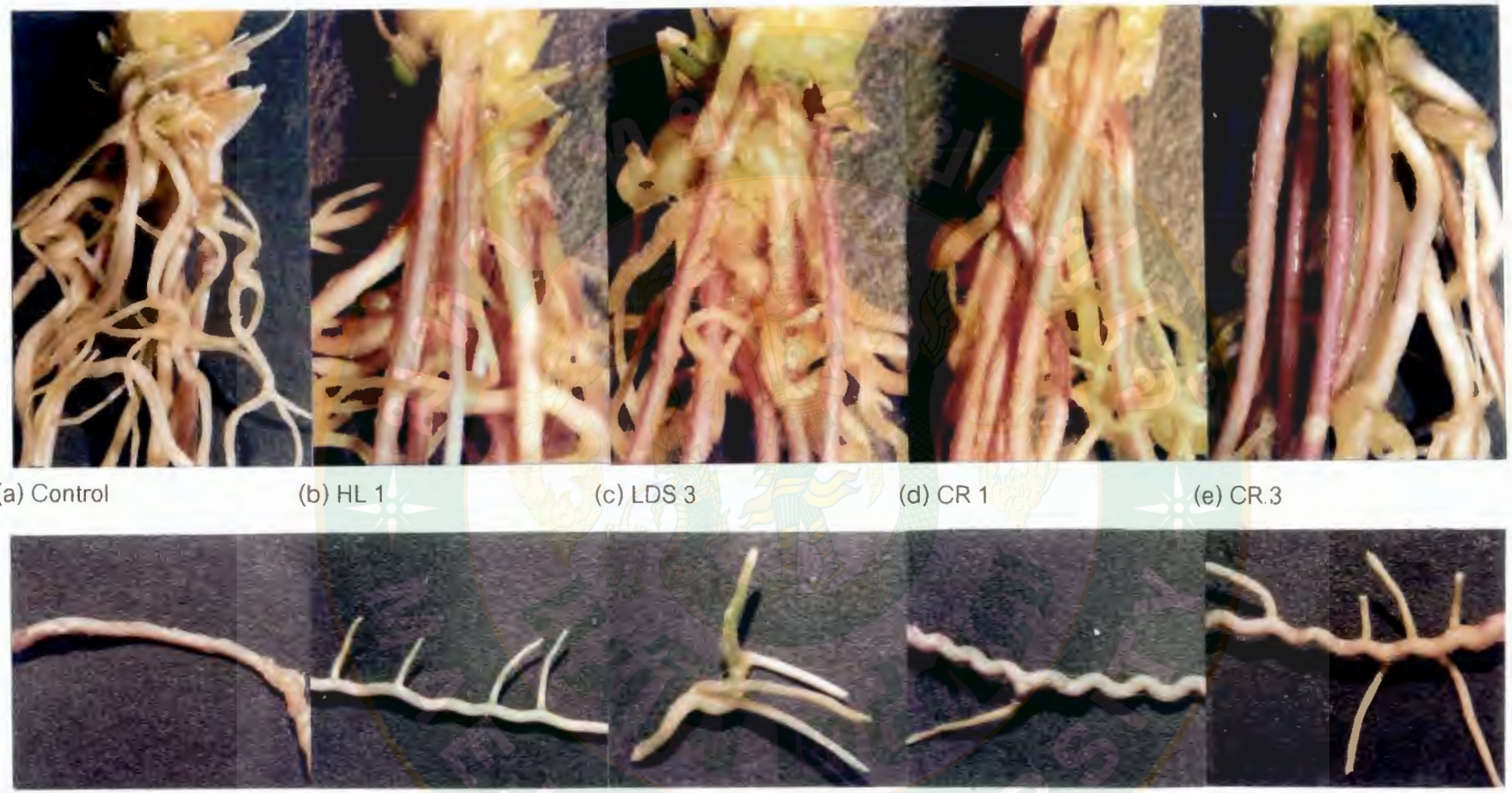
ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ HL 3 นั้น ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากที่สุด เท่ากับ 11.45 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าการใส่เชื้อ CR 3 และการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4) แต่การใส่เชื้อ HL 3 หญ้าแฝกจะมีความยาวรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ กับการใส่เชื้อ LDS 3, HL 1, HL 2 และ CR 1 ซึ่งหญ้าแฝกมีความยาวรากเท่ากับ 10.53, 10.23, 10.15 และ 9.58 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับการใส่เชื้อ CR 3 หญ้าแฝกมีความยาวรากเท่ากับ 6.60 เซนติเมตร และการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากน้อยที่สุดเท่ากับ 6.18 เซนติเมตร

4. การพัฒนาด้านจำนวนรากที่เกิดใหม่

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ไม่ทำให้หญ้าแฝกมีการพัฒนาด้านจำนวนรากที่เกิดใหม่ที่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 4, ภาพที่ 7 และ 8) อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates นั้น ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนรากที่เกิดใหม่มากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนรากที่เกิดใหม่มากที่สุดเท่ากับ 11.50 เส้น รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ CR 1, HL 1, LDS 3, HL 2, และ HL 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีจำนวนรากที่เกิดใหม่เท่ากับ 9.50, 9.25, 8.25, 8.25, และ 7.50 เส้น ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนรากที่เกิดใหม่น้อยที่สุดเท่ากับ 5.00 เส้น

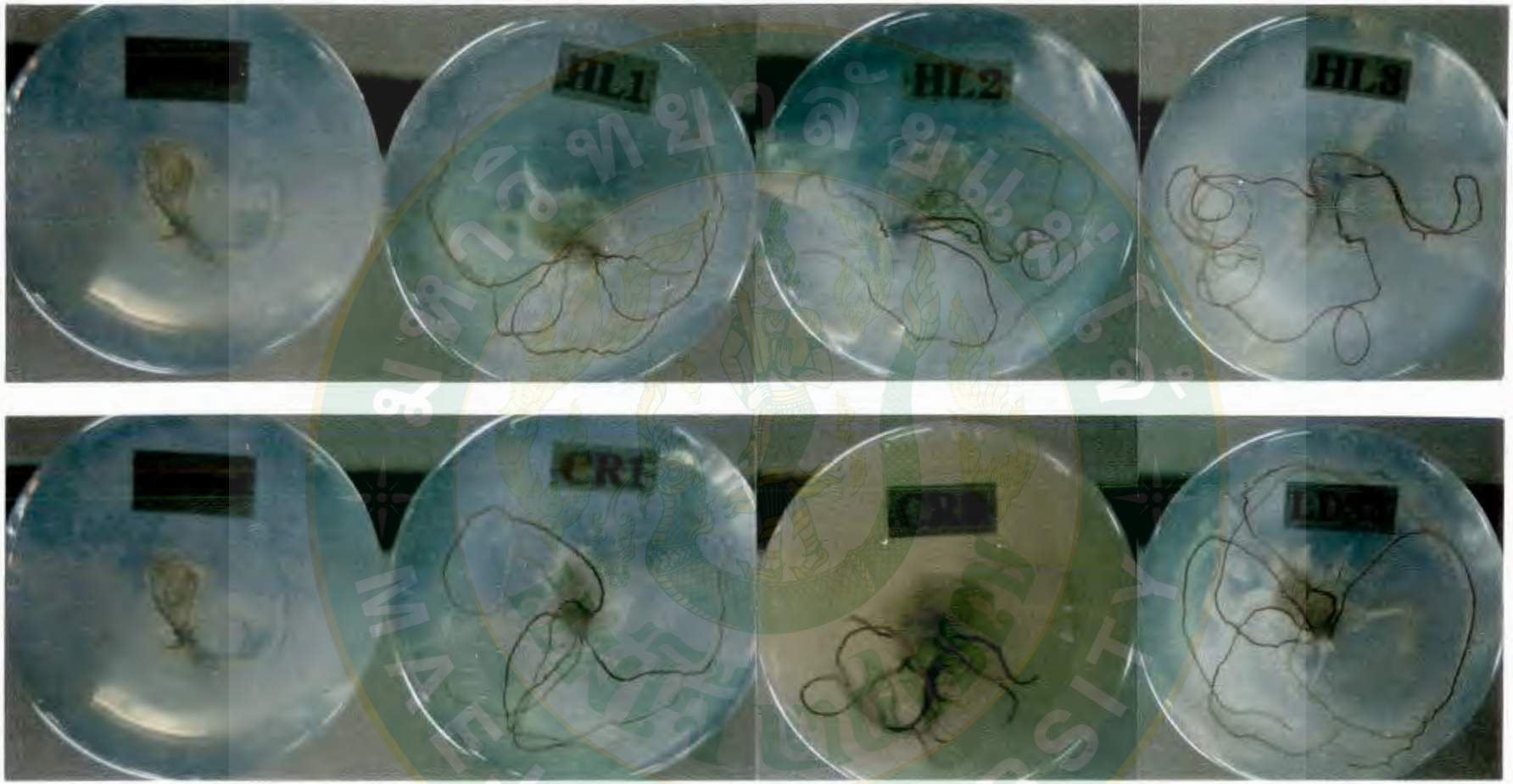
5. การพัฒนาด้านจำนวนรากฝอย

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนรากฝอยเกิดขึ้นมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ HL 1, LDS 3, HL 2, นั้น ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนรากฝอยมากที่สุด เท่ากับ 76.50, 65.75, และ 63.00 ส้น ซึ่งมากกว่าการใส่เชื้อ CR 3, การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย และ HL 3 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 7) แต่การใส่เชื้อ HL 3 หญ้าแฝกมีจำนวนรากฝอย ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ CR 1 ซึ่งหญ้าแฝกมีจำนวนรากฝอยเท่ากับ 49.25 เส้น ส่วนการใส่เชื้อ CR 3, การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย และ HL 3 หญ้าแฝกมีจำนวนรากฝอยน้อยที่สุดเท่ากับ 21.75, 20.00 และ 18.75 เส้น



(a) Control (b) HL 1 (c) LDS 3 (d) CR 1 (e) CR 3

ภาพที่ 7. เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเปลี่ยนแปลงของรากหญ้าแฝกที่เกิดขึ้นใหม่ และการแตกรากฝอย ในการทดลองสภาพปลอดเชื้อ (a) Control (b) HL 1 (c) LDS 3 (d) CR 1 (e) CR 3



ภาพที่ 8. เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของรากหญ้าแฝก บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในการทดลองสภาพปลอดเชื้อ

6. การสะสมน้ำหนักแห้งของรากที่เกิดใหม่

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝก มีน้ำหนักแห้งของรากที่เกิดใหม่มากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4) โดยเฉพาะการใส่เชื้อ LDS 3 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากที่เกิดใหม่มากที่สุด เท่ากับ 0.0242 กรัม รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ HL 1, HL 3, CR 1, HL 2 และ CR 3 หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากที่เกิดใหม่เท่ากับ 0.0240, 0.0228, 0.0226, 0.0219 และ 0.0209 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากที่เกิดใหม่ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.0089 กรัม

7. การสะสมน้ำหนักแห้งของราก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากหญ้าแฝกมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4,ภาพที่ 9) โดยเฉพาะการใส่เชื้อ LDS 3 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากสูงที่สุดเท่ากับ 0.040 กรัม รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ HL 3, HL 2, CR 1, HL 1 และ CR 3 ที่มีน้ำหนักแห้งของรากหญ้าแฝกเท่ากับ 0.038, 0.036, 0.034 และ 0.032 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากต่ำที่สุดเท่ากับ 0.019 กรัม

8. การสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบ

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบสูงกว่าการไม่ใส่เชื้อ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 9) โดยเฉพาะการใส่เชื้อ LDS.3 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบมากที่สุด เท่ากับ 0.107 กรัม รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อแบคทีเรีย CR 1, CR 3, HL 2, HL 3 และ HL 1 หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบ เท่ากับ 0.099, 0.096, 0.095, 0.092 และ 0.089 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบต่ำที่สุดเท่ากับ 0.057 กรัม

9. การสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (มวลชีวภาพ)

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดมากกว่าการไม่ใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 9) โดยเฉพาะการใส่เชื้อ LDS 3 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดมากที่สุด เท่ากับ 0.147 กรัม

รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ CR 1, HL 2, HL 3, CR 3 และ HL 1 หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดเท่ากับ 0.133, 0.130, 0.129, 0.128 และ 0.123 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวม ทั้งหมดต่ำที่สุดเท่ากับ 0.076 กรัม

10. ศักยภาพการตรึงไนโตรเจน

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยการใส่เชื้อ CR 3 หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากที่สุดเท่ากับ 903.29 nmol C_2H_4/sample/day ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ กับการใส่เชื้อ CR 1, HL 3, HL 2, LDS 3, HL 1 และการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งหญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 62.41, 26.10, 17.59, 17.59, 15.12 และ 7.38 nmol C_2H_4/sample/day ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

11. เปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบหญ้าแฝก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกพบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบาง isolates ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 10) โดยการใส่เชื้อ CR 1 และ HL 2 ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากที่สุดเท่ากับ 1.32 และ 1.30 ซึ่งมากกว่าการใส่เชื้อ HL 1, การไม่ใส่เชื้อ และ LDS 3 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่การใส่เชื้อ CR 1 และ HL 2 หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ HL 3 และ CR 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบเท่ากับ 1.16 และ 1.15 สำหรับการใส่เชื้อ HL 3 และ CR 3 มีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบ มากการใส่เชื้อ LDS 3 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ HL 1 และการไม่ใส่เชื้อ ซึ่งหญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบเท่ากับ 1.07 และ 1.02

12. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน)

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากกว่า การไม่ใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 10) โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากที่สุด เท่ากับ 0.130 กรัม รองลงไป ได้แก่การใส่เชื้อ HL 2, CR 3, HL 3, LDS 3, และ HL 1 โดยที่หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจน

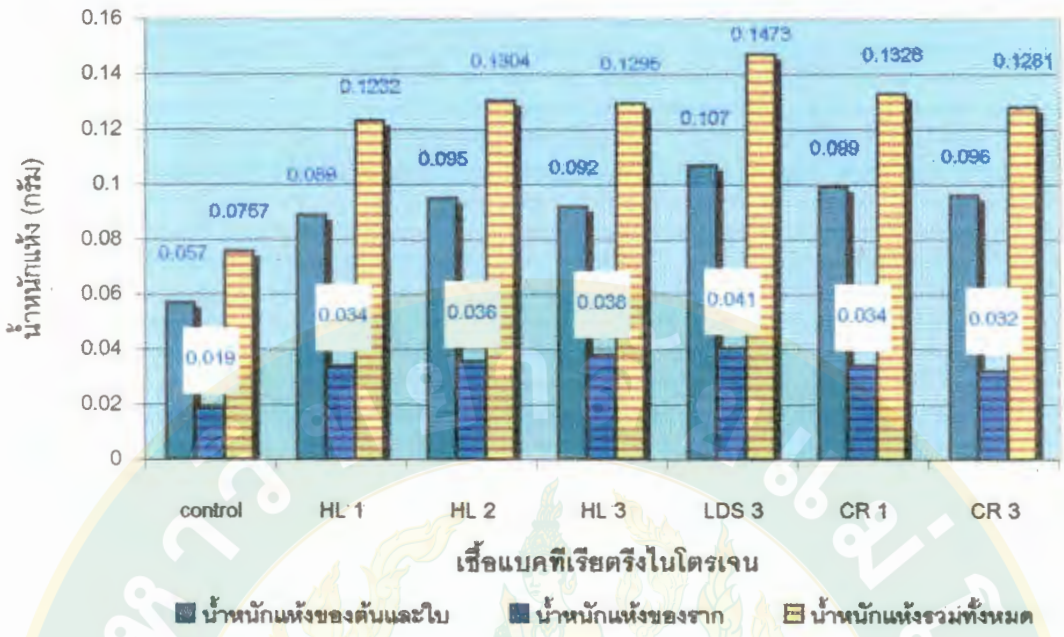
ทั้งหมดในต้นและใบ เท่ากับ 0.123, 0.110, 0.106, 0.096, และ 0.095 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้ หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนในต้นและใบต่ำที่สุดเท่ากับ 0.058 กรัม

ตารางที่ 4. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่างๆ และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ในสภาพปลอดเชื้อ

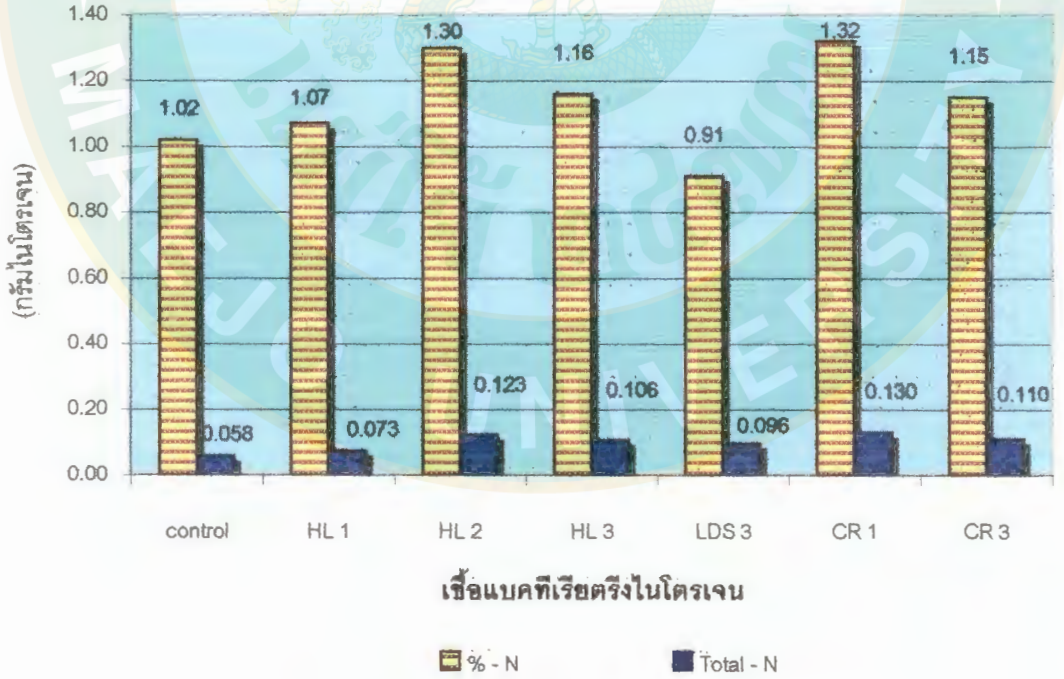
	ความสูง (ซม.)	จำนวนหน่อ (ต้น)	รากที่เกิดใหม่ (เส้น)	รากแขนง (เส้น)	ความยาวราก (ซม.)	น.น. แห้งราก ที่เกิดใหม่ (กรัม)	น.น. แห้งราก (กรัม)	น.น. แห้ง ต้นและใบ(กรัม)	น.น. แห้งรวม ทั้งหมด (กรัม)	ศักยภาพการตรึง ไนโตรเจน (ARA)	เปอร์เซนต์ ไนโตรเจน	ปริมาณ ไนโตรเจนในต้น
Control	14.50 c	0.50 b	5.00	20.00 b	6.18 c	0.0089 b	0.0187 b	0.0570 b	0.0757 b	7.38 b	1.02 bc	0.058 c
HI 1	16.53 bc	2.75 a	9.25	76.50 a	10.23 abc	0.0240 a	0.0340 a	0.0893 a	0.1232 a	15.12 b	1.07 bc	0.073 b
HL 2	20.90 a	2.50 a	8.25	63.00 a	10.15 abc	0.0219 a	0.0356 a	0.0948 a	0.1304 a	17.59 b	1.30 a	0.123 ab
HL 3	18.58 ab	2.25 a	7.50	18.75 b	11.45 a	0.0228 a	0.0380 a	0.0915 a	0.1295 a	26.10 b	1.16 ab	0.106 ab
LDS 3	19.23 ab	2.50 a	8.25	65.75 a	10.53 ab	0.0242 a	0.0405 a	0.1068 a	0.1473 a	17.59 b	0.91 c	0.096 b
CR 1	18.30 ab	2.25 a	9.50	49.25 ab	9.58 abc	0.0226 a	0.0343 a	0.0985 a	0.1328 a	62.41 b	1.32 a	0.130 a
CR 3	16.65 bc	3.00 a	11.50	21.75 b	6.60 bc	0.0209 a	0.0321 a	0.0960 a	0.1281 a	903.29 a	1.15 ab	0.111 ab
F-Test	*	**	ns	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	13.29	32.53	36.57	41.24	20.92	24.44	12.17	13.71	12.35	167.34	7.54	14.14

หมายเหตุ ตัวเลขในแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการทดสอบ DMRT

หน่วยของการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจน (ARA) nmol C_2H_4/sample/day



ภาพที่ 9. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่างๆ ของหญ้าแฝก ในสภาพปลอดเชื้อ



ภาพที่ 10. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน)ของหญ้าแฝก

ผลการทดลองย่อยที่ 2 ทำการทดลองในภาชนะปลูกกระถางพลาสติก วัสดุปลูก คือ ทรายน้ำจืดผสมขี้เถ้าแกลบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เป็นการทดลองที่ไม่สามารถที่จะควบคุมสภาพแวดล้อมได้ทั้งหมด อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน ผลการทดลองมีดังนี้

1. **การพัฒนาด้านความสูง**

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึง สัปดาห์ที่ 5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 5, ภาพที่ 11) อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates นั้น ทำให้หญ้าแฝกมีความสูง มากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยในสัปดาห์ที่ 5 พบว่า การใส่เชื้อ HL 2 ทำให้หญ้าแฝกมีความสูง มากที่สุดเท่ากับ 62.63 เซนติเมตร รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อแบคทีเรีย LDS 1, HL 1, CR 1, CR 4, CR 2, *Azospirillum brasilense*, CR 3, CR 5, LDS 2 และ *Klebsiella oxytoca* หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 62.25, 60.75, 59.50, 59.00, 58.75,58.50, 57.75, 55.38, 55.13 และ 54.82 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุดเท่ากับ 53.00 เซนติเมตร

2. **การพัฒนาด้านจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ)**

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 5) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates นั้น ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยในสัปดาห์ที่ 5 พบว่าการใส่เชื้อ HL 2 และ *Klebsiella oxytoca* ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอสูงที่สุดเท่ากับ 12.00 ต้น รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อแบคทีเรีย CR 4, CR 5, LDS 2, CR 2, CR 3, LDS 1, CR 1, HL 1 และ *Azospirillum basilense* หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 11.75, 11.00, 10.75, 10.50, 10.25, 9.75, 9.75, 9.50 และ 9.25 ต้น ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 8.50 ต้น

ตารางที่ 5. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความสูง(ซม.) และจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝกในแต่ละสัปดาห์ ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน

	ความสูง (สัปดาห์)					จำนวนต้นต่อกอ (สัปดาห์)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Control	42.75	48.25	51.25	53.00	53.75	4.25	5.25	6.75	8.00	8.50
HL 1	44.50	53.25	57.50	60.50	60.75	4.25	5.50	7.50	9.25	9.50
LDS 1	44.00	51.75	58.75	61.50	62.25	5.50	7.50	8.00	8.50	9.75
CR 1	43.75	53.00	54.75	56.00	59.50	4.75	5.75	7.50	8.75	9.75
CR 2	45.25	51.25	55.75	57.75	58.75	4.25	6.00	7.00	8.50	10.50
Azospirillum brasilense	44.00	50.25	55.75	58.00	58.50	4.75	6.50	7.50	8.50	9.25
HL 2	47.00	55.25	61.00	63.25	65.00	5.00	7.25	10.00	11.00	12.00
LDS 2	43.75	49.25	53.00	54.00	55.13	5.00	7.50	8.75	9.25	10.75
CR 3	45.00	49.25	53.50	55.50	57.75	4.25	7.25	8.25	8.50	10.25
CR 4	43.75	49.75	56.00	57.50	59.00	5.25	7.00	9.25	9.50	11.75
CR 5	44.25	50.25	53.00	54.00	55.38	5.00	7.00	7.75	8.25	11.00
Klebsiella oxytoca	44.00	50.00	52.00	53.25	54.88	5.50	7.75	10.25	11.25	12.00
F - Test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	5.8	11.59	11.75	11.94	13.04	15.5	31.67	32.59	31.94	31.66

ภาพที่ 11. เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน

MAEJO UNIVERSITY

3. การพัฒนาด้านความยาวราก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 6, ภาพที่ 11) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates นั้นทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 98.25 เซนติเมตร รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* CR 5, LDS 2, LDS 1, HL 1, CR 2, CR 1, CR 4, *Klebsiella oxytoca* และ HL 2 หญ้าแฝกมีความยาวราก เท่ากับ 97.25, 94.75, 92.00, 90.00, 88.50, 87.00, 85.00, 83.00, 81.00 และ 78.50 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากน้อยที่สุดเท่ากับ 77.00 เซนติเมตร

4. การสะสมน้ำหนักแห้งของราก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 6, ภาพที่ 12) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates นั้นทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ HL 2 ทำให้หญ้าแฝกน้ำหนักแห้งของรากมากที่สุดเท่ากับ 5.21 กรัม รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ LDS 1, *Klebsiella ocytoca*, CR 3, HL 1, CR 2, CR 5, CR 1, CR 4, LDS 2 และ *Azospirillum brasilense* หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากเท่ากับ 4.50, 3.98, 3.80, 3.63, 3.56, 3.45, 3.37, 3.30, 3.26, และ 3.26 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากน้อยที่สุดเท่ากับ 3.10 กรัม

5. การสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบ

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 6, ภาพที่ 12) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates นั้น ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งมากที่สุดเท่ากับ 4.45 กรัม รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ CR 1, HL 1, LDS 1, CR 2, HL 2, *Azospirillum brasilense*, CR 4, CR 5, *Klebsiella oxytoca* และ LDS 2 หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบเท่ากับ 4.44, 4.37, 4.17, 4.12, 4.06, 4.05, 4.00, 3.98, 3.68 และ 3.65 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 3.49 กรัม

6. การสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (มวลชีวภาพ)

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 6, ภาพที่ 12) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุกๆ isolates นั้น ทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ HL 2 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 9.27 กรัม รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ LDS 1, CR 3, HL 1, CR 1, CR 2 *Klebsiella oxytoca*, CR 5, *Azospirillum brasilense*, CR 4, และ LDS 2 ซึ่งหญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดเท่ากับ 8.67, 8.25, 8.00, 7.79, 7.76, 7.66, 7.43, 7.31, 7.30 และ 6.91 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดน้อยที่สุดเท่ากับ 6.60 กรัม

7. ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 6, ภาพที่ 13) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ HL 2 ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากที่สุด เท่ากับ 473.45 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ LDS 1, *Klebsiella oxytoca, Azospirillum brasilense,* CR 2, CR 3, CR 5, LDS 2, HL 1, CR 1, และ CR 4 ที่หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 413.19, 372.94, 367.43, 366.65, 363.09, 353.70, 352.78, 349.42, 317.12, และ 304.69 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนน้อยที่สุดเท่ากับ 141.86 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day

8 เปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบหญ้าแฝก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 6, ภาพที่ 14) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบาง isolates ทำให้ หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 2 ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนมากที่สุดเท่ากับ 0.82 รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ HL 1, LDS 2,

CR 4, CR 3, *Azospirillum brasilense*, LDS 1, การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, HL 2, CR 5 และ *Klebsiella oxytoca* หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.79, 0.78, 0.76, 0.75, 0.73, 0.72, 0.69, 0.66, และ 0.68 ส่วนการใส่เชื้อ CR 1 หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 0.65

9. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน)

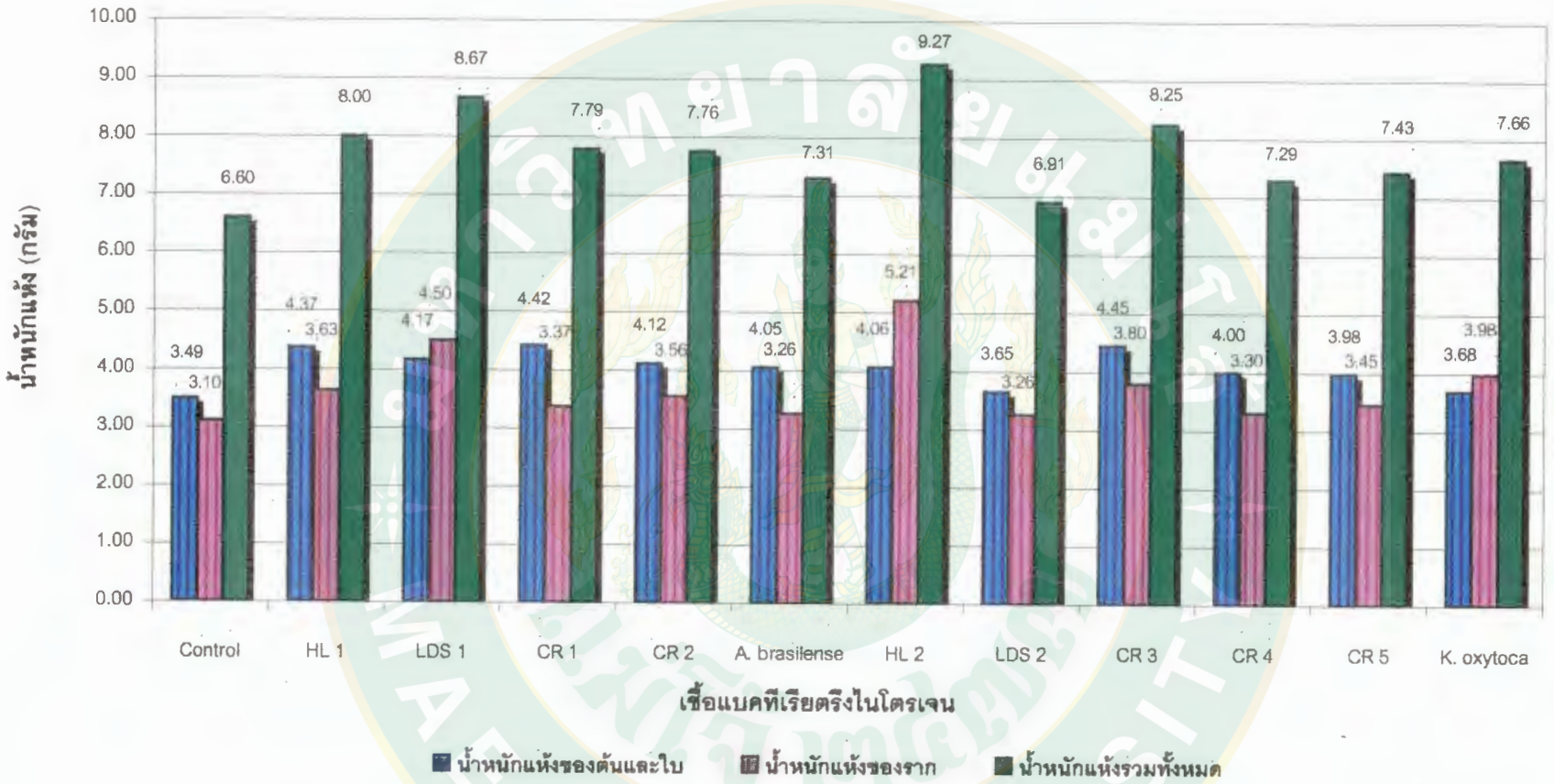
ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 6, ภาพที่ 14) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 2 ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนในต้นและใบมากที่สุด เท่ากับ 3.39 กรัม รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ HL 1, CR 3, CR 4, LDS 1, *Azospirillum brasilense*, CR 1, HL 2, LDS 2, CR 5 และ *Klebsiella oxytoca* หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบเท่ากับ 3.38, 3.24, 3.04, 3.02, 3.00, 2.90, 2.82, 2.77, 2.71 และ 2.48 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 2.481 กรัม

ตารางที่ 6. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความยาวราก การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่างๆ และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน

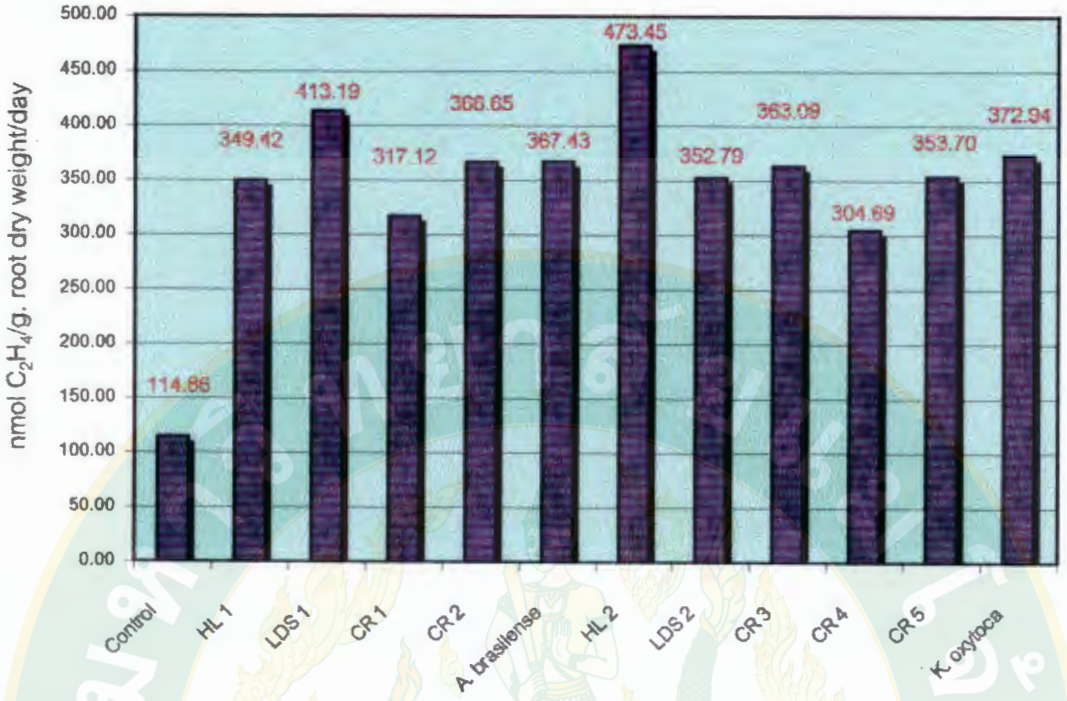
	ความยาวราก (ซม.)	น้ำหนักแห้งของราก (กรัม)	น้ำหนักแห้งของต้นและใบ (กรัม)	น้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (กรัม)	ศักยภาพการตรึงไนโตรเจน (ARA)	เปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นหญ้าแฝก	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้น
Control	77.00	3.10	3.49	6.60	141.86	0.72	2.48
HL 1	88.50	3.63	4.37	8.00	349.42	0.79	3.38
LDS 1	90.00	4.50	4.17	8.67	413.19	0.73	3.02
CR 1	85.00	3.37	4.42	7.79	317.12	0.65	2.90
CR 2	87.00	3.56	4.12	7.67	366.65	0.82	3.39
Azospirillum brasilense	97.25	3.26	4.05	7.31	367.43	0.75	3.00
HL 2	78.50	5.21	4.06	9.27	473.45	0.69	2.82
LDS 2	92.00	3.26	3.65	6.91	352.79	0.78	2.77
CR 3	98.25	3.80	4.45	8.25	363.09	0.76	3.24
CR 4	83.00	3.30	4.00	7.29	304.69	0.76	3.04
CR 5	94.75	3.45	3.98	7.43	353.70	0.69	2.71
Klebsiella oxytoca	81.00	3.98	3.68	7.66	372.94	0.68	2.48
F - Test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	14.24	42.82	22.77	30.81	44.48	12.88	21.66

หมายเหตุ ตัวเลขในแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการทดสอบ DMRT

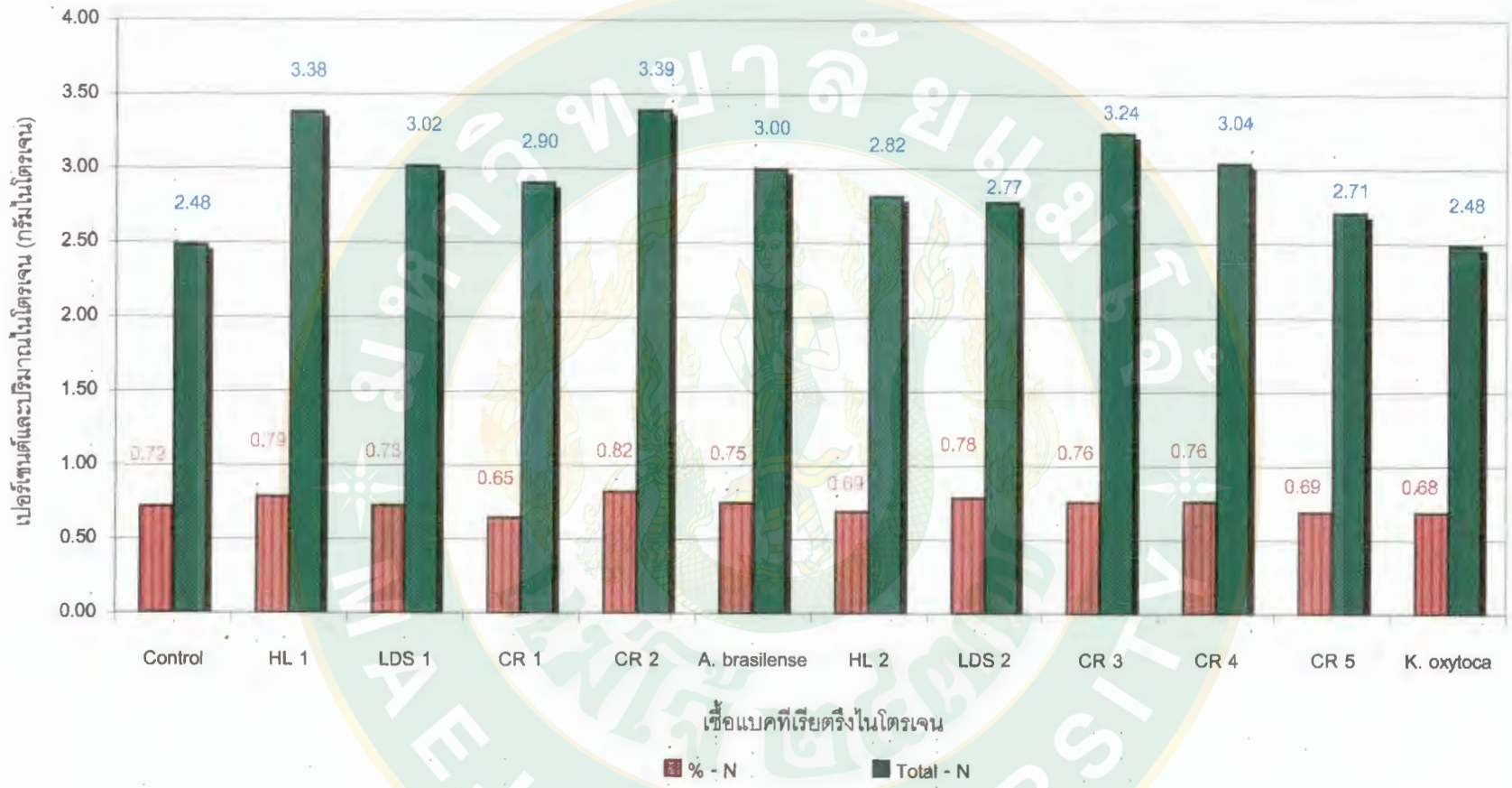
หน่วยของการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจน (ARA) nmol C_2H_4/g. root dry weight/day



ภาพที่ 12. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการสะสมน้ำหนักแห้ง (กรัม) ในส่วนต่างๆ ของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน



ภาพที่ 13 ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน



ภาพที่ 14. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน

ผลการทดลองย่อยที่ 3 การทดลองนี้จะมีการดำเนินการทดลอง เหมือนการทดลองย่อยที่ 2 แต่จะแตกต่างกันที่ระยะเวลาในการทดลองโดยในการทดลองย่อยที่ 3 นี้จะมีอายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน มีผลการทดลองดังนี้

1. การพัฒนาด้านความสูง

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกโดยการบันทึกข้อมูลความสูงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึง สัปดาห์ที่ 10 พบว่าการพัฒนาด้านความสูงในสัปดาห์ที่ 1,2,3,9 และ 10 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มที่การใส่เชื้อทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีความสูง มากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยในสัปดาห์ที่ 10 นั้น การใส่เชื้อแบคทีเรีย *Azospirillum brasilense* และ HL.2 ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 64.75 เซนติเมตร รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ LDS 2, *Klebsiella oxytoca*, HL 1, CR 3, CR 2, CR 4, LDS 1, CR 1 และ CR 5 หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 62.75, 61.50, 61.25, 60.50, 60.00, 59.25, 57.75, 55.00, และ 54.50 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยที่การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุดเท่ากับ 53.75 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 4, 5 และ 8 นั้น พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงที่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย เช่นเดียวกันในสัปดาห์ที่ 6 และ 7 การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีความสูงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 7, ภาพที่ 15)

2. การพัฒนาด้านจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ)

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกโดยการบันทึกข้อมูลตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 10 พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรีย ทุก ๆ isolates นั้นทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากกว่าไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยในสัปดาห์ที่ 10 การใส่เชื้อ CR 2 หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากที่สุดเท่ากับ 16.25 ต้น รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ HL 1, HL 2, CR 3 ,LDS 1, CR 4, *Azospirillum brasilense*, *Klebsiella oxytoca*, CR 1, CR 5 และ LDS 2 หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 14.00, 14.00, 13.75, 13.50, 13.25, 13.00, 10.75, 10.75, 10.50 และ 10.00 ต้น ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 9.00 ต้น (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝกในแต่ละสัปดาห์ ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน

	สัปดาห์									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	42.75	46.00	47.25	47.75 c	48.00 d	49.00 c	49.75 c	52.25 b	52.75	53.75
HL 1	46.25	52.50	55.00	57.50 ab	57.50 ab	59.25 abc	60.00 abc	60.50 ab	60.75	61.25
LDS 1	44.50	49.00	50.50	50.75 bc	51.75 bcd	52.75 abc	53.50 abc	54.00 b	56.25	57.75
CR 1	44.00	48.00	50.00	51.75 abc	52.50 bcd	52.75 abc	53.25 abc	53.75 b	54.75	55.00
CR 2	44.50	50.25	53.50	56.75 ab	57.00 ab	58.25 abc	58.50 abc	59.50 ab	59.75	60.00
Azospirillum brasilense	46.25	53.50	56.00	59.50 a	61.00 a	62.75 a	63.25 a	64.00 a	64.50	64.75
HL 2	47.50	54.75	57.25	58.25 ab	59.75 ab	61.00 ab	62.00 ab	63.25 a	64.25	64.75
LDS 2	43.75	49.25	53.25	56.00 ab	58.25 abc	58.75 abc	59.50 abc	60.25 ab	61.75	62.25
CR 3	45.25	50.50	54.50	56.75 ab	58.00 abc	59.00 abc	59.00 abc	59.50 ab	59.75	60.50
CR 4	44.75	49.00	51.00	52.75 abc	53.75 abcd	54.75 abc	55.75 abc	57.50 ab	58.25	59.25
CR 5	45.00	48.25	50.00	50.75 bc	51.25 cd	51.75 bc	51.75 bc	52.75 b	53.50	54.25
Klebsiella oxytoca	45.50	52.50	54.75	57.50 ab	57.75 abc	58.75 abc	59.50 abc	60.25 ab	60.75	61.50
F - Test	ns	ns	ns	*	*	**	**	*	ns	ns
CV (%)	8.27	8.98	9.43	9.05	8.75	8.32	8.41	9.21	9.12	9.31

หมายเหตุ ตัวเลขในแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการทดสอบ DMRT

ตารางที่ 8. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านจำนวนต้นต่อกอ(หน่อ) ของหญ้าแฝกในแต่ละสัปดาห์ ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน

	สัปดาห์									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	4.00	4.25	5.50	5.75	6.00	7.00	7.75	8.00	9.00	9.00
HL 1	4.25	5.25	6.75	7.00	7.25	8.75	10.00	11.25	12.50	14.00
LDS 1	4.25	4.75	6.25	7.00	7.50	8.50	9.25	10.25	11.25	13.50
CR 1	4.00	4.25	5.00	5.75	6.50	9.00	9.00	9.50	10.50	10.75
CR 2	5.00	6.25	7.50	8.00	9.00	9.50	10.50	13.00	14.50	16.25
Azospirillum brasilense	4.50	4.75	6.50	7.00	8.25	9.25	10.25	11.00	12.00	13.00
HL 2	4.00	4.00	5.75	6.50	7.00	8.50	9.75	10.00	12.00	14.00
LDS 2	4.00	4.25	5.25	5.25	6.00	7.00	8.25	8.75	9.25	10.00
CR 3	4.25	6.00	7.25	7.75	8.00	8.50	10.00	11.75	12.50	13.75
CR 4	4.50	4.75	5.00	5.50	6.25	7.75	8.25	8.75	10.50	13.25
CR 5	4.00	4.00	6.00	6.75	7.50	8.25	8.75	9.25	9.75	10.50
Klebsiella oxytoca	4.25	4.25	5.25	5.50	6.00	6.50	7.75	8.50	9.75	10.75
F - Test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	11.59	33.1	33.31	30.99	30.11	26.2	27.32	27.14	23.93	25.74

กาพที่ 15. เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต ของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน

3. การพัฒนาด้านความยาวราก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะ การใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากที่สุด เท่ากับ 141.25 เซนติเมตร ซึ่งมีความยาวรากมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใส่เชื้อ CR 5, *Klebsiella oxytoca* และ การไม่ใส่เชื้อ แต่การใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ LDS 1, CR 2, HL 1, CR 4, CR 1, CR 3, LDS 2, และ HL 2 ที่มีความยาวรากเท่ากับ 139.50, 129.75, 128.25, 117.25, 114.75, 114.25, 105.50, และ 105.50 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ CR 5, *Klebsiella oxytoca* และการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย หญ้าแฝกมีความยาวรากเท่ากับ 99.00, 90.50, และ 90.00 เซนติเมตร ตามลำดับซึ่งการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากน้อยที่สุด (ตารางที่ 9, ภาพที่ 15)

4. การสะสมน้ำหนักแห้งของราก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใส่เชื้อ HL1 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากมากที่สุดเท่ากับ 6.69 กรัม รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense*, LDS 1, CR 2, CR 4, LDS 2, CR 1, HL 2, การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, CR 3 และ *Klebsiella oxytoca* หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากเท่ากับ 6.51, 5.71, 5.67, 4.63, 4.43, 4.34, 4.18, 4.07, 4.06, และ 4.05 กรัม ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ CR 5 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากน้อยที่สุดเท่ากับ 4.01 กรัม (ตารางที่ 9, ภาพที่ 16)

5. การสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบ

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบมากที่สุดเท่ากับ 5.71 กรัม ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ กับการใส่เชื้อ *Klebsiella oxytoca*, CR 2 , CR 5 และ CR 3 ที่มีน้ำหนักแห้งของต้นและใบเท่ากับ 4.45, 4.45, 4.10 และ 3.74 กรัม ตามลำดับ โดยการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบน้อยที่สุด ส่วนการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* นั้น มีน้ำหนักแห้งของต้นและใบไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ LDS 2, CR 4, LDS 1, HL 1, HL 2, CR 1, และ การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียหญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบเท่ากับ 5.11, 5.07, 4.80, 4.78, 4.71, 4.66, และ 4.65 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 9, ภาพที่ 16)

6. การสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (มวลชีวภาพ)

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 12.22 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการใส่เชื้อ CR 1, HL 2, การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, *Klebsiella oxytoca*, CR 5, และ CR 3 ที่มีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดเท่ากับ 9.00, 8.89, 8.72, 8.50, 8.11, และ 7.80 กรัม ตามลำดับ โดยการใส่เชื้อ CR 3 หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดน้อยที่สุด ส่วนการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* นั้นมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ HL 1, LDS 1, CR 2, CR 4 และ LDS 2 โดยหญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดเท่ากับ 11.46, 10.51, 10.12, 9.70 และ 9.54 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 9, ภาพที่ 16)

7. ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ HL 1 ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากที่สุด เท่ากับ 2297.91 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใส่เชื้อ HL 2, CR 5, CR 3, *Azospirillum brasilense*, LDS 2, CR 1, CR 2, CR 4 และ การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 672.60, 508.22, 501.52, 450.21, 399.76, 323.41, 239.58, 175.86, และ 61.39 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ *Klebsiella oxytoca*, LDS 1 หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 2267.82 และ 1828.35 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ HL 1, HL 2, CR 5, CR 3, *Azospirillum brasilense*, LDS 2, CR 1, CR 2, CR 4 แต่จะพบว่าการใส่เชื้อ *Klebsiella oxytoca* จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนต่ำที่สุด (ตารางที่ 9, ภาพที่ 17)

8. เปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบหญ้าแฝก

ผลการทดลองการ ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบาง isolates ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 5 ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้น

และใบมากที่สุดเท่ากับ 0.923 รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ CR 4, CR 1, CR 2, HL 1, CR 3, การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, HL 2, *Klebsiella oxytoca* และ *Azospirillum brasilense* หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบเท่ากับ 0.89, 0.88, 0.83, 0.81, 0.81, 0.79, 0.78, 0.73 และ 0.73 ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ LDS.2 และ LDS.1 หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบต่ำที่สุดเท่ากับ 0.73 (ตารางที่ 9, ภาพที่ 18)

9. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน)

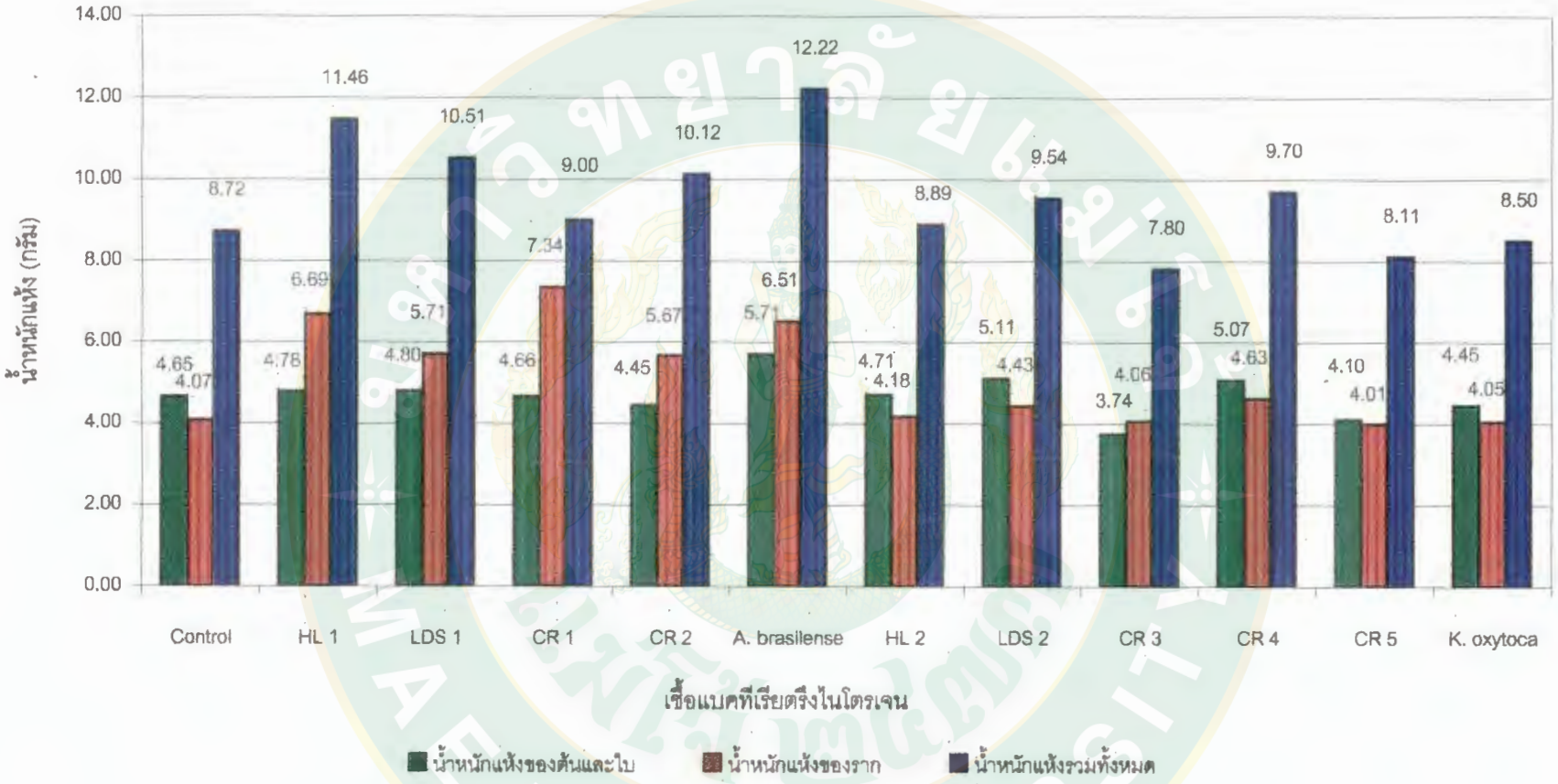
ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียบาง isolates ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 4 ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากที่สุดเท่ากับ 4.52 กรัม รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense*, CR 1, CR 5, LDS 2, การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, CR 2, HL 2, LDS 1, HL 1 และ *Klebsiella oxytoca* ซึ่งหญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบเท่ากับ 4.13, 4.09, 3.77, 3.69, 3.68, 3.67, 3.60, 3.51, 3.46 และ 3.24 กรัม ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 3.01 กรัม (ตารางที่ 9, ภาพที่ 18)

ตารางที่ 9. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความยาวราก การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ในการทดลองสภาพกระถาง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน

	ความยาวราก (ซม.)	น้ำหนักแห้งของราก (กรัม)	น้ำหนักแห้งของต้นและใบ (กรัม)	น้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (กรัม)	ศักยภาพการตรึงไนโตรเจน (ARA)	เปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบ	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ
Control	90.00 c	4.07	4.65 c	8.72 bc	61.39 c	0.79	3.68
HL 1	128.25 abc	6.69	4.78 abc	11.46 ab	2997.91 a	0.81	3.46
LDS 1	139.50 ab	5.71	4.80 abc	10.51 abc	1828.35 abc	0.73	3.51
CR 1	114.75 abc	7.34	4.66 abc	9.00 bc	323.41 bc	0.88	4.09
CR 2	129.75 abc	5.67	4.45 bc	10.12 abc	239.58 bc	0.83	3.67
Azospirillum brasilense	141.25 a	6.51	5.71 a	12.22 a	450.21 bc	0.73	4.13
HL 2	105.50 abc	4.18	4.71 abc	8.89 bc	672.60 bc	0.78	3.57
LDS 2	105.50 abc	4.43	5.11 ab	9.54 abc	399.76 bc	0.73	3.69
CR 3	114.25 abc	4.06	3.74 c	7.80 c	501.52 bc	0.81	3.01
CR 4	117.25 abc	4.63	5.07 ab	9.70 abc	175.86 bc	0.89	4.52
CR 5	99.00 bc	4.01	4.10 bc	8.11 c	508.22 bc	0.92	3.77
Klebsiella oxytoca	90.50 c	4.05	4.45 bc	8.50 bc	2267.82 ab	0.73	3.24
F - Test	**	ns	**	*	**	ns	ns
CV (%)	15.99	28.44	11.83	18.7	112.07	14.47	15.81

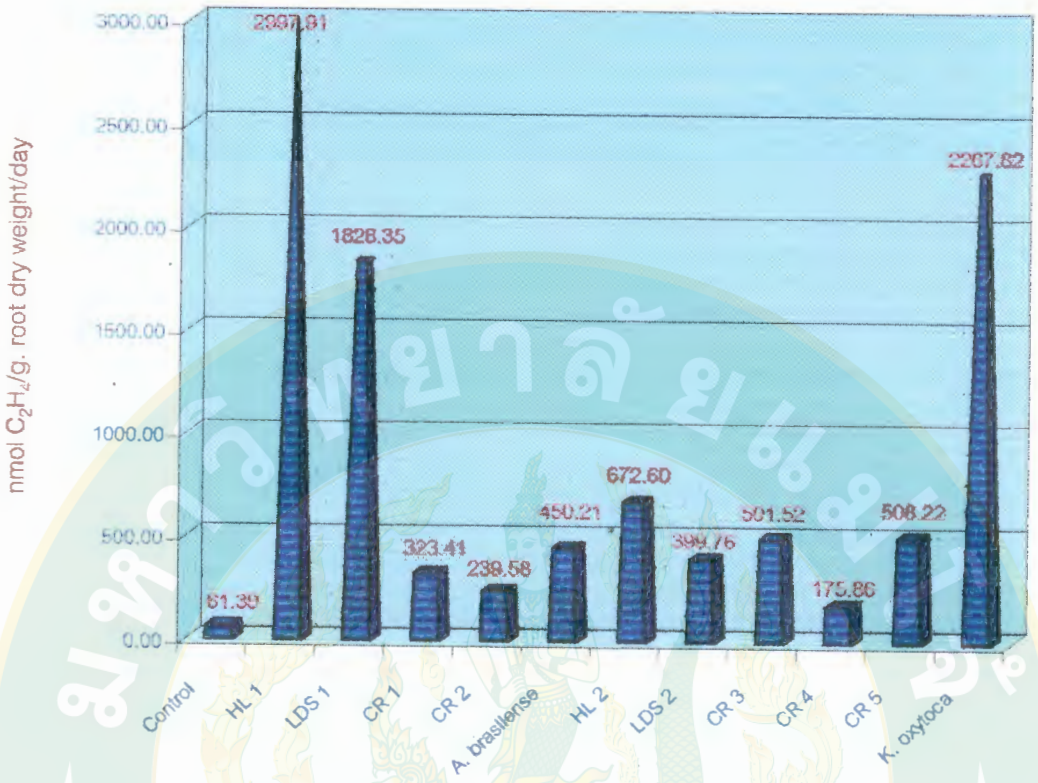
หมายเหตุ ตัวเลขในแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการทดสอบ DMRT

หน่วยของการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจน (ARA) nmol C_2H_4/g. root dry weight/day



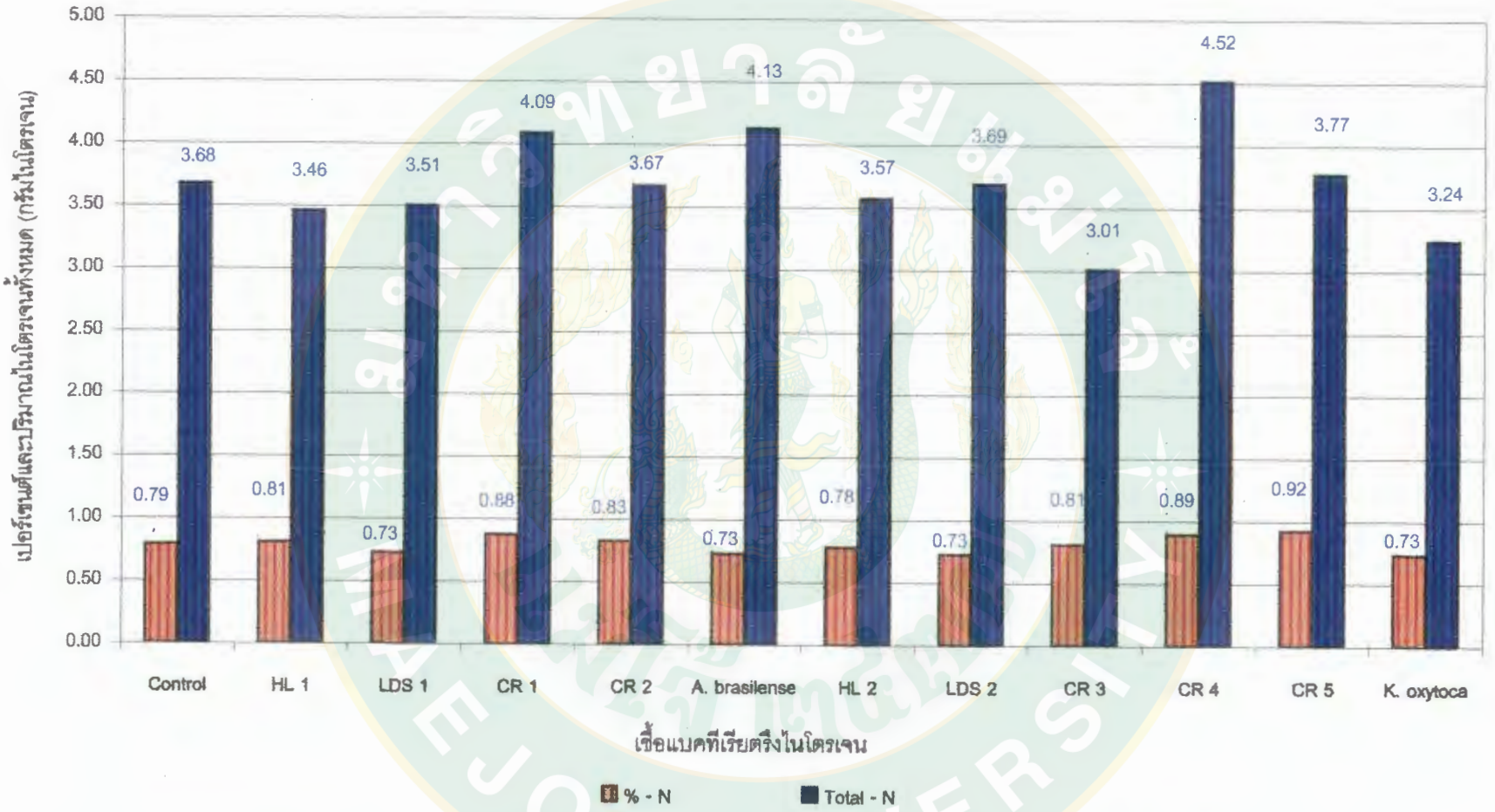
ภาพที่ 16. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการสะสมน้ำหนักแห้ง (กรัม) ในส่วนต่างๆ ของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน

MAEJO UNIVERSITY



ภาพที่ 17. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก สภาพกระถางทดลอง อายุเก็บเกี่ยว 70 วัน

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY



ภาพที่ 18. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน) ของหญ้าแฝก ในสภาพกระถางทดลอง อายุเก็บเกี่ยว 70 วัน

ผลการทดลองย่อย 4 การทดลองนี้เป็นการทำทดลองในภาชนะปลูกท่อซีเมนต์ที่มีความสูงประมาณ 120 เซนติเมตร วัสดุที่ใช้ปลูกคือ ดินที่ได้มาจากพื้นที่ที่เปิดทำการเกษตรใหม่ผสมขี้เถ้าแกลบและปุ๋ยหมักฮิวโมสในอัตราส่วน 85:15:2 อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน มีผลการทดลองดังนี้

1. การพัฒนาด้านความสูง

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกโดยการทดลองนี้จะบันทึกข้อมูลทางด้านความสูงทั้งหมด 16 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 165.75 เซนติเมตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใส่เชื้อ LDS 1, HL 1, CR 1 และ *Azospirillum brasilense* หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 147.75, 146.25, 145.25 และ 145.00 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 10, ภาพที่ 19) โดยการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุด ส่วนการใส่เชื้อ CR 3 ไม่พบว่ามีความสูงแตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ HL.2, LDS.2, *Klebsiella oxytoca*, CR 5, CR 4, CR 2 และการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งหญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 163.00, 161.50, 161.00, 158.00, 156.00, 156.00 และ 150.25 เซนติเมตร ตามลำดับ

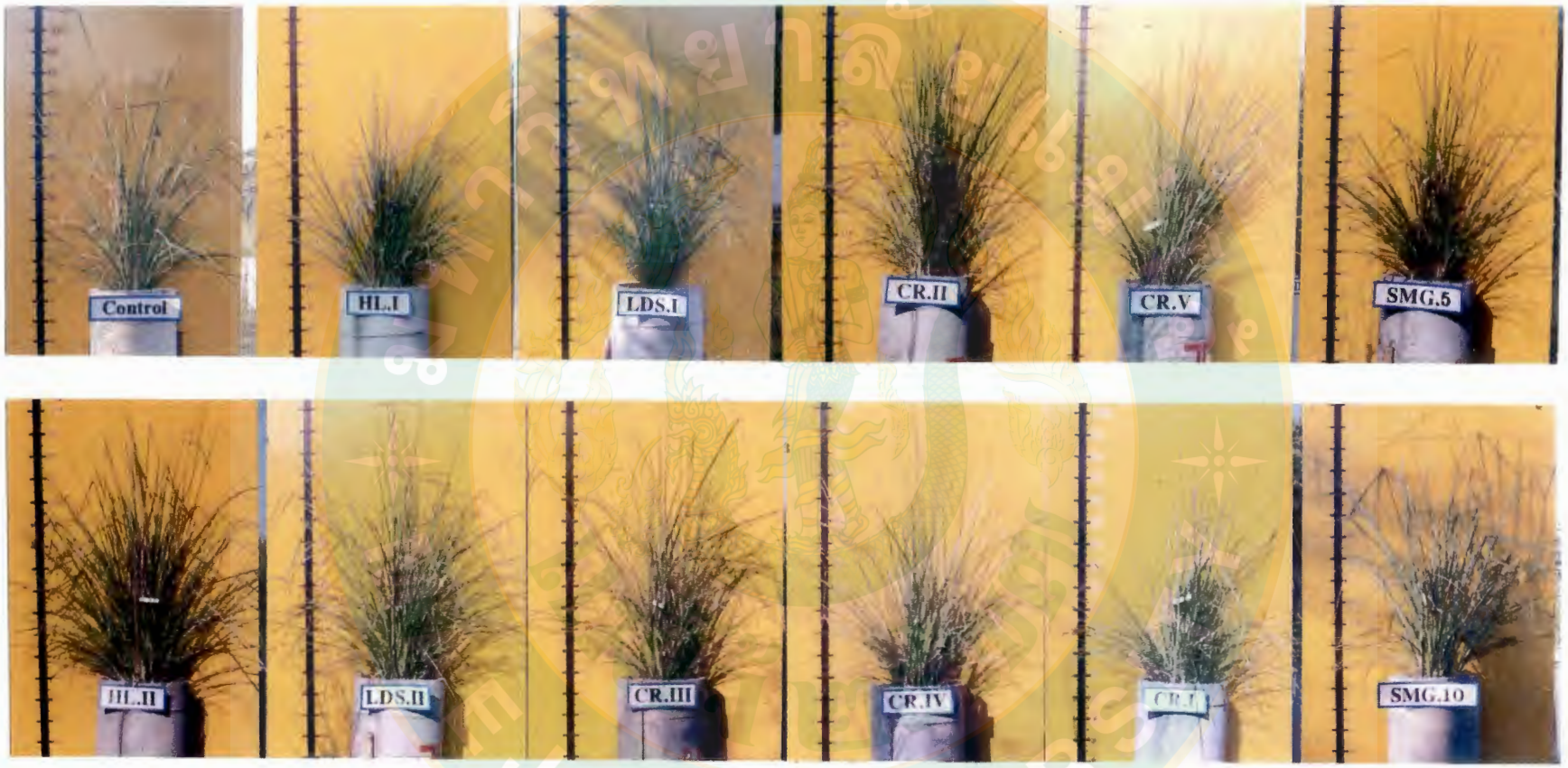
2. การพัฒนาด้านจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ)

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก โดยทำการบันทึกข้อมูลจำนวนต้นต่อกอทั้งหมด 3 ครั้ง พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 11) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates นั้นทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 4 ในการเก็บข้อมูล ครั้งที่ 3 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากที่สุดเท่ากับ 72.50 ต้น รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ CR 3, *Klebsiella oxytoca*, HL 1, CR 5, HL 2, LDS 2, LDS 1, CR 2, CR 1 และ *Azospirillum brasilense* หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 72.25, 72.00, 71.75, 71.50, 69.75, 69.50, 67.50, 67.50, 67.25 และ 66.75 ต้น ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 66.50 ต้น

ตารางที่ 10. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝกในแต่ละสัปดาห์ ในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน

	สัปดาห์															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Control	71.75	90.25	109.25	125.00	126.00	129.50	133.00 bc	142.50 ab	143.00 ab	144.25 ab	145.00 ab	146.25 ab	147.50 abc	149.00 ab	149.50 bcd	150.25abcd
HL 1	72.75	91.75	110.75	121.25	124.00	128.75	131.00 c	139.00 b	139.75 b	140.50 b	142.25 b	142.75 b	143.75 bc	145.00 ab	146.00 cd	146.25 cd
LDS 1	72.75	92.50	103.25	115.25	120.25	125.25	129.25 c	135.25 b	136.50 b	139.00 b	141.00 b	142.25 b	144.00 bc	146.00 ab	147.00 cd	147.75 bcd
CR 1	74.00	95.50	109.00	122.00	122.50	127.75	129.75 c	135.00 b	136.75 b	138.00 b	138.50 b	140.75 b	142.00 c	143.00 b	144.50 d	145.25 d
CR 2	71.50	97.25	111.75	130.50	133.75	136.00	137.25 abc	141.25 ab	143.25 ab	144.75 ab	146.50 ab	149.25 ab	151.50 abc	152.75 ab	155.25abcd	156.00abcd
A. brasilense	73.25	98.50	115.00	131.25	131.50	133.25	133.50 bc	136.25 b	137.25 b	138.25 b	139.25 b	140.75 b	141.75 c	143.00 b	144.50 d	145.00 d
HL 2	73.00	94.75	120.25	134.25	143.75	145.75	148.50 a	157.50 a	157.50 a	159.00 a	160.00 a	160.75 a	161.75 ab	162.50 ab	162.75ab	163.00ab
LDS 2	72.00	93.00	107.75	128.25	131.00	134.25	137.00 abc	148.25 ab	150.25 ab	152.25 ab	154.00 ab	156.00 ab	158.50 abc	159.50 ab	161.00abc	161.50abc
CR 3	73.25	99.25	114.25	133.50	138.00	143.00	146.75 ab	157.25 a	158.25 a	159.75 a	161.00 a	161.50 a	163.00 a	164.050 a	165.00a	165.75a
CR 4	69.50	91.00	104.75	120.75	125.75	132.75	138.00 abc	145.50 ab	147.50 ab	149.25 ab	151.25 ab	152.50 ab	153.50 abc	155.00 ab	155.50abcd	156.00abcd
CR 5	74.75	100.50	111.00	124.75	129.00	135.25	140.25 abc	148.00 ab	148.75 ab	150.00 ab	151.25 ab	152.50 ab	154.25 abc	156.25 ab	157.25abcd	158.00abcd
K. oxytoca	75.75	105.75	120.25	138.50	138.50	141.00	143.75 abc	148.25 ab	150.00 ab	152.00 ab	153.75 ab	155.25 ab	157.50 abc	159.25 ab	160.25abc	161.00abc
F - Test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	**	**	**	**	**	**	*	*
CV (%)	4.03	7.59	7.95	8.84	8.05	6.83	6.41	5.4	5.34	5.16	5.26	5.33	5.55	5.74	5.99	6.06

หมายเหตุ ตัวเลขในแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการทดสอบ DMRT



ภาพที่ 19. เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน

3. การพัฒนาด้านความยาวราก

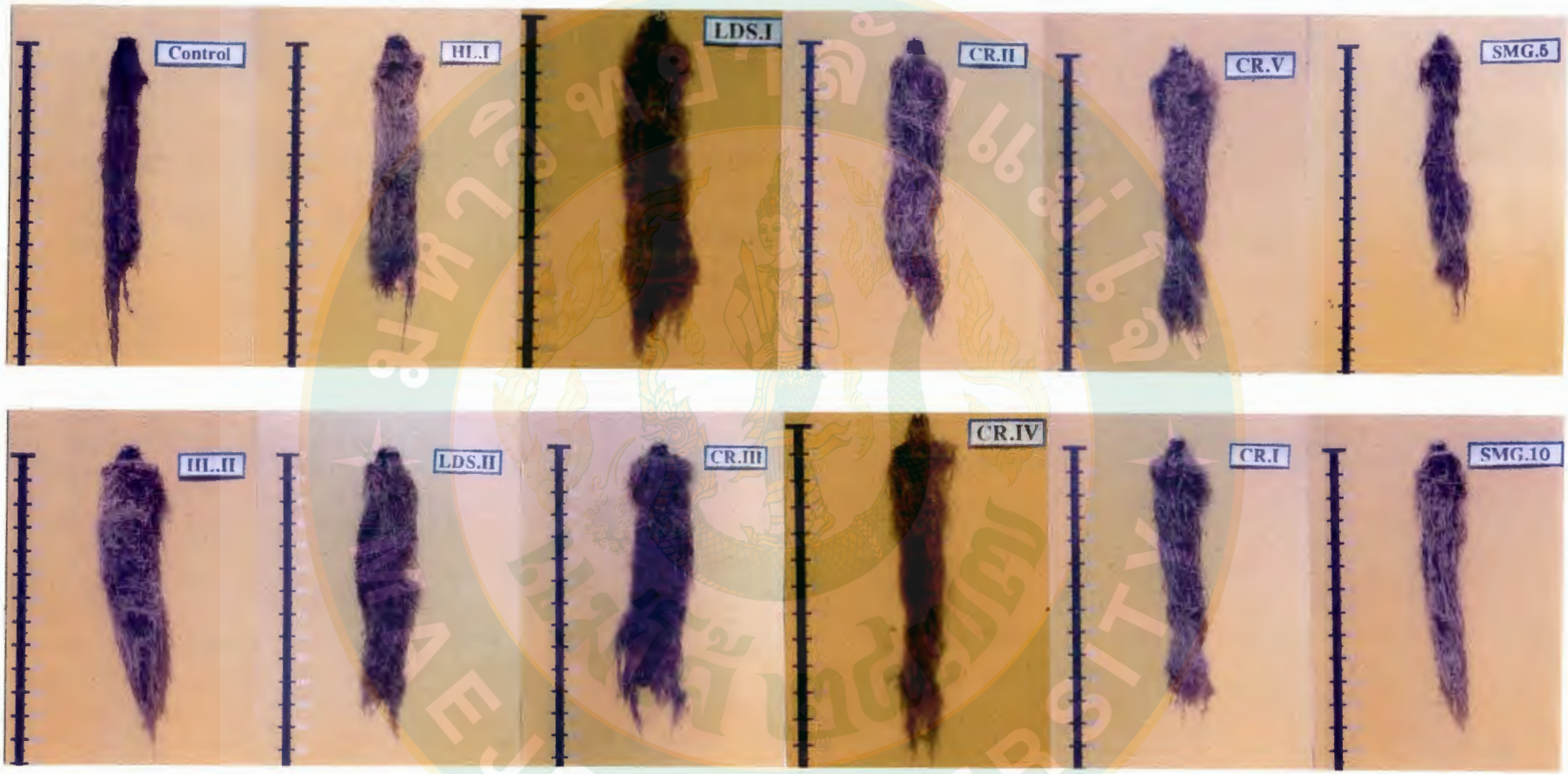
ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 11) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบาง isolates ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 2 ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 150.25 เซนติเมตร รองลงไป ได้แก่ การใส่เชื้อ CR 1, HL 1, *Azospirillum brasilense*, CR 5, การไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, LDS 2, CR 4, HL 2, LDS 1 และ CR 3 หญ้าแฝกมีความยาวรากเท่ากับ 145.00, 144.00, 142.75, 141.50, 139.25, 139.25, 135.25, 134.75, 132.25 และ 127.00 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ *Klebsiella oxytoca* ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากน้อยที่สุดเท่ากับ 119.25 เซนติเมตร

4. การสะสมน้ำหนักแห้งของราก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 11, ภาพที่ 20) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบาง isolates ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ HL 2 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากมากที่สุดเท่ากับ 165.06 กรัม รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ LDS 2, CR 3, การไม่ใส่เชื้อ, CR 5, HL 1, CR 2, CR 1, LDS 1 และ *Klebsiella oxytoca* ซึ่งหญ้าแฝกมี น้ำหนักแห้งของรากเท่ากับ 145.80, 145.55, 134.91, 132.49, 124.49, 124.62, 120.35, 111.37, 110.15, 103.25, และ 92.99 กรัม ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากน้อยที่สุดเท่ากับ 88.63 กรัม

5. การสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบ

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 11, ภาพที่ 20) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบาง isolates ทำให้หญ้าแฝกมีการน้ำหนักแห้งของต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบมากที่สุดเท่ากับ 196.31 กรัม รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ LDS 2, CR 5, HL 2, การไม่ใส่เชื้อ, LDS 1, HL 1, CR 4, CR 1, CR 2 และ *Klebsiella oxytoca* ซึ่งหญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบ เท่ากับ 191.42, 191.40, 190.08, 171.00, 170.65, 168.43, 167.60,



ภาพที่ 20. เปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณและความยาวของรากหญ้าแฝก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน

159.08, 154.33 และ 144.49 กรัม ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 105.79 กรัม

6. การสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (มวลชีวภาพ)

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 11, ภาพที่ 20) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบาง isolates ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ HL 2 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 355.14 กรัม รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ CR 3, LDS 2, CR 5, การไม่ใส่เชื้อ, CR 4, HL 1, LDS 1, CR 1, CR 2 และ *Klebsiella oxytoca* หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดเท่ากับ 341.85, 337.25, 323.88, 305.91, 292.22, 288.78, 273.90, 269.23, 265.70 และ 237.48 กรัม ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดน้อยที่สุดเท่ากับ 194.42 กรัม

7. ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก

ในการทดลองนี้ได้ทำการแบ่งรากออกเป็น 3 ส่วน ตามความยาวของรากหญ้าแฝก นำไปทำการตรวจวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนในแต่ละส่วนของความยาวรากหญ้าแฝก

7.1 ระยะความยาวราก 0-30 เซนติเมตร

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทุก ๆ isolates มีแนวโน้มทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 11, ภาพที่ 21) โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 3, LDS 2, CR 5, CR 2, HL 2 และ CR 4 ที่มีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 2231.27, 1904.89, 1745.81, 1714.51, 1664.74 และ 1600.27 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติกับการใส่เชื้อ LDS 1, *Klebsiella oxytoca*, CR 1, *Azospirillum brasilense* และ HL 1 ที่มีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 1285.06, 1151.11, 1140.01, 1095.04 และ 1081.09 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียให้กับหญ้าแฝกไม่สามารถตรวจวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้

7.2 ระยะความยาวราก 31-60 เซนติเมตร

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อ (ตารางที่ 11, ภาพที่ 21) แต่มีแนวโน้มการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากที่สุดเท่ากับ 1095.94 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ LDS 2, CR 4, HL 2, CR 5, CR 2, LDS 1, CR 1, HL 1, *Azospirillum brasilense* และ *Klebsiella oxytoca* ที่ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 841.07, 781.53, 707.15, 648.46, 642.11, 595.61, 579.95, 504.96, 501.33 และ 408.40 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียให้กับหญ้าแฝกสามารถตรวจวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้

7.3 ระยะความยาวรากมากกว่า 61 เซนติเมตร

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 11, ภาพที่ 21) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุกๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้หญ้าแฝกมีการศักยภาพการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด เท่ากับ 6041.96 nmol C_2H_4/ g. root dry weight/day รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ CR 3, CR 2, HL 2, LDS 2, CR 4, CR 1, HL 1, LDS 1, CR 5 และ *Klebsiella oxytoca* ซึ่งหญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 1237.40, 1008.15, 990.69, 971.74, 933.61, 909.43, 825.05, 824.98, 627.87 และ 557.90 nmol C_2H_4/g. root dry weight/day ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียให้กับหญ้าแฝกไม่สามารถตรวจวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้

8. เปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบหญ้าแฝก

ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 11, ภาพที่ 22) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบาง isolates ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ *Klebsiella oxytoca* ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากที่สุดเท่ากับ 0.85 รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ

LDS 1, CR 2, CR 1, *Azospirillum brasilense*, CR 3, CR 5, การไม่ใส่เชื้อ, LDS 2, HL 1 และ HL 2 ซึ่งหญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบเท่ากับ 0.78, 0.77, 0.74, 0.74, 0.73, 0.73, 0.73, 0.71 และ 0.67 ส่วนการใส่เชื้อ CR 4 ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบต่ำที่สุดเท่ากับ 0.65

9. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน)

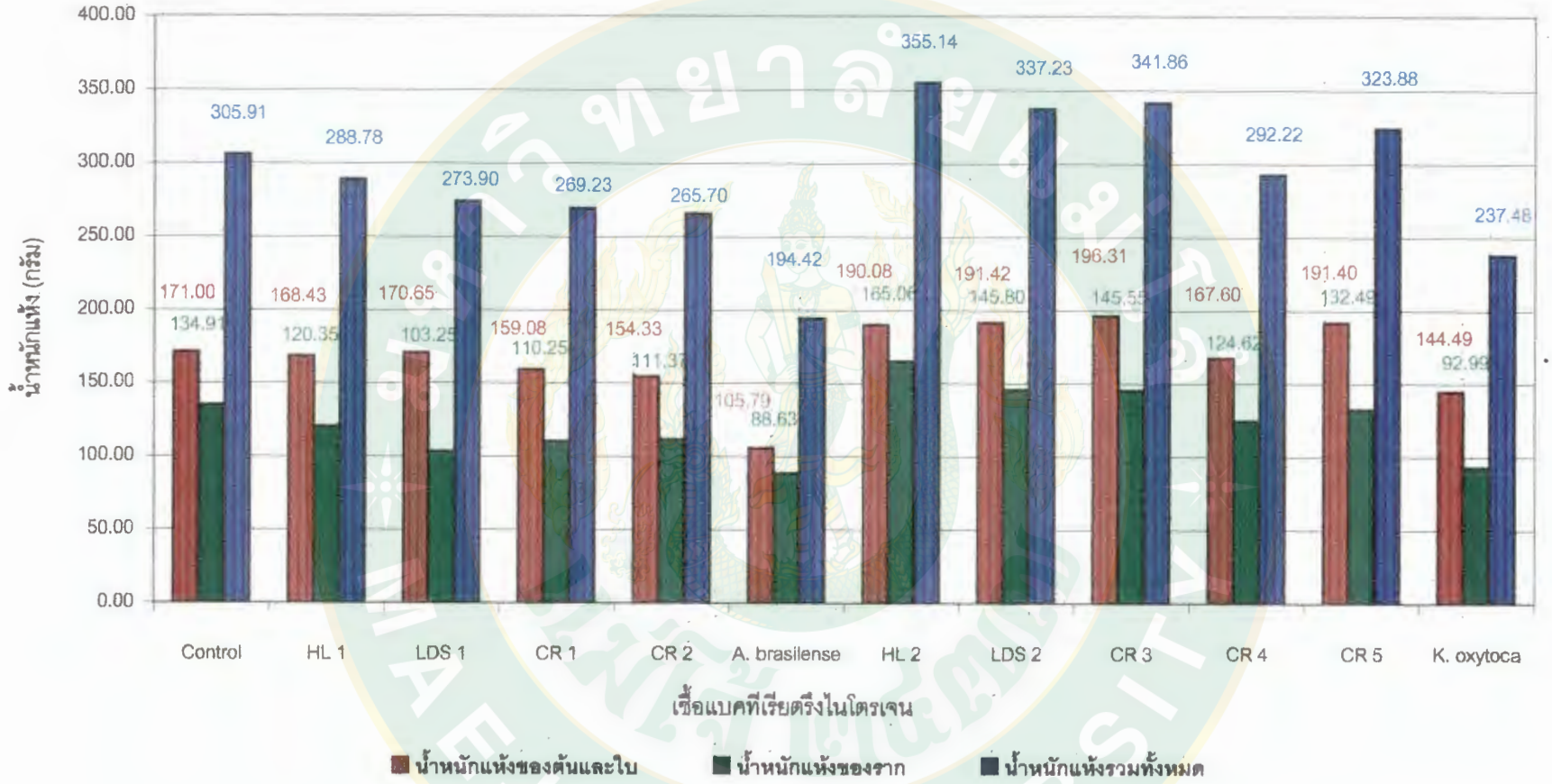
ผลการทดลองการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อ (ตารางที่ 11, ภาพที่ 23) แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบาง isolates ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบสูงที่สุดเท่ากับ 144.20 กรัม รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ CR 5, LDS 2, LDS 1, CR 2, การไม่ใส่เชื้อ, *Klebsiella oxytoca*, HL 1, CR 1, HL 2 และ CR 4 หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบเท่ากับ 136.66, 134.48, 131.17, 124.05, 123.38, 122.53, 119.08, 112.22, 109.86 และ 108.64 กรัม ตามลำดับ ส่วนการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 78.13 กรัม

ตารางที่ 11. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการพัฒนาด้านจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ), ความยาวราก, การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน

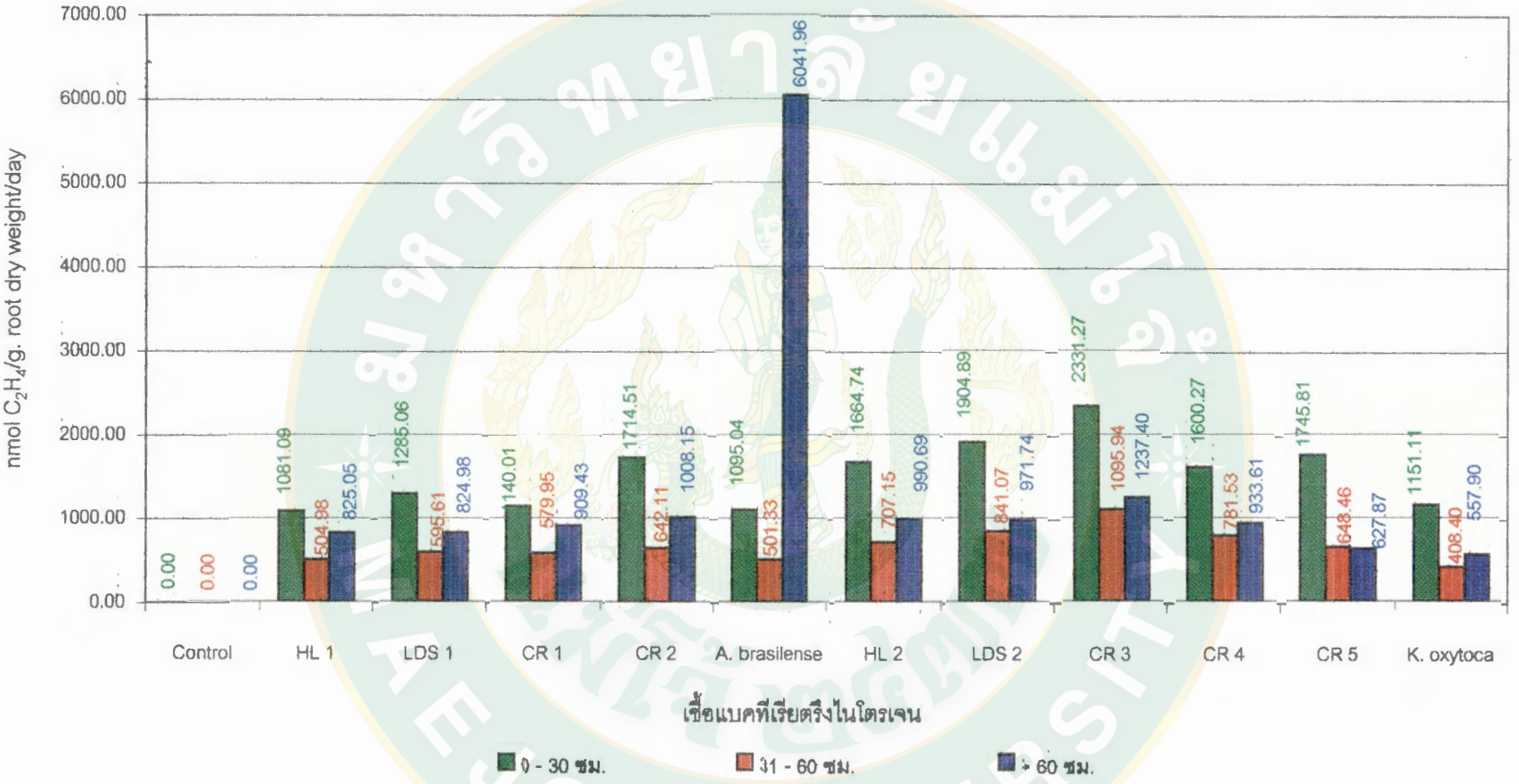
	จำนวนหน่อ (ครั้งที่)			ความยาวราก	น.น. แห้งราก	น.น. แห้ง	น.น. แห้งรวม	ศักยภาพการตรึงไนโตรเจน (ARA)			เปอร์เซนต์	ปริมาณไนโตรเจน
	1	2	3	(ซม.)	(กรัม)	ต้นและใบ (กรัม)	ทั้งหมด (กรัม)	0-30 ซม.	31-60 ซม.	> 60 ซม.	ไนโตรเจน	ทั้งหมดในต้น
Control	19.50	52.50	66.50	139.25	134.91	171.00	305.91	0.00 b	0.00	0.00	0.725	123.383
HL 1	20.25	56.25	71.75	144.00	120.35	168.43	288.78	1081.09 ab	504.98	825.05	0.710	119.078
LDS 1	21.00	53.00	67.50	132.25	103.25	170.65	273.90	1285.06 ab	595.61	824.98	0.778	131.172
CR 1	19.75	53.00	67.25	145.00	110.25	159.08	269.23	1140.01 ab	579.95	909.43	0.770	112.215
CR 2	19.50	53.25	67.50	150.25	111.37	154.33	265.70	1714.51 a	642.11	1008.15	0.773	124.053
A. brasilense	20.25	52.50	66.75	142.75	88.63	105.79	194.42	1095.04 ab	501.33	6041.96	0.743	78.133
HL 2	19.50	54.75	69.75	134.75	165.06	190.08	355.14	1664.74 a	707.15	990.69	0.670	109.858
LDS 2	20.25	55.50	69.50	139.25	145.80	191.42	337.23	1904.89 a	841.07	971.74	0.725	134.482
CR 3	19.50	58.25	72.50	127.00	145.55	196.31	341.86	2331.27 a	1095.94	1237.40	0.740	144.204
CR 4	19.50	57.75	72.50	135.25	124.62	167.60	292.22	1600.27 a	781.53	933.61	0.648	108.636
CR 5	19.50	57.75	71.50	141.50	132.49	191.40	323.88	1745.81 a	648.46	627.87	0.733	136.659
K. oxytoca	20.50	57.50	72.00	119.25	92.99	144.49	237.48	1151.11 ab	408.40	557.90	0.848	122.526
F - Test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
CV (%)	14.03	14.28	14.91	8.55	29.72	26.13	25.79	40.92	64.86	248.91	16.63	26.43

หมายเหตุ ตัวเลขในแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการทดสอบ DMRT

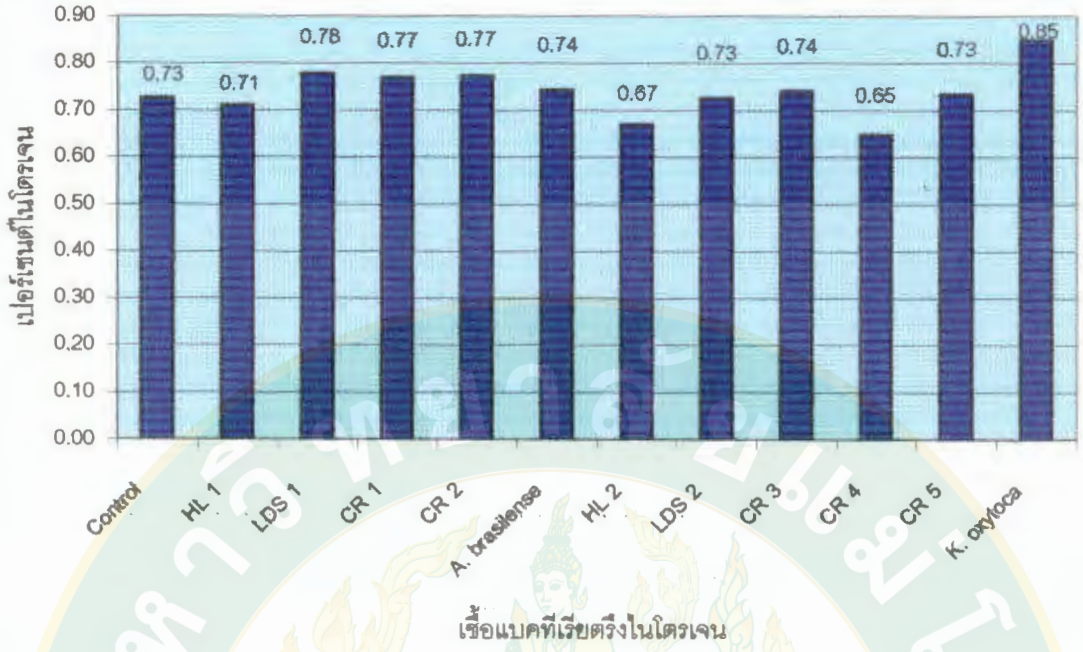
หน่วยของการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจน (ARA) nmol C_2H_4/g. root dry weight/day



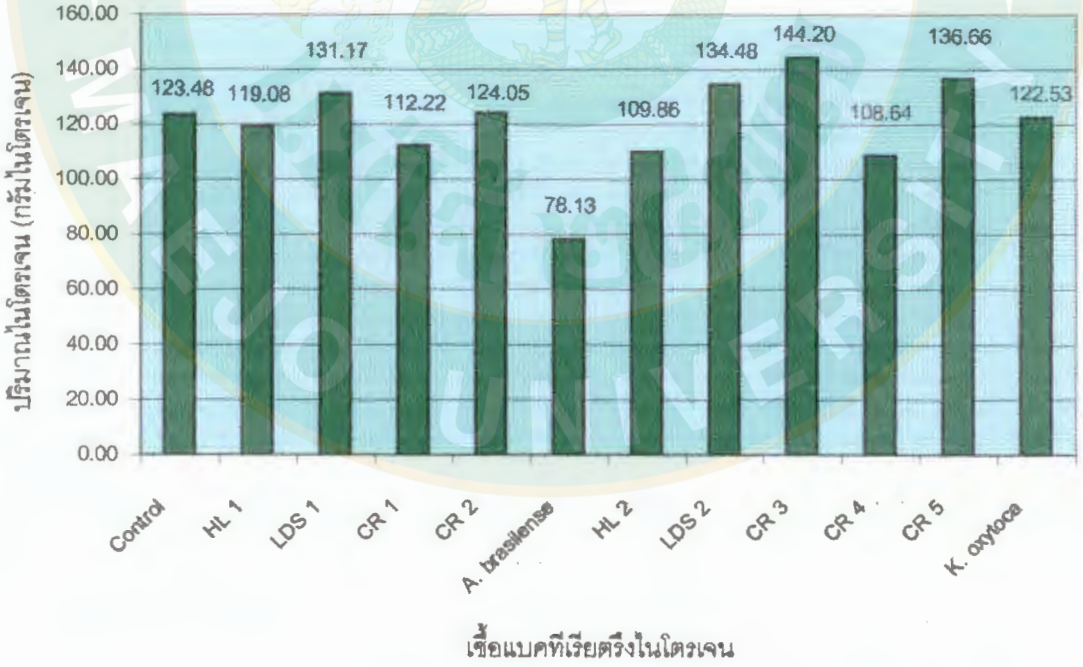
ภาพที่ 21. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่างๆ ของหญ้าแฝก ทดลองในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน



ภาพที่ 22. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ในแต่ละระดับความยาวราก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์ อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน



ภาพที่ 23. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบหญ้าแฝก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์



ภาพที่ 24. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบของหญ้าแฝก การทดลองในสภาพท่อซีเมนต์

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2.

การทดลองที่ 2 นี้ เป็นการทดลองในสภาพแวดล้อม วัสดุปลูก ภาชนะปลูก ระยะเวลาดำเนินการทดลอง และเชื้อแบคทีเรีย isolates ที่แตกต่างกัน โดยทำการแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลองย่อย มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน isolates ต่าง ๆ ที่สามารถคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1. ต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก โดยในการทดลองย่อยที่ 1 เป็นการทดลองในสภาพปลอดเชื้อ คือวัสดุปลูกเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนกึ่งแข็ง (semi-solid) ภาชนะปลูกเป็นขวดทดลอง และการควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ แสง ความชื้น ฯลฯ ดังนั้นการเจริญเติบโต และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝกจึงไม่ถูกจำกัดโดยปัจจัยทางสภาพแวดล้อม การทดลองย่อยที่ 2 และ 3 เป็นการทดลองที่ไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ คือ วัสดุปลูกจะเป็นทรายผสมขี้เถ้าแกลบนึ่งฆ่าเชื้อ และภาชนะปลูกจะเป็นกระถางพลาสติก ขนาด 10x12 นิ้ว โดยการทดลองย่อยที่ 2 มีอายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน ส่วนการทดลองย่อยที่ 3 มีอายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน สำหรับการทดลองย่อยที่ 4 เป็นการทดลองที่ใช้วัสดุปลูกเป็นดินจากพื้นที่เปิดทำการเกษตรใหม่ผสมขี้เถ้าแกลบและปุ๋ยหมักฮิวโมส ในอัตราส่วน 85:13:2 ภาชนะปลูกเป็นท่อซีเมนต์ขนาด 35x120 เซนติเมตร อายุการเก็บเกี่ยว 120 วัน

ผลการทดลองพบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียทุก ๆ isolates ให้กับหญ้าแฝกในทุกการทดลองย่อย ทำให้หญ้าแฝกมีการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต, การสะสมมวลชีวภาพ เช่น การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ และมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าในหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ ประทีป และคณะ (2542) เหตุผลอาจอธิบายได้คือ การตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียทุก ๆ isolates ที่ใส่ให้กับหญ้าแฝกจะเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตของพืช (Dobereiner, 1983 ; Vose , 1983) นอกจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนแล้วน่าจะมีการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตที่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสร้างขึ้น เช่น Gibberellin, Cytokinin, Indole acetic acid รวมทั้งสารพวกกรดอะมิโน และวิตามินต่าง ๆ จึงช่วยกระตุ้นให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ข้อสรุปนี้ สอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ Patel (1969) ; Brown and Burlingham (1968) ; Brown (1976) ; Reynders and Vlassak (1979) ; Tien *et al.* (1979) ; Gonzalez - Lopez *et al.* (1983) ผลของธาตุอาหารไนโตรเจน และสารเร่งการเจริญเติบโตทำให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตและแตกรากแขนงได้ดี จึงทำให้หญ้าแฝกสามารถดูดใช้สารละลายธาตุอาหารพืชได้มากขึ้นด้วย

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใส่ให้กับหญ้าแฝก แสดงแนวโน้มที่ทำให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตได้ดีในการทดลอง ส่วนใหญ่คือเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างรากหญ้าแฝกจาก 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อ *Azotobacter sp.* เป็นแบคทีเรีย isolates ที่คัดเลือกได้จากพื้นที่ ต. ห้วยลาน อ. สันกำแพง จ. เชียงใหม่ ตัวอย่าง เช่น isolates HL.2 เนื่องจากแบคทีเรียมีการใช้แหล่งอาหารและพลังงาน รวมถึงลักษณะของโคโลนี ลักษณะของเซล ที่คล้ายคลึงกับเชื้อในกลุ่ม *Azotobacter sp.* กลุ่มที่ 2. เป็นกลุ่มที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อ *Beijerinckia sp.* เป็น isolates ที่คัดเลือกได้จากพื้นที่ บ้านแม่ข้าวต้มหลวง อ. เมือง บ้านโป่งปูเฟื่อง และบ้านตีนดอย อ. แม่สรวย จ. เชียงราย ตัวอย่างเช่น isolates CR 1, CR 2, CR 3, CR 4 และ CR 5 เนื่องจากแบคทีเรียมีการใช้แหล่งอาหารและพลังงาน รวมถึงลักษณะของโคโลนี ลักษณะของเซล ที่คล้ายคลึงกับเชื้อในกลุ่มของ *Beijerinckia sp.* ส่วนแบคทีเรียกลุ่มที่ 3 นั้น เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใดแล้วคือ เชื้อ *Azospirillum brasilense* และก็มีแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีลักษณะคล้ายกับเชื้อนี้คือเชื้อแบคทีเรีย isolates LDS 3 ที่คัดเลือกได้จากสถานีพัฒนาที่ดิน อ. เมือง จ. เชียงราย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองอื่น ๆ ที่รายงานถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในพืชตระกูลหญ้าต่าง ๆ เช่น เศรษฐา และคณะ (2539) รายงานว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* (Sp.7) ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย Nur *et al.* (1980) ; O'Hara *et al.* (1981) รายงานว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum* ให้แก่ข้าวโพดทำให้น้ำหนักแห้งและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นข้าวโพดสูงกว่าข้าวโพดที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย Pal and Malik (1981) พบว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้ข้าวฟ่างดูดใช้ไนโตรเจนเพิ่มขึ้น Smith *et al.* (1976) พบว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum* ทำให้หญ้า Guinea (*Panicum maximum*) และ Pearl millet (*Peunsetum americanum*) มีผลผลิตน้ำหนักแห้งของต้นเพิ่มมากขึ้นแม้ว่าในบางครั้งอัตราการตรึงไนโตรเจนของหญ้าไม่สูงก็ตาม ซึ่งผลผลิตของหญ้าที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจจะเกิดจากสารเร่งการเจริญเติบโตที่เชื้อสร้างขึ้นก็ได้ เช่นเดียวกัน Zora *et al.* (1984) รายงานว่าการใส่เชื้อ *Azotobacter sp.* ให้แก่ข้าวโพดทำให้ปริมาณไนโตรเจน พื้นที่ใบ ปริมาณของ chlorophyll และ carotenoid ในใบและน้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพดทั้งหมดเพิ่มขึ้น

จากผลการทดลองที่ 2. ทั้ง 4 การทดลองย่อย ซึ่งในการทดลองจะมีปัจจัยทางด้านลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย และปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เป็นตัวจำกัด พบว่าในการทดลองเมื่อพิจารณามองโดยภาพรวม การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ให้กับหญ้าแฝก พบว่าเชื้อแบคทีเรีย isolates CR 1, CR 3 และ HL 2 มีแนวโน้มทำให้หญ้าแฝกมีการ

พัฒนาด้านการเจริญเติบโต การสะสมมวลชีวภาพ และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย isolates อื่น ๆ โดยเฉพาะการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ใส่ให้กับหญ้าแฝกนั้นมีลักษณะคล้ายกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ *Azotobacter sp.*, *Azospirillum sp.* และ *Beijerinckia sp.* โดยในการทดลองที่ 3. ในการตรวจวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนจะทำการวัดโดยการแบ่งวัดตามระยะความยาวของรากหญ้าแฝก พบว่าที่ระยะความยาวของรากที่มากกว่า 60 เซนติเมตรนั้นการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ทำให้หญ้าแฝกมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่สูงที่สุด เนื่องมาจากเชื้อ *Azospirillum brasilense* เป็นเชื้อที่ต้องการใช้ออกซิเจนน้อย จึงทำให้เชื้อมีการตรึงไนโตรเจนได้สูงในระดับของความยาวรากที่มากกว่า 60 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ruschel *et al.* (1978) ที่ว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน และต้องการออกซิเจนน้อย มักพบอาศัยอยู่ร่วมกับรากอ้อยหรือดินบริเวณรากอ้อยที่ระดับความลึก 0-40 เซนติเมตรจากผิวหน้าดิน ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ต้องการใช้ออกซิเจน จะอยู่ร่วมกับรากอ้อยที่ระดับความลึก 40-80 หรือ 80-120 เซนติเมตร เมื่อหญ้าแฝกที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่สูงทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนในต้นและใบสูงขึ้น ทำให้ให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตที่ดี ส่งผลให้น้ำหนักแห้งทั้งหมด หรือการสะสมมวลชีวภาพ ที่ดีกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ซึ่งความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolates ที่ใช้ในการทดลองจะแตกต่างกันออกไป จะขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย และสภาพแวดล้อมต่างๆ และที่สำคัญคือความจำเพาะกับพืชปลูกที่แตกต่างกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น เศรษฐา (2529) รายงานว่า เชื้อ *Beijerinckia indica* นั้นช่วยให้อ้อยมีการตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าเชื้อ *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum* และ *Azomonas sp.* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dobereiner (1961) ; Dobereiner *et al.* (1972a) ; Dobereiner (1982) ที่รายงานว่าเชื้อ *Beijerinckia indica* มีความสัมพันธ์ค่อนข้างจำเพาะกับอ้อย

จากผลการทดลองที่ 2. ที่พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ทำให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโต การสะสมมวลชีวภาพ และมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจน ที่สูงมากกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อ จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูง นำไปใช้ในการทดลองที่ 3. โดยมีการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับการใส่เชื้อแบคทีเรียเพื่อจะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปุ๋ยไนโตรเจนกับเชื้อแบคทีเรีย ว่าจะช่วยส่งเสริมให้หญ้าแฝกมี การเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร

ผลการทดลองที่ 3.

การศึกษาเปรียบเทียบการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและปุ๋ยไนโตรเจนระดับความเข้มข้นต่างกัน ต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก

เป็นการทดลองในภาชนะปลูกกระถางพลาสติก วัสดุปลูกเป็นทรายน้ำจืดผสมขี้เถ้าแกลบ นึ่งฆ่าเชื้อวัสดุปลูกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตระดับความเข้มข้นต่างกัน ใส่พร้อมสารละลายธาตุอาหารพืช อายุการเก็บเกี่ยว 35 วัน ผลการทดลองมีดังนี้

1. การพัฒนาด้านความสูงของหญ้าแฝก

1.1 ความสูงเมื่ออายุ 1 สัปดาห์ หลังการปลูก พบว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจน ร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืชแก่หญ้าแฝกที่ระดับ 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมี ความสูงเฉลี่ยมากกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30, 10 ppm. และการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน ตามลำดับ (ตารางที่ 12) แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ปุ๋ยไนโตรเจน 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความสูง 69.73 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าการให้ปุ๋ยที่ระดับ 30, 10 ppm. และการไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยหญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 68.85, 68.43 และ 66.55 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุด

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าหญ้าแฝกมีความสูงมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใส่เชื้อ HL 2 หญ้าแฝกมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 70.59 เซนติเมตร รองลงไป ได้แก่ การใส่เชื้อ LDS 3, CR 3 และ CR 1 หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 68.88, 68.25 และ 67.84 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย (uninoculated) ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุดเท่ากับ 64.75 เซนติเมตร (ตารางที่ 12, ภาพที่ 25 และ 30)

การใส่เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนแก่หญ้าแฝกนั้นไม่ทำให้ความสูงของหญ้าแฝกเมื่ออายุ 1 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการให้ปุ๋ยเพียงอย่างเดียวที่ทุกระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน หรือการใส่เชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว เพราะจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

1.2 ความสูงเมื่ออายุ 2 สัปดาห์ หลังการปลูก พบว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช แก่หญ้าแฝกที่ระดับ 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงเฉลี่ยมากกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 ppm. , การไม่ให้ปุ๋ย และ 10 ppm. ตามลำดับ (ตารางที่ 13) แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับ 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความสูง 87.78 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 ppm. , การไม่ใส่ปุ๋ยและ 10 ppm. แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 86.33, 83.28 และ 82.08 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งความสูงในสัปดาห์ที่ 2 นี้ การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝกที่ระดับ 10 ppm. ทำให้หญ้าแฝก มีความสูงน้อยที่สุด

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใส่เชื้อ HL 2 ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 87.00 เซนติเมตร รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ CR 1, CR 3 และ LDS 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 86.72, 85.44 และ 84.78 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุดเท่ากับ 80.38 เซนติเมตร (ตารางที่ 13, ภาพที่ 26 และ 30)

การใส่เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนแก่หญ้าแฝกนั้น ไม่ทำให้ความสูงของหญ้าแฝกเมื่ออายุ 2 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการให้ปุ๋ยเพียงอย่างเดียวที่ทุกระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน หรือการใส่เชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

1.3 ความสูงเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ หลังการปลูก พบว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช แก่หญ้าแฝกที่ระดับ 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงเฉลี่ยมากกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20, 10 ppm. และการไม่ให้ปุ๋ย ตามลำดับ (ตารางที่ 14) แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับ 30 ppm ทำให้หญ้าแฝกมีความสูง 96.95 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20, 10 ppm และการไม่ให้ปุ๋ย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 94.72, 92.83 และ 90.93 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งความสูงในสัปดาห์ที่ 3 นี้ การไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุด

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 96.75 เซนติเมตร รองลงไปได้แก่ การ

ตารางที่ 12. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 1 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	64.75	65.75	68.13	66.88	66.38
CR 1	65.25	67.25	71.38	67.50	67.85
CR 3	68.38	66.88	68.88	68.88	68.26
LDS 3	65.63	69.63	71.38	68.88	68.88
HL 2	68.75	72.63	68.88	72.13	70.60
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	66.55	68.43	69.73	68.85	

F - test

ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 7.42%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = ns CV (sub plot) 7.25%

Interaction (N X A) = ns

ตารางที่ 13. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 2 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

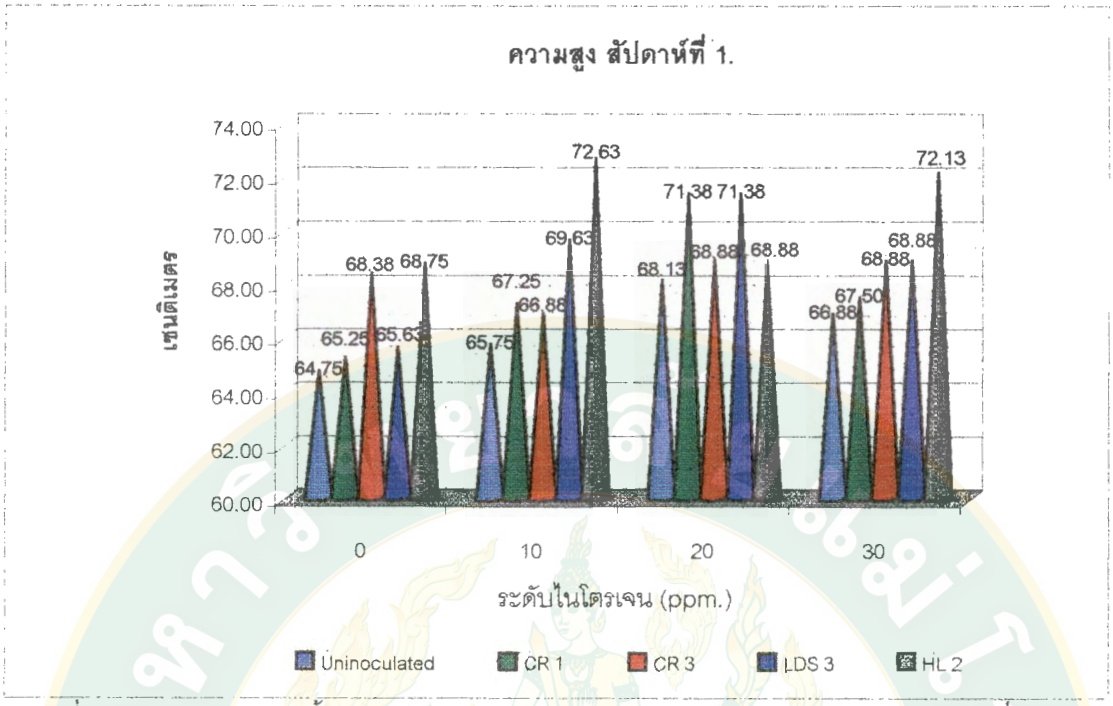
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	78.50	79.00	79.75	84.25	80.38
CR 1	87.50	86.38	86.50	86.50	86.72
CR 3	85.00	81.25	84.75	90.75	85.44
LDS 3	80.50	81.38	91.63	85.63	84.79
HL 2	84.88	82.38	89.00	91.75	87.00
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	83.28	82.08	86.33	87.78	

F - test

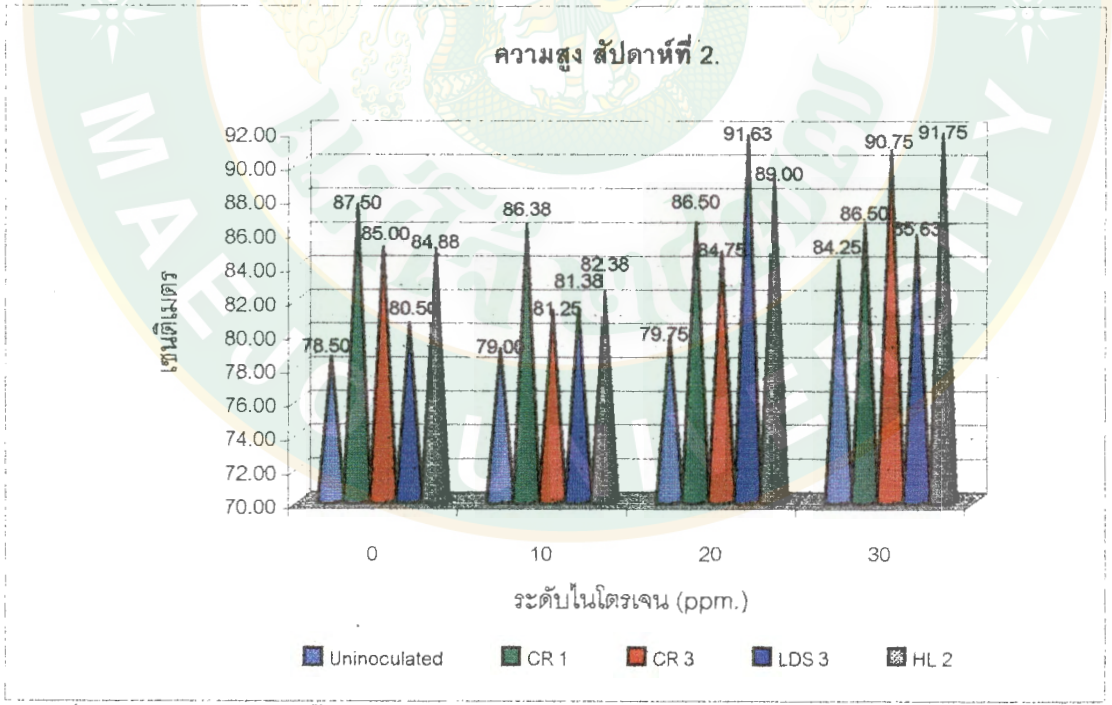
ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 11.03%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = ns CV (sub plot) 9.09%

Interaction (N X A) = ns



ภาพที่ 25. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูงของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 1 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง



ภาพที่ 26. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูงของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 2 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ใส่เชื้อ HL 2, LDS 3 และ CR 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 96.03, 93.88, 93.84 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุดเท่ากับ 88.81 เซนติเมตร (ตารางที่ 14, ภาพที่ 27 และ 30)

การใส่เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจน แก่หญ้าแฝกนั้นไม่ทำให้ความสูงของหญ้าแฝกเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวที่ทุกระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน หรือการใส่เชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

1.4 ความสูงเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ หลังการปลูก พบว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช แก่หญ้าแฝกที่ระดับ 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงเฉลี่ยมากกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20, 10 ppm. และการไม่ให้ปุ๋ย ตามลำดับ (ตารางที่ 15) แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความสูง 101.70 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20, 10 ppm และการไม่ให้ปุ๋ยแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 101.20, 97.90 และ 96.20 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งความสูงของหญ้าแฝกในสัปดาห์ที่ 4 นี้ การไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุด

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใส่เชื้อ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 101.19 เซนติเมตร รองลงไป ได้แก่ การใส่เชื้อ HL 2, LDS 3 และ CR 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 100.69, 100.31 และ 99.25 เซนติเมตร ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุดเท่ากับ 94.81 เซนติเมตร (ตารางที่ 15, ภาพที่ 28 และ 30)

การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแต่ละชนิดร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนแก่หญ้าแฝกนั้น ไม่ทำให้ความสูงของหญ้าแฝกเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว ที่ทุกระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน หรือการใส่เชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

1.5 ความสูงเมื่ออายุ 5 สัปดาห์ หลังการปลูก พบว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช แก่หญ้าแฝกที่ระดับ 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงเฉลี่ยมากกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30, 10 ppm. และการไม่ให้ปุ๋ย ตามลำดับ (ตารางที่ 16) แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความสูง 110.45 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30, 10 ppm. และการไม่ให้ปุ๋ย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 109.65, 107.20 และ 103.55 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งความสูงของหญ้าแฝกในสัปดาห์ที่ 5 นี้ การไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมี ความสูงน้อยที่สุด

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใส่เชื้อ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 109.81 เซนติเมตร รองลงไป ได้แก่การใส่เชื้อ CR 3, HL 2 และ LDS 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีความสูงเท่ากับ 109.00, 108.50 และ 106.94 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีความสูงน้อยที่สุดเท่ากับ 104.31 เซนติเมตร (ตารางที่ 16, ภาพที่ 29 และ 30)

การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแต่ละชนิดร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนแก่หญ้าแฝกนั้น ไม่ทำให้ความสูงของหญ้าแฝกในสัปดาห์ที่ 5 มีความแตกต่างกันกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวที่ทุกระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนหรือการใส่เชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

ตารางที่ 14. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 3 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	87.25	89.25	86.75	92.00	88.81
CR 1	99.25	97.00	97.75	93.00	96.75
CR 3	90.25	94.63	89.00	101.50	93.85
LDS 3	87.50	89.75	102.25	96.00	93.88
HL 2	90.38	93.50	98.00	102.25	96.03
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	90.93	92.83	94.75	96.95	

F - test

ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 9.79%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = ns CV (sub plot) 10.24%

Interaction (N X A) = ns

ตารางที่ 15. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 4 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	95.75	94.50	92.75	96.25	94.81
CR 1	101.75	103.50	102.75	96.75	101.19
CR 3	95.75	98.50	96.50	106.25	99.25
LDS 3	92.25	93.75	111.50	103.75	100.31
HL 2	95.50	99.25	102.50	105.50	100.69
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	96.20	97.90	101.20	101.70	

F - test

ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 8.94%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = ns CV (sub plot) 9.20%

Interaction (N X A) = ns

ตารางที่ 16. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูง (ซม.) ของหญ้าแฝก อายุ 5 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

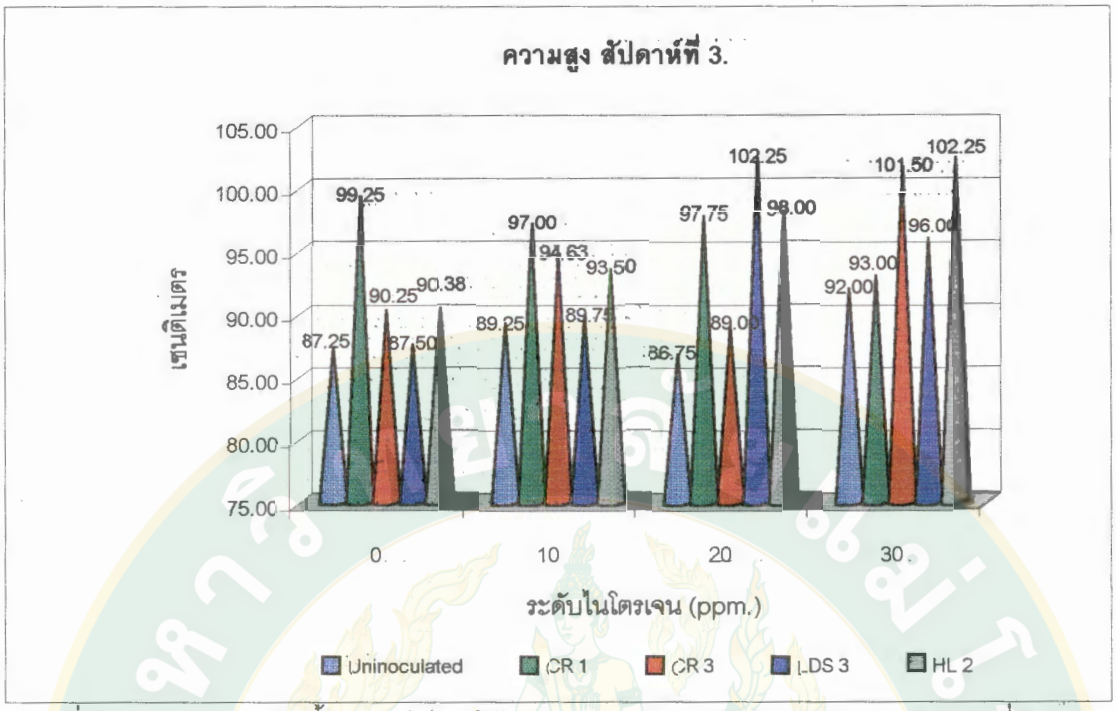
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	101.75	102.75	108.25	104.50	104.31
CR 1	108.25	114.75	110.75	105.50	109.81
CR 3	105.25	109.50	107.00	114.25	109.00
LDS 3	100.00	101.75	117.75	108.25	106.94
HL 2	102.50	107.25	108.50	115.75	108.50
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	103.55	107.20	110.45	109.65	

F - test

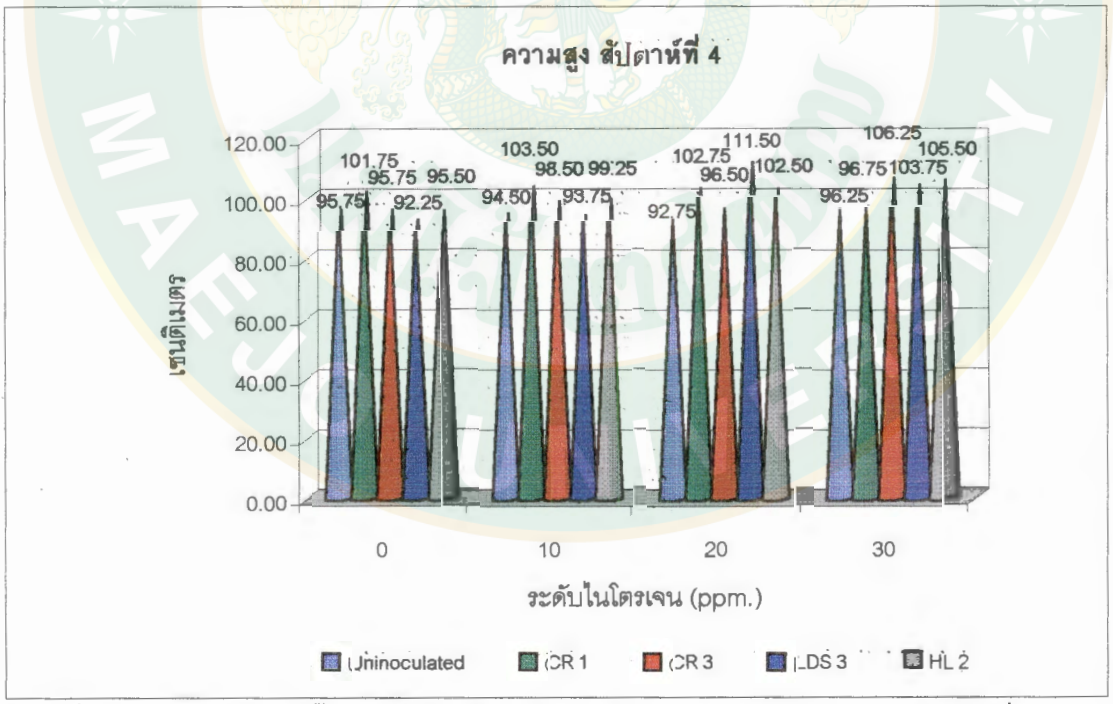
ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 8.34%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = ns CV (sub plot) 8.99%

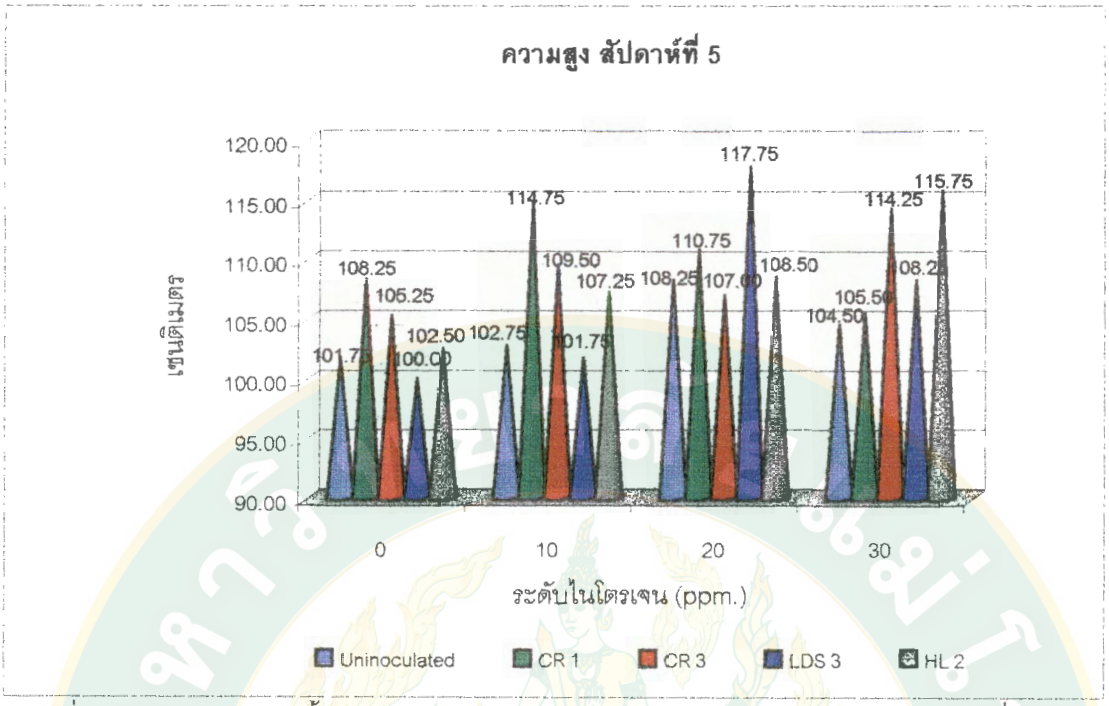
Interaction (N X A) = ns



ภาพที่ 27. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูงของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 3 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง



ภาพที่ 28. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูงของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 4 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง



ภาพที่ 29. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความสูงของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 5 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ภาพที่ 30. ผลของการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกันต่อการการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก ภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ในสภาพกระถางทดลอง

(a) uninoculation (b) CR 1 (c) CR 3 (d) LDS 3 (e) HL 2

2. การพัฒนาด้านจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก

2.1 จำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) เมื่ออายุ 1 สัปดาห์ ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างกันพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่มีแนวโน้มว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้น ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยโดยการให้ปุ๋ยที่ระดับ 30 ppm. ซึ่งหญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากที่สุดเท่ากับ 1.95 ต้น รองลงไปได้แก่การให้ปุ๋ยที่ระดับ 10 และ 20 ppm. หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 1.85 ต้น ส่วนการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 1.75 ต้น (ตารางที่ 17)

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าการใส่เชื้อ HL 2 และ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 2.19 และ 2.00 ต้น ซึ่งมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนการใส่เชื้อ CR 3 และ LDS 3 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 1.94 และ 1.75 ต้น มากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, การใส่เชื้อ HL 2 และ CR 1 โดยหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 1.38 ต้น (ตารางที่ 17,ภาพที่ 31 และ 36)

การใส่เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกันร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้น ไม่ทำให้จำนวนต้นต่อกอแตกต่างกันกับการใส่เชื้อแบคทีเรียหรือการให้ปุ๋ยเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

2.2 จำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับ สารละลายธาตุอาหารพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่มีแนวโน้มว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน โดยการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30 และ 10 ppm. หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอ มากที่สุดเท่ากับ 2.70 ต้น รองลงไปเป็น การให้ปุ๋ยไนโตรเจน 20 ppm. ซึ่งหญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 2.65 ต้น ส่วนการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 2.6 ต้น (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 17. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 1 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	1.50	1.50	1.00	1.50	1.38
CR 1	1.50	2.25	2.00	2.25	2.00
CR 3	2.00	1.50	2.00	2.25	1.94
LDS 3	1.75	2.00	1.75	1.50	1.75
HL 2	2.00	2.00	2.50	2.25	2.19
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	1.75	1.85	1.85	1.95	

F - test

ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 30.68%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = * * CV (sub plot) 32.07%

Interaction (N X A) = ns LSD 0.01 (แบคทีเรีย) = 0.504

ตารางที่ 18. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 2 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

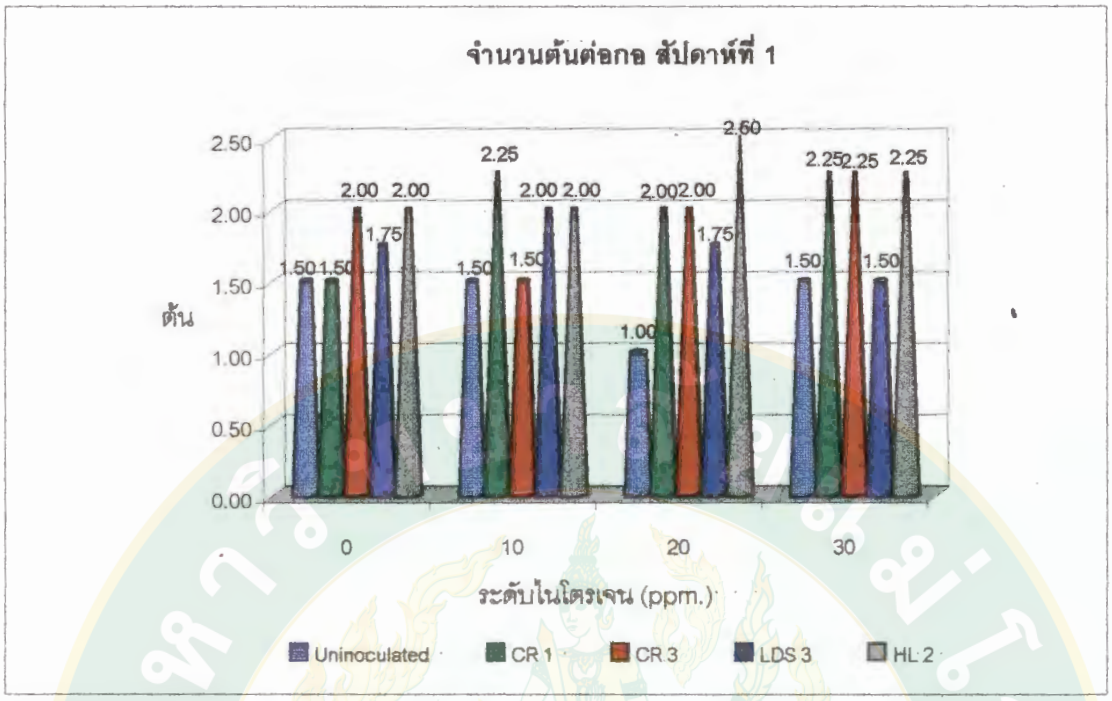
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	2.25	2.50	1.75	2.00	2.13
CR 1	2.50	2.75	2.75	2.50	2.63
CR 3	2.50	2.50	3.00	3.25	2.81
LDS 3	2.75	3.00	2.25	2.50	2.63
HL 2	3.00	2.75	3.50	3.25	3.13
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	2.60	2.70	2.65	2.70	

F - test

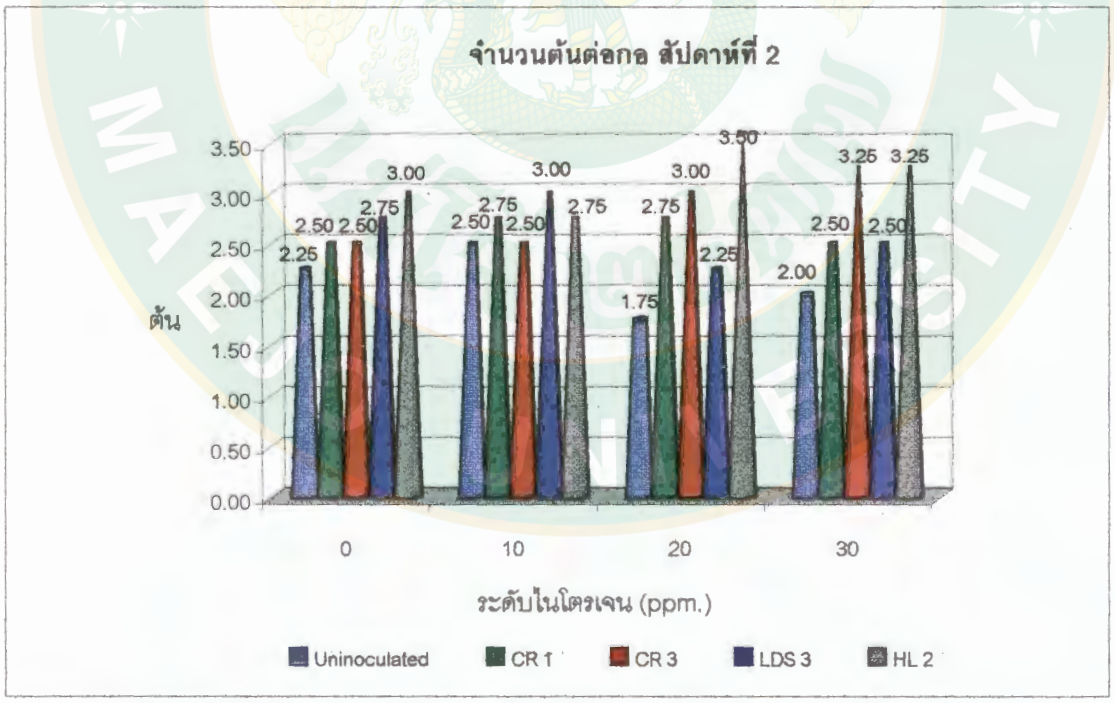
ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 21.37%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = * CV (sub plot) 29.29%

Interaction (N X A) = ns LSD 0.05 (แบคทีเรีย) = 0.497



ภาพที่ 31. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 1 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง



ภาพที่ 32. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 2 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าการใส่เชื้อ HL 2 และ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 3.13 และ 2.81 ต้น ซึ่งมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการใส่เชื้อ CR 1 และ LDS 3 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 2.63 ต้น มากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, การใส่เชื้อ HL 2 และ CR 3 โดยหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 2.13 ต้น (ตารางที่ 18, ภาพที่ 32 และ 36)

การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่างชนิดกัน ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้น ไม่ทำให้จำนวนต้นต่อกอแตกต่างกัน กับการใส่เชื้อแบคทีเรียหรือการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

2.3 จำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) เมื่ออายุ 3 สัปดาห์ ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่มีแนวโน้มว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้น ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากกว่าการไม่ให้ปุ๋ย โดยการให้ปุ๋ยที่ระดับ 30 ppm. ซึ่งหญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากที่สุดเท่ากับ 3.40 ต้น รองลงไปได้แก่การให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับ 10 และ 20 ppm. หญ้าแฝกมีความสูง เท่ากับ 3.30 และ 3.15 ต้น ส่วนการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 3.10 ต้น (ตารางที่ 19)

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าการใส่เชื้อ HL 2, LDS 3 และ CR 3 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 3.69, 3.50 และ 3.38 ต้น ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการใส่เชื้อ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 3.00 ต้น มากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, การใส่เชื้อ HL 2, LDS 3 และ CR 3 โดยหญ้าแฝกที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 2.63 ต้น (ตารางที่ 19, ภาพที่ 33 และ 36)

การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่างชนิดกัน ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้น ไม่ทำให้จำนวนต้นต่อกอแตกต่างกันกับการใส่เชื้อแบคทีเรียหรือการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

2.4 จำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่มีแนวโน้มว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยโดยการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากที่สุดเท่ากับ 3.95 ต้น รองลงไปได้แก่การให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับ 10 และ 30 ppm. ซึ่งหญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 3.85 และ 3.80 ต้น ส่วนการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 3.7 ต้น (ตารางที่ 20)

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าการใส่เชื้อ HL 2 และ LDS 3 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 4.38 และ 4.19 ต้น ซึ่งมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนการ ใส่เชื้อ CR 3 และ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 3.94 และ 3.63 ต้น มากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, การใส่เชื้อ HL 2 และ LDS 3 โดยหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 3.00 ต้น (ตารางที่ 20, ภาพที่ 34 และ 36)

การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่างชนิดกัน ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้น ไม่ทำให้จำนวนต้นต่อกอแตกต่างกันกับการใส่เชื้อแบคทีเรียหรือการให้ปุ๋ยไนโตรเจนอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

2.5 จำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) เมื่ออายุ 5 สัปดาห์ ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างกันพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่มีแนวโน้มว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้น ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากกว่าการไม่ให้ปุ๋ย โดยการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากที่สุดเท่ากับ 5.15 ต้น รองลงไปได้แก่การให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ

ตารางที่ 19. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 3 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	2.50	3.00	2.00	3.00	2.63
CR 1	3.25	2.75	3.25	2.75	3.00
CR 3	3.25	3.25	3.50	3.50	3.38
LDS 3	3.00	3.75	3.25	4.00	3.50
HL 2	3.50	3.75	3.75	3.75	3.69
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	3.10	3.30	3.15	3.40	

F - test

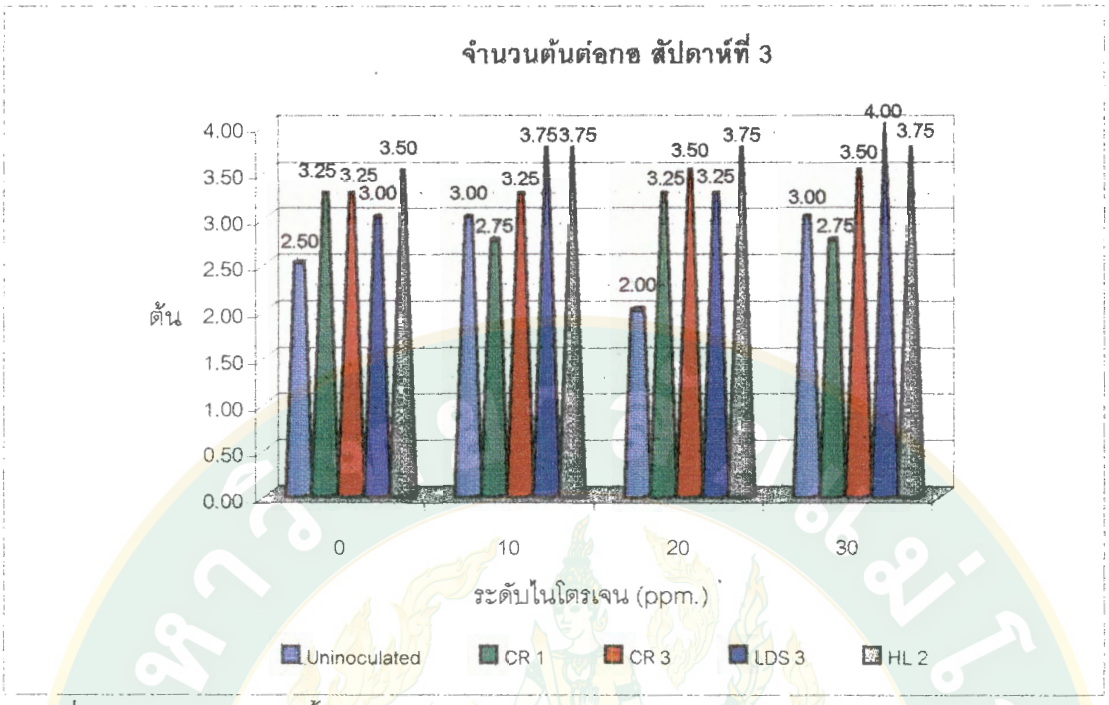
ระหว่างระดับปุ๋ย (N)	= ns	CV (main plot)	21.38%
ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A)	= *	CV (sub plot)	27.52%
Interaction (N X A)	= ns	LSD 0.05 (แบคทีเรีย)	= 0.567

ตารางที่ 20. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 4 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

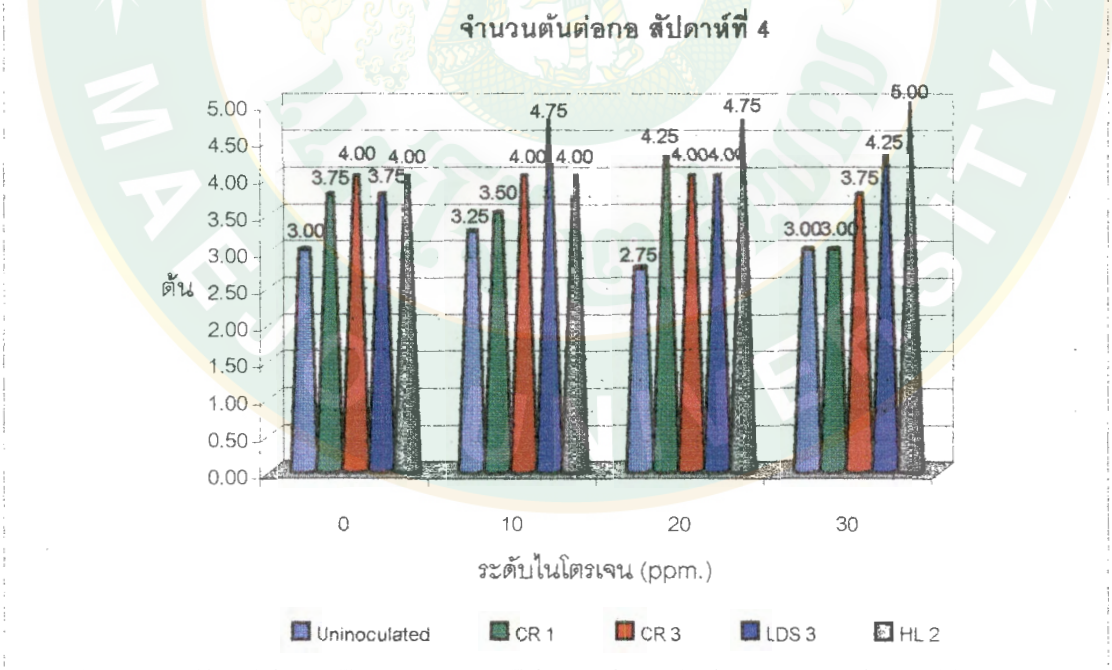
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	3.00	3.25	2.75	3.00	3.00
CR 1	3.75	3.50	4.25	3.00	3.63
CR 3	4.00	4.00	4.00	3.75	3.94
LDS 3	3.75	4.75	4.00	4.25	4.19
HL 2	4.00	4.00	4.75	5.00	4.44
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	3.70	3.90	3.95	3.80	

F - test

ระหว่างระดับปุ๋ย (N)	= ns	CV (main plot)	15.22%
ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A)	= * *	CV (sub plot)	25.70%
Interaction (N X A)	= ns	LSD 0.01 (แบคทีเรีย)	= 0.835



ภาพที่ 33. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 3 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง



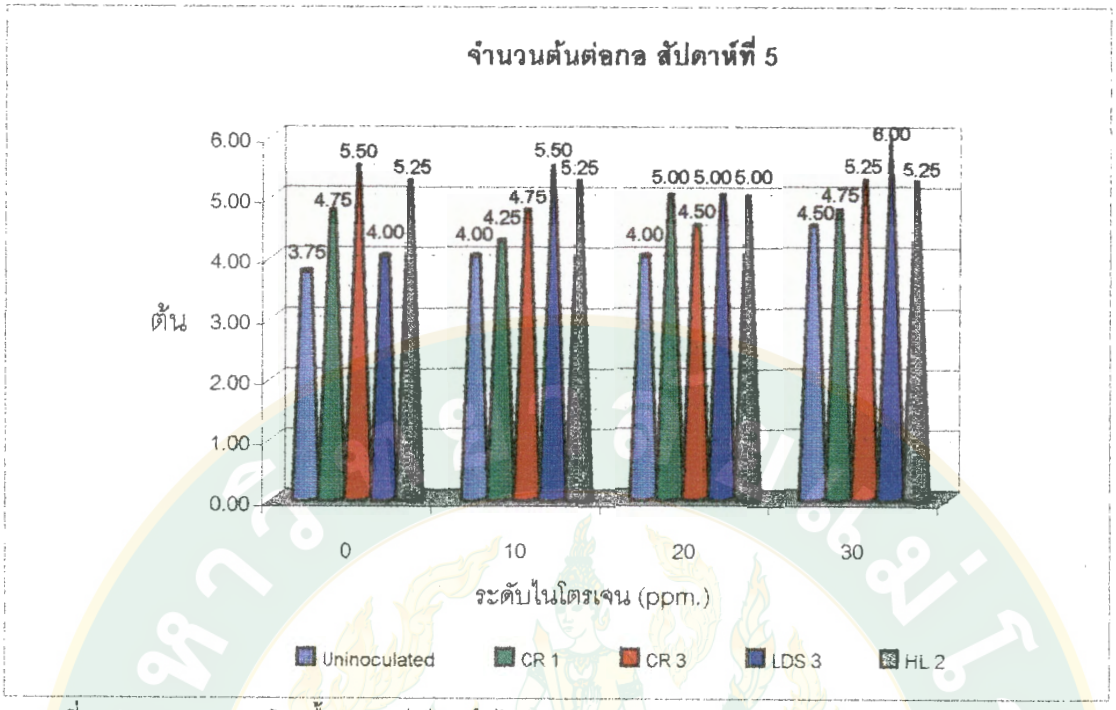
ภาพที่ 34. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 4 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ตารางที่ 21. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอ (หน่อ) ของหญ้าแฝก อายุ 5 สัปดาห์ ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

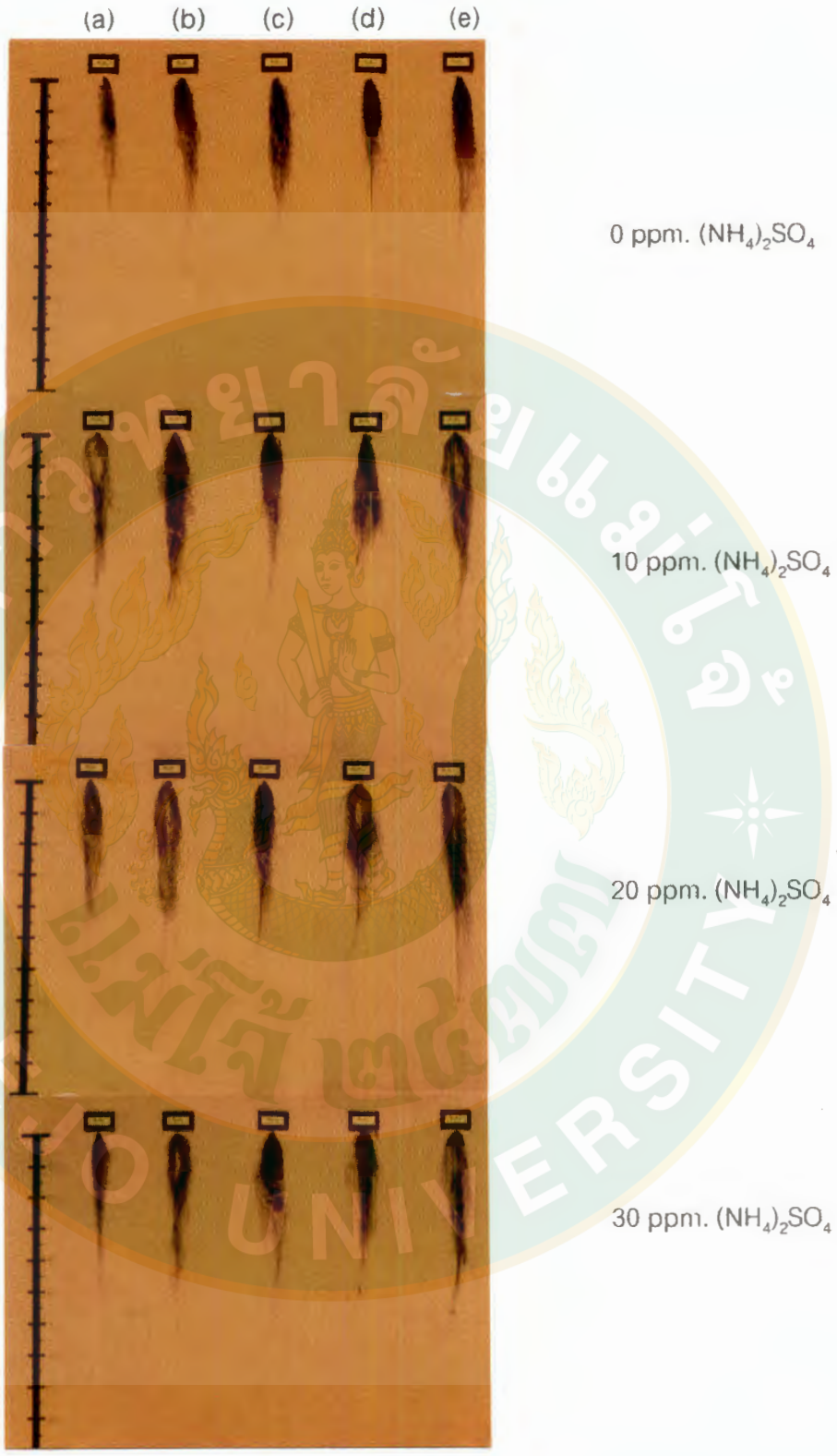
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	3.75	4.00	4.00	4.50	4.06
CR 1	4.75	4.25	5.00	4.75	4.69
CR 3	5.50	4.75	4.50	5.25	5.00
LDS 3	4.00	5.50	5.00	6.00	5.13
HL 2	5.25	5.25	5.00	5.25	5.19
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	4.65	4.75	4.70	5.15	

F - test

ระหว่างระดับปุ๋ย (N)	= ns	CV (main plot)	15.51%
ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A)	= *	CV (sub plot)	21.73%
Interaction (N X A)	= ns	LSD 0.05 (แบคทีเรีย)	= 0.666



ภาพที่ 35. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อจำนวนต้นต่อกอของหญ้าแฝก สัปดาห์ที่ 5 ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง



ภาพที่ 36. ผลของการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกันต่อปริมาณและความยาวของรากหญ้าแฝก ภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ในสภาพกระถางทดลอง

(a) uninoculation (b) CR 1 (c) CR 3 (d) LDS 3 (e) HL 2

10 และ 20 ppm. ซึ่งหญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 4.75 และ 4.70 ต้น ส่วนการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝก มีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดเท่ากับ 4.65 ต้น (ตารางที่ 21)

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าการใส่เชื้อ HL 2, LDS 3 และ CR 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 5.19, 5.13 และ 5.00 ต้น ซึ่งมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการใส่เชื้อ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 4.69 ต้น มากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย, การใส่เชื้อ HL 2, LDS 3 และ CR 3 โดยหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุด เท่ากับ 4.06 ต้น (ตารางที่ 21, ภาพที่ 35 และ 36)

การใส่เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้น ไม่ทำให้จำนวนต้นต่อกอแตกต่างกันกับการใส่เชื้อแบคทีเรีย หรือการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

3. การพัฒนาด้านความยาวรากของหญ้าแฝก

ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่มีแนวโน้มว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้น ทำให้หญ้าแฝกมีจำนวนต้นต่อกอมากกว่าการไม่ให้ปุ๋ย โดยการให้ปุ๋ยที่ระดับ 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 65.50 เซนติเมตร รองลงไปได้แก่การให้ปุ๋ยไนโตรเจน ที่ระดับ 10 และ 30 ppm. ซึ่งหญ้าแฝกมีความยาวรากเท่ากับ 63.85 และ 63.55 เซนติเมตร ส่วนการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากน้อยที่สุดเท่ากับ 63.30 เซนติเมตร (ตารางที่ 22)

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียทุก isolates ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยการใส่เชื้อ HL.2 ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 65.63 เซนติเมตร รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ CR 1, LDS 3 และ CR 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีความยาวรากเท่ากับ 65.31, 64.44 และ 62.56 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้หญ้าแฝกมีความยาวรากน้อยที่สุดเท่ากับ 62.31 เซนติเมตร (ตารางที่ 22, ภาพที่ 37)

การใส่เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้น ทำให้ความยาวรากของหญ้าแฝกไม่แตกต่างกันกับการใส่เชื้อแบคทีเรีย หรือการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

4. การสะสมน้ำหนักแห้งของราก

ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่มีแนวโน้มว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้น ทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งของรากมากว่าการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน โดยการให้ปุ๋ยที่ระดับ 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากมากที่สุดเท่ากับ 1.152 กรัม รองลงไปได้แก่การให้ปุ๋ยที่ระดับ 30 และ 10 ppm. ซึ่งหญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากเท่ากับ 1.139 และ 1.124 กรัม ส่วนการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากน้อยที่สุดเท่ากับ 1.088 กรัม (ตารางที่ 23)

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกากรไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียทุก isolates ทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งของรากมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยการใส่เชื้อ HL 2 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากมากที่สุดเท่ากับ 1.173 กรัม รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ CR 3, LDS 3 และ CR 1 ซึ่งหญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากเท่ากับ 1.150, 1.149 และ 1.148 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของรากน้อยที่สุดเท่ากับ 1.009 กรัม (ตารางที่ 23, ภาพที่ 38)

การใส่เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้น ทำให้การสะสมน้ำหนักแห้งของรากหญ้าแฝกไม่แตกต่างกันกับการใส่เชื้อแบคทีเรีย หรือการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

ตารางที่ 22. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความยาวราก (ซม.) ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	62.25	65.75	63.00	58.25	62.31
CR 1	69.00	66.00	65.00	61.25	65.31
CR 3	58.75	63.00	63.00	65.50	62.56
LDS 3	59.25	64.75	66.50	67.25	64.44
HL 2	67.25	59.75	70.00	65.50	65.63
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	63.30	63.85	65.50	63.55	

F - test

ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 15.40%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = ns CV (sub plot) 9.65%

Interaction (N X A) = ns

ตารางที่ 23. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งของราก (กรัม) ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

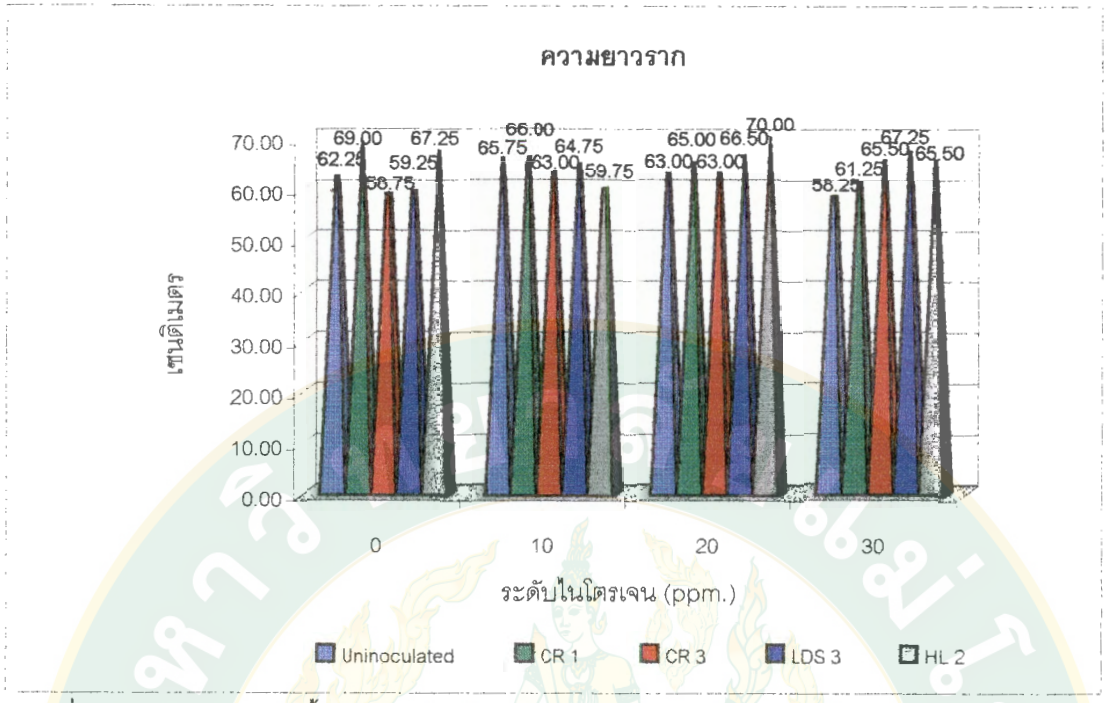
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	1.030	1.015	1.045	0.945	1.009
CR 1	1.148	1.188	1.175	1.080	1.148
CR 3	1.098	1.078	1.170	1.255	1.150
LDS 3	1.020	1.170	1.183	1.223	1.149
HL 2	1.143	1.170	1.188	1.193	1.174
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	1.088	1.124	1.152	1.139	

F - test

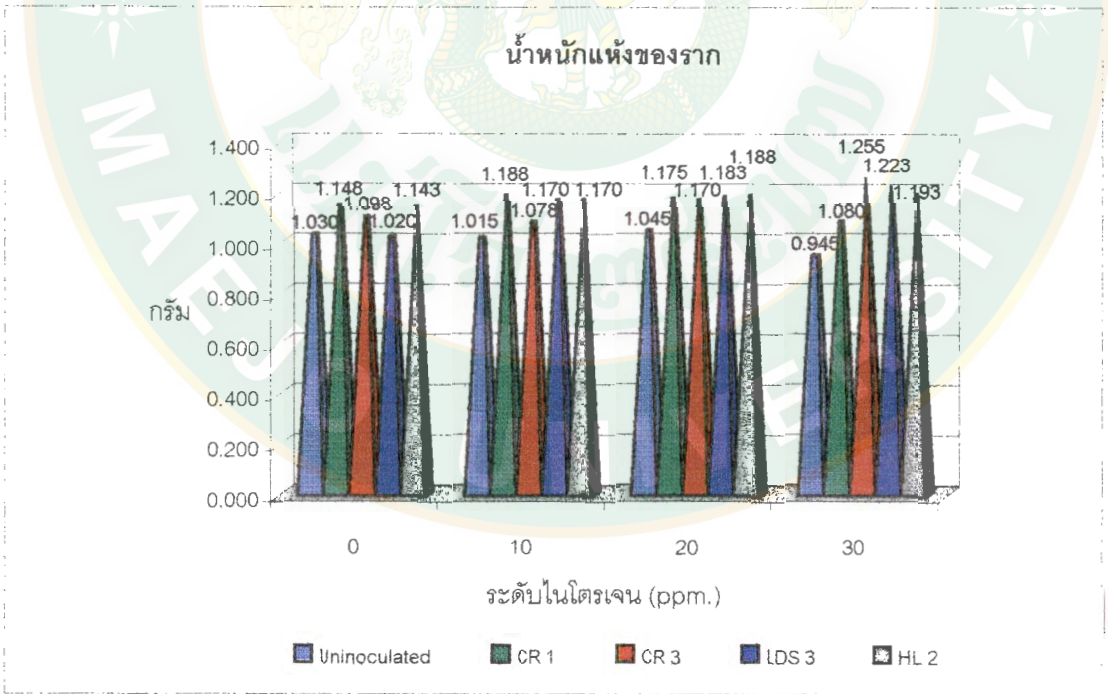
ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 19.57%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = ns CV (sub plot) 24.04%

Interaction (N X A) = ns



ภาพที่ 37. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อความยาวของรากหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง



ภาพที่ 38. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งของรากหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

5. การสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบ

ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าหญ้าแฝกที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 และ 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบเท่ากับ 5.83 และ 5.76 กรัม ซึ่งมากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการให้ปุ๋ยที่ระดับ 10 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบเท่ากับ 5.38 กรัม มากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ย, การให้ปุ๋ยที่ระดับ 20 และ 30 ppm. โดยการที่ไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 5.06 กรัม (ตารางที่ 24)

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียทุก isolates ทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยการใส่เชื้อ CR.1 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบมากที่สุดเท่ากับ 5.90 กรัม รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ HL 2, LDS 3 และ CR 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบเท่ากับ 5.66, 5.57 และ 5.55 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 4.94 กรัม (ตารางที่ 24, ภาพที่ 39)

การใส่เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้น ไม่ทำให้การสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบแตกต่างกันกับการใส่เชื้อแบคทีเรียหรือการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

6. การสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (มวลชีวภาพ)

ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าหญ้าแฝกที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 และ 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดเท่ากับ 6.98 และ 6.90 กรัม มากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการให้ปุ๋ยที่ระดับ 10 ppm. ซึ่งหญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 6.48 กรัม มากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน, การให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 และ 30 ppm. โดยการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดน้อยที่สุดเท่ากับ 6.14 กรัม (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 24. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งของต้นและใบ (กรัม) ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	4.63	4.66	5.10	5.38	4.94
CR 1	5.38	6.33	6.21	5.69	5.90
CR 3	5.06	5.10	6.07	5.61	5.46
LDS 3	4.49	5.33	6.34	6.11	5.57
HL 2	5.71	5.48	5.44	6.01	5.66
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	5.05	5.38	5.83	5.76	

F - test

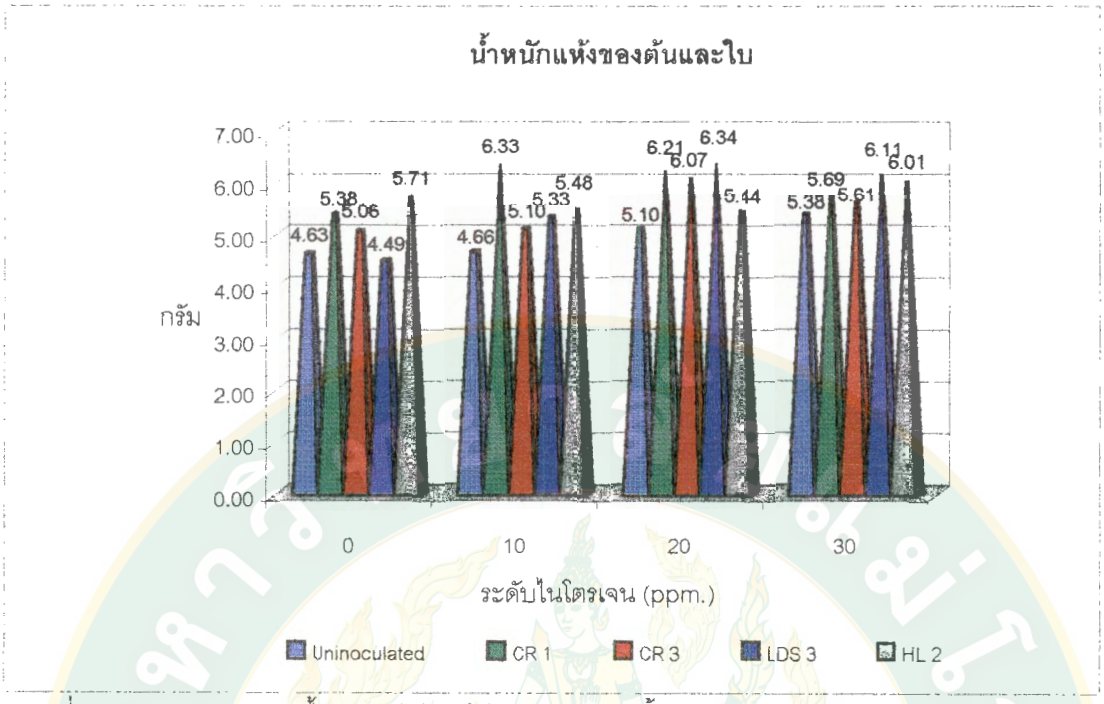
ระหว่างระดับปุ๋ย (N)	= *	CV (main plot)	12.85%
ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A)	= ns	CV (sub plot)	21.09%
Interaction (N X A)	= ns	LSD 0.05 (ไนโตรเจน)	= 0.545

ตารางที่ 25. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด (กรัม) ของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

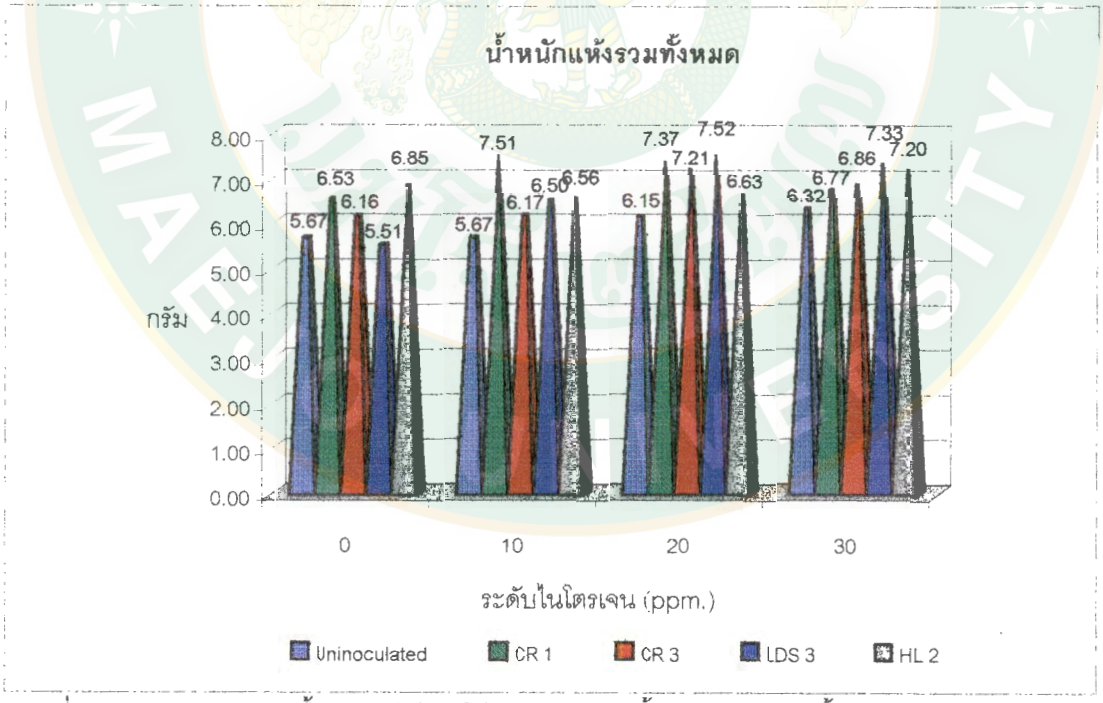
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	5.67	5.67	6.15	6.32	5.95
CR 1	6.53	7.51	7.37	6.77	7.05
CR 3	6.16	6.17	7.21	6.86	6.60
LDS 3	5.51	6.50	7.52	7.33	6.72
HL 2	6.85	6.56	6.63	7.20	6.81
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	6.14	6.48	6.98	6.90	

F - test

ระหว่างระดับปุ๋ย (N)	= *	CV (main plot)	12.88%
ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A)	= ns	CV (sub plot)	20.91%
Interaction (N X A)	= ns	LSD 0.05 (ไนโตรเจน)	= 0.657



ภาพที่ 39. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งของต้นและใบของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง



ภาพที่ 40. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก isolates ทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยการใส่เชื้อ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 7.05 กรัม รองลงไป ได้แก่ การใส่เชื้อ HL 2, LDS 3 และ CR 1 ซึ่งหญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 6.81, 6.72 และ 6.60 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีการสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดน้อยที่สุดเท่ากับ 5.95 กรัม (ตารางที่ 25, ภาพที่ 40)

การใส่เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้นไม่ทำให้การสะสมน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดแตกต่างกันกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย หรือการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

7. เปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบหญ้าแฝก

ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับการสะลายธาตุอาหารพืช ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่มีแนวโน้มว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้น ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน โดยการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากที่สุดเท่ากับ 1.194 รองลงไปได้แก่การให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 10 และ 30 ppm. ซึ่งหญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบเท่ากับ 1.188 และ 1.172 ส่วนการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนหญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนต่ำที่สุดเท่ากับ 1.094 (ตารางที่ 26)

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียทุก ๆ isolates ให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยการใส่เชื้อ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบมากที่สุดเท่ากับ 1.198 รองลงไปได้แก่ การใส่เชื้อ HL 2, CR 3 และ LDS 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบเท่ากับ 1.19, 1.173 และ 1.135 ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 1.115 (ตารางที่ 26, ภาพที่ 41)

การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่างชนิดกัน ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้น ไม่ทำให้เปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบหญ้าแฝก แตกต่างกันกับการใส่เชื้อแบคทีเรีย หรือการให้ปุ๋ยเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

8. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบ (กรัมไนโตรเจน)

ผลการทดลองการให้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าหญ้าแฝกที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 และ 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นในต้นและใบเท่ากับ 6.886 และ 6.722 กรัม สูงกว่าการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการให้ปุ๋ยที่ระดับ 10 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนในต้นเท่ากับ 6.304 กรัม มากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน การให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20 และ 30 ppm. โดยการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 5.396 กรัม (ตารางที่ 27)

เมื่อพิจารณาถึงการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กับการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน แต่มีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากกว่าการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยการใส่เชื้อ CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากที่สุดเท่ากับ 6.963 กรัม รองลงไปได้แก่การใส่เชื้อ HL 2, LDS 3 และ CR 3 ซึ่งหญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบเท่ากับ 6.650, 6.280 และ 6.273 กรัม ตามลำดับ ส่วนการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบน้อยที่สุดเท่ากับ 5.473 กรัม (ตารางที่ 27, ภาพที่ 42)

การใส่เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกันร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับความเข้มข้นนั้น ไม่ทำให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบหญ้าแฝกแตกต่างกันกับการใส่เชื้อแบคทีเรีย หรือการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน

ตารางที่ 26. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	1.050	1.150	1.120	1.140	1.115
CR 1	1.070	1.250	1.200	1.250	1.193
CR 3	1.160	1.230	1.150	1.150	1.173
LDS 3	1.040	1.150	1.220	1.130	1.135
HL 2	1.150	1.160	1.280	1.170	1.190
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	1.094	1.188	1.194	1.168	

F - test

ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = ns CV (main plot) 14.09%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = ns CV (sub plot) 12.40%

Interaction (N X A) = ns

ตารางที่ 27. ผลการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นหญ้าแฝก (กรัมไนโตรเจน) ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

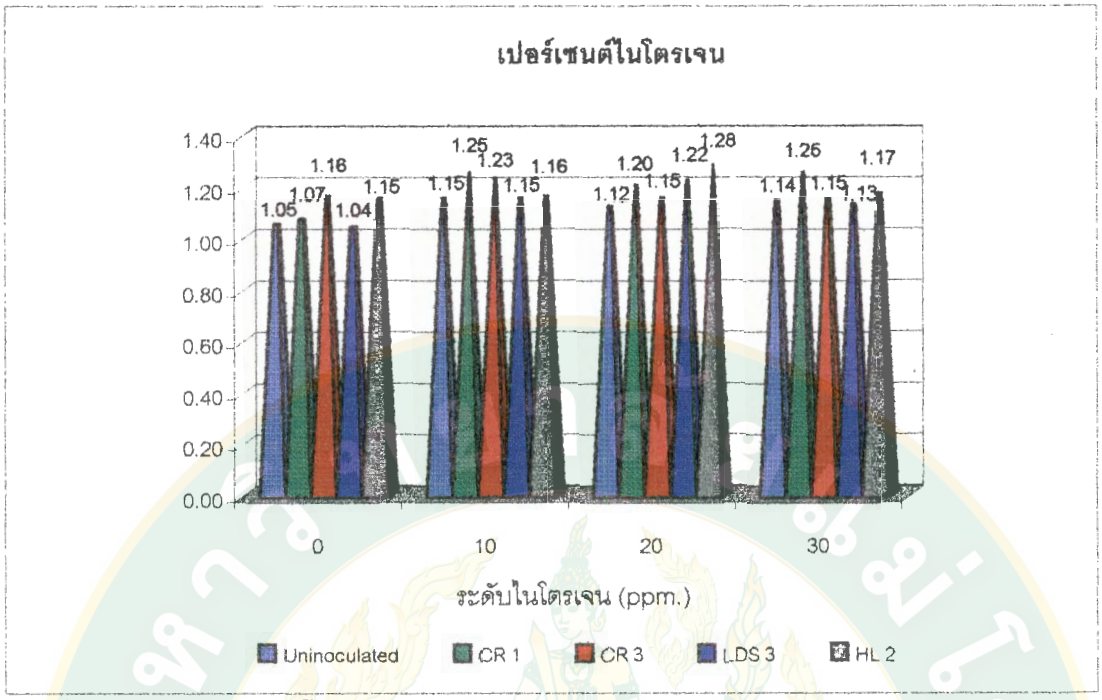
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ระดับไนโตรเจน				ค่าเฉลี่ยแต่ละเชื้อแบคทีเรีย
	0	10	20	30	
Uninoculated	4.750	5.300	5.770	6.070	5.473
CR 1	5.770	7.830	7.160	7.070	6.958
CR 3	5.510	6.100	7.010	6.470	6.273
LDS 3	4.570	5.980	7.690	6.880	6.280
HL 2	6.360	6.310	6.800	7.120	6.648
ค่าเฉลี่ยแต่ละระดับไนโตรเจน	5.392	6.304	6.886	6.722	

F - test

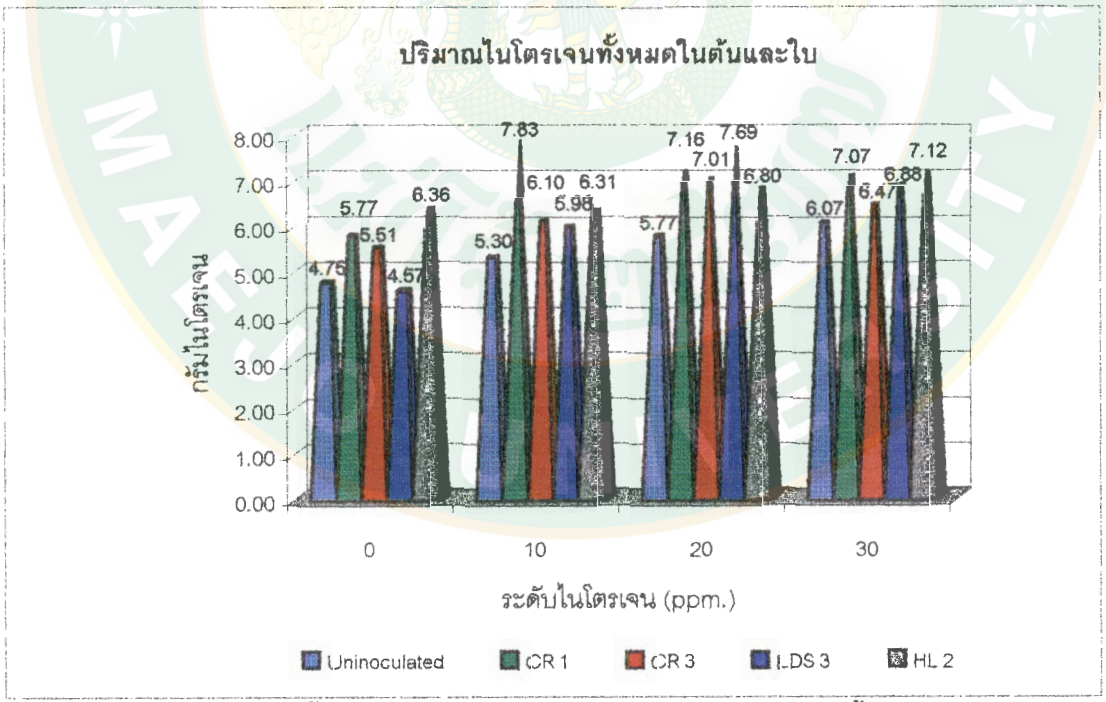
ระหว่างระดับปุ๋ย (N) = * CV (main plot) 20.78%

ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย (A) = ns CV (sub plot) 22.72%

Interaction (N X A) = ns LSD 0.05 (ไนโตรเจน) = 1.013



ภาพที่ 41. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในต้นและใบของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง



ภาพที่ 42. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบของหญ้าแฝก ขณะที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างกัน ในสภาพกระถางทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 3.

การทดลองที่ 3. เป็นการทดลองโดยการทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1. และจากการทดลองที่ 2. โดยพิจารณาจากเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใส่ให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต และมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่สูง เช่น เชื้อแบคทีเรีย isolates CR 1, CR 3, LDS 3 และ HL 2 ที่ทำการคัดเลือกมาใช้ในการทดลองที่ 3. โดยมีการให้ปุ๋ยไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีระดับความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 10, 20 และ 30 ppm. จะทำการให้ปุ๋ยพร้อมสารละลายธาตุอาหารพืช โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับต่าง ๆ กันต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของหญ้าแฝก ภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช เป็นการทดลองที่ไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ วัสดุปลูกคือทรายจืดผสมขี้เถ้าแกลบ อบฆ่าเชื้อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภาชนะปลูกเป็นกระถางพลาสติกขนาด 10x12 นิ้ว

ผลการทดลองพบว่า การพัฒนาด้านการเจริญเติบโต เช่น ความสูง, จำนวนต้นต่อกอ และความยาวราก ภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตด้านต่าง ๆ ได้ดีกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย เหตุผลน่าจะอธิบายได้คือการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนให้กับหญ้าแฝก เชื้อแบคทีเรียมีการตรึงไนโตรเจนและไนโตรเจนที่เชื้อแบคทีเรียตรึงได้ก็จะเป็นแหล่งสำหรับการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย (Dobereiner, 1983 ; Vose, 1983) นอกจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนแล้วยังมีข้อสันนิษฐานอีกว่าน่าจะมีการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น Gibberellin, Cytokinin, Indole acetic acid รวมถึงสารพวกกรดอะมิโน และวิตามินต่าง ๆ จึงช่วยให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย ข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Patel (1969) ; Brown and Burlingham (1968) ; Brown (1976) ; Reynder and Vlassak (1979) ; Tien *et al.* (1979) ; Gonzalez - Lopez *et al.* (1983) ผลของธาตุอาหารไนโตรเจน และสารเร่งการเจริญเติบโตทำให้รากหญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตและแตกรากแขนงได้ดี จึงทำให้หญ้าแฝกสามารถดูดใช้สารละลายธาตุอาหารพืชได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Okon (1984) ที่พบว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum sp.* ทำให้จำนวนการแตกรากแขนงและรากขนอ่อนเพิ่มมากขึ้น จากผลการทดลองที่ 3. พบว่าหญ้าแฝกมีการตอบสนองต่อการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทำให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโต เช่น ความสูง, จำนวนต้นต่อกอ และความยาวราก ที่มากกว่าหญ้าแฝกที่ใส่เชื้อแบคทีเรีย isolates อื่น ๆ และการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย จึงส่งผลให้หญ้าแฝกที่มีการใส่เชื้อ CR 1

มีการสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ เช่น น้ำหนักแห้งของราก, น้ำหนักแห้งของต้นและใบ และน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด ที่สูงมากกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เศรษฐา และคณะ (2539) ที่รายงานว่าการใส่เชื้อแบคทีเรีย ตรึงไนโตรเจน 6 สายพันธุ์ ให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีน้ำหนักแห้งของต้น และน้ำหนักแห้งของรากมากกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อ เช่นเดียวกับ Nur *et al* .(1980);O' Hara *et al.* (1981) รายงานว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum* ให้แก่ข้าวโพดทำให้ข้าวโพดมีน้ำหนักแห้ง และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นข้าวโพดที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย

เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบหญ้าแฝก พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุก ๆ isolates ทำให้หญ้าแฝกมีเปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบสูงมากกว่าหญ้าแฝกที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะหญ้าแฝกที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย isolate CR 1 พบว่ามีเปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบที่สูง จึงส่งผลให้หญ้าแฝกที่มีการใส่เชื้อ isolate CR 1 ทำให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าหญ้าแฝกที่ใส่เชื้อแบคทีเรีย isolates อื่น และการไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nur *et al.* (1980) ที่รายงานว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum brasilense* ให้กับหญ้า Setaria (*Setaria italica*) นั้นทำให้หญ้า Setaria มีผลผลิตน้ำหนักแห้ง และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบหญ้าเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ เศรษฐา (2529) รายงานว่าการใส่เชื้อ *Azomonas sp.*, *Azospirillum brasilense*, *Beijerinckia indica* และ *Azotobacter chroococcum* ทำให้อ้อยมีเปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากกว่าอ้อยที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย

สำหรับผลของการให้ปุ๋ยไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารละลายธาตุอาหารพืช ที่มีระดับความเข้มข้นต่างกัน คือ 0, 10, 20 และ 30 ppm. ภายหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน จากผลการทดลองพบว่าการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก เช่น ความสูง และจำนวนต้นต่อกอ พบว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความสูง และจำนวนต้นต่อกอมากกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 20, 10 ppm. และการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อพิจารณาที่ความยาวราก และการสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ ของหญ้าแฝก เช่น น้ำหนักแห้งของราก, น้ำหนักแห้งของต้นและใบ และน้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด รวมถึงเปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบหญ้าแฝก พบว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm. ทำให้หญ้าแฝกมีความยาวราก, น้ำหนักแห้งของราก, น้ำหนักแห้งของต้นและใบ, น้ำหนักแห้งรวมทั้งหมดและเปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบหญ้าแฝกมากกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30, 10 ppm.

แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm. จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน ที่น้ำหนักแห้งของต้นและใบ, น้ำหนักแห้งรวมทั้งหมด และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบหญ้าแฝก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเศรษฐา (2529) ที่พบว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 50 ppm. นั้นช่วยให้อ้อยมีการตรึงไนโตรเจนสูงมากกว่าการใส่ปุ๋ยที่ระดับ 25, 100 ppm. และการไม่ใส่เชื้อปุ๋ยไนโตรเจนเลย เช่นเดียวกัน Dobereiner *et al.* (1975) ; Smith *et al.* (1976) รายงานว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนในระดับต่ำบางระดับช่วยกระตุ้นให้พืชมีการตรึงไนโตรเจนได้มากกว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับสูง และ Wright (1980) รายงานว่าการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 70 ppm. แก่หญ้า *Panicum coloratum* ที่คลุกเชื้อ *Azotobacter sp.* ก่อนปลูกนั้นหญ้าจะมีการตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่า เมื่อให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 140 ppm. และ 210 ppm.

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างการใส่เชื้อแบคทีเรียร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน ไม่ทำให้หญ้าแฝกมีการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต, การสะสมมวลชีวภาพ เช่น การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ รวมถึงเปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบหญ้าแฝกที่แตกต่างกันทางสถิติ เพราะจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับปุ๋ยไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจน ทำให้หญ้าแฝกมีการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต, การสะสมมวลชีวภาพ เช่น การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ รวมถึงเปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบหญ้าแฝก มากกว่าหญ้าแฝกที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียหรือไม่ให้ปุ๋ยไนโตรเจน โดยเฉพาะการใส่เชื้อ CR 1 มีแนวโน้มที่จะทำให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโต การสะสมมวลชีวภาพ เช่น การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ รวมถึงเปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบหญ้าแฝกที่สูง ใกล้เคียงกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm. จากผลการทดลองนี้ซึ่งเป็นการทดลองที่ใช้ระดับปุ๋ยไนโตรเจนในระดับต่ำร่วมกับการใส่เชื้อแบคทีเรีย แต่หญ้าแฝกยังมีการเจริญเติบโตที่ดี น่าจะนำไปใช้เป็นแนวทางในการลดการใช้ปุ๋ยเคมีหรือเป็นการลดต้นทุนการผลิต โดยการลดการใช้ปุ๋ยเคมีลงแล้วใช้การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Baltensperger *et al.* (1978) ที่รายงานว่าการใส่เชื้อ *Azospirillum sp.* และ *Azotobacter sp.* ร่วมกับการให้ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราต่ำกับหญ้า Bermuda (*Cynodon dactylon*) ทำให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งของต้นหญ้า Bermuda เพิ่มมากขึ้น 17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใส่เชื้อ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุป

ผลการศึกษาอิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก สามารถสรุปได้ดังนี้

1. สามารถแยก และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ และแบบสัมพันธ์กับพืช จากรากหญ้าแฝกในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ ได้เชื้อแบคทีเรีย 5 isolates และจากพื้นที่จังหวัดเชียงราย ได้เชื้อแบคทีเรีย 12 isolates สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 17 isolates แต่ละ isolates มีความแตกต่างกัน

2. สามารถตรวจวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเทคนิควิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) พบว่ามีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่คัดเลือกได้จำนวน 7 isolates ที่สามารถวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้ โดยแบคทีเรียจะมีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ พันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย ตลอดจนสภาพแวดล้อมที่ทำการสุ่มคัดเลือกเก็บรากหญ้าแฝก

3. ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใส่ให้กับหญ้าแฝก ทำให้หญ้าแฝกมีการพัฒนาด้านการเจริญเติบโต, การสะสมมวลชีวภาพ (total biomass) และศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่สูงกว่าหญ้าที่ไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

4. การใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ มีแนวโน้มที่ทำให้หญ้าแฝกมีการเจริญเติบโต การสะสมมวลชีวภาพ (total biomass) เช่น การสะสมน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ เปอร์เซนต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นและใบมากกว่าหญ้าแฝกที่ไม่ได้ใส่เชื้อแบคทีเรียและไม่ได้ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองการศึกษาถึงอิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแฝกทำให้เราทราบถึงข้อมูลพื้นฐาน คือ ในสภาพธรรมชาติมีจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและแบบสัมพันธ์กับพืช อาศัยอยู่ร่วมกับรากหญ้าแฝก และมีกิจกรรมร่วมกัน ซึ่งหญ้าแฝกเป็นพืชตระกูลหญ้า เช่นเดียวกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น อ้อย, ข้าวโพด, ข้าวฟ่าง, ข้าว, ข้าวสาลี ฯลฯ จึงควรจะมีการศึกษาถึงประโยชน์ของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเหล่านี้ เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มผลผลิตของพืชเศรษฐกิจเหล่านี้และเป็นการลดต้นทุนการผลิตจากการใช้ปุ๋ยเคมีลง รวมถึงเป็นการรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน เพื่อไม่ให้ดินนั้นสูญเสียคุณสมบัติที่ดีไปจากการใช้ปุ๋ยเคมีจำนวนมาก ๆ และเป็นเวลานาน

อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดลองนี้ ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก คือ เป็นการทดลองเพียงในสภาพปลอดเชื้อและสภาพกระถาง ที่ยังมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องน้อย จึงควรที่จะมีการศึกษาในสภาพแปลงทดลองที่เป็นแปลงปลูกขนาดใหญ่หรือในพื้นที่ที่ทำการเกษตรจริง ๆ ของเกษตรกร และยังมีปัจจัยเกี่ยวกับพันธุ์หญ้าแฝก ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้หญ้าแฝกหอม (*Vetiveria zizanioides*) สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี เพียงพันธุ์เดียวจึงไม่ทราบว่าหญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis*) หรือหญ้าแฝกสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งอาจจะมีการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่มนี้แตกต่างกันออกไปเป็นอย่างไร ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การตรวจวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิควิธี Acetylene Reduction Activity (ARA) นั้นเป็นการวัดโดยวิธีทางอ้อม แต่อย่างไรก็ตามก็สามารถใช้เป็นบรรทัดฐานได้ระดับหนึ่ง เพื่อให้การตรวจวัดศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนให้แม่นยำยิ่งขึ้น จำเป็นต้องใช้วิธี N^{15} หรือธาตุไนโตรเจนรังสีไอโซโทปในอนาคตโดยดูความสัมพันธ์กับการสร้างมวลชีวภาพของหญ้าแฝก และควรตรวจสอบจำนวนชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยละเอียด ในขณะเดียวกันก็ปรับปรุงหาวิธีการนำเอาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเหล่านี้ไปใช้ทำเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการปลูกกล้าหญ้าแฝกตลอดจนการปลูกหญ้าแฝกในพื้นที่จริง แม้กระทั่งการพยายามค้นหาสายพันธุ์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่สามารถสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) เพื่อประโยชน์ในการเกษตรกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2537. **ลักษณะของหญ้าแฝก**. คู่มือการดำเนินงานเกี่ยวกับหญ้าแฝก. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 94 น.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2541. **ความรู้เรื่องหญ้าแฝก**. คู่มือการดำเนินงานเกี่ยวกับหญ้าแฝก กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 115 น.

ณัฐพร สุนทรวิจารณ์. 2534. **เรสทริกชั่น แฟรกเมนต์ เลงช์ โพลิมอฟิซึมของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Bradyrhizobium japonioum***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,กรุงเทพฯ.

บรรหาร แตงฉ่ำ, แดน ฟูแสง, เศรษฐา ศิริพินทุ์, ประกอบ จันทรอร่าม, จุลศักดิ์ บุญรัตน และ ขวัญตา กังวาลปรีชาดา. 2528. **คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียอิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนที่เหมาะสมกับข้าวโพดพันธุ์ สุวรรณ 1**. เอกสารวิชาการด้านปฐพีวิทยา เล่มที่ 1. การประชุมวิชาการประจำปี 2529. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร , กรุงเทพฯ. 460 น.

ประทีป เอี๊ยบเจริญ, เศรษฐา ศิริพินทุ์, อภิชัย ธีรธร และ อนันต์ ปินตารักษ์. 2542. **อิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแฝก**. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2542 ณ อาคารอินทรีจันทรสถิตย์ (ศูนย์เรียนรวม 1) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพ ฯ.

ปรัชฌา ธัญญาดี. 2537. **การศึกษาการผลิตปุ๋ยหมักจากใบหญ้าแฝก**. รายงานผลการวิจัยโครงการปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรีย์วัตถุ กองอนุรักษ์ดินและน้ำ กรมพัฒนาที่ดิน. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 15 น.

ไพเราะ ทิพยทัศน์. 2520. การใช้การตรึงไนโตรเจนแทนปุ๋ยวิทยาศาสตร์. **ว. วิทย์ (เกษตร)**. **10**:259-263.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2533. ยีนตรึงไนโตรเจน (nif) และยีนสร้างปม (nod) ของ *Rhizobium*. **ว. อุสาหกรรมเกษตร** (1) 3:22-32.

วีรชัย ณ นคร.2533. **ชนิดและพันธุ์หญ้าแฝกหอมที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบ**. เอกสารโรเนียว. 3 หน้า.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2538. **ไนโตรเจนเมตาโบลิซึม**. สรีระวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.230 น.

สมศักดิ์ วังใน. 2541. **การตรึงไนโตรเจน ไรโซเบียม-พืชตระกูลถั่ว**. ภาคปฐพีวิทยา, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ. 252 น.

เศรษฐา ศิริพินทุ์, เกษม สุขสถาน, อุดม พูลเกษ, วงจันทร์ วงแก้ว, นันทกร บุญเกิด, บรรหาญ แดงฉ่ำ และ เย็นใจ วสุวัต. 2528. **อิทธิพลของการคลุกเชื้อแบคทีเรียที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนในบริเวณรากอ้อย และการเจริญเติบโตของอ้อยพันธุ์ เอฟ- 140 ในขณะที่มีปุ๋ยไนโตรเจน**. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 3. สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 460 น.

เศรษฐา ศิริพินทุ์.2529. **อิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของอ้อยบางพันธุ์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.สาขาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เศรษฐา ศิริพินทุ์, อภิชัย ธีรธร, อนันต์ ปินตารักษ์ และ อภิชาติ สวนคำกอง. 2539. **อิทธิพลของการใส่เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของหญ้าแฝกบางพันธุ์**. ใน: การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 2 วันที่ 3-4 มิถุนายน 2539.สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้.

ออมทรัพย์ นพอมรบดี.2539. **ธาตุอาหารพืชที่ได้จากจุลินทรีย์ดิน**. เอกสารวิชาการปุ๋ยชีวภาพ. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน. กองปฐพีวิทยา. กรมวิชาการเกษตร .399 น.

Balansundaram, V. R. and A. Sen. 1971. Effect of Bacterization of Rice (*Oryza sativa L.*) with *Beijerinckia*. **Indian. J. Agric. Sci. 4(1)**:700-704.

Balandreau, J., G. Rinaudo, and Y. R. Dommergues. 1976. Asymbiotic Nitrogen Fixation in Paddy soil, pp. 611-668. In W.E. Newton and C.J. Nymun (eds). **First International Symposium on Nitrogen Fixation, Vol. II.** Washington State University Press, Pullman, Washington.

Baldani., N. L. D., J. I. Baldani, and J. Dobereiner. 1983. Effect of *Azospirillum* Inoculation and Root Infection and Nitrogen Incorporation in Wheat. **Cannadian J. Microbiology . 29**:924-929.

Baltensperger, A. A., S. G. Schank, R. L. Smith, R. C. Littell, J. H. Bouton and A. F. Dudek. 1978. Effect of Inoculation with *Azospirillum* and *Azotobacter* on Turf-Type Bermuda Genotypes. **Crop Science. 18(Nov-Dec)**:1,043-1,045.

Becking, J. H. 1978. *Beijerinckia* in Errigated Rice Soils. **Ecol. Bull. (Stockholm). 26**:116-129.

Bothe, H., W. Zimmer, G. Denneberg, A. Kronenberg and G. Neuer. 1985. Nitrogen Fixation and Denitrification by *Azospirillum* Grown in Free Living Culture and in Association with Wheat, p.373. In H.J. Evans, P.J. Bottomley and W.S. Newton (eds). **Nitrogen Fixation Research Progress**. Martius Nijhoff Publisher, Dordrecht, Netherland.

Brown, M. E. 1976. Role of *Azotobacter paspali* in Association with *Paspalum notatum.* **J. Appl. Bacteriol. 40**:341-348.

Brown, M. E. and S. K. Burlingham. 1968. Production of Plant Growth Substances by ***Azotobacter chroococcum***. **J. Gen. Microbiol. 53**:135-144.

Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 th Editon.**, The Williams and Wilkins company, Baltimore, 1,268 p.

Chase, A. and Cornelia D. Niles. 1962. **Index to Grass Species**. Vol. 3,(Pap-Z), pp, 509-510. G.H Hall & Co., 70 Lincoln.

Dart, P. S. 1986. N_2-Fixation Associated with Non-Leguminous Agriculture. **Plant and Soil. 90**:303-334.

Day, J. M., and M. C. P. Neves., and J. Dobereiner. 1975. Nitrogenase Activity on the Root of Tropical of Forage Grasses. **Soil Biochem. 7**:107-112.

Dobereiner, J. 1961. Nitrogen-Fixing Becteria of the Genus *Beijerinckia* in the Rhizosphere of Sugacane. **Plant and Soid. 15**:211-216.

Dobereiner, J.1982. Emerging Technology base on Biological Nitrogen Fixation by Association N_2 - Fixation Organism, pp. 469-483. In P.M. Graham and S.C. Harris (eds.). **Biological Nitrogen FixationTechnology for Tropical Agricultural**, CIAT, Cali, Columbia.

Dobereiner, J.1983. Ten years *Azospirillum*, pp. 9-23. *In* N. Klingmuller (ed.). ***Azospirillum*** II. **Genetic, Physiology, Ecology**. The 2 nd. Workshop held at the University of Bayreuth, Germany, 6-7 September 1983. Stuttgart

Dobereiner, J.1983. Isolation and Identification of Root Associated Diazotrophs. **Plant and Soil. 110**:207-212.

Dobereiner, J. and V. L. D. Baldani. 1979. Selective Infection of Maize Root by Streptomycin Resistant *Azospirillum lipoferum* and other Bacteria. **Can. J. Microbiol. 25**:1,264-1,269

Dobereiner, J. and J. M. Day. and P. J. Dart. 1972a. Nitrogenase Activity in the Rhizosphere of Sugarcane and other Tropical grass. **Plant and Soil. 37**:191-196.

Dobereiner, J. and J. M. Day. and P. J. Dart. 1972b. Nitrogenase Activity and Oxygen Sensitivity of the *Paspalum notatum-Azotobacter paspali* Association. **J. Gen. Microbiol. 71**:103-116.

Dobereiner, J. and J. M. Day. and P. J. Dart. 1975. Nitrogen Fixation in the Rhizoshere of torpical grasses, pp.39-56. In W.D.P. Stewart(ed). **Nitrogen Fixation by Free-living Micro-organisms. International Biological Programme Series**. Vol. 6. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Dobereiner, J. and J. M. Day. 1976. Associative Symbiotes in Tropical Grasses: Characterization of Micro-Organisms and Dinitrogen Fixing Sites, pp. 518-538. In W.E. Newton and C.J. Nyman (eds.). **Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixition**. Washington State University Press. Pullman.

Dobereiner, J., I. E. Marriel and M. Nery. 1976. Ecological Distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinckia. **Can. J. Microbiol. 22**:1,464-1,473.

Dobereiner, J. and H. De-Polli. 1980. Diazotrophic Rhizocoenoses, pp. 301-334. In D. P. Stewart and J. R. Gallo(eds.). **Nitrogen Fixation**. Academic Press, London.

Gilliland, H. B., 1971. **Flora of Malaya, Vol. 3**. Grasses of Malaya Lim Bian Han, Govemment Printer, Singapore, 319 p.

Gonzalez. L, J., V. Salmeron, J. Morreno and A. Romos-cormenzama. 1983. Amino acid and Vitamin Prouced by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in Chemically-Defined Media and Dialysed Soil Media. **Soil media. Soil Biol. Biochem. 15**:711-713.

John, G. H., Noel, R. K., Peter, H. A. S., James T. S., and Stanley, T.O. 1994. **Bergey's Manual Determinative Bacteriology. 9 th Edition**. The Willans and Wilkins Company,Baltimore, 787 p.

Kazuo, K. 1996. **Isolation of Free - Living Nitrogen Fixation Bacteria form the Rhizosphere of Rice**. Report of Monbusho International Scientific Research Progame.

Kennedy. C. 1992. Ammonium Exertion by nif L Mutants of *Azotobacter vinelandii*. pp. 93-96. In Khush, G. S., and J. Benelt. **Nodulation and Nitrogen Fixation in Rice**. International Rice Research Institute.

Kennedy, I.R., and Y. T. Tchan. 1992. Biological Nitrogen Fixation in Non-Leguminous Field Crops : Recent Advances. **Plant and Soil. 141**:93-118.

Ladha, J. K., A. Tirol. Padre., G. C. Punzalon., and I. Watanabe. 1987. Nitrogen Fixing (C_2H_4 - Reducing) Activity and Plant Growth Characters of 16 Westland Rice Varieties. **Soil Science and Plant Nutrition. 33**:187-200.

Lin, ., Y. Okon and R. W. F. Hardy. 1983. Enhanced Mineral Uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolar* Root Inoculated with *Azospirillum Brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol. 45**:1,775-1,779.

Malik, K. A. and Y. Zafar. 1985. Quantification of Root Associated Nitrogen Fixation in Kallar Grass as Estimated by $^{15}N_2$ Istope Dilution, pp. 161-171. In K. A. Malik, S. H. Mujtaba Naqvi and M. I. H. Aleen (eds). **Nitrogen and Enviroment**. NIAB. Faisalabad, Pakestan.

Manjunath, A., R. Mohan and D. J. Bagyaraj. 1981. Interaction between *Beijerinckia mobilis*, *Aspergillus niger*, *Glomus fasciculatus* and their Effects on Growth of Onion. **New Phytol. 87**:723-727.

Munns, D.N.1968. Nodulation of *Midicajo sativa* in Solution Culture. I. Acid Sensitive Step. **Plant and Soil. 28**:129-146.

Nur, I., Y. Okon and Y. Henis. 1980. An Increase in Nitrogen Content of *Staria italica* and *Zea mays* Inoculated with *Azospirillum*. **Can. J. Microbiol. 26**:482-485.

O'Hara, G. W., M. R. Davey and J. A. Lucas. 1981. Effect of Inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* Strains Under Temperate Condition. **Can. J. Microbiol. 27**:871-877.

Okon, Y. 1984. Development and Function of *Azospirillum* Inoculation., p. 17. In **Abstracts Books of the Third International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes**, Held in Helsinki, 2-8 September 1984, Helsinki, Finland.

Okon, Y.,S. L. Albreaht and R. H. Burris. 1977. Method for Growing *Spirillum lipoferum* and for Couting it in Pure Culture and Associated with Plant. **Appl. Environ. Microbiol. 33**:85-88.

Okon, Y., R. Itzigsohn., S. Burdman., and M. Hampel. 1995. Anvances in Agronomy and Ecology of Azospirillum / Plant Association. pp. 635-640. In **Proceeding of the 10th International Congrees on Nitrogen Fixation:Nitrogen Fixation Fundamentals and Application.** St. Peterburg. Russia, May 28-June 3, 1995.

Pal, U. R. and H. S. Malik. 1981. Contribution of *Azospirillum brasilense* to the Nitrogen Need of Grain Sorghum (*Sorghum bicolar* L. moench) in Humid Sub-Tropics. **Plant and Soil. 63**:501-504.

Patel, J. L. and M. E. Brown. 1969. Interaction of *Azotobacter* with Rhizosphere and Root-Surface Microflora. **Plant and Soil. 31**:273-281.

Partriquin, D. G., J. Dobereiner and D.K. Jain 1983. Site and Process off Association between Diazotrophs and Grasses. **Can. J. Microbiol. 29**:900-912.

Rennie, R. J. 1980. Single Medium for the Isolation of Acetylene Reduction (Dinitrogen-Fixing) Bacteria from soil. **Can. J. Microbiol. 26**:1,275-1,283.

Reynder, L. and K. Vlassak. 1979. Conversion of Tryptophan to Indole Acetic Acid by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biol. Biochem. 11**:547-548.

Reynder, L. and K. Vlassak. 1982. Use of *Azospirillum brasilense* as Biofertilizer in Intensive Wheat Cropping. **Plant and Soil. 66**:217-233.

Rinaudo, G., D. Gauthier and Y. Dommergues.1981. Enhancement of Association N_2- Fixation through Manipulation of the Rhizospher Mecroflora, pp. 104-109 In P. B.Vose and A. P. Ruchel (eds). **Associative N_2-fixation**. CRC Press, Boca Raton.

Ruschel, A.P. and R. Ruschel. 1978. Verietal Difference Affecting Nitrogengenase Activity in the Rhizosphere of Sugarcane. In **Proceedings of Internationol Sociaty of Sugarcane Technologists XVI Congress. 2**:1,941-1,947.

Schank, S. C., K. L. Weier and I. C. Mac Rae. 1981. Plant Yield and Nitrogen Content of a Digitgrass in Response to *Azospirillum* Inoculation. **Appl. Environ. Microbiol. 41**:342-345.

Singh, S., T. K. Ganguly, S. Nerlakantan, K. Singh, A. Singh and P. S. Tomer. 1980. Note on the Response of Sorghum and Cowpea to *Azospitillum brasilense* and Nitrogen. **Indian J. Agric. Sci. 50**:721-724.

Smith, R. L. J. H. Bouton, S. C. Schank, K. H. Quesenberry, M. E. Tyler, J. R. Milan, M. H. Gaskins and R. C. Little. 1976. Nitrogen Fixation in Grasses Inoculated with *Spirillum lipoferum.* **Crop Science 193**:1,003-1,005.

Tien, T. M., M. H. Gaskins and D. H. Hubbel. 1979. Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and their Effect on the Growth of Pearl millet (*Pennisetum americanum*). **Appl. Environ. Microbiol. 37**:1,016-1,024.

Tilak, K. V. B. R., C. S. Singh, N. K. Ray and N. S. Subba Rao. 1982. *Azospirillum brasilense* and *Azobacter chroococcum* Inculum: Effect on Yield of Maize (*Zea mays*) and Sorghum (*Sorghum bicolor*). **Soil Biol. Biochem. 14**:417-418.

Vose, P. B. 1983. Development in Non-Legume N_2 – Fixing System. **Can J. Microbiol. 29**:837-850.

Vose, P. B., A.P. Ruschel, R. L. Victoria, S. M. Tsai Saito and E. Matsui. 1982. **15-Nitrogen as a Tool in Biological Nitrogen Fixation Research**, pp. 575-592. In P.H. Graham and S.C. Harris (eds.).

Watanabe, I. And K. K. Lee. 1977. Non-Symbiotic Nitrogen Fixation Rice and Rice Fields, pp. 289-305. In Ayanaba and P. J. Dart (eds.) **Biological Nitrogen Fixation in Farming System of the Tropice**. John Willy & Sons, Inc., New York.

Wong, P. P. and N. E. Stenberg. 1979. Characterization of Azospirillum Isolated from Nitrogen Fixation Roots of Harvested Sorghum Plant. **Appl. Environ. Microbilo. 38**:1,189-1,191.

Wrigth, S. I.1980. **Dinitrogen Fixation (acetylene reduction) Associated with Forage Grasses in Texas: Enumeration, Characterization and Inoculation Studies of Bacterial Isolates.** Ph. D. Thesis, Texas A&M University.

Yoshida, I. and R. R. Ancajas. 1971. Nitrogen Fixation by Bacteria in the Root Zone of Rice. **Soi. Sci. Soc. Amer. Proc. 35**:156-157.

Zhong, Z - P., C - Z. Hu., J - W. Wong., J - F. Hoand., A - L. Lou., and J - G. Li. 1995. Purification and Properties of Nitrogrnase MoFe Protein Frow a nif Z Dilution Strain of *Azotobacter vinelandii*. p. 164. In **Proceeding of the 10th International Congrees on Nitrogen Fixation:Nitrogen Fixation Fundamentals and Application**. St. Peterburg. Russia, May 28-June 3, 1995.

Zora, S., M. R. Sarec, M. Govedarica, B. Krstic, B. Barasevic and Z. Stankovec. 1984. Efficiency of *Azotobacter* Nitrogen Fixation as Realted to Maize form and Mineral nitrogen nutrition, p. 49. In **Abstract book of the Third International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes**. 2-8 September 1984, Held in Helsinki, Finland.

ภาคผนวก

สูตรอาหาร ก. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปราศจากไนโตรเจนแบบ (nitrogen free agar, NFA) ตามสูตรของ Dobereiner และคณะ (1972 a,b)

K_2HPO_4	0.1	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$CaCl_2$	0.02	กรัม
$FeCl_3$	0.01	กรัม
$NaMoO_4$	0.002	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร
pH	6.8	

ปรับ pH ด้วย NaOH 1 N.

Autoclave ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

หมายเหตุ ในกรณีที่ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (nitrogen free broth, NFB) ก็ใช้สูตรเดียวกับสูตรอาหาร ก. แต่ไม่ใส่วุ้น บางครั้งต้องการเก็บเชื้อแบคทีเรียเพื่อทำ stock culture จะใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก. แต่ผสม yeast extract ลงไป 0.05 เปอร์เซนต์

สูตรอาหาร ข. ได้ดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก. โดยเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน ที่แตกต่างกันเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียใน Family *Azotobacteraceae*

1. ใช้ Starch	แทน	Glucose	10	กรัมต่อลิตร
2. ใช้ Manitol	แทน	Glucose	10	กรัมต่อลิตร
3. ใช้ Ramnose	แทน	Glucose	10	กรัมต่อลิตร
4. ใช้ Benzoate	แทน	Glucose	5	กรัมต่อลิตร
5. ใช้ Arabinose	แทน	Glucose	5	กรัมต่อลิตร
6. ใช้ Malic acid	แทน	Glucose	5	กรัมต่อลิตร
7. ใช้ Peptone	แทน	Glucose	5	กรัมต่อลิตร

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข.1,2 และ 3 ใช้จำแนกเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azomonas* sp. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข. 4,5,6 และ 7 ใช้จำแนกเชื้อ *Beijerinckia* sp.

สูตรอาหาร ค. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum sp.* ดัดแปลงจากสูตรของ Dobereiner คณะ (1976); Okon และคณะ (1977) มีองค์ประกอบดังนี้

Malic acid	5	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$CaCl_2 . 7H_2O$	0.02	กรัม
$FeCl_3 . 6H_2O$	0.01	กรัม
$NaMoO_4 4.2H_2O$	0.002	กรัม
KOH	4	กรัม
Distilled water	1	ลิตร
Bromothymol blue (0.5%) in ethanol	2	มิลลิลิตร

หมายเหตุ ในกรณีทำอาหารกึ่งแข็ง (semi solid) จะใส่ agar 1.75 กรัม ในกรณีทำอาหารวุ้น จะใส่ agar 15 กรัม ในกรณีทำอาหารเหลว (nitrogen free broth ; NFB) จะไม่ใส่ agar ในการทำ stock culture จะใส่ yeast extract 0.01-0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ด้วย KOH 1 N.1 จนได้ pH 6.5