โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตและประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงสำหรับส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง

Production and application of immobilized mixed bacterial inoculum for promoting growth of sugarcane under drought condition

ชื่อนิสิต นางสาว ปฐมาวดี ตรีสอน **เลขประจำตัว** 5832332823

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงงาน	การผลิตและประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงสำหรับส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง
โดย	นางสาวปฐมาวดี ตรีสอน รหัสนิสิต 5832332823
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง
การผลิตและประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึง
สำหรับส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

นิสิตในโครงการ
นางสาวปฐมาวดี ตรีสอน 5832332823

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

ชื่อโครงการ การผลิตและประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงสำหรับส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวปฐมาวดี ตรีสอน รหัสประจำตัวนิสิต 5832332823

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ชื่อ รศ.ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย โทร 662 218 5081

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

พื้นที่เพาะปลูกอ้อยส่วนใหญ่ในประเทศไทยจะอยู่นอกเขตชลประทาน ทำให้เมื่อเกิดปัญหาภัยแล้งจะเกิดความเสียหายต่อไร่อ้อยและส่งผลกระทบต่อเกษตรกรที่ปลูกอ้อย งานวิจัยนี้จึงสนใจใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratophericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 และแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ *Weissella cibaria* PN3 มาช่วยให้อ้อยสามารถทนอยู่ในสภาวะแล้งได้ดีขึ้น โดยเตรียมแบคทีเรียในรูปหัวเชื้อผสมแบบตรึงกับวัสดุ เพื่อช่วยให้แบคทีเรียสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานขึ้น โดยวัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และกากเนื้อในปาล์ม จากการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพและลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าถ่านชีวภาพมีค่าความชื้นสัมพัทธ์สูง และมีรูพรุนจำนวนมาก จึงง่ายต่อการที่แบคทีเรียจะเข้าไปอาศัยและเจริญอยู่ภายใน ส่วนลักษณะพื้นผิวของเถ้าลอยจะมีรูพรุนที่แบคทีเรียสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ได้ และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มมีธาตุไนโตรเจนสูง ซึ่งไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่สำคัญต่อการเจริญของอ้อย จากการทดลองตรึงเซลล์แบคทีเรียในวัสดุตรึง พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึงแต่ละชนิดค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียในวัสดุตรึงที่บ่มครบ 2 สัปดาห์ มีปริมาณแบคทีเรีย 10^9-10^{11} CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วัสดุตรึงทั้ง 3 ชนิดผสมกัน เพื่อนำข้อดีของวัสดุแต่ละชนิดมารวมกัน เมื่อเติมวัสดุตรึงที่มีเชื้อแบคทีเรียแบบผสมลงในดินที่ปลูกอ้อย พบว่าช่วงที่ให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ อ้อยมีการเจริญเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง และเมื่อจำลองสภาวะแล้งโดยงดให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าอ้อยที่ใส่แบคทีเรียตรึงทนสภาวะแล้งได้ดี โดยชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิด มีความยาวรากมากที่สุด และชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์ความยาวต้นและใบที่เพิ่มขึ้นมากที่สุด ดังนั้นควรจะเพิ่มระยะเวลาของช่วงการจำลองสภาวะแล้งให้นานขึ้น เพื่อให้เห็นผลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนมากกว่านี้ จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้งได้ดียิ่งขึ้น

Project title Production and application of immobilized mixed bacterial inoculum for promoting growth of sugarcane under drought condition

Name of student Miss Patamavadee Treeson Student ID. 5832332823

Project Advisor Assoc. Prof. Ekawan Luepromchai, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic year 2018

Abstract

Most of sugarcane plantations in Thailand are located outside the irrigation area. Therefore, drought stress can affect sugarcane production and their farmers. In this study, we are interested in using plant growth promoting rhizobacteria (*Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratophericus* L19 and *Bacillus altitudinis* T17) and biosurfactant producing bacteria (*Weissella cibaria* PN3) to enhance drought tolerance of sugarcane. The mixed bacteria inoculum was immobilized in solid materials to prolong its survival in the environment. When compared the physical properties and surface characteristics of carriers under the scanning electron microscope, the results showed that biochar had high relative humidity and high porosity, which could allow the bacteria to grow inside the material. Fly ash also had high porosity, while palm kernel cake had high nitrogen content. Nitrogen is an important nutrient for sugarcane growth. The survival of immobilized bacteria in each carrier was similar. After 2-week incubation, the number of immobilized bacteria were 10^9-10^{11} CFU/g carrier. Consequently, we mixed 3 types of carriers to combine the advantages of each type. The immobilized carriers were added to the sugarcane planted soil. Sugarcane stems and leaves were increased in every treatment after 2-week under non-stress condition. When drought stress condition was applied for another 2 weeks, all the plants with bacterial inoculum were able to tolerate drought stress. The treatment with 3-mixed bacteria had the longest roots, while the treatment with 4-mixed bacteria had the longest stems and leaves. To confirm the efficiency of 3- and 4-mixed bacteria, further study should have longer drought stress condition. However, these results showed that the immobilized mixed bacterial inoculum could enhance growth of sugarcane under drought condition.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร . เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขโครงการฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตา และความเอาใจใส่ของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำและความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ร่วมห้องปฏิบัติการทุกคน ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และคำแนะนำ รวมถึงคอยให้กำลังใจเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณบริษัทเคทิส วิจัยและพัฒนา จำกัด ที่สนับสนุนท่อนพันธุ์อ้อยและดินสำหรับปลูกอ้อยในงานวิจัย

ขอขอบคุณอ.ดร. บุญลือ คะเชนทร์ชาติ ที่ช่วยให้ผู้วิจัยนำท่อนพันธุ์อ้อยและดินมาให้ ทำให้ผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยได้อย่างราบรื่นตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณบริษัททิพย์กำแพงเพชร ไบโอเอนเนอยี่ จำกัด ที่สนับสนุนเถ้าลอยสำหรับการทำวิจัย

ขอขอบคุณบริษัทโกลเด้นไทม์เอ็นเตอไพร์ส จำกัด ที่สนับสนุนกากเนื้อในเมล็ดปาล์มสำหรับการทำวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคน ที่ให้โอกาส ให้การสนับสนุน คอยรับฟังปัญหา และช่วยเหลือผู้วิจัยในทุกๆด้าน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญแก่ผู้วิจัยเรื่อยมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง
นางสาวปฐมาวดี ตรีสอน
พฤษภาคม 2561

สารบัญ

บทคัดย่อ ง

Abstract จ

กิตติกรรมประกาศ ฉ

สารบัญ ช

สารบัญภาพ ฌ

สารบัญตาราง ฎ

บทที่ 1 1

1.1 อ้อย 1

1.2 แบคทีเรียในดินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria) 1

1.3 แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิว 4

1.4 วัสดุตรึงแบคทีเรีย 4

1.5 วัตถุประสงค์ 6

1.6 วิธีการดำเนินงาน 6

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

บทที่ 2 7

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินงาน 7

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 7

2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 8

2.3 วิธีดำเนินงาน 8

2.3.1 แบคทีเรีย วัสดุตรึง อ้อย และดินที่ใช้ในการทดลอง 8

2.3.2 วัดอัตราการเจริญของเชื้อ 9

2.3.3 ทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึง 9

2.3.3.1 วัดค่าความเป็นกรดเบส 9

2.3.3.2 วัดค่าความชื้นสัมพัทธ์ 9

2.3.3.3 วัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ 10

2.3.3.4 วัดปริมาณแร่ธาตุภายในวัสดุตรึง 10

2.3.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงชนิดต่างๆ ในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสมเพื่อหาวัสดุตรึงที่มีความสามารถในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด 10

2.3.4.1 การตรึงเชื้อผสม 3 และ 4 ชนิด ในวัสดุตรึงแบบเดี่ยว 10

2.3.4.2 การตรึงเชื้อผสม 3 ชนิดและเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงแบบผสม 10

2.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง 11

บทที่ 3 13

ผลการทดลอง 13

3.1 ผลการวัดอัตราการเจริญของเชื้อ 13

3.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึง 14

3.2.1 ค่าความเป็นกรดเบส, ค่าความชื้นสัมพัทธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง 14

3.2.2 ปริมาณแร่ธาตุของวัสดุตรึง 14

3.3 อัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึง 16

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง 17

บทที่ 4 25

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 25

เอกสารอ้างอิง 27

ภาคผนวก 30

ภาคผนวก ก 30

ภาคผนวก ข 32

สารบัญภาพ

รูปที่ 1.1 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในดินที่ส่งเสริมการเจริญของพืชกับพืช 3

รูปที่ 2.1 วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ถ่านชีวภาพ (ก), เถ้าลอย (ข) และ กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (ค) 8

รูปที่ 2.2 ดินที่ใช้ปลูกอ้อย 9

รูปที่ 2.3 พื้นที่ตั้งกระถางอ้อย ซึ่งเปิดไฟ LED เพิ่มแสงให้อ้อย 11

รูปที่ 3.1 กราฟการเจริญของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratophericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 ในอาหาร TSB จากการนับจำนวนโคโลนี 13

รูปที่ 3.2 กราฟการเจริญของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratophericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 ในอาหาร TSB จากการวัดค่า OD_{600} 13

รูปที่ 3.3 ภาพพื้นผิว, รูพรุนของวัสดุตรึง และการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวของวัสดุตรึง 15

รูปที่ 3.4 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 3 ชนิดในวัสดุตรึงแบบเดี่ยวและแบบผสม 16

รูปที่ 3.5 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงแบบเดี่ยวและแบบผสม 17

รูปที่ 3.6 อ้อยก่อนงดให้น้ำเพื่อจำลองสภาวะแล้ง 18

รูปที่ 3.7 อ้อยหลังจากการจำลองสภาวะแล้ง 19

รูปที่ 3.8 การเจริญของอ้อย โดยวัดจากความยาวของลำต้น จากชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด 20

รูปที่ 3.9 การเจริญของอ้อย โดยวัดจากจำนวนใบ 21

รูปที่ 3.10 การเจริญของอ้อย โดยวัดจากความยาวของใบ 21

รูปที่ 3.11 รากของอ้อยหลังการปลูกในสภาวะแล้ง 22

รูปที่ 3.12 ความยาวของรากอ้อย ในชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด 23

รูปที่ 3.13 จำนวนแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวราก โดยใช้วิธี MPN ในอาหาร TSB เพื่อดูปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 24

รูปที่ 3.14 จำนวนแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวราก โดยใช้วิธี MPN ในอาหาร TSB ที่ใส่ PEG 20% เพื่อดูปริมาณแบคทีเรียทนแล้ง 24

รูปที่ ข-1 วัสดุตรึงปริมาณ 3 กรัม ในขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร (vial) 32

รูปที่ ข-2 ภาพพื้นผิวของวัสดุตรึง และการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวของวัสดุตรึง 32

รูปที่ ข-3 วัสดุตรึงที่มีแบคทีเรียเชื้อผสมในถุงพลาสติก ก่อนนำไปผสมดินเพื่อใช้ปลูกอ้อย 32

รูปที่ ข-4 ลักษณะของรากอ้อยก่อนถูกย้ายลงกระถามใหม่เพื่อทำการทดลอง 33

รูปที่ ข-5 อ้อยหลังจากการจำลองสภาวะแล้ง โดยงดให้น้ำ 2 สัปดาห์ 33

รูปที่ ข-6 รากอ้อยหลังจากการปลูกโดยจำลองสภาวะแล้ง 34

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียมาส่งเสริมการเจริญของพืช 3

ตารางที่ 2 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชมาตรึงในวัสดุตึงและดูผลการส่งเสริมการเจริญของพืช 5

ตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรดเบส, ค่าความชื้นสัมพัทธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง 14

ตารางที่ 4 ปริมาณแร่ธาตุของวัสดุตรึงแต่ละชนิด 14

ตารางที่ ข-1 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 3 ชนิดในวัสดุตรึงแบบเดี่ยวและแบบผสม 34

ตารางที่ ข-2 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงแบบเดี่ยวและแบบผสม 34

ตารางที่ ข-3 การเจริญของอ้อยก่อนเริ่มทำการทดลอง 35

ตารางที่ ข-4 การเจริญของอ้อยหลังให้น้ำติดต่อกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ 36

ตารางที่ ข-5 การเจริญของอ้อยหลังงดให้น้ำเพื่อจำลองสภาะวแล้งติดต่อกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยวัดจากความยาวของลำต้น, จำนวนใบ และความยาวใบ ในชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด 37

ตารางที่ ข-6 ความยาวของรากอ้อย ในชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด 38

บทที่ 1
บทนำ

1.1 อ้อย

อ้อย (Sugarcane, *Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยเป็นสินค้าส่งออกอันดับสาม รองจากยางพาราและข้าว อ้อยเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลและพลังงานทดแทน ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 11 ล้านไร่ โดยแบ่งเป็นพื้นที่ในภาคเหนือ 2.7 ล้านไร่ ภาคกลาง 3 ล้านไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 ล้านไร่ และภาคตะวันออก 6 แสนไร่ และในปัจจุบันอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายของประเทศไทยมีแนวโน้มที่จะขยายตัวไปได้อีก เนื่องจากรัฐบาลมีนโยบายบริหารพื้นที่เกษตรกรรม โดยเปลี่ยนพื้นที่ปลูกข้าวที่อยู่ในพื้นที่ไม่เหมาะสมให้เป็นพื้นที่ปลูกอ้อยโรงงาน มันสำปะหลัง ปาล์มน้ำมัน และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ส่งผลให้พื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น โดยในการปลูกอ้อย น้ำถือเป็นปัจจัยการหลักที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตอ้อย หากอ้อยได้รับน้ำอย่างเพียงพอ การเจริญเติบโตของอ้อยจะเพิ่มปริมาณสูงขึ้น โดยทั่วไปแล้วการปลูกอ้อยส่วนใหญ่จะใช้น้ำฝนเป็นหลัก และให้น้ำเพิ่มในช่วงฝนทิ้งช่วง หรือการปลูกอ้อยในช่วงที่ไม่มีฝน (ปลูกอ้อยข้ามแล้ง) (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม, 2561) ซึ่งในแต่ละช่วงการเจริญเติบโตของอ้อย ดินจะต้องมีความชื้นอยู่ในช่วง 50-100% ซึ่งถ้ามีความชื้นต่ำกว่า 50% อ้อยจะขาดน้ำ ส่งผลให้อ้อยเจริญเติบโตไม่ดี และมีผลผลิตที่ลดลง (นุชจรินทร์ และอรรถสิทธิ์ 2555) ในปัจจุบันพบว่าพื้นที่เพาะปลูกอ้อยส่วนใหญ่จะอยู่นอกเขตชลประทาน ทำให้เมื่อเกิดปัญหาภัยแล้งจะเกิดความเสียหายต่อไร่อ้อยและส่งผลกระทบต่อเกษตรกรที่ปลูกอ้อย

1.2 แบคทีเรียในดินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria)

สิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมในบริเวณแหล่งเพาะปลูกพืชนั้นมีความสัมพันธ์กับการเจริญของพืช โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินที่จะส่งผลต่อการเจริญของโครงสร้างของพืช ได้แก่ ดอก, ผล, ลำต้น, ใบ และราก โดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เช่น ความชื้นในดิน, ปริมาณแร่ธาตุ และค่าความเป็นกรดด่าง จะเป็นตัวกำหนดความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน (Backer และคณะ, 2018) และจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษาแบคทีเรียในดิน พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะแล้ง และสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้

โดยแบคทีเรียจะมีกลไกที่ช่วยให้พืชสามารถปรับตัวเพื่อให้มีชีวิตรอดอยู่ในสภาวะแล้ง ได้แก่

1. การผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ และหลั่งออกนอกเซลล์ เพื่อให้เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ไปจับกับแคตไอออน เช่น โซเดียม ซึ่งจะช่วยลดปริมาณโซเดียมที่พืชจะนำเข้าเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยลดความเครียดที่เกิดจากสภาวะดินเค็ม ทำให้พืชทนทานต่อความเครียดจากแรงดันออสโมติกและความเค็มได้มากขึ้น (Upadhyay and Singh, 2015)

2. การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase หรือ 1-aminocyclopropane-1-carboxylase โดยแบคทีเรียจะหลั่งออกมาเพื่อไปย่อยสลาย ACC ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอธีลีน ซึ่งโดยปกติแล้วพืช

จะผลิตฮอร์โมนเอธีลีนออกมาเพื่อตอบสนองต่อความเครียด เช่น อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีโลหะหนัก, อุณหภูมิสูงมากๆ, มีการปนเปื้อนของสารเคมี, สภาพแวดล้อมมีน้ำมากหรือน้อยเกินไป และการได้รับอันตรายจากแมลง พยาธิตัวกลม ราและแบคทีเรียก่อโรคในพืช โดยฮอร์โมนเอธีลีนจะส่งผลต่อการเจริญของพืช เร่งการแก่ชรา มีอาการใบเหลือง และมีการหลุดร่วงของใบ เป็นต้น (Backer และคณะ, 2018, Olanrewaju และคณะ, 2017)

3. การผลิตออสโมไลท์ เช่น กรดอะมิโนโพรลีน, ไกลซีนบีเทน และทรีฮโลส โดยสารออสโมไลท์จะช่วยปรับค่าแรงดันออสโมติก และปริมาณไอออน ช่วยให้พืชสามารถทนต่อสภาวะแล้งได้ดีขึ้น (Kaushal and Wani, 2015)

แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชสามารถผลิตฮอร์โมนพืชที่สำคัญ ได้แก่

1. จิบเบอเรลลิน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช เช่น การยืดยาวของลำต้น, การงอกของเมล็ด, การมีดอก, การมีผล, ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงดีขึ้น และ ทำให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์มากขึ้น (Olanrewaju และคณะ, 2017)

2. ไซโทไคนิน เป็นฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ในเนื้อเยื่อเจริญของพืช, การเจริญของเซลล์, การข่มของตายอด, การเจริญของราก, การงอกของเมล็ด, การสร้างไซเลมและคลอโรพลาสต์, การเจริญของดอกและผล, ความชราของใบ และมีปฏิสัมพันธ์กับศัตรูพืช (Olanrewaju และคณะ, 2017)

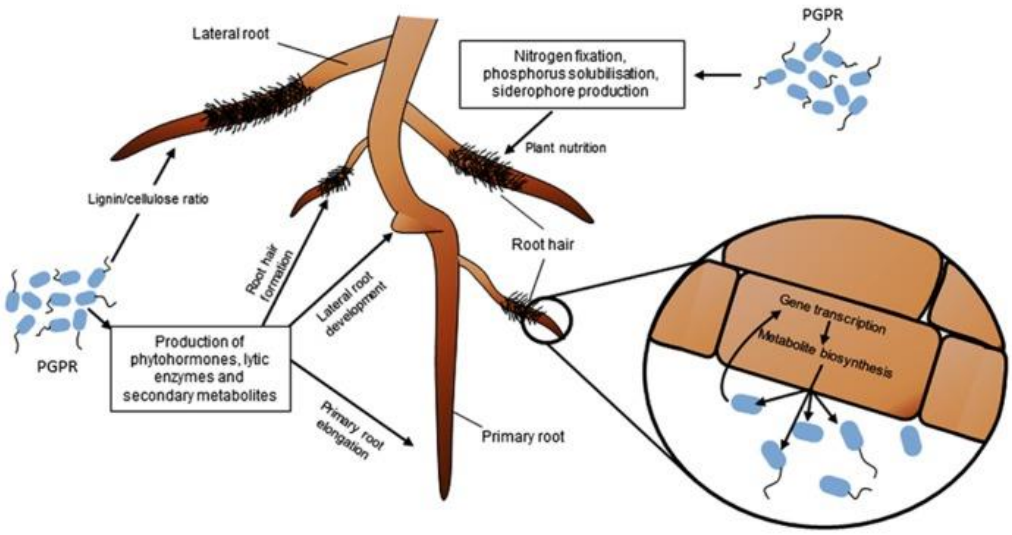
3. กรดแอบไซซิก เป็นฮอร์โมนพืชที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปิดปิดของปากใบ, เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช และการปรับตัวของพืชในสภาวะเครียด เช่น ในสภาวะแล้ง (Cohen และคณะ, 2009)

4. กรดอินโดลอะซีติก เป็นฮอร์โมนกลุ่มออกซิน ซึ่งจะช่วยในการยืดยาวและการขยายขนาดของราก ทำให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้น สามารถดูดซึมน้ำและแร่ธาตุได้มากขึ้นตามไปด้วย (Olanrewaju และคณะ, 2017, Vessey, 2003)

นอกจากนี้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติอื่นๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น

1. ช่วยละลายฟอสฟอรัสในดิน ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ โดยฟอสฟอรัสเป็นแร่ธาตุที่สำคัญต่อการเจริญของพืช ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะพบแร่ธาตุฟอสฟอรัสในดินปริมาณมาก แต่ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้นั้นมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด เนื่องจากฟอสฟอรัสส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นแบคทีเรียจะสร้างและหลั่งกรดอินทรีย์และเอนไซม์ฟอสฟาเทสเพื่อเปลี่ยนฟอสฟอรัสให้อยู่ในโครงสร้างที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (Vacheron และคณะ, 2013, Vessey, 2003)

2. ช่วยตรึงไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศแล้วเปลี่ยนให้อยู่ในโครงสร้างที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น แอมโมเนียม ไนไตรต์ ไนเตรท (Olanrewaju และคณะ, 2017)



รูปที่ 1.1 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในดินที่ส่งเสริมการเจริญของพืชกับพืช (Vacheron และคณะ, 2013)

โดยในปัจจุบันมีผู้วิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชหลากหลายชนิด และทดสอบในพืชที่แตกต่างกันออกไป ดังที่ได้ยกตัวอย่างไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียมาส่งเสริมการเจริญของพืช

แบคทีเรีย	พืชที่ใช้ทดสอบ	อ้างอิง
Burkholderia sp. *Bacillus megaterium*	มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*)	Tripti และคณะ, 2017
Gluconacetobacter diazotrophicus *Herbaspirillum seropedicae* *Herbaspirillum rubrisubalbicans* *Azospirillum amazonense* *Burkholderia tropica*	อ้อย	da Silva และคณะ, 2012
Pseudomonas fluorescens	ถั่วดำ (*Vigna mungo*) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*)	Saharan และคณะ, 2010
Bradyrhizobium japonicum	ถั่วเหลือง	Khavazi และคณะ, 2007
Pseudomonas fluorescens *Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas stutzeri*	มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*)	Tank and Saraf, 2010
Klebsiella oxytoca	ฝ้าย (*Gossypium hirsutum*)	Yue และคณะ, 2007
Pseudomonas brassicacearum *Pseudomonas marginalis* *Rhodococcus* sp.	ถั่ว (*Pisum sativum*)	Safronova และคณะ, 2005

1.3 แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นแอมฟิฟาติก คือมีทั้งส่วนที่มีขั้วหรือชอบน้ำ และส่วนที่ไม่มีขั้วหรือไม่ชอบน้ำอยู่ในโครงสร้างเดียวกัน โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกใช้อย่างกว้างขวางในการบำบัดสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ และสามารถย่อยสลายได้เองทางธรรมชาติ จึงไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กลุ่มไกลโคลิพิด จัดอยู่ในกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโมเลกุลต่ำ หน้าที่หลักคือการลดแรงตรึงผิวและลดแรงระหว่างผิว มีคุณสมบัติการตอบสนองต่อพื้นผิวที่หลากหลาย เช่น การละลาย, การกระจาย, การก่ออิมัลชัน, การส่งผ่านสาร เป็นต้น (เพ็ญนภา บุญจริง, 2015)

การใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิต่างๆ โดยคาดหวังว่าสารละแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยจับโมเลกุลของน้ำ ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของดินเพิ่มมากขึ้น และสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิจะมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้

1.4 วัสดุตรึงแบคทีเรีย

การนำจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชมาใช้ประโยชน์ อาจมีปัญหาเรื่องการเก็บรักษา และอัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์เมื่ออยู่ในดิน โดยจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการใส่เชื้อลงในวัสดุตรึง ก่อนนำไปผสมกับดินจะช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อมากกว่าการใส่เชื้อลงในดินโดยตรง (Hale และคณะ, 2015)

โดยวัสดุต่างชนิดกันส่งผลต่อความสามารถในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน เช่น จากงานวิจัยของเปรียบเทียบระหว่างถ่านชีวภาพและเถ้าลอย พบว่าถ่านชีวภาพสามารถส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเถ้าลอย (Tripti และคณะ, 2017) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เปรียบเทียบถ่านชีวภาพที่ถูกผลิตจากไม้ต่างชนิดกัน เช่น ถ่านชีวภาพจากใบปาล์ม, ไม้สน และกะลามะพร้าว พบว่ามีความสามารถในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน (Hale และคณะ, 2015) โดยวัสดุตรึงมีทั้งที่เป็นอินทรีย์วัตถุ เช่น ชานอ้อย, ถ่านหินและพีต และอนินทรีย์วัตถุ เช่น แร่เวอร์มิคูไลท์, อะลูมิเนียมซิลิเคต และแป้งทัลคัม (Saharan และคณะ, 2010)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชมาตรึงในวัสดุตึงและดูผลการส่งเสริมการเจริญของพืช

วัสดุตรึง	แบคทีเรียที่ถูกตรึง	ผลของการใช้แบคทีเรียและวัสดุตรึงในงานวิจัย	อ้างอิง
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสผสมกับแป้ง	*Gluconacetobacter diazotrophicus* *Herbaspirillum seropedicae* *Herbaspirillum rubrisubalbicans* *Azospirillum amazonense* *Burkholderia tropica*	ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อและพืชได้ดีกว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้วัสดุตรึง	da Silva และคณะ, 2012
ถ่านชีวภาพเถ้าลอย	*Burkholderia* sp. *Bacillus megaterium*	แบคทีเรียและวัสดุตรึงช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตของพืชให้ดีขึ้น ดินมีความอุดมสมบูรณ์มากขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่แบคทีเรียและวัสดุตรึง	Tripti และคณะ, 2017
ถ่านชีวภาพ	*Enterobacter cloacae*	แบคทีเรียและวัสดุตรึงช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ่มน้ำของดิน ช่วยเพิ่มมวลและการเจริญของรากพืช เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่แบคทีเรียและวัสดุตรึง	Hale และคณะ, 2014
ทราย ขี้เลื่อย แร่เวอร์มิคูไลท์	*Pseudomonas aeruginosa* *Bacillus licheniformis*	แบคทีเรียและวัสดุตรึงช่วยเพิ่มผลผลิตขอลพืช และทำให้พืชเจริญดีขึ้น	Maheshwari และคณะ, 2015

การเลือกใช้วัสดุตรึงจะต้องคำนึงองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น ความหาง่ายของวัสดุที่นำมาใช้ คุณสมบัติเฉพาะของวัสดุ เช่น สมบัติความเป็นกรดด่าง, ความสามารถในการอุ้มน้ำ และค่าความชื้นสัมพัทธ์ โดยค่าความเป็นกรดด่างของวัสดุตรึงควรเป็นกลาง เนื่องจากเป็นช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย และเป็นช่วงที่แร่ธาตุในดิน เช่น ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส และโปแตสเซียม ละลายได้ดีทำให้พืชสามารถดึงเอาแร่ธาตุต่างๆไปใช้ได้ดียิ่งขึ้น สำหรับความสามารถในการอุ้มน้ำและค่าความชื้นสัมพัทธ์จะบอกถึงปริมาณน้ำในวัสดุตรึง ซึ่งจะส่งผลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์และปริมาณออกซิเจนในวัสดุตรึง โดย 40% ของค่าความชื้นสัมพัทธ์เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย (Borowik and Wyszkowska, 2016) โดยนอกจากจะสามารถเป็นที่อยู่อาศัยให้แบคทีเรียได้แล้ว วัสดุตรึงบางชนิดยังสามารถเป็นแหล่งอาหารให้แก่บคทีเรียได้อีกด้วย

โครงงานวิจัยนี้สนใจนำวัตถุตรึงมาทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียเทียบกับถ่านชีวภาพที่นิยมนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงแบคทีเรีย (Hale และคณะ, 2015, Tripti และคณะ, 2017, Sun และคณะ, 2016, Hale และคณะ, 2014, Khan และคณะ, 2016) แต่มีราคาสูง โดยวัสดุตรึงที่สนใจศึกษา

ได้มาจากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ 1) เถ้าลอย ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและอุตสาหกรรมการเผาไหม้ถ่านหิน โดยในปัจจุบันมีการนำเถ้าลอยไปใช้เป็นสารผสมคอนกรีตสำหรับงานก่อสร้าง และเป็นวัสดุดิบเสริมปูนซีเมนต์ในการผลิตวัสดุก่อสร้าง เช่น กระเบื้องมุงหลังคา, เสาเข็ม, พื้นสำเร็จรูป เป็นต้น และ 2) กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันจากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ซึ่งในปัจจุบันจะถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยจะนำวัสดุตรึงมาผสมกับแบคทีเรียผสมระหว่าง *Bacillus thuringiensis* B2 รหัส MSCU 0882, *Bacillus stratophericus* L19 รหัส MSCU 0873, *Bacillus altitudinis* T17 รหัส MSCU 0867 ที่แยกมาได้จากดินในบริเวณเพาะปลูกอ้อยและข้าว และ *Weissella cibaria* PN3 รหัส MSCU 0840 ที่แยกมาได้จากแหนม โดยแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียทนต่อสภาวะแล้งที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้แก่ ความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA ซึ่งมีบทบาทต่อการยืดยาวและการแบ่งเซลล์ อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นการเจริญของรากพืช ส่งผลให้พืชสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการลำเลียงสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของพืช (เอกวัล ลือพร้อมชัย, 2560) ส่วน *Weissella cibaria* PN3 เป็นแบคทีเรียผลิตกรดแล็คติกที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว (เพ็ญนภา บุญจริง, 2015) ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้นแสดงว่าเมื่อนำมารวมกับแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ สามารถส่งเสริมการเจริญของอ้อยได้

1.5 วัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงชนิดต่างๆ ในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม

2. ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

1.6 วิธีการดำเนินงาน

1. วัดอัตราการเจริญของเชื้อ

2. ทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึง

3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงชนิดต่างๆ ในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม

4. ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การนำเถ้าลอยและกากปาล์มมาใช้เป็นวัสดุตรึงแบคทีเรียเป็นการช่วยลดปริมาณขยะจากโรงงานอุตสาหกรรม คาดหวังว่าการนำแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ จะสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีของเกษตรกร

บทที่ 2
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินงาน

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge ware) ของบริษัท NALGENE, USA
2. กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX, USA
3. ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ของบริษัท Schott, Germany
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX, USA
5. ขวดใส่สารขนาดเล็ก (Vial) ของบริษัท PYREX, USA
6. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J., USA และ รุ่น GREEN SSeriker 2 ของบริษัท PanaPolytech Co., LTD., Thailand
7. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) รุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
8. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Refrigerated Centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท KUBOTA, Japan
10. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific industries, USA
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น MP125 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
13. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ของบริษัท PYREX, USA
14. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) แบบ ISSco รุ่น BV-124 ของบริษัท Internal Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
15. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
16. แท่งแก้วปาดเชื้อ (Spreader) ของบริษัท Suzhou Yunbo Glass Co., Ltd., Chinese
17. ปิเปตทิป (Tip) ขนาด 200, 1000, 5000 และ 10000 ไมโครลิตร ของบริษัท Hycon Plastics
18. บีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX, USA
19. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
20. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท HIRAYAMA, Japan
21. หลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf tube) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Axygen, INC., USA
22. ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P200, P1000, P5000 และ P10000 ของบริษัท Eppendorf, Thailand
23. แผ่นสไลด์ บริษัท Sail Brand, China
24. แผ่นปิดสไลด์ บริษัท Sail Brand, China

2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

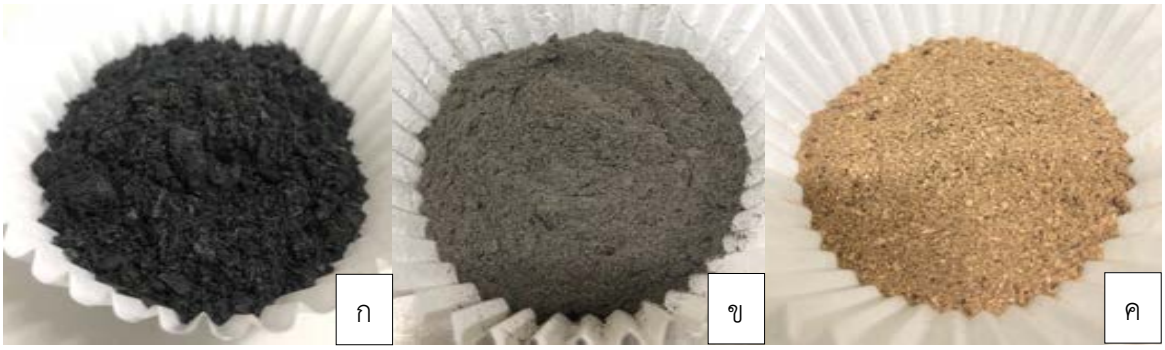
1. Tryptone Soya Broth ของบริษัท Sisco Research Laboratories, India
2. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
3. ผงวุ้น ตรานางเงือก ของบริษัท ห้างหุ้นส่วนจำกัด พัฒนาสินเอ็นเตอร์ไพรส์, Thailand
4. เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
5. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO4.2H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
6. โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
7. คริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet)

2.3 วิธีดำเนินงาน

2.3.1 แบคทีเรีย วัสดุตรึง อ้อย และดินที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ B2 รหัส MSCU 0882 ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่ปลูกอ้อย อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี, *Bacillus stratophericus* สายพันธุ์ L19 รหัส MSCU 0873 ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่ปลูกอ้อย อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี, *Bacillus altitudinis* สายพันธุ์ T17 รหัส MSCU 0867 ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่ปลูกข้าว อ.ท่าวุ้ง จ.ลพบุรี และ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 ที่แยกได้จากแหนม โดยเชื้อทั้ง 4 ชนิดถูกเก็บอยู่ในคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ถ่านชีวภาพ ซึ่งสั่งมาจากกลุ่มเกษตรกรชิมลอง (Erevthai), เถ้าลอยจากบริษัท ทิพย์กำแพงเพชร ไบโอเอนเนอยี่ จำกัด และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มจากบริษัทโกลเด้นไทม์เอ็นเตอไพร์ส จำกัด



รูปที่ 2.1 วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ถ่านชีวภาพ (ก), เถ้าลอย (ข) และ กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (ค)

ดินที่ใช้ปลูกอ้อยและท่อนพันธุ์อ้อยจากแปลงทดลองที่จังหวัดนครสวรรค์ ของบริษัท เคทิส วิจัยและพัฒนา จำกัด

รูปที่ 2.2 ดินที่ใช้ปลูกอ้อย

2.3.2 วัดอัตราการเจริญของเชื้อ

เพื่อดูอัตราการเจริญของเชื้อแต่ละตัว และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อก่อนนำมาเตรียมหัวเชื้อเพื่อทำการทดลองขั้นต่อไป

เลี้ยงเชื้อใน Tryptic Soy Broth (TSB) โดยบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerated Microcentrifuge เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วเตรียมหัวเชื้อโดยผสมเซลล์กับ 0.85%NaCl โดยปรับให้ค่า OD เท่ากับ 1 หลังจากนั้นใส่หัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน TSB ปริมาตร 45 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้องและเก็บผลที่ 0, ½, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 26, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยวัดค่า OD_{600}, ทำวิธีการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับส่วน (serial dilution techniques) และวิธีการดรอบเพลต (drop plate techniques) ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงอัตราการเจริญของเชื้อ

เมื่อได้กราฟแสดงอัตราการเจริญของเชื้อมาแล้ว จะสามารถดูผลจากกราฟได้ว่าจะต้องเลี้ยงเชื้อนานแค่ไหนเพื่อให้ได้หัวเชื้อที่เจริญอยู่ในระยะที่ต้องการ ซึ่งก็คือระยะ late log phase

2.3.3 ทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึง

เพื่อนำผลคุณสมบัติของวัสดุแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกัน และนำมาวิเคราะห์ผลร่วมกับผลการทดลองอื่นๆ เพื่อหาวัสดุตรึงที่มีความเหมาะสมในการส่งเสริมการมีชีวิตของจุลินทรีย์

2.3.3.1 วัดค่าความเป็นกรดเบส

นำวัสดุตรึง 10 กรัม มาผสมกับน้ำ DI 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและทิ้งไว้ให้วัสดุตรึงตกตะกอน วัดค่าความเป็นกรดด่างด้วย pH meter

2.3.3.2 วัดค่าความชื้นสัมพัทธ์

อบวัสดุตรึง 5 กรัมใน oven แล้วนำมาชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่ นำน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งที่ได้มาคำนวนหาค่าความชื้นสัมพัทธ์โดยใช้สูตร

$$\text{Moisture Content} = \frac{\text{wet weight} - \text{dry weight}}{\text{wet weight}} \times 100$$

2.3.3.3 วัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ

วัดปริมาณน้ำที่ไหลผ่านวัสดุตรึงปริมาตร 10 กรัม จากน้ำทั้งหมด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวนหาปริมาตรของน้ำที่ถูกวัสดุตรึงกักเก็บไว้

2.3.3.4 วัดปริมาณแร่ธาตุภายในวัสดุตรึง

ส่งวัสดุตรึงไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยตรวจหาปริมาณ C, N, Cd, Cu และ Zn

เมื่อได้ผลการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของวัสดุตรึงแต่ละชนิด จะนำค่าที่ได้ไปใช้ออกแบบการทดลองขั้นต่อไป เช่น การกำหนดค่าความชื้นสัมพัทธ์สุดท้ายของวัสดุตรึงภายหลังการใส่หัวเชื้อ

2.3.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงชนิดต่างๆ ในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสมเพื่อหาวัสดุตรึงที่มีความสามารถในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

เพื่อหาวัสดุตรึงที่มีความสามารถในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

2.3.4.1 การตรึงเชื้อผสม 3 และ 4 ชนิด ในวัสดุตรึงแบบเดี่ยว

วัสดุตรึงที่ใช้ได้แก่ ถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratophericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 ใน TSB สำหรับเตรียมเชื้อผสม 3 ชนิด และเพิ่มเชื้อ *Weissella cibaria* PN3 ใน Luria-Bertani (LB) สำหรับเตรียมหัวเชื้อผสม 4 ชนิด บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerated Microcentrifuge เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วเตรียมหัวเชื้อโดยใส่เซลล์ลงใน 0.85%NaCl ปรับค่า OD ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratophericus* L19, *Bacillus altitudinis* T17 และ *Weissella cibaria* PN3 ให้เท่ากับ 1.4, 1, 1 และ 1 ตามลำดับ เพื่อให้แต่ละเชื้อมีความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และผสมหัวเชื้อในอัตราส่วน 1:1:1 สำหรับเชื้อผสม 3 ชนิด และผสมในอัตราส่วน 1:1:1:1 ในเชื้อผสม 4 ชนิด เนื่องจากต้องการต้องการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหัวเชื้อผสมที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถทนแล้ง 3 ชนิดกับหัวเชื้อผสมที่ใช้แบคทีเรียทนแล้ง 3 ชนิด ร่วมกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ แล้วใส่หัวเชื้อผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในวัสดุตรึงปริมาตร 3 กรัม ที่ถูกบรรจุไว้ในขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร (vial) ขนาด 22 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิทและมีอากาศอยู่ภายในขวด ปรับค่าความชื้นสัมพัทธ์ของวัสดุตรึงแต่ละชนิดให้เท่ากับ 40% (Tripti และคณะ, 2017) ด้วย 0.85%NaCl โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และเตรียมแบคทีเรียตรึงทั้งหมด 6 ชุดการทำลองเพื่อใช้เก็บผลในแต่ละสัปดาห์ บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด แล้วเก็บผลที่ 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ โดยทำวิธีการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับส่วน (serial dilution techniques) และวิธีการกระจายเชื้อ (spread plate) ลงอาหาร TSA หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสมในวัสดุตรึง

2.3.4.2 การตรึงเชื้อผสม 3 ชนิดและเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงแบบผสม

เนื่องจากวัสดุตรึงแต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่แตกต่างกัน การใช้วัสดุผสมจึงเป็นการรวมคุณสมบัติที่ดีของวัสดุแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน ซึ่งอาจส่งผลให้สามารถส่งเสริมการมีชีวิตรอด

ของจุลินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น วัสดุตรึงแบบผสมที่ใช้ได้แก่ ถ่านชีวภาพผสมเถ้าลอย, ถ่านชีวภาพผสมกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และเถ้าลอยผสมกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ในอัตราส่วน 1:1 และทำการทดลองเหมือนการทดสอบอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 3 ชนิดและเชื้อผสม 4 ชนิด ในวัสดุตรึงแบบเดี่ยวในข้อ 3.1

2.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

ในการทดลองนี้ใช้ต้นกล้าอ้อยอายุประมาณ 2 เดือน โดยปลูกในกระถางขนาด 4×5×12.5 เซนติเมตร ตั้งกระถางไว้ริมหน้าต่าง และติดไฟ LED กำลังไฟฟ้า 15 วัตต์ เพื่อให้อ้อยได้รับแสงที่มากขึ้น

รูปที่ 2.3 พื้นที่ตั้งกระถางอ้อย ซึ่งเปิดไฟ LED เพิ่มแสงให้อ้อย

ชุดการทดลองแรกจะใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิด ชุดการทดลองที่ 2 จะใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด ชุดการทดลองที่ 3 จะใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ และชุดควบคุมจะใช้ดินในการปลูกอ้อยโดยไม่ผสมวัสดุตรึง เตรียมวัสดุตรึงโดยผสมถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มในอัตราส่วน 1:1:1 เนื่องจากถ่านชีวภาพมีรูพรุนจำนวนมากและมีค่าความชื้นสัมพัทธ์สูง กากเนื้อในเมล็ดปาล์มมีธาตุไนโตรเจนสูง ซึ่งไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่สำคัญต่อการเจริญของอ้อย และเถ้าลอยที่เป็นของเสียจากโรงงานน้ำตาลที่มีพื้นผิวที่เป็นรูพรุนเหมาะที่จะให้แบคทีเรียเข้าไปอาศัย ดังนั้นการใช้วัสดุตรึงทั้งสามชนิดร่วมกันจึงเป็นการนำข้อดีของวัสดุแต่ละชนิดมารวมกัน ทำให้ได้วัสดุตรึงที่มีความเหมาะสมมากขึ้น โดยจะนำวัสดุตรึงมาใส่เชื้อผสมโดยเตรียมตามขั้นตอนในข้อ 2.3.4.1 บ่มวัสดุตรึงที่มีเชื้อในถุงพลาสติก มัดปากถุงโดยให้มีอัตราส่วนของอากาศในถุงใกล้เคียงกับปริมาณอากาศในขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร บ่มเชื้อจนครบ 2 สัปดาห์

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียในดินปลูกอ้อย โดยนำวัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 100 กรัมมาผสมกับดิน 1.5 กิโลกรัม โดยในวัสดุตรึงจะมีแบคทีเรียประมาณ 10^{9}–10^{11} CFU ต่อกรัม และนำต้นกล้าอ้อยอายุ 2 เดือน มาปลูกในดินที่เตรียมไว้ รดน้ำอ้อยทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วหลังจากนั้นหยุดให้น้ำเพื่อจำลองสภาวะแล้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วัดผลการเจริญของต้นอ้อยจากการวัดความยาวราก, ลำต้น, ใบ, ดูลักษณะของแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และวัดปริมาณของ

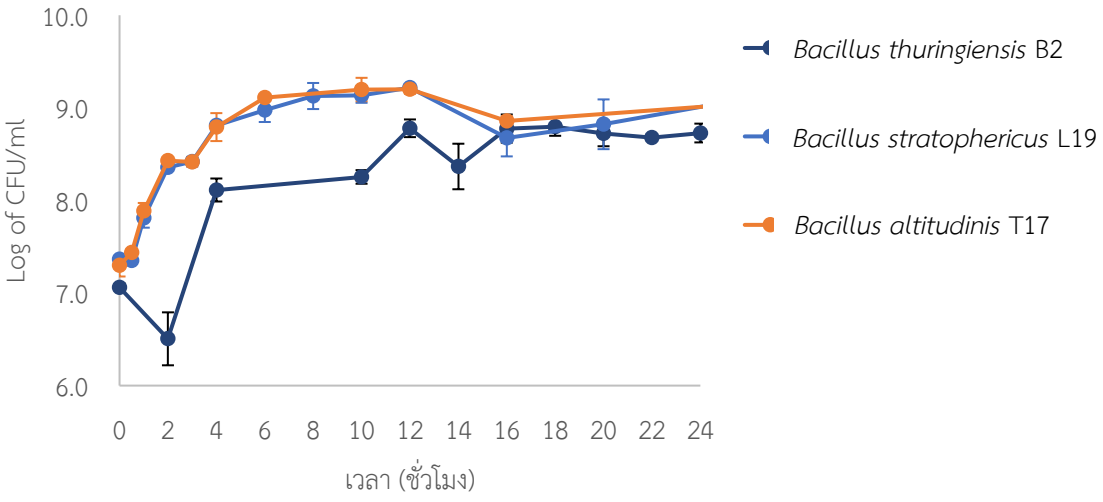
เชื้อที่เจริญบริเวณพื้นผิวราก โดยนำราก 1 กรัมใส่ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทำให้เซลล์แบคทีเรียหลุดออกจากผิวรากโดยนำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที และนำไปใส่อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (sonicator bath) เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์มาละลายใน 0.85%NaCl และดูปริมาณเชื้อโดยใช้วิธี MPN ในอาหาร 2 ชนิดคือ อาหาร TSB เพื่อใช้ดูปริมาณเชื้อทั้งหมดและอาหาร TSB ที่ใส่ PEG 20% เพื่อใช้ดูปริมาณเชื้อทนแล้ง

บทที่ 3

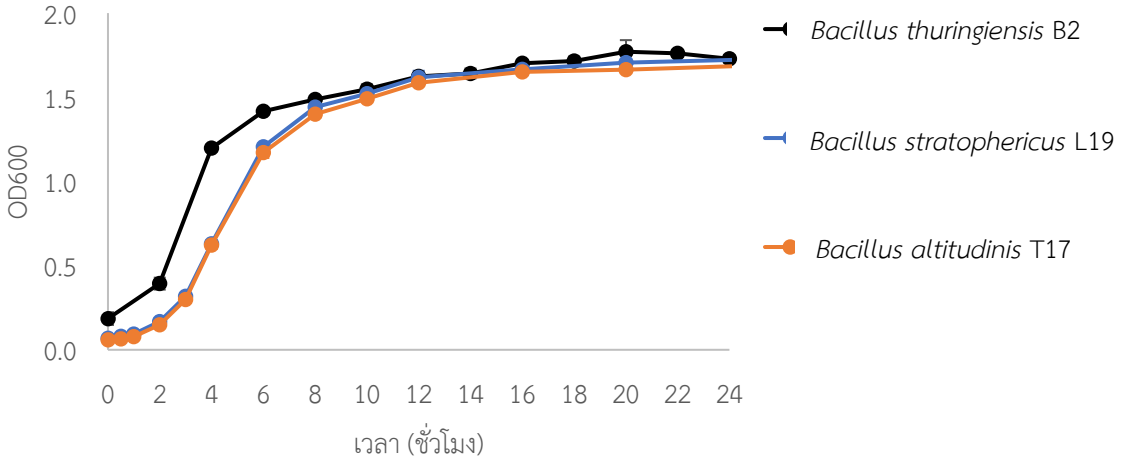
ผลการทดลอง

3.1 ผลการวัดอัตราการเจริญของเชื้อ

จากผลการวัดอัตราการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวทำให้ทราบว่า เชื้อทั้งสามชนิดจะเจริญอยู่ในระยะ late log phase เมื่อบ่มประมาณ 4-6 ชั่วโมง (รูปที่ 3.1 และ 3.2) ซึ่งจะเป็นเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อต่อไป



รูปที่ 3.1 กราฟการเจริญของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratophericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 ในอาหาร TSB จากการนับจำนวนโคโลนี



รูปที่ 3.2 กราฟการเจริญของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratophericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 ในอาหาร TSB จากการวัดค่า OD_{600}

3.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึง

3.2.1 ค่าความเป็นกรดเบส, ค่าความชื้นสัมพัทธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง

จากตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรดเบสของวัสดุตรึง ถ่านชีวภาพมีความเป็นเบสสูงที่สุด รองลงมาคือเถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มมีความเป็นกรดสูงที่สุด ค่าความชื้นสัมพัทธ์ของถ่านชีวภาพมีค่าสูงถึง 51.3% รองลงมาคือกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และเถ้าลอยมีค่าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำที่สุด จากค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึงทั้งสามชนิด จะเห็นได้ว่าถ่านชีวภาพและกากเนื้อในเมล็ดปาล์มมีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำที่ใกล้เคียงกัน โดยกากเนื้อในเมล็ดปาล์มสามารถอุ้มน้ำได้มากที่สุด และเถ้าลอยสามารถอุ้มน้ำได้น้อยที่สุด

ตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรดเบส, ค่าความชื้นสัมพัทธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง

วัสดุตรึง	ค่าความเป็นกรดเบส	ค่าความชื้นสัมพัทธ์ (%)	ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (มิลลิลิตรต่อกรัม)
ถ่านชีวภาพ	10.3	51.3	2.0
เถ้าลอย	9.2	0.4	1.2
กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม	5.7	8.4	2.4

3.2.2 ปริมาณแร่ธาตุของวัสดุตรึง

จากตารางที่ 4 กากเนื้อในเมล็ดปาล์มมีปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุด ส่วนถ่านชีวภาพมีปริมาณคาร์บอนสูงที่สุด ไม่สามารถตรวจพบปริมาณแคดเมียมในกากเนื้อในปาล์ม แต่พบในถ่านชีวภาพและเถ้าลอยในปริมาณที่เท่ากันคือ 0.2 กรัมต่อกิโลกรัม และเถ้าลอยมีปริมาณทองแดงและสังกะสีสูงที่สุดในวัสดุตรึงทั้งสามชนิด

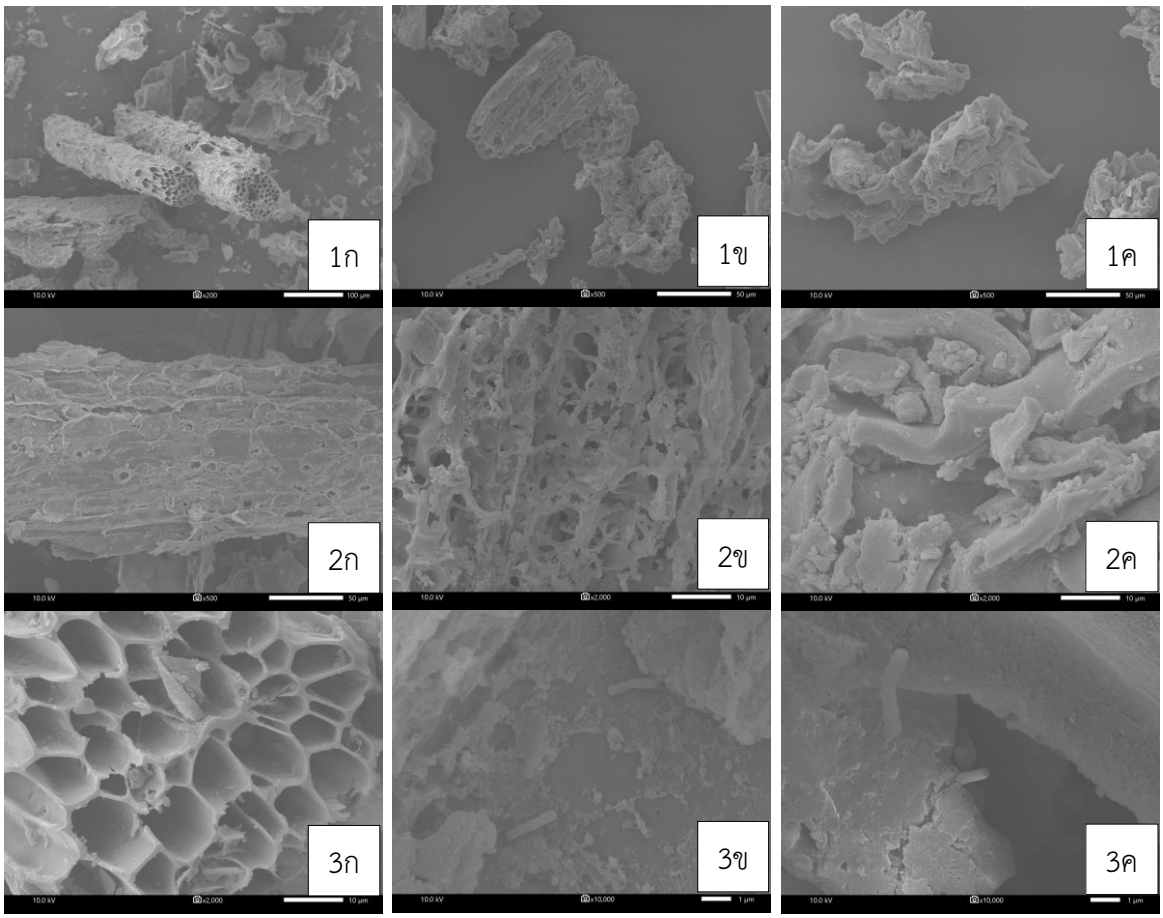
ตารางที่ 4 ปริมาณแร่ธาตุของวัสดุตรึงแต่ละชนิด

แร่ธาตุ	ถ่านชีวภาพ	เถ้าลอย	กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม
ไนโตรเจน (Total N) (%)	0.11	0.03	1.71
คาร์บอน (Total organic carbon) (กรัมต่อกิโลกรัม)	199.2	23.3	115.6
แคดเมียม (Cd) (กรัมต่อกิโลกรัม)	0.2	0.2	ND
ทองแดง (Cu) (กรัมต่อกิโลกรัม)	14.2	27.6	22.5
สังกะสี (Zn) (กรัมต่อกิโลกรัม)	20.5	137.0	36.2

หมายเหตุ ND หมายถึงไม่สามารถตรวจพบได้

3.2.3 ลักษณะของวัสดุตรึงและเชื้อภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด

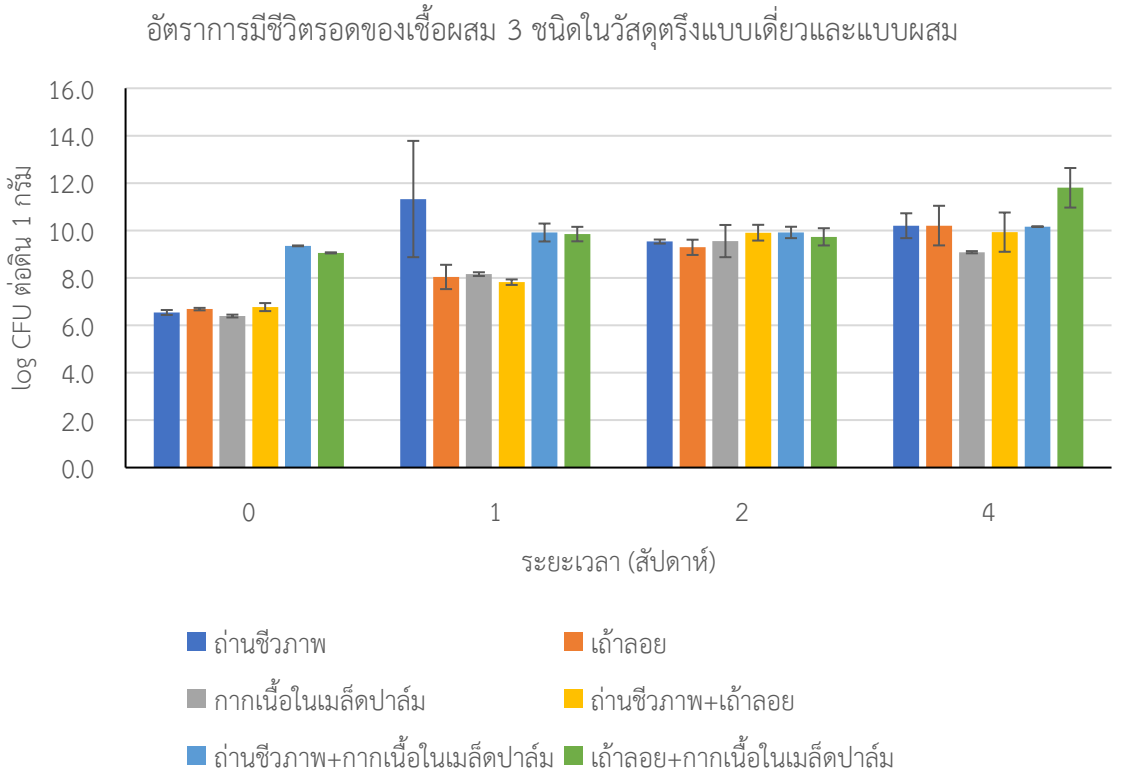
ภาพที่ได้จากการดูภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดทำให้เห็นถึงลักษณะพื้นผิวและรูพรุนของวัสดุตรึง โดยจากรูปที่ 3.3 ถ่านชีวภาพมีรูพรุนขนาดใหญ่ (3ก) เมื่อเทียบกับรูพรุนของเถ้าลอยที่กำลังขยายเดียวกัน (2ข) ส่วนกากเนื้อในปาล์มมีลักษณะพื้นผิวที่ค่อนข้างแตกต่างจากถ่านชีวภาพและเถ้าลอย โดยพื้นผิวของกากเนื้อในปาล์มจะมีลักษณะคล้ายวัสดุที่ถูกบีบอัด ทำให้มีช่องว่างให้แบคทีเรียเข้าไปอาศัยได้ โดยจากการหาเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าไม่สามารถหาแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวของถ่านชีวภาพได้เลย จึงคาดว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่อาศัยอยู่ภายในรูพรุนของถ่านชีวภาพ ส่วนเถ้าลอยและกากเนื้อในปาล์มนั้นสามารถพบเซลล์แบคทีเรียได้ในบริเวณพื้นผิวที่ค่อนข้างเรียบ (3ข และ 3ค)



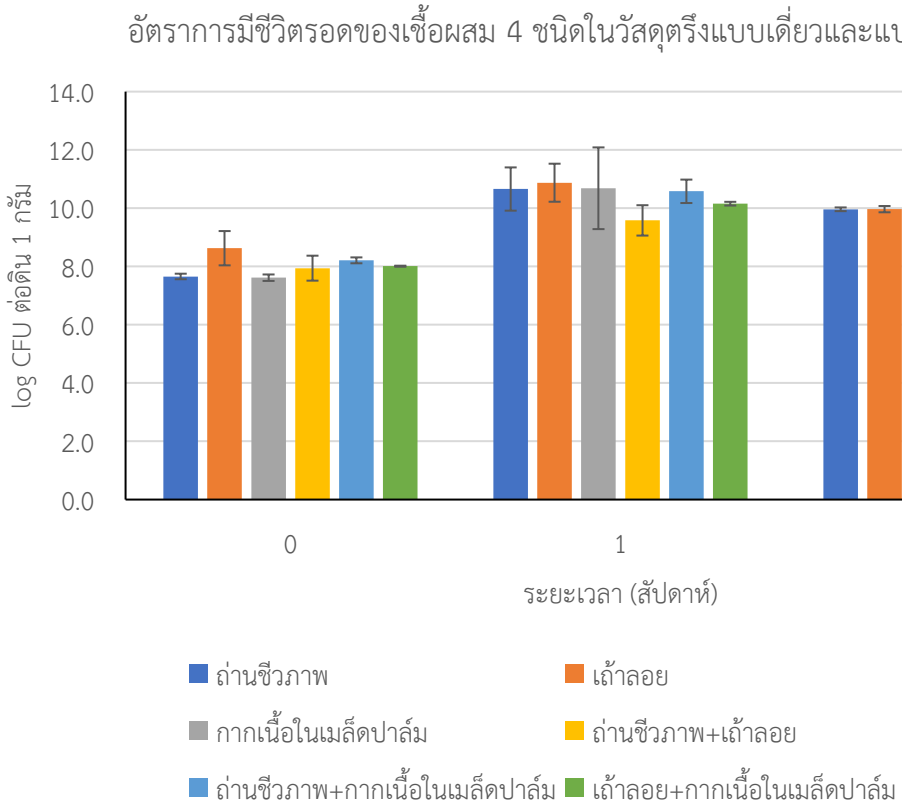
รูปที่ 3.3 ภาพพื้นผิว, รูพรุนของวัสดุตรึง และการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวของวัสดุตรึง โดย 1ก, 2ก และ 3ก คือถ่านชีวภาพที่กำลังขยาย 200x, 500x และ 2,000x ตามลำดับ, 1ข, 2ข และ 3ข คือเถ้าลอยที่กำลังขยาย 500x, 2,000x และ 10,000x ตามลำดับ และ 1ค, 2ค และ 3ค คือกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่กำลังขยาย 500x, 2,000x และ 10,000x ตามลำดับ

3.3 อัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึง

จากกราฟในรูปที่ 3.4 และรูปที่ 3.5 จะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อมีการเพิ่มขึ้นจากวันแรกที่ได้ใส่เชื้อลงไป (สัปดาห์ที่ 0) และมีปริมาณเชื้อสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 10^{10} CFU ต่อดิน 1 กรัม ซึ่งอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อในวัสดุตรึงแต่ละชนิดค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยในสัปดาห์ที่ 2 วัสดุตรึงทุกชนิดมีปริมาณแบคทีเรีย 10^{9}-10^{11} CFU ต่อวัสดุตรึง 1 กรัม จากผลดังกล่าวจึงเลือกใช้ระยะเวลาบ่มวัสดุตรึงกับเชื้อผสมเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนที่จะนำมาผสมกับดินเพื่อใช้ในการปลูกอ้อยในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง



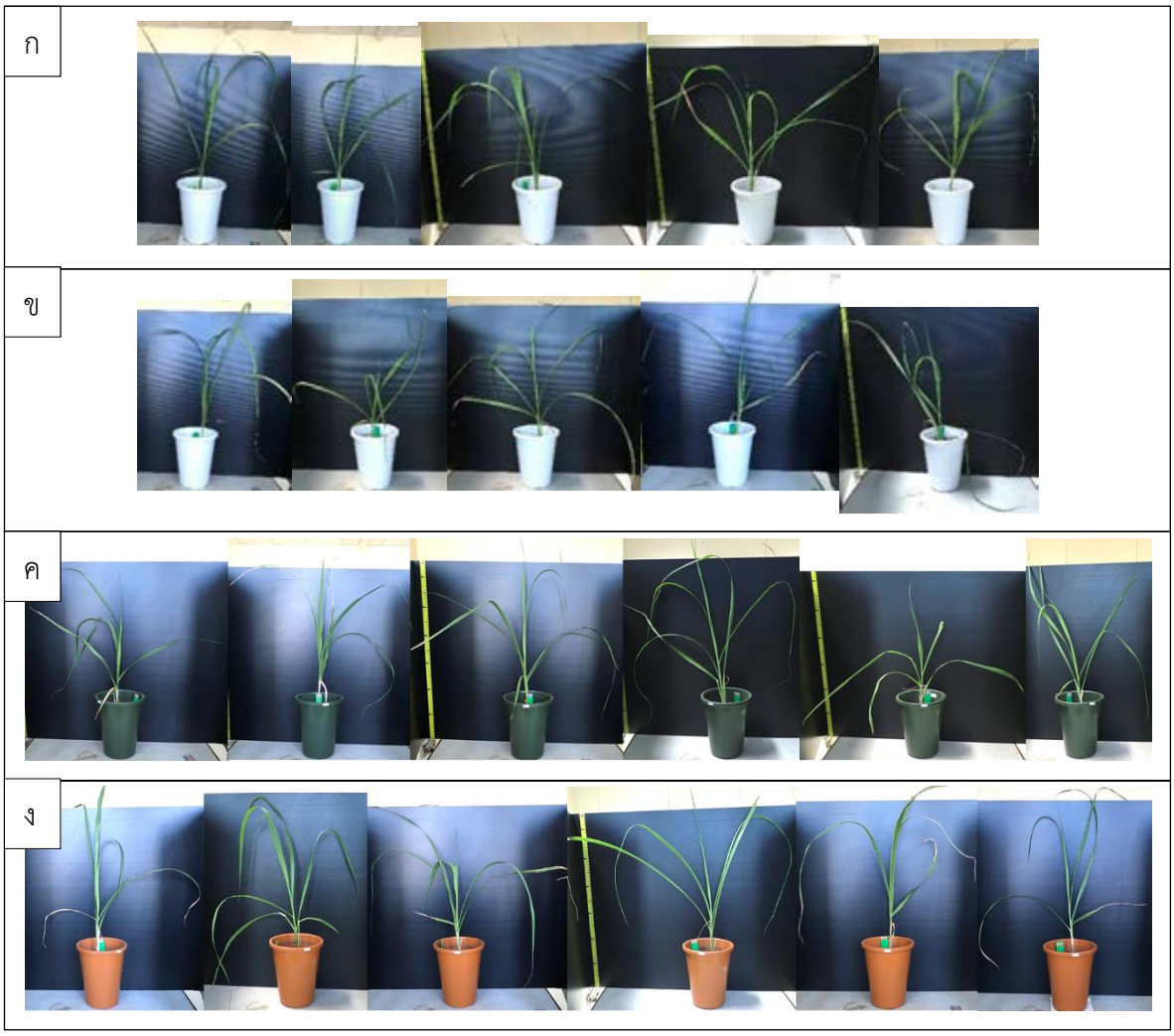
รูปที่ 3.4 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 3 ชนิดในวัสดุตรึงแบบเดี่ยวและแบบผสม



รูปที่ 3.5 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงแบบเดี่ยวและแบบผสม

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง

จากรูป 3.6 คือต้นอ้อยหลังให้น้ำ 2 สัปดาห์ ก่อนจะงดให้น้ำเพื่อจำลองสภาวะแล้ง โดยลักษณะใบของต้นอ้อย ที่บริเวณปลายใบจะแห้งเล็กน้อย และจากรูป 3.7 หลังงดให้น้ำอ้อยเพื่อจำลองสภาวะแล้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าต้นอ้อยในชุดควบคุมมีการเหี่ยวแห้งมากเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ โดยมีต้นอ้อยที่แห้งตาย 1 ต้น ขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆ ไม่พบต้นที่มีการแห้งตาย พบแค่การแห้งบริเวณปลายใบและขอบใบ โดยเมื่อดูจากสีและการแห้งของใบจะพบว่า ชุดควบคุมมีการแห้งของใบมากที่สุด รองลงมาคือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อผสม ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด และชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดตามลำดับ



รูปที่ 3.6 อ้อยก่อนงดให้น้ำเพื่อจำลองสภาวะแล้ง โดยรูป ก คือชุดควบคุมจะใช้ดินในการปลูกอ้อยโดยไม่ผสมวัสดุตรึง, รูป ข คือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อผสมกับดินในการปลูกอ้อย, รูป ค คือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดกับดินในการปลูกอ้อย และรูป ง คือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดกับดินในการปลูกอ้อย

ก

ข

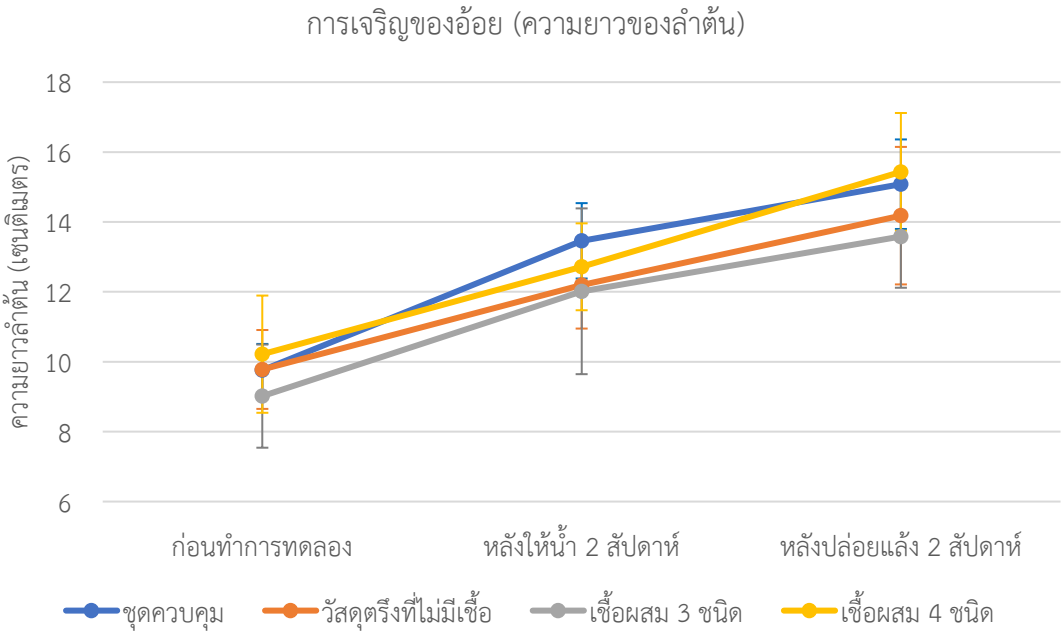
ค

ง

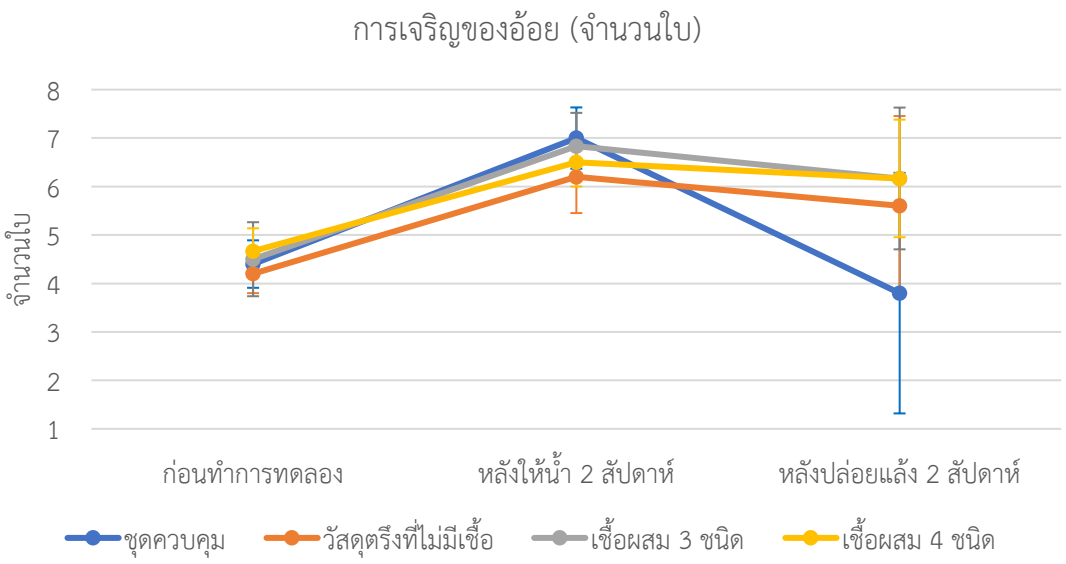
รูปที่ 3.7 อ้อยหลังจากการจำลองสภาวะแล้ง โดยงดให้น้ำ 2 สัปดาห์ รูป ก คือชุดควบคุมจะใช้ดินในการปลูกอ้อยโดยไม่ผสมวัสดุตรึง, รูป ข คือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อผสมกับดินในการปลูกอ้อย, รูป ค คือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดกับดินในการปลูกอ้อย และรูป ง คือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดกับดินในการปลูกอ้อย

จากผลการติดตามดูการเจริญของอ้อยจะเห็นได้ว่าในช่วงแรกที่มีการใช้น้ำตามปกติ อ้อยมีการเจริญที่เพิ่มมากขึ้น โดยชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดมีความยาวของลำต้นเพิ่มขึ้น 38, 25, 33 และ 24 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใบเพิ่มขึ้น 59, 48, 52 และ 40 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวของใบเพิ่มขึ้น 16, 13, 8 และ 21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับความยาวลำต้น, จำนวนใบ และความยาวใบก่อนทำการทดลอง

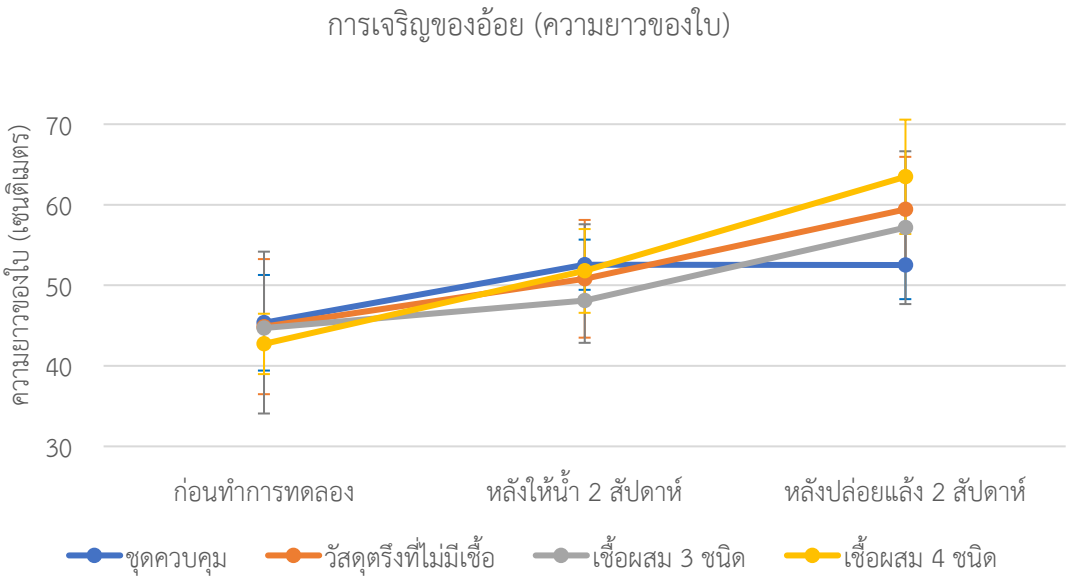
เมื่องดให้น้ำเพื่อจำลองสภาวะแล้ง จะเห็นได้ว่าทุกชุดการทดลองมีความยาวของลำต้นอ้อยที่เพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 3.8) โดยที่ชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดมีความยาวของลำต้นเพิ่มขึ้น 12, 16, 13 และ 21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับความยาวลำต้นก่อนเริ่มจำลองสภาวะแล้ง เมื่อดูจำนวนใบของอ้อยพบว่าทุกชุดการทดลองมีจำนวนใบที่ลดลง โดยชุดควบคุมมีจำนวนใบที่ลดลงมากที่สุด (รูปที่ 3.9) โดยที่ชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดมีจำนวนใบลดลง 46, 10, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับจำนวนใบก่อนเริ่มสภาวะแล้ง และเมื่อดูผลของความยาวของใบจะเห็นว่าชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยความยาวใบที่ลดลง ส่วนชุดการทดลองอื่นๆ มีค่าเฉลี่ยของความยาวใบที่เพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 3.10) โดยที่ชุดควบคุมมีความยาวใบลดลง 0.03 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดมีความยาวของใบที่เพิ่มขึ้น 17, 17 และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับความยาวใบก่อนเริ่มสภาวะแล้ง



รูปที่ 3.8 การเจริญของอ้อย โดยวัดจากความยาวของลำต้น จากชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด



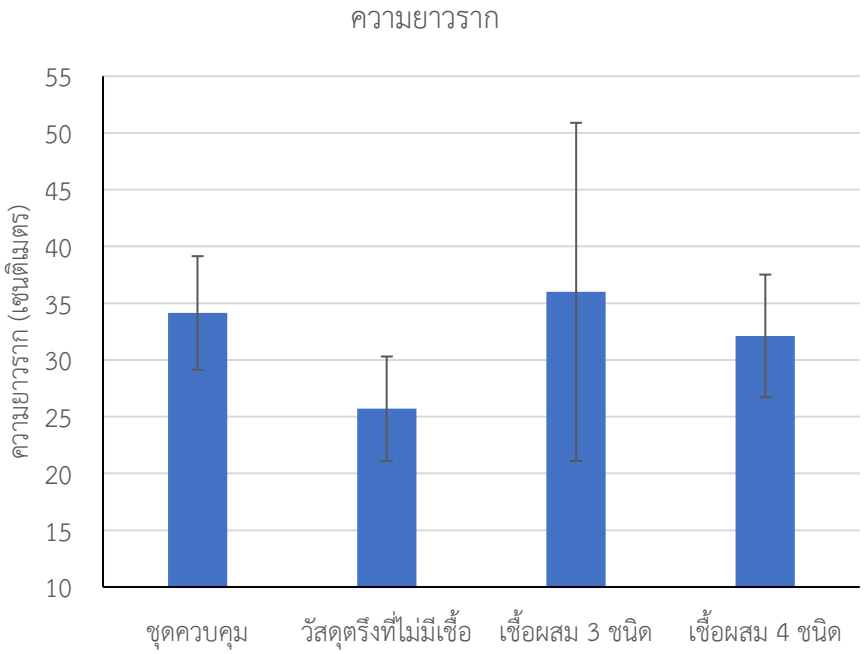
รูปที่ 3.9 การเจริญของอ้อย โดยวัดจากจำนวนใบ



รูปที่ 3.10 การเจริญของอ้อย โดยวัดจากความยาวของใบ

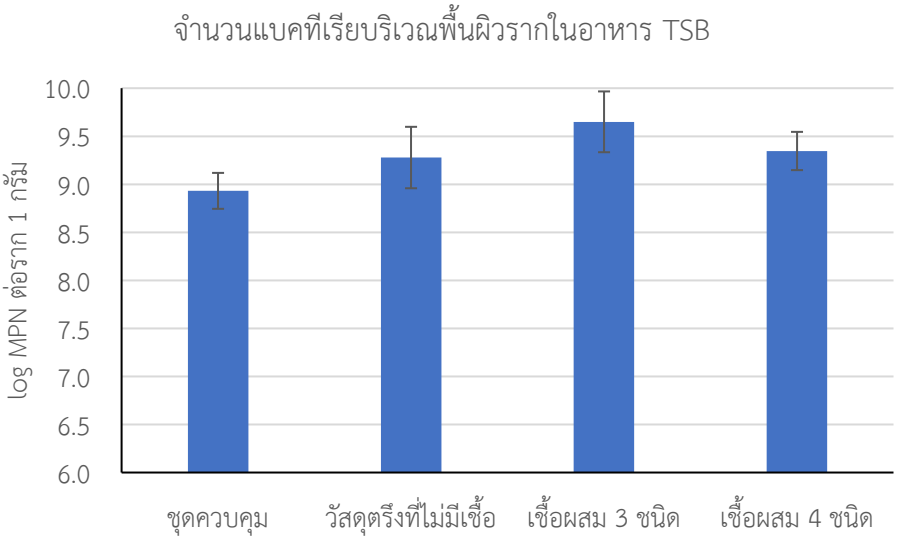
เมื่อดูปริมาณและความยาวของรากอ้อย พบว่าในชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดมีปริมาณรากที่เยอะกว่ารากในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ โดยชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดมีค่าเฉลี่ยความยาวของรากคือ 34.1, 25.7, 36.0 และ 32.1 เซนติเมตร

รูปที่ 3.11 รากของอ้อยหลังการปลูกในสภาวะแล้ง โดยรูป ก คือชุดควบคุมจะใช้ดินในการปลูกอ้อยโดยไม่ผสมวัสดุตรึง, รูป ข คือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อผสมกับดินในการปลูกอ้อย, รูป ค คือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดกับดินในการปลูกอ้อย และรูป ง คือชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดกับดินในการปลูกอ้อย

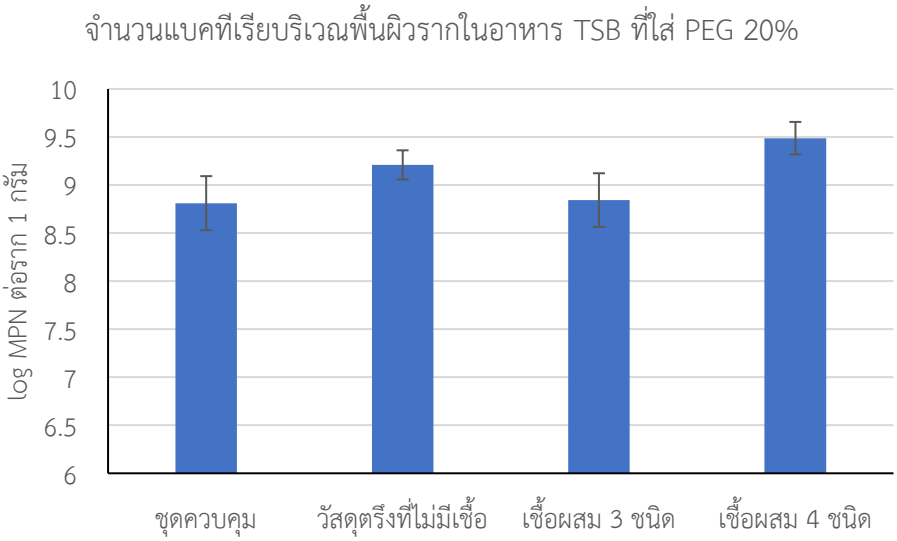


รูปที่ 3.12 ความยาวของรากอ้อย ในชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบริเวณพื้นผิวรากของชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดมีค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวรากคือ 8.5×10^{8}, 1.9×10^{9}, 4.5×10^{9} และ 2.2×10^{9} MPN ต่อราก 1 กรัม (รูปที่ 3.13) และจำนวนแบคทีเรียทนแล้งบริเวณพื้นผิวรากของชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดมีค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียทนแล้งบริเวณพื้นผิวรากคือ 6.5×10^{8}, 1.6×10^{9}, 7.0×10^{8} และ 3.1×10^{9} MPN ต่อราก 1 กรัม (รูปที่ 3.14)



รูปที่ 3.13 จำนวนแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวราก โดยใช้วิธี MPN ในอาหาร TSB เพื่อดูปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด



รูปที่ 3.14 จำนวนแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวราก โดยใช้วิธี MPN ในอาหาร TSB ที่ใส่ PEG 20% เพื่อดูปริมาณแบคทีเรียทนแล้ง

บทที่ 4
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เลือกใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมระหว่างแบคทีเรียในดินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชและเป็นแบคทีเรียทนแล้งได้แก่ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratophericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 ร่วมกับแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้แก่ *Weissella cibaria* PN3 และใช้ถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มเป็นวัสดุตรึง โดยถ่านชีวภาพมีค่าความชื้นสัมพัทธ์สูง และมีรูพรุนจำนวนมาก จึงง่ายต่อการที่แบคทีเรียจะเข้าไปอาศัยและเจริญอยู่ภายในรูพรุนของถ่านชีวภาพ แต่ถ่านชีวภาพมีข้อเสียตรงที่มีราคาสูง จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในพื้นที่ทางการเกษตรขนาดใหญ่ ส่วนเถ้าลอยเป็นของเสียจากโรงงานที่มีการเผาไหม้เชื้อเพลิง เช่น โรงงานน้ำตาล โดยลักษณะพื้นผิวของเถ้าลอยจะมีรูพรุนที่แบคทีเรียสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ได้ และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มซึ่งเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำมันเมล็ดในปาล์ม มีธาตุไนโตรเจนสูงซึ่งไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่สำคัญต่อการเจริญของอ้อย

จากอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึงพบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึงแต่ละชนิดค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยเชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และในสัปดาห์ที่ 2 จะมีปริมาณแบคทีเรียสูงถึง 10^9-10^{10} CFU ต่อวัสดุตรึง 1 กรัม และอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 2 กับสัปดาห์ที่ 4 มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Saharan และคณะ (2010) ที่ดูอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในแป้งทัลคัมและอะลูมิเนียมซิลิเคต พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ และจะเริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อบ่มครบ 6 เดือน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วัสดุตรึงที่ผสมกับแบคทีเรียไว้นาน 2 สัปดาห์ ก่อนจะนำมาผสมกับดินเพื่อใช้ปลูกอ้อย และจากผลของอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึงแต่ละชนิดที่มีค่าใกล้เคียงกัน ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วัสดุตรึงทั้ง 3 ชนิดผสมกันเพื่อนำข้อดีของวัสดุแต่ละชนิดมารวมกัน ทำให้ได้วัสดุตรึงที่มีความเหมาะสมมากขึ้น

ผลของการปลูกอ้อยในสภาวะแล้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากการสังเกตุการแห้งของใบและลำต้นพบว่าอ้อยในชุดควบคุมมีการแห้งของใบและลำต้นมากที่สุด และอ้อยในชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีแบคทีเรียเชื้อผสม 3 ชนิดมีการแห้งของใบที่น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอ้อยในชุดการทดลองอื่นๆ ในชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีแบคทีเรียเชื้อผสม 4 ชนิดมีเปอร์เซ็นต์ความยาวของลำต้นและใบที่เพิ่มขึ้นมากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์จำนวนใบลดลงน้อยที่สุด และเมื่อดูลักษณะและความยาวของรากอ้อย โดยเปรียบเทียบรากอ้อยในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อผสม พบว่ารากในชุดควบคุมจะมีความยาวที่มากกว่า เนื่องจากในการจำลองสภาวะแล้งโดยไม่รดน้ำ ทำให้ดินในชุดควบคุมแห้งมาก ส่วนชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อผสมจะมีวัสดุตรึงมาช่วยให้ดินสามารถอุ้มน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งผลของความยาวรากสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2006) ที่บอกว่าในสภาวะแล้งพืชจะสร้างกรดแอบไซซิกที่จะมาช่วยกระตุ้นการเจริญของราก และถ้าเปรียบเทียบรากอ้อยในชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อผสมกับรากอ้อยในชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีแบคทีเรียเชื้อผสม พบว่าแบคทีเรียเชื้อผสมน่าจะสร้างฮอร์โมนมากระตุ้นการเจริญของราก ทำให้อ้อยในชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีแบคทีเรียเชื้อผสมมีปริมาณและความยาวรากที่มากกว่ารากในชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อผสม ซึ่งผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Patten และ Glick (2002) ที่พบกว่าการใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชจะช่วยให้พืชมีความยาวของรากมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่แบคทีเรีย จำนวน

แบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียทนแล้งบริเวณพื้นผิวรากของชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด มีค่าที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงบอกได้ว่าการใส่วัสดุตรึงและหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสมไม่ได้ส่งผลต่อปริมาณของแบคทีเรียบริเวณรอบพื้นผิวราก ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียที่ใส่ลงไปนั้นถูกตรึงอยู่ภายในวัสดุตรึง และไม่ได้มีการเคลื่อนที่ไปเกาะบริเวณราก แต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง เนื่องจากสามารถสร้างสารเมทาบอไลท์ให้พืชได้ แม้จะไม่ได้อยู่บริเวณพื้นผิวรากก็ตาม

การศึกษาการใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อแบคทีเรียแบบผสมในการส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง พบว่าช่วงที่ให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ อ้อยมีการเจริญเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง และเมื่อจำลองสภาวะแล้งโดยงดให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีแบคทีเรียเชื้อผสมสามารถทนอยู่ในสภาวะแล้งได้ดีที่สุด โดยชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิด มีความยาวรากมากที่สุด และชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์ความยาวต้นและใบที่เพิ่มขึ้นมากที่สุด จากงานวิจัยของ Lim และ Kim (2013) และงานวิจัยของ Sarma และ Saikia (2013) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะแล้ง โดยแต่ละชุดการทดลองได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้พืชทั้งหมด 10 ต้น อีกทั้งยังจำลองสภาวะแล้งนาน 2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ตามลำดับ ดังนั้นถ้าต้องการเปรียบเทียบผลที่ชัดเจนของการส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้งระหว่างแบคทีเรียเชื้อผสม 3 ชนิด และ 4 ชนิด ควรจะเพิ่มจำนวนอ้อยที่ใช้ในแต่ละชุดการทดลอง และเพิ่มระยะเวลาของช่วงการจำลองสภาวะแล้งให้นานขึ้น เพื่อให้เห็นผลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนมากกว่านี้ แต่จากผลการทดลองทั้งหมดก็สามารถสรุปได้ว่าการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้งได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S. & Smith, D. L. (2018) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front Plant Sci,* 9**,** 1473.

Borowik, A. & Wyszkowska, J. (2016) Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil *Plant, Soil and Environment,* 62 (No. 6)**,** 250-255.

Cohen, A. C., Travaglia, C. N., Bottini, R. & Piccoli, P. N. (2009) Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic Azospirillum in the alleviation of drought effects in maize. *Botany,* 87 (5)**,** 455-462.

da Silva, M. F., de Souza Antônio, C., de Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., de Barros Soares, L. H. & Reis, V. M. (2012) Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant and Soil,* 356 (1-2)**,** 231-243.

Hale, L., Luth, M. & Crowley, D. (2015) Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. *Soil Biology and Biochemistry,* 81**,** 228-235.

Hale, L., Luth, M., Kenney, R. & Crowley, D. (2014) Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain Enterobacter cloacae UW5 for soil inoculation. *Applied Soil Ecology,* 84**,** 192-199.

Kaushal, M. & Wani, S. P. (2015) Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Annals of Microbiology,* 66 (1)**,** 35-42.

Khan, N., Clark, I., Sanchez-Monedero, M. A., Shea, S., Meier, S., Qi, F., Kookana, R. S. & Bolan, N. (2016) Physical and chemical properties of biochars co-composted with biowastes and incubated with a chicken litter compost. *Chemosphere,* 142**,** 14-23.

Khavazi, K., Rejali, F., Seguin, P. & Miransari, M. (2007) Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of Bradyrhizobium japonicum in soybean (Glycine max L.) inoculants. *Enzyme and Microbial Technology,* 41 (6-7)**,** 780-784.

Lim, J. H. & Kim, S. D. (2013) Induction of Drought Stress Resistance by Multi-Functional PGPR Bacillus licheniformis K11 in Pepper. *Plant Pathol J,* 29 (2)**,** 201-208.

Maheshwari, D. K., Dubey, R. C., Agarwal, M., Dheeman, S., Aeron, A. & Bajpai, V. K. (2015) Carrier based formulations of biocoenotic consortia of disease suppressive Pseudomonas aeruginosa KRP1 and Bacillus licheniformis KRB1. *Ecological Engineering,* 81**,** 272-277.

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. & Babalola, O. O. (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol,* 33 (11)**,** 197.

Patten, C. L. & Glick, B. R. (2002) Role of Pseudomonas putida Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology,* 68 (8), 3795-3801.

Safronova, V. I., Stepanok, V. V., Engqvist, G. L., Alekseyev, Y. V. & Belimov, A. A. (2005) Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. *Biology and Fertility of Soils,* 42 (3), 267-272.

Saharan, K., Sarma, M. V. R. K., Srivastava, R., Sharma, A. K., Johri, B. N., Prakash, A., Sahai, V. & Bisaria, V. S. (2010) Development of non-sterile inorganic carrier-based formulations of fluorescent pseudomonad R62 and R81 and evaluation of their efficacy on agricultural crops. *Applied Soil Ecology,* 46 (2), 251-258.

Sarma, R. K. & Saikia, R. (2013) Alleviation of drought stress in mung bean by strain Pseudomonas aeruginosa GGRJ21. *Plant and Soil,* 377 (1-2), 111-126.

Sun, D., Hale, L. & Crowley, D. (2016) Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. *Biology and Fertility of Soils,* 52 (4), 515-522.

Tank, N. & Saraf, M. (2010) Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. *Journal of Plant Interactions,* 5 (1), 51-58.

Tripti, Kumar, A., Usmani, Z., Kumar, V. & Anshumali (2017) Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. *J Environ Manage,* 190, 20-27.

Upadhyay, S. K. & Singh, D. P. (2015) Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biol (Stuttg),* 17 (1), 288-293.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moenne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dye, F. & Prigent-Combaret, C. (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci,* 4, 356.

Vessey, J. K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil,* 255 (2), 571-586.

Yue, H., Mo, W., Li, C., Zheng, Y. & Li, H. (2007) The salt stress relief and growth promotion effect of Rs-5 on cotton. *Plant and Soil,* 297 (1-2), 139-145.

Zhang, J., Jia, W., Yang, J. & Ismail, A. M. (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research,* 97 (1), 111-119.

นุชจรินทร์ พึ่งพา และ อรรถสิทธิ์ บุญธรรม. 2555. การศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมในแต่ละช่วงอายุการเจริญเติบโตของอ้อย. การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9, หน้า 2241-2247

เพ็ญนภา บุญจริง (2015) การคัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาการหมักดองพื้นบ้านเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2561. เข้าถึงจาก http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-3254.pdf เข้าถึงเมื่อ 20 มกราคม 2562.

เอกวัล ลือพร้อมชัย และคณะ, การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2560.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth

อาหารสำเร็จรูป Tryptone Soya Broth 30.0 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 30.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth ที่ใส่ PEG 20%

อาหารสำเร็จรูป Tryptone Soya Broth 30.0 กรัม

Polyethylene glycol (PEG6000) 200.0 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 30.0 กรัม และ PEG 200.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

อาหารสำเร็จรูป MRS 55.0 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 55.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS)

Sodium Chloride 8.0 กรัม

Potassium Chloride 0.2 กรัม

Disodium phosphate 1.44 กรัม

Monopotassium phosphate 0.24 กรัม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

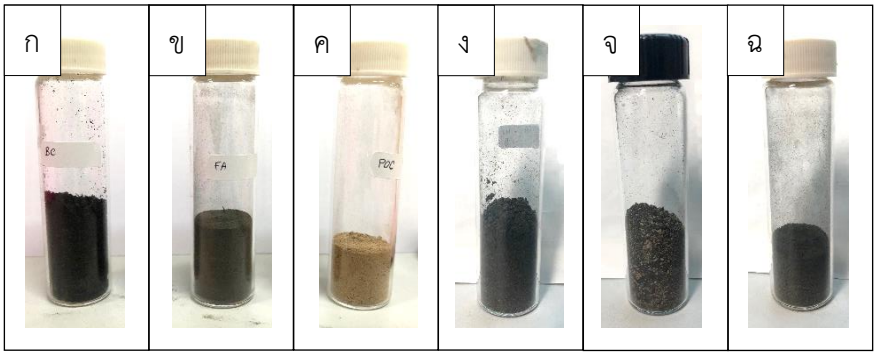
5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม

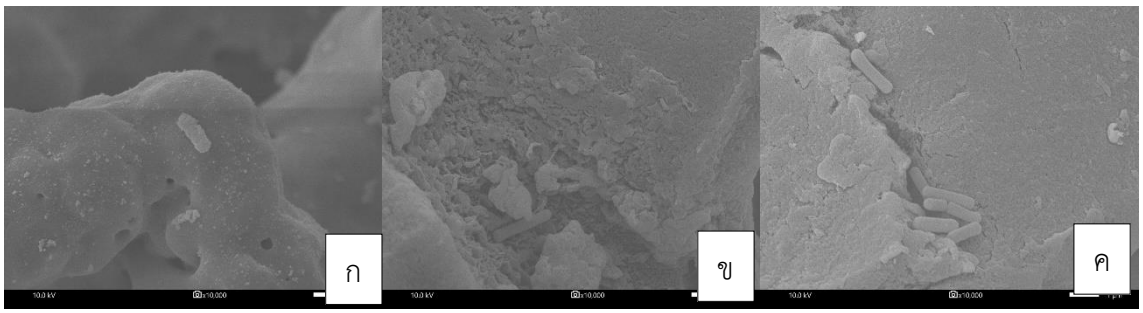
ละลายโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ข้อมูลจากการทดลอง



รูปที่ ข-1 วัสดุตรึงปริมาณ 3 กรัม ในขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร (vial) โดยรูป ก คือถ่านชีวภาพ, รูป ข คือเถ้าลอย, รูป ค คือกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม, รูป ง คือถ่านชีวภาพผสมกับเถ้าลอย, รูป จ คือถ่านชีวภาพผสมกับกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และรูป ฉ คือเถ้าลอยผสมกับกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม



รูปที่ ข-2 ภาพพื้นผิวของวัสดุตรึง และการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวของวัสดุตรึง โดยภาพ ก คือแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนผิวเถ้าลอย ที่กำลังขยาย 10,000x ส่วนภาพ ข และ ภาพ ค คือแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนพื้นผิวกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ที่กำลังขยาย 10,000x

รูปที่ ข-3 วัสดุตรึงที่มีแบคทีเรียเชื้อผสมในถุงพลาสติก ก่อนนำไปผสมดินเพื่อใช้ปลูกอ้อย

รูปที่ ข-4 ลักษณะของรากอ้อยก่อนถูกย้ายลงกระถามใหม่เพื่อทำการทดลอง

รูปที่ ข-5 อ้อยหลังจากการจำลองสภาวะแล้ง โดยงดให้น้ำ 2 สัปดาห์ โดยเรียงจากซ้ายไปขวา คืออ้อยในชุดควบคุมที่ใช้ดินในการปลูกโดยไม่ผสมวัสดุตรึง 2 ต้น, อ้อยในชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อผสมกับดินในการปลูก 2 ต้น, อ้อยในชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดกับดินในการปลูก 2 ต้น และอ้อยชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิดกับดินในการปลูก 2 ต้น

รูปที่ ข-6 รากอ้อยหลังจากการปลูกโดยจำลองสภาวะแล้ง

ตารางที่ ข-1 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 3 ชนิดในวัสดุตรึงแบบเดี่ยวและแบบผสม

	ปริมาณแบคทีเรีย ในสัปดาห์ที่ (CFU ต่อ วัสดุตรึง 1 กรัม)			
	0	1	2	4
ถ่านชีวภาพ	3.49×10^{6}	2.13×10^{11}	3.42×10^{9}	1.59×10^{10}
เถ้าลอย	4.83×10^{6}	1.10×10^{8}	1.95×10^{9}	1.61×10^{10}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม	2.47×10^{6}	1.44×10^{8}	3.58×10^{9}	1.21×10^{9}
ถ่านชีวภาพ+เถ้าลอย	5.88×10^{6}	6.63×10^{7}	8.09×10^{9}	8.53×10^{9}
ถ่านชีวภาพ+กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม	2.25×10^{9}	8.24×10^{9}	8.28×10^{9}	1.46×10^{10}
เถ้าลอย+กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม	1.14×10^{9}	7.07×10^{9}	5.41×10^{9}	6.34×10^{11}

ตารางที่ ข-2 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงแบบเดี่ยวและแบบผสม

	ปริมาณแบคทีเรีย ในสัปดาห์ที่ (CFU ต่อ วัสดุตรึง 1 กรัม)		
	0	1	2
ถ่านชีวภาพ	4.53×10^{7}	4.54×10^{10}	9.17×10^{9}
เถ้าลอย	4.23×10^{8}	7.47×10^{10}	9.26×10^{9}
กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม	4.11×10^{7}	4.82×10^{10}	1.14×10^{10}
ถ่านชีวภาพ+เถ้าลอย	8.73×10^{7}	3.80×10^{9}	1.83×10^{11}
ถ่านชีวภาพ+กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม	1.62×10^{8}	3.79×10^{10}	1.82×10^{10}
เถ้าลอย+กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม	1.02×10^{8}	1.43×10^{10}	1.60×10^{10}

ตารางที่ ข-3 การเจริญของอ้อยก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยวัดจากความยาวของลำต้น, จำนวนใบ และความยาวใบ ในชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิด และชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด

	ต้นที่	ความยาวลำต้น	จำนวนใบ	ความยาวใบ					ค่าเฉลี่ยความยาวใบ
ชุดควบคุม	1	9.9	5	9.8	38.2	62.5	68	32.8	42.3
	2	8.4	5	10.7	59.5	39.7	57.6	25.0	38.5
	3	10.7	4	25.3	54.5	55.1	32.7		41.9
	4	9.8	4	69.2	41.7	76.0	33.3		55.1
	5	10	4	38.3	59.1	63.0	35.7		49.0
วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ	1	8.7	4	53.4	70.9	73.4	25.4		55.8
	2	9.2	5	10.7	40.6	50.5	47.1	10.1	31.8
	3	10.2	4	7.2	34.4	57.1	60.2		39.8
	4	11.8	4	63.2	41.3	60.8	37.2		50.6
	5	9	4	34.5	61.4	57.2	32.5		46.4
เชื้อผสม 3 ชนิด	1	6.8	5	18.0	60.2	42.3	61.1	12.9	38.9
	2	7.3	3	50.5	64	67.3			60.6
	3	10.8	5	50.5	19.8	62.8	69.9	18.2	44.2
	4	9.5	4	46.2	69.8	67.6	44.0		56.9
	5	9.4	5	8.5	35.5	46.6	47.7	31.4	33.9
	6	10.3	5	45.5	11.8	48.0	49.0	13.5	33.6
เชื้อผสม 4 ชนิด	1	11.7	4	33.7	60.8	65.0	17.6		44.3
	2	8.2	5	18.5	50.1	53.3	58.6	12.0	38.5
	3	8.4	5	16.3	51.1	66.4	63.0	21.6	43.7
	4	9.1	5	10.1	60.2	79.3	75.1	23.3	49.6
	5	12.1	5	6.7	37.5	57.5	54.6	38.8	39.0
	6	11.8	4	55.0	25.8	54.2	30.0		41.3

ตารางที่ ข-4 การเจริญของอ้อยหลังให้น้ำติดต่อกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยวัดจากความยาวของลำต้น, จำนวนใบ และความยาวใบ ในชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด

	ต้นที่	ความยาวลำต้น	จำนวนใบ	ความยาวใบ								ค่าเฉลี่ยความยาวใบ
ชุดควบคุม	1	13.3	8.0	10.1	38.4	62.0	67.9	66.3	70.4	55.1	29.4	50.0
	2	13.8	7.0	10.7	61.4	40.0	62.4	62.6	56.1	46.7		48.6
	3	14.7	7.0	60.4	25.3	59.5	56.6	62.1	58.2	42.0		52.0
	4	14.0	7.0	70.9	42.4	76.1	58.1	64.8	50.4	29.4		56.0
	5	11.5	6.0	64.2	38.3	69.4	73.0	53.0	39.5			56.2
วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ	1	11.4	6.0	54.1	74.8	83.9	69.2	43.4	28.6			59.0
	2	10.3	7.0	57.3	10.5	40.1	56.3	48.5	33.2	19.7		37.9
	3	13.8	7.0	7.8	60.8	34.5	66.7	63.2	57.6	46.7		48.2
	4	13.2	6.0	67.1	41.9	72.7	81.7	36.9	22.0			53.7
	5	12.3	5.0	67.0	68.8	63.7	43.2	33.2				55.2
เชื้อผสม 3 ชนิด	1	8.1	7.0	64.0	42.2	66.6	43.7	51.2	40.6	19.4		46.8
	2	11.2	6.0	51.0	64.3	68.9	50.1	44.3	35.5			52.4
	3	14.1	8.0	50.3	68.5	19.8	60.1	54.3	54.5	43.7	22.0	46.7
	4	15.3	7.0	73.2	45.9	75.6	76.5	57.9	46.4	23.5		57.0
	5	12.8	6.0	51.6	35.6	52.1	49.9	31.5	23.9			40.8
	6	10.6	7.0	46.6	11.5	53.7	58.1	63.0	49.2	32.7		45.0
เชื้อผสม 4 ชนิด	1	12.0	7.0	64.0	33.2	67.6	19.1	66.4	53.0	29.9		47.6
	2	15.0	7.0	49.7	18.4	60.9	60.5	55.5	61.7	42.7		49.9
	3	11.1	7.0	50.9	16.2	66.2	73.2	67.7	45.5	33.6		50.5
	4	13.5	6.0	60.2	82.3	86.9	73.0	46.3	28.6			62.9
	5	12.2	6.0	36.1	58.4	63.4	67.9	33.2	27.5			47.8
	6	12.5	6.0	59.1	26.5	71.6	69.7	49.7	35.8			52.1

ตารางที่ ข-5 การเจริญของอ้อยหลังงดให้น้ำเพื่อจำลองสภาะวแล้งติดต่อกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยวัดจากความยาวของลำต้น, จำนวนใบ และความยาวใบ ในชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด

	ต้นที่	ความยาวลำต้น	จำนวนใบ	ความยาวใบ							ค่าเฉลี่ยความยาวใบ
ชุดควบคุม	1	14.0	0.0								
	2	14.4	3.0	75.2	67.4	44.5					62.4
	3	17.0	3.0	62.0	72.4	57.0					63.8
	4	16.2	6.0	75.0	75.8	57.5	70.6	91.8	67.2		73.0
	5	13.8	7.0	38.1	64.6	70.1	72.8	80.8	73.9	44.4	63.5
วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ	1	13.6	2.0	69.2	57.0						63.1
	2	11.7	7.0	57.0	10.5	39.8	56.2	52.7	61.5	47.9	46.5
	3	15.0	6.0	60.4	66.6	63.2	76.7	69.2	38.2		62.4
	4	17.5	7.0	68.8	41.5	72.3	81.7	72.5	57.7	32.5	61.0
	5	13.1	6.0	66.9	68.9	63.8	72.0	69.3	43.6		64.1
เชื้อผสม 3 ชนิด	1	11.0	7.0	63.8	41.8	66.9	43.0	69.8	75.9	53.0	59.2
	2	13.8	7.0	68.0	50.2	69.0	50.0	77.0	67.2	35.9	59.6
	3	15.0	3.0	72.2	62.8	39.2					58.1
	4	15.5	7.0	73.0	75.6	75.3	76.2	79.2	79.1	53.6	73.1
	5	13.2	6.0	51.7	35.6	51.9	50.3	34.5	26.5		41.8
	6	13.0	7.0	16.5	53.8	57.5	62.7	81.0	63.9	22.8	51.2
เชื้อผสม 4 ชนิด	1	15.0	7.0	64.5	71.8	19.0	70.3	85.4	60.3	29.4	57.2
	2	17.0	7.0	49.4	61.2	60.0	55.6	89.5	78.7	48.2	63.2
	3	12.5	7.0	71.3	51.2	72.7	67.2	75.5	62.8	31.8	61.8
	4	14.3	4.0	82.1	78.8	72.6	72.3				76.5
	5	17.2	7.0	64.1	36.8	63.8	67.9	60.0	54.4	36.0	54.7
	6	16.6	5.0	59.2	71.7	69.9	75.2	61.0			67.4

ตารางที่ ข-6 ความยาวของรากอ้อย ในชุดควบคุม, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ, ชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 3 ชนิดและชุดการทดลองที่ใช้วัสดุตรึงที่มีเชื้อผสม 4 ชนิด

	ความยาวราก						ค่าเฉลี่ยความยาวราก
ชุดควบคุม	36.2	29.3	41.3	37.5	26.4		34.1
วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ	29.0	26.3	27.0	30.2	16.0		25.7
เชื้อผสม 3 ชนิด	27.5	16.0	26.0	43.5	66.4	36.6	36.0
เชื้อผสม 4 ชนิด	29.4	31.2	23.1	32.0	34.4	42.6	32.1

ตารางที่ ข-7 จำนวนแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวราก โดยใช้วิธี MPN ในอาหาร TSB เพื่อดูปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

	จำนวนแบคทีเรีย (MPN ต่อราก 1 กรัม)						ค่าเฉลี่ย
ชุดควบคุม	7.5×10^{8}	4.6×10^{8}	1.5×10^{8}	4.6×10^{8}	1.1×10^{9}		8.5×10^{8}
วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ	1.1×10^{9}	9.3×10^{8}	4.6×10^{9}	2.4×10^{9}	4.6×10^{8}		1.9×10^{9}
เชื้อผสม 3 ชนิด	1.1×10^{9}	2.4×10^{9}	2.4×10^{9}	2.4×10^{9}	7.5×10^{9}	1.1×10^{10}	4.5×10^{9}
เชื้อผสม 4 ชนิด	1.1×10^{9}	2.4×10^{9}	1.5×10^{9}	4.6×10^{9}	1.5×10^{9}		2.2×10^{9}

ตารางที่ ข-8 จำนวนแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวราก โดยใช้วิธี MPN ในอาหาร TSB ที่ใส่ PEG 20% เพื่อดูปริมาณแบคทีเรียทนแล้ง

	จำนวนแบคทีเรีย (MPN ต่อราก 1 กรัม)						ค่าเฉลี่ย
ชุดควบคุม	2.4×10^{8}	1.2×10^{9}	4.6×10^{8}	2.4×10^{8}	1.1×10^{9}		6.5×10^{8}
วัสดุตรึงที่ไม่มีเชื้อ	1.1×10^{9}	1.1×10^{9}	1.1×10^{9}	2.4×10^{9}	2.4×10^{9}		1.6×10^{9}
เชื้อผสม 3 ชนิด	1.5×10^{9}	4.6×10^{8}	2.1×10^{8}	1.1×10^{9}	4.6×10^{8}	4.6×10^{8}	7.0×10^{8}
เชื้อผสม 4 ชนิด	2.4×10^{9}	1.5×10^{9}	4.6×10^{9}	3.8×10^{9}			3.1×10^{9}