ผลงานเรื่องที่ 2

ผลงานฉบับเต็ม

เรื่อง

วิจัยรูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกให้มีประสิทธิภาพเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตพืช

Research on formulation of microbial producing 5 - aminolevulinic acid for growth and yield of plant

ของ

นางนวลจันทร์ ชะบา

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ ตำแหน่งเลขที่ 7
กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน
กรมพัฒนาที่ดิน

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรเชี่ยวชาญ
ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน ตำแหน่งเลขที่ 7
กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน
กรมพัฒนาที่ดิน
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (ก)

สารบัญตาราง (ข)

สารบัญภาพ (ค)

สารบัญตารางภาคผนวก (ง)

บทคัดย่อ 1

Abstract 2

คำนำ 3

วัตถุประสงค์ 4

การตรวจเอกสาร 4

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ 19

วิธีดำเนินการ 19

อุปกรณ์ 19

วิธีการ 20

แผนผังวิธีการดำเนินงานวิจัย 34

ผลการทดลองและวิจารณ์ 35

สรุปผลการทดลอง 71

ข้อเสนอแนะ 72

ประโยชน์ที่ได้รับ 72

เอกสารอ้างอิง 73

ภาคผนวก 87

- ภาคผนวก ก 88
- ภาคผนวก ข 88
- ภาคผนวก ค 88
- ตารางภาคผนวก 90

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 สมบัติของวัสดุอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ 25

2 สมบัติของวัสดุที่ใช้ในการขยายเชื้อผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 26

3 จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แยกจากดินบริเวณรอบรากข้าว 35

4 ประสิทธิภาพการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg l^{-1}) ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของ L - alanine และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 37

5 ประสิทธิภาพการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 10 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ glutamic acid 10 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น 38

6 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แบคทีเรียผลิตได้ในอาหารเหลว King’s B medium ที่ใช้ L - alanine 15 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น 40

7 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แบคทีเรียผลิตได้ในอาหารเหลว Sistrom’s minimal media เป็นเวลา 10 วัน ที่ใช้ glutamic acid 10 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น 42

8 ความสูงและความยาวรากของข้าวปทุมธานี 1 และขาวดอกมะลิ 105 ที่อายุ 7 วัน จากการใส่แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในสภาพห้องปฏิบัติการ 45

9 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (cfu ml^{-1}) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างกัน 47

10 สมบัติทางเคมีของดินก่อนและหลังการทดลองในสภาพโรงเรือนกระจก 60

11 ความสูง และจำนวนต้นต่อกอของข้าวในสภาพโรงเรือนกระจก 62

12 เมล็ดดีต่อรวง เมล็ดลีบต่อรวง และผลผลิตข้าวในสภาพโรงเรือนกระจก 64

13 สมบัติทางเคมีของดินหลังการทดลองในสภาพแปลงทดลอง 66

14 ความสูง และจำนวนต้นต่อกอของข้าวในสภาพแปลงทดลอง 68

15 เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวง เมล็ดลีบต่อรวง และผลผลิตข้าวในสภาพแปลงทดลอง 70

16 ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจจากการปลูกข้าว 71

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 แสดงสูตรโครงสร้างของ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (Donnelly *et al*., 2006) 4

2 การสังเคราะห์ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยกระบวนการทางเคมีจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ (Sasaki *et al*., 2002) 7

3 กระบวนการสังเคราะห์ กรด 5 - อะมิลีวูลินิก โดยวิถี C4 (a) และ C5 (b) (Sasaki *et al*., 2002) 9

4 สูตรโครงสร้างกรด 5 - aminolevulinic acid hydrochloride (Donnelly *et al*.,2007) 10

5 ขั้นตอนการผลิตกรด 5 - aminolevulinic acid hydrochloride (Okada *et al*., 2012) 10

6 แสดงระยะปลูก พื้นที่เก็บข้อมูล และพื้นที่เก็บเกี่ยวข้าวในแต่ละแปลงย่อย 33

7 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แบคทีเรียผลิตได้ในอาหารเหลว King’s B medium ที่ใช้ L - alanine 15 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น 41

8 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แบคทีเรียผลิตได้ในอาหารเหลว Sistrom’s minimal media เป็นเวลา 10 วัน ที่ใช้ glutamic acid 10 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น 43

9 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างกัน 47

10 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 49

11 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 50

12 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 52

13 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 53

14 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 54

15 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 55

16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อ 1 - 10 วัน 57

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ **หน้า**

1 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (log no. g^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 90
2 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg kg^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 91
3 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (log no. g^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 92
4 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg kg^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 93
5 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (log no. g^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 94
6 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg kg^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 95
7 ระดับความรุนแรงของความเป็นกรดเป็นด่างของดิน (pH, ดิน : น้ำ = 1:1) 96
8 ระดับอินทรียวัตถุในดิน (soil organic matter) 96
9 ระดับธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน 96
10 การวิเคราะห์ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของข้าวแต่ละตำรับการทดลอง 97

วิจัยรูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกให้มีประสิทธิภาพเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตพืช

นวลจันทร์ ชะบา   จันจิรา แสงสีเหลือง   พนิดา ปรีเปรมโมทย์
กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ศึกษาวัสดุรองรับและวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก และผลของจุลินทรีย์ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตข้าว ดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนกระจก กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน และแปลงเกษตรกรปลูกข้าว จังหวัดกาญจนบุรี ดำเนินการในชุดดินเดิมบาง ปลูกข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ระหว่างปี 2558 - 2560 โดยการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของข้าวในห้องปฏิบัติการ ศึกษาวัสดุรองรับในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ วิธีการขยายเชื้อจุลินทรีย์ อัตราการใช้ในโรงเรือนและแปลงทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) 6 ตำรับการทดลอง 3 ซ้ำ ประกอบด้วย ตำรับที่ 1 ควบคุม ตำรับที่ 2 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน ตำรับที่ 3 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน และปูนโดโลไมท์ ตำรับที่ 4 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ตำรับที่ 5 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ และโดโลไมท์ ตำรับที่ 6 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปูนโดโลไมท์ และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน ผลการทดลอง พบว่า จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวในพื้นที่ปลูกข้าวจาก 14 จังหวัด จำนวน 149 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน ได้ 35 ไอโซเลต แบคทีเรียสังเคราะห์แสง 25 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน 10 ไอโซเลต มีการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด 12.81 - 36.07 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ L - alanine เป็นสารตั้งต้น และคัดเลือกแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต ที่มีผลทำให้การเจริญเติบโตของข้าวสูงสุดในการทดลองในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Pseudomonas putida* KBRN 7/1 ทำให้ความสูงและความยาวของรากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพิ่มขึ้น 13.27 และ 23.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ *Bacillus thuringiensis* KBRN 9/3 ทำให้ความสูงและความยาวรากข้าวปทุมธานี 1 เพิ่มขึ้น 22.55 และ 21.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วัสดุรองรับในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ ได้แก่ อัลจิเนต ปุ๋ยหมัก พีทมอส เพอร์ไลต์ และภูไมท์ วิธีการขยายเชื้อจากผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โดยใช้ปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัม รำข้าว 3 กิโลกรัม ขยายเชื้อ 2 วัน ได้ปริมาณเชื้อ 9.04 log no. ต่อกรัม และอัตราการใช้ 300 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับการใช้ปูนโดโลไมท์ และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน มีผลทำให้ผลผลิตข้าวสุพรรณบุรี 1 สูงสุด เฉลี่ย 1,099 กิโลกรัมต่อไร่ เพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 17.54 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ 4,336.5 บาทต่อไร่ เพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 9.65 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ สารเสริมการเจริญเติบโตของพืช ข้าว
ทะเบียนวิจัย : 59 - 60 - 17 - 09 - 020001 - 005 - 105 - 13 - 23

Research on formulation of microbial producing 5 - aminolevulinic acid for growth and yield of plant

Nuanjun Chaba Junjira saengsileung Panida Prepremmote
Soil Biotechnology Division Land Development Department

Abstract

The objectives of this research were to select effective microorganisms producing 5 - aminolevulinic acid (5 - ALA), study on carriers for microbial product and their effect on rice growth and yield. The experiments were conducted during 2015 - 2017 in Laboratory and green house at Soil Biotechnology Division, Land Development Department. Field experiment was conducted at rice plantation area in Kanchanaburi province on Doem bang soil series (Db) and Suphanburi 1 rice variety. The field experiment was a randomized completely block design with 3 replications of 6 treatments including 1) control 2) chemical fertilizers based on soil fertility analysis 3) chemical fertilizers based on soil fertility analysis with dolomite 4) 5 - ALA producing bacteria at the rate of 300 kg per rai 5) 5 - ALA producing bacteria at the rate of 300 kg per rai with dolomite 6) 5 - ALA producing bacteria at the rate of 300 kg per rai with dolomite and a haft rate of chemical fertilizers based on soil fertility analysis. 149 soil samples were collected from paddy field of 14 provinces for isolation and selection bacterial. 35 isolates of aerobic bacteria and 25 isolates of photosynthetic bacteria were selected. Then 10 isolates were selected for studying the rice growth in laboratory according to the quantity of 5 - ALA production. They were 12.81 - 36.07 mg l^{-1}. The result found that *Pseudomonas putida* KBRN 7/1 performed the highest the height and root length of Khao Dawk Mali 105 rice variety. The percentage of increasing was 13.27 and 23.13 % respectively. While *Bacillus thuringiensis* KBRN 9/3 was 22.55 and 21.55 % in Pathum Thani 1 rice varirty, respectively. In addition, the carrier for microbial production were alginate, compost, peat moss, perlite and pumice. 300 kg of compost and 3 kg of rice brand were used for increasing microbial population from microbial product. The microbial population was reached to 9.04 log no. g^{-1} for 2 days of cultivation periods. Finally the result in field experiment showed that using 300 kg per rai of microbial with dolomite and a haft rate of chemical fertilizers based on soil fertility analysis had the highest growth and yield of Suphanburi 1 rice variety. The average yield was 1,099 kg per rai and increased from control 17.54 %. Moreover net income was 4,336.5 baht per rai and increased from control 9.65 %

Keywords **:** 5 - Aminolevulinic acid, Microbial product, Plant growth regulating substance, Rice
Research registration number : 59 - 60 - 17 - 09 - 020001 - 005 - 105 - 13 - 23

คำนำ

กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (5 - aminolevulinic acid หรือ ALA) เป็นกรดอะมิโนชนิดที่ไม่ใช่ส่วนประกอบของโปรตีน (non - protein amino acids) ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม พบได้ทั้งในพืช สัตว์ รา และแบคทีเรีย โดยเป็นสารตั้งต้นชนิดหนึ่งในการสังเคราะห์สารประกอบเตตราไพโรล (tetrapyrrole) ซึ่งประกอบด้วย ฮีม คลอโรฟิลล์ และวิตามินบี 12 ในสิ่งมีชีวิต (Sasaki *et al.,* 2002; Akram and Ashraf, 2013) โดยกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulating substance) (Seiji and Murooka, 2001) รวมทั้งเป็นสารชีวภาพที่ไม่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม (Rebeiz *et al*., 1984; Rebeiz *et al*., 1988) เนื่องจากจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตพืช โดยมีความสำคัญต่อสรีระวิทยาของพืช กระบวนการหายใจ กระบวนการสังเคราะห์แสง กระตุ้นการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาพที่มีแสง และกิจกรรมเมตาบอลิซึมต่างๆ (Zhang *et al.,* 2015) ดังนั้นจึงมีความสำคัญต่อการผลิตพืช นอกจากนี้การใช้สารดังกล่าวในการปลูกพืชในสภาวะความเครียดที่เกิดจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม (abiotic stress) เช่น สภาวะอุณหภูมิต่ำ ความเค็ม และความแห้งแล้งนั้น กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะช่วยทำให้พืชสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตในสภาวะดังกล่าวได้ (Korkmaz, 2012) สำหรับการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งจากกระบวนการทางเคมีและชีวภาพ โดยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เป็นการผลิตแบบอุตสาหกรรมจึงทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง แต่ผลผลิตที่ได้ต่ำ และต้องมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส (Seiji and Murooka, 2001) สำหรับการสังเคราะห์ทางชีวภาพ เป็นกระบวนการผลิตโดยจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีการที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยให้เหมาะสมในการผลิต และใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้น โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ ได้แก่ สาหร่าย เช่น *Agmemnellum quadruplicatum* และ *Cyanidium caldarium* แบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น *Anacystis nidulans Rhodobacter sphaeroides* และ *Chlorobium limicola* แบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการออกซิเดชั่นของสารเคมี (chemotrophic) เช่น *Pseudomonas riboflavin Propionicbacterium shermanii Clostridium thermoaceticum Methanosarcina barkeri* และ *Methanobacterium thermoautotrophicum* เป็นต้น (Tangprasittipap and Prasertsan, 2002) การนำกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกมาใช้ประโยชน์ในการผลิตพืชนั้น พบว่าการใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำจะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตพืช (Pfalz and Anwar, 1984) ช่วยในการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์ และการสังเคราะห์แสงในพืชหลายชนิด เช่น แตงกวา (Zhen *et al.,* 2012) มะเขือเทศ (Zhang *et al*., 2015) ทานตะวัน (Akram *et al.,* 2012) ผักกาดขาว (Naeem *et al.,* 2010) มันฝรั่ง (Zhang *et al.,* 2006) และ ข้าว (Nunkaew *et al.,* 2014) เป็นต้น ซึ่งจากการฉีดพ่นกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกความเข้มข้นต่ำกว่า 1.8 มิลลิโมลาร์ และการใช้ในการแช่รากพืชโดยใช้ความเข้มข้น 0.06 มิลลิโมลาร์ จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตพืชไร่และพืชผักหลายชนิด (Hotta *et al*., 1997) การใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแปลงเพาะกล้าข้าวในสภาพอุณหภูมิต่ำ คือ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน มีผลทำให้ต้นกล้าข้าวสามารถเจริญเติบโตมีชีวิตรอดในเวลา 30 วัน ได้ 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับควบคุม ข้าวสามารถเจริญมีชีวิตรอดได้เพียง 65 เปอร์เซ็นต์ (Hotta *et al*., 1998) แต่ถ้าใช้ในสภาวะที่ไม่มีแสงจะทำให้ยับยั้งอัตราการหายใจ และการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของพืช (Hotta *et al.,* 1997) อย่างไรก็ตามการวิจัยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำไปส่งเสริมและถ่ายทอดสู่เกษตรกรเพื่อใช้เป็นปัจจัยการผลิตนั้นจำเป็นจะต้องมีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้ง่าย และยังคงมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมาะสม รวมทั้งรักษาประสิทธิภาพของ

จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ด้วย ซึ่งการเลือกใช้วัสดุรองรับจุลินทรีย์ และวิธีการผลิตที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการมีชีวิตรอด และประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ ดังนั้นจากสมบัติของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยเฉพาะทางด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตพืชจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกร เนื่องจากปัจจุบันเกษตรกรและผู้บริโภคได้ให้ความสนใจในเรื่องการผลิตและการบริโภคอาหารปลอดภัย การเลือกใช้ปัจจัยการผลิตที่เป็นสารอินทรีย์และจุลินทรีย์ถือเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตอาหารปลอดภัย ซึ่งการวิจัยคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตพืช โดยเฉพาะการนำไปใช้ประโยชน์ในการปลูกข้าว ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย จึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการผลิตพืชของประเทศไทย

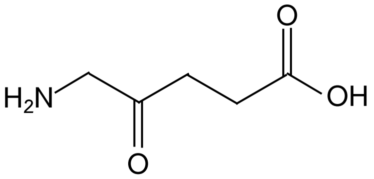
วัตถุประสงค์

1) เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก
2) ศึกษาวัสดุรองรับและวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก
3) ศึกษาผลของจุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโต และผลผลิตข้าว

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

กรด 5 อะมิโนลีวูลินิก หรือกรดเดลต้า - อะมิโนลีวูลินิก หรือกรดเดลต้า - อะมิโนลีวูลิเนต หรือกรด 5 - อะมิโน - 4 - ออกโซเพนทาโนอิก เป็นกรดอะมิโนคีโต (aminoketo acid) ที่ไม่เป็นส่วนประกอบของโปรตีน มีจำนวนคาร์บอน 5 อะตอม มีน้ำหนักโมเลกุล 131.13 กรัมต่อโมล และมีสูตรทางเคมี คือ $C_5H_9NO_3$ มีค่าคงที่ของการแตกตัว pKa1 เท่ากับ 3.90 และค่า pKa2 เท่ากับ 8.05 (Novo *et al.*, 1996) ละลายน้ำได้ ความเสถียรของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในสารละลายขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ความเป็นกรดเป็นด่าง ความเข้มข้น อุณหภูมิ และระดับออกซิเจนในสารละลาย (Bunke *et al.,* 2000; De Blois *et al.,* 2002; Donnelly *et al*., 2007)



ภาพที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (Donnelly *et al*., 2006)

กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกเป็นสารตั้งต้นชนิดหนึ่งในการสังเคราะห์สารประกอบเตตราไพโรล (tetrapyrrole) ที่ประกอบด้วย ฮีม คลอโรฟิลล์ และวิตามินบี 12 พบได้ทั้งในพืช สัตว์ สาหร่าย และแบคทีเรีย (Akram and Ashraf, 2013) โดยมีการค้นพบครั้งแรกในเลือดของเป็ด (Shemin and Russell, 1953) ต่อมาตรวจวิเคราะห์พบ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในอาหารที่มีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* (Beale, 1970) และพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิต กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ เช่น *Rhodobacter* (Kars and Ceylan, 2013) *P. riboflawin C. thermoaceticum* และ *M. berkeri* เป็นต้น (Sasaki and Larcher, 1987*)* ซึ่งกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีการศึกษาการใช้ประโยชน์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าว (Nguyen *et al.,* 2016)

ไม้ผล และพืชผัก เป็นต้น (Sun *et al*., 2017) รวมทั้งในปัจจุบันนี้ยังมีการศึกษาการใช้ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก เป็นสารกำจัดวัชพืชและแมลงศัตรูพืชด้วย (Xu *et al*., 2015; Yang *et al*., 2011) นอกจากนี้ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ยังช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชที่ปลูกในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ที่ส่งผลทำให้พืชเกิดสภาวะความเครียดทั้งสภาวะที่มีความเค็ม แห้งแล้ง และอุณหภูมิสูงหรือต่ำมาก (Kosar *et al*., 2015) โดยพบว่าเมื่อใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในสภาวะดังกล่าวจะส่งผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของพืช เช่น กระบวนการสังเคราะห์แสง กระตุ้นการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาพมีแสง การสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ช่วยในการดูดใช้ธาตุอาหารของพืช การสังเคราะห์โปรตีน ควบคุมความสมดุลของแรงดันออสโมติก รวมทั้งเป็นสารที่มีสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (Sasikala *et al*., 1994; Wu *et al*., 2018) โดยบทบาทของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นวิถีที่ต้องมีการควบคุมอย่างมาก ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เกิดจากการเปลี่ยนรูปของ protochlorophyllidae ไปเป็น chlorophyll a เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นเมื่อมีแสง เมื่อใบพืชได้รับแสง protochlorophyllidae จะเปลี่ยนไปเป็น chlorophyllidae a อย่างรวดเร็วจนหมด และพืชจะสร้าง protochlorophyllidae ขึ้นมาใหม่ ใบพืชที่ถูกแสงจึงเปลี่ยนเป็นสีเขียว แต่ถ้ามี protochlorophyllidae เหลืออยู่ทำให้การสังเคราะห์หยุดลง ซึ่ง protochlorophyllidae จะไปยับยั้งปฏิกิริยาการสร้าง กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก แต่ถ้ามีการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกกับพืช ทำให้พืชสามารถสังเคราะห์ protochlorophyllidae ขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง จึงส่งผลต่อการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Mohr and Schopfer, 1995)

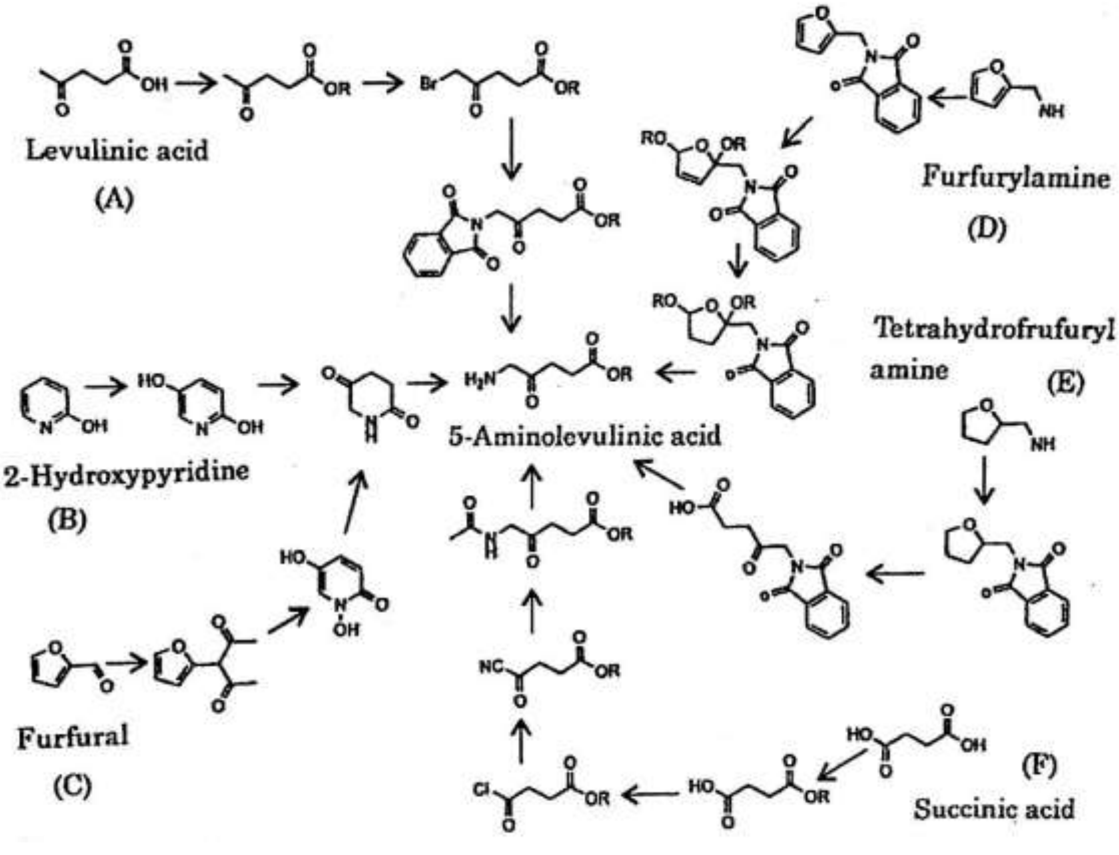
การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในการผลิตพืชนั้น มีรายงานการใช้ประโยชน์ในหลายรูปแบบ เช่น การแช่ราก การแช่เมล็ด และการฉีดพ่น เป็นต้น จากการศึกษาของ Hotta *et al*. (1997) พบว่า การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ที่ระดับความเข้มข้น 0.06 - 6 มิลลิโมลาร์ ในการแช่รากของต้นกล้าข้าว มีผลทำให้ต้นกล้าข้าวมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในสภาวะมีแสง และเมื่อใช้ในพลูด่าง พบว่า ความเข้มข้น 0.06 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้การสะสมของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น สำหรับการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในการแช่เมล็ดพืชนั้น มีรายงานการศึกษาของ Roy *et al*. (1998) พบว่า การแช่เมล็ดถั่วก่อนนำไปปลูก มีผลทำให้การเจริญเติบโต จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น รวมทั้งน้ำหนักแห้งของใบ ลำต้น ฝัก และปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก แบบฉีดพ่นลงบนใบผักกาดที่ระดับความเข้มข้น 0.06 0.18 0.6 และ 1.8 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของรากเพิ่มขึ้น การฉีดพ่นที่ระดับความเข้มข้น 0.18 และ 0.6 มิลลิโมลาร์ ช่วยเพิ่มการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และลดการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะมีแสง และการฉีดพ่นที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 0.06 มิลลิโมลาร์ ช่วยเพิ่มการเจริญและผลผลิตของถั่วแดง ข้าวบาร์เลย์ มันฝรั่ง และกระเทียม 10 - 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับควบคุม (Hotta *et al*., 1989) รวมทั้งการฉีดพ่นที่ระดับความเข้มข้น 0.05 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่ใบข้าวผลทำให้น้ำหนักแห้งเหนือดินเพิ่มขึ้น 7 - 28 เปอร์เซ็นต์ (Kuk *et al*., 2003) ดังนั้นระดับความเข้มข้นของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่เหมาะสมจึงส่งผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เช่น ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ราก 0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ การฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 10 - 100 กรัมต่อพื้นที่ประมาณ 25 ไร่ จะช่วยให้พืช ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่วแดง และหัวผักกาด มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 110 - 150 เปอร์เซ็นต์ (Virgon and McEwen, 1995) สำหรับในประเทศไทยส่วนใหญ่จะมีการศึกษาวิจัยการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในข้าวโดยจะมีการเปรียบเทียบความเข้มข้น และวิธีการใช้ เช่น การศึกษาของ พรพิมล และ วัฒนาลัย (2554) คัดเลือกแบคทีเรีย *Propionicacidbacteria* (PAB) ที่ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก และศึกษาผลของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจากแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโต

ในข้าวหอมปทุมธานี 1 และขาวดอกมะลิ 105 พบว่า *P. acidipropionici* TISTR442 สามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 43.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำไปทดสอบการงอกของเมล็ดข้าว พบว่า การรดน้ำผสมกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นข้าวทำให้ข้าวปทุมธานี 1 และขาวดอกมะลิ105 มีความสูงเพิ่มขึ้น 101.18 และ 139.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อใช้ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเพิ่มการเจริญเติบโตของต้น ราก และจำนวนรากของข้าวปทุมธานี 1 ได้ 52.17 90.67 และ 93.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพิ่มขึ้น 83.54 157.97 และ 193.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการศึกษาของกัญญารัตน์ และคณะ (2557) เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 0.01 0.10 และ 1.00 ไมโครโมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของข้าวขาวหอมมะลิ 105 โดยการฉีดพ่นทางใบ ส่งผลให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งการใช้แบบฉีดพ่นยังมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นด้วย สำหรับการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หรือชีวภัณฑ์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยนั้นมีรายงานสิ่งประดิษฐ์ชีวภัณฑ์ 5 - อะมิโนลีวูลินิก ไฟว์อะล่า สำหรับเร่งการเจริญเติบโตของพืช เช่น พืชไร่ ข้าว ไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชผัก โดยจะช่วยเพิ่มผลผลิตพืช ลดต้นทุน และไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้ใช้และผู้บริโภค (สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, 2560) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานผลตอบแทนทางเศรษฐกิจจากการใช้ชีวภัณฑ์ดังกล่าว แต่มีรายงานผลตอบแทนทางเศรษฐกิจการศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียสังเคราะห์แสงผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในรูปของแข็งเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว ให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจในช่วง 11,838 - 12,202 บาทต่อไร่ (ดวงพร และ ธนวันต์, 2557) สำหรับในต่างประเทศมีผลิตภัณฑ์ที่มีการจำหน่ายเพื่อการค้าชื่อว่า PentakeepR - V ซึ่งสินค้าดังกล่าวผลิตโดยบริษัท Cosmo seiwa agriculture จำกัด ประเทศญี่ปุ่น เป็นประเทศแรกที่จัดจำหน่ายกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. sphearoides* โดยการใช้ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 - 0.08 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยในการขยายพันธุ์อินทะผาลัม (*Phoenix dactylifera* L.) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เจริญเติบโตได้เร็วขึ้น การผลิตสารสี และการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้มีการระบุว่ากรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ส่งเสริมการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ควบคุมการหายใจของพืชในเวลากลางคืน ช่วยขยายปากใบ ส่งเสริมให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่กดดันต่างๆ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณแสงที่พืชได้รับ และการสูญเสียน้ำจากความแห้งแล้ง เป็นต้น (พรพิมล และวัฒนาลัย, 2554; อังคณา และคณะ, 2561)

กระบวนการสังเคราะห์ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

กระบวนการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก แบ่งออกเป็น 2 กระบวนการ คือ การสังเคราะห์โดยกระบวนการทางเคมี และชีวภาพ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. กระบวนการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยกระบวนการทางเคมี จะใช้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ได้แก่ กรดลีวูลินิก (levulinic acid) ไฮดรอกซีไพริดีน (hydroxypyridine) เฟอร์ฟูรัล (furfural) เฟอร์ฟูรีลเอมีน (furfurylamine) เตตราไฮโดรเฟอร์ฟูรีลเอมีน (tetrahydrourfurylamine) และกรดซัคซินิก (succinic acid) ดังแสดงรายละเอียดในภาพที่ 2 ซึ่งการออกซิเดชั่นในสภาวะที่มีแสงของเฟอร์ฟูรีลเอมีน พบว่าเป็นวิธีการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลนิกที่สามารถปฏิบัติได้ดีกว่าการใช้สารตั้งต้นอื่นๆ ข้างต้น ถึงแม้ว่าการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นเป็นวิธีการที่ไม่ค่อยเป็นที่นิยมเนื่องจากต้นทุนสูง มีความยุ่งยาก มีกระบวนการผลิตหลายขั้นตอน และผลผลิตที่ได้ต่ำ (Miyachi *et al*., 1998)



ภาพที่ 2 การสังเคราะห์ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยกระบวนการทางเคมีจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ (Sasaki *et al.*, 2002)

2. กระบวนการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยกระบวนการทางชีวภาพ เป็นกระบวนการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยจุลินทรีย์ ซึ่งมีวิถีการสังเคราะห์ 2 วิถี (Avissar *et al.*, 1989) ได้แก่ วิถี C_4 (Shemin pathway) (Bradshaw *et al.,* 1993; Neidle and Kaplan, 1993) การสังเคราะห์อีกวิถีหนึ่ง คือ วิถี C_5 (Beale pathway) (Akram and Ashraf, 2013) ซึ่งมีกระบวนการสังเคราะห์ ดังนี้

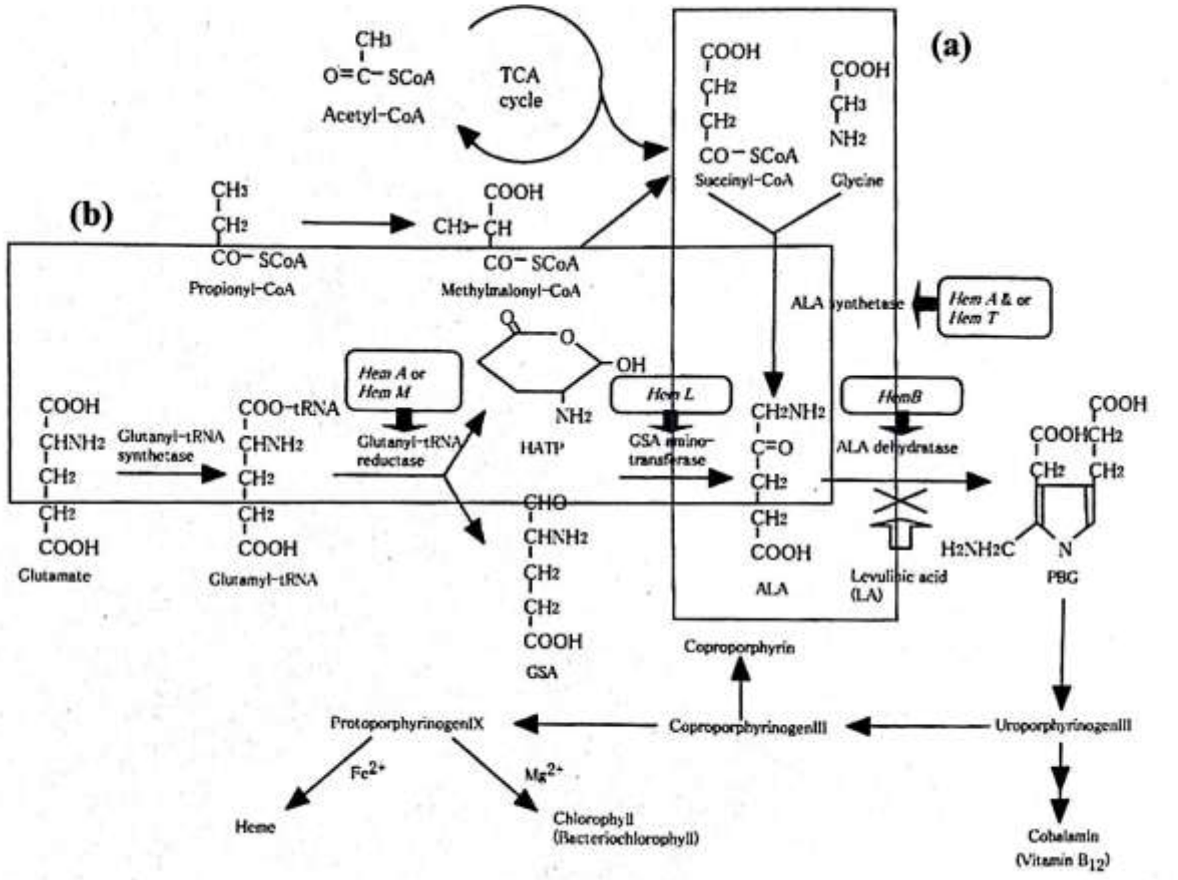
2.1 วิถี C_4 (Shemin pathway)

การสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในวิถี C_4 เป็นกระบวนการสังเคราะห์โดยใช้ซัคซินิวโคเอ (succinyl CoA) และไกลซีน (glycine) เป็นสารตั้งต้น และมีการทำงานของเอ็นไซม์ ALA synthetase (ALAS) และ ALA dehydratase (ALAD) ซึ่งมีขั้นตอนเริ่มต้นจากซัคซินิวโคเอ ซึ่งเป็นสารตัวกลางของวัฎจักรเครบทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนไกลซีนได้ alpha - amino - bata - ketoadipic acid ซึ่งเป็นสารไม่เสถียรจึงเปลี่ยนไปเป็นกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthetase ร่วมกับ pyridoxal phosphate ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ โดยกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ต้องการแสง จากนั้นกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะเปลี่ยนไปเป็น porphobilinogen (PBG) ซึ่งเป็นสารพวก monopyrrole โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ ALA dehydrogenase พร้อมกับสูญเสียน้ำออกไป 2 โมเลกุล ซึ่งจะได้วิตามินบี 12 ฮีม และคลอโรฟิลล์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นเมื่อสิ้นสุดกระบวนการ (Gibson *et al.*, 1958) (ภาพที่ 3) สำหรับกระบวนการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยวิถี C_4 นี้ส่วนใหญ่พบใน

ยีสต์ เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แบคทีเรีย โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียสีม่วงสังเคราะห์แสงที่ไม่ต้องการซัลเฟอร์ (purple non sulfur photosynthetic group) เช่น สกุล *Rhodobacter* และเชื้อรา

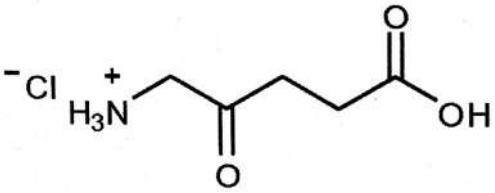
2.2 วิถี C_5 (Beale pathway)

การสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในวิถี C_5 เป็นกระบวนการสังเคราะห์โดยใช้กลูตาเมต (glutamate) เป็นสารตั้งต้น ขั้นตอนการสังเคราะห์เริ่มต้นจากใช้กลูตาเมต หรือ α - ketoglutamate เป็นสารตั้งต้นและเกิดปฏิกริยา 3 ขั้นตอน คือ ปฏิกิริยาขั้นแรกกลูตาเมตจับกับ tRNA โดยมีเอนไซม์ glutamate - $tRNA^{Glu}$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งมี ATP และ Mg^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ ปฏิกิริยาขั้นที่สอง glutamate - tRNA จะเปลี่ยนเป็น glutamate - semialdehyde (GSA) แบบเส้นตรงโดยอาศัยเอนไซม์ NADPH: Glu - tRNA (oxido) reductase หรือเปลี่ยนเป็น GSA แบบวงแหวน และปฏิกิริยาสุดท้าย GSA เปลี่ยนเป็น กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยเอนไซม์ GSA aminotransferase และ pyridoxal phosphate เป็นโคแฟคเตอร์ ซึ่งพบปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นที่ stroma ของ plasmid (Jahn *et al*., 1992) (ภาพที่ 3) สำหรับกระบวนการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยวิถี C_5 นี้จะพบในคลอโรพลาสต์ของพืชชั้นสูง สาหร่าย และแบคทีเรียต้องการอากาศ เช่น *P. riboflavin Baciilus subtilis Escherichia coli Salmonella typhimurium* และ *Propionibacterium* รวมทั้งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงบางชนิด เช่น *Rhodocyclus gelatinosus* และ *Chromatium vinosum* (Sasikala and Ramana, 1995) ซึ่งการนำแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ มาศึกษาเอนำไปใช้ประโยชน์ในการปลูกพืชนั้น เนื่องจากแบคทีเรียที่ต้องการอากาศจะสามารถใช้ได้ทั้งในสภาพพื้นที่ดอน และดินนาน้ำขัง และแบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกได้จะเป็นกลุ่มจุลินทรีย์เขตรากพืชหรือไรโซสเฟียร์ ซึ่งในสภาพการใช้ประโยชน์ในนาข้าวน้ำขังนั้นบริเวณเขตอิทธิพลรากพืชจะมีลักษณะเป็นดินที่มีออกซิเจนสัมผัสหรือชั้นออกซิไดส์ (oxidised layer) ชัดเจน แต่จะต่างจากดินที่ไม่มีออกซิเจนที่ห่างจากผิวรากออกไป ซึ่งการหายใจของรากข้าวจะใช้ออกซิเจนจากอากาศเหนือผิวน้ำที่เคลื่อนย้ายลงมาทางช่องอากาศของเนื้อเยื่อใบ และลำต้น ข้าวจึงเป็นพืชที่มีความสามารถในการนำออกซิเจนจากอากาศเหนือดินมายังบริเวณราก (วิภาวรรณ, 2558) ดังนั้นในดินนาน้ำขังจึงมีจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่อาศัยอยู่ ทั้งจุลินทรีย์ไม่ต้องการออกซิเจน จุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจน (Newton, 2007; Chen *et al*., 2009) ดังนั้นกระบวนการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในดินนาน้ำขังที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการอากาศ เช่น *Bacillus* และ *Pseudomonas* จึงเป็นวิถี C_5 อย่างไรก็ตามระดับออกซิเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกด้วย ซึ่งออกซิเจนมีผลอย่างยิ่งต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก เนื่องจากเป็นสิ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ ALA synthetase และการสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ ในสภาพที่มีออกซิเจน ดังนั้การควบคุมปริมาณออกซิเจนจึงมีความจำเป็นต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกให้ได้ในปริมาณสูง (Sasaki *et al*., 2002)

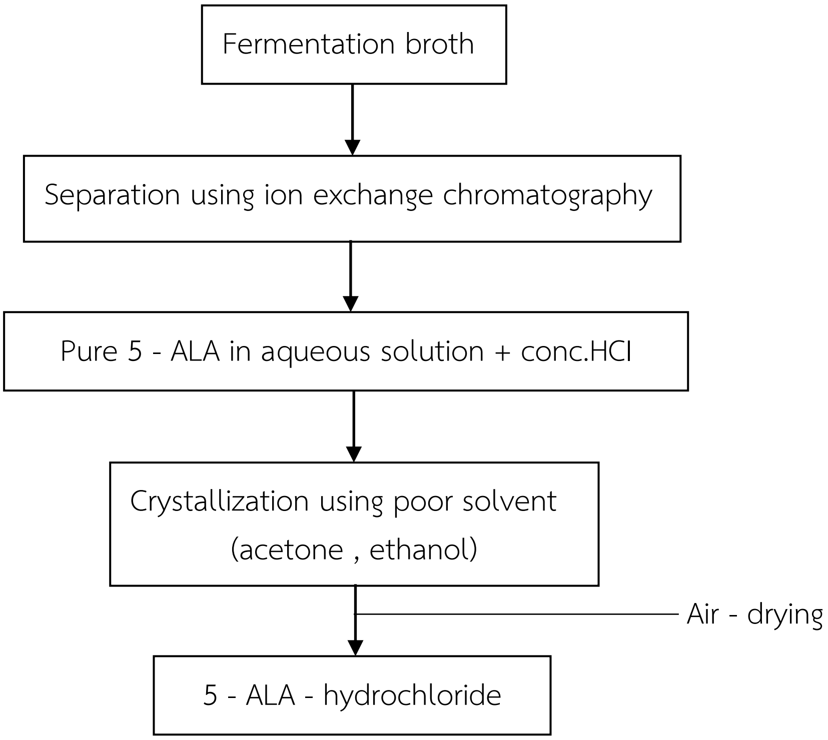

(a)
(b)
CH3
O=C−SCoA
Acetyl-CoA
TCA cycle
COOH
CH2
CH2
CO−SCoA
Succinyl-CoA
COOH
CH3
NH2
Glycine
CH3
CH2
CO−SCoA
Propionyl-CoA
COOH
CH3-CH
CO−SCoA
Methylmalonyl-CoA
ALA synthetase
Hem A & or Hem T
Hem A or Hem M
Glutamyl-tRNA reductase
O
OH
NH2
HATP
Hem L
GSA aminotransferase
HemB
ALA dehydratase
COOH
CHNH2
CH2
CH2
COOH
Glutamate
Glutamyl-tRNA synthetase
COO-tRNA
CHNH2
CH2
CH2
COOH
Glutamyl-tRNA
CHO
CHNH2
CH2
CH2
COOH
GSA
CH2NH2
C=O
CH2
CH2
COOH
ALA
Levulinic acid (LA)
COOH
COOH CH2
CH2 CH2
H2NH2C
N
PBG
Coproporphyrin
ProtoporphyrinogenIX
CoproporphyrinogenIII
UroporphyrinogenIII
Fe2+
Mg2+
Heme
Chlorophyll (Bacteriochlorophyll)
Cobalamin (Vitamin B12)

ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์ กรด 5 - อะมิลีวูลินิก โดยวิถี C_4 (a) และ C_5 (b) (Sasaki *et al*., 2002)

สำหรับการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกทางชีวภาพนั้น เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีต้นทุนไม่สูงเท่ากับวิธีสังเคราะห์ทางเคมี และสามารถควบคุมและพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้ได้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในปริมาณสูง จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจและมีการนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เชิงการค้า ซึ่งมีรายงานตั้งแต่ ปี 1998 โดยใช้แบคทีเรีย *R. sphaeroides* ซึ่งใช้ซัคซินิวโคเอ และไกลซีนเป็นสารตั้งต้น โดยการทำงานของเอ็นไซม์ ALA synthetase และมีรายงานพบว่าการเติมกรดลีวูลินิก ในสภาพที่มีอากาศ และแสง มีผลทำให้มีการผลิต กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้น (Nishikawa *et al*., 1999) แต่กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจากกระบวนการผลิตนี้จะมีการปนเปื้อนของแซ็กคาไรด์ โปรตีน กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และไอออนของโลหะในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Okada *et al.,* 2012) จึงต้องมีกระบวนการแยกกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกออกมาโดยใช้วิธี ion exchange chromatography และ capillary electrophoresis (Mauzerall and Granick, 1956) แล้วจะนำไปทำให้ตกผลึกและทำให้แห้ง ซึ่งการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในรูปแบบของแข็งนั้นจะอยู่ในรูปของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกไฮโดรคลอไรด์ (5 - aminolevulinic acid hydrochloride) (ภาพที่ 4) โดยการผสมคลอไรด์ไอออนเข้าไปในสารละลายกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ผ่านกระบวนการแยกให้บริสุทธิ์แล้ว โดยจะตกผลึกด้วยตัวทำละลาย เช่น เอทานอล และอะซีโตน หลังจากนั้นนำไปผึ่งให้แห้ง (air - drying) (Okada *et al.,* 2012) รายละเอียดดังภาพที่ 5



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างกรด 5 - aminolevulinic acid hydrochloride (Donnelly *et al.*,2007)



Fermentation broth
Separation using ion exchange chromatography
Pure 5 - ALA in aqueous solution + conc.HCl
Crystallization using poor solvent (acetone , ethanol)
Air - drying
5 - ALA - hydrochloride

ภาพที่ 5 ขั้นตอนการผลิตกรด 5 - aminolevulinic acid hydrochloride (Okada *et al.*, 2012)

จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

การผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยจุลินทรีย์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ซึ่งในการเลี้ยงเชื้อนั้นจุลินทรีย์จะผลิต กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุดในช่วงกลางของ log phase (Sasaki and Larcher, 1987) และจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มจะใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่แตกต่างกัน (Sasikala *et.al*, 1994) แต่ส่วนใหญ่จะใช้กลูตาเมตเป็นสารตั้งต้น สำหรับกลุ่มจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ประกอบด้วย

1. สาหร่าย เช่น *Agmenellum quadruplicatum Cyanidium caldarium* แบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้กลูตาเมตเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 0.225 และ 0.483 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Kipe-Nolt and Stevens, 1980; Jugenson *et al,* 1976)

2. กลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ใช้ออกซิเจน เช่น *Anacystis nidulans* และ *Anabaena variabilis* แบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้กลูตาเมตเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 0.380 และ 0.019 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Anderson *et al.,* 1983; Avisser, 1980)

3. กลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่ใช้ออกซิเจน เช่น *R. palustris R. sphaeroides* ใช้ซัคซิเนตและไกลซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 0.750 และ 2 - 4 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Andersen *et al.,* 1983) นอกจากนี้จะมีแบคทีเรียที่ใช้กลูตาเมต ได้แก่ *C. limicola* และ *Chloroflexxus aurantiacus* สามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 3.950 และ 0.580 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Anderson *et al.,* 1983) รวมทั้งมีรายงานการใช้ปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* สายพันธุ์ TK 103 PP803 และ P 1 ที่ผลิตโดยใช้วัสดุรองรับ คือ ฟางข้าวและแกลบดำ อัตรา 4 : 1 ศึกษาในนาข้าวจำลองภายใต้สภาวะมีอากาศน้อย และมีแสง เป็นเวลา 10 วัน พบว่า ปุ๋ยชีวภาพที่ระดับและปริมาณที่เหมาะสมมีแบคทีเรียสังเคราะห์แสงอยู่ในช่วง 6.7 - 6.8 log cfuต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์ PP803 มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 2.61 ไมโครโมลาร์ (ดวงพร และธนวัฒน์, 2557)

4.กลุ่มแบคทีเรียต้องการออกซิเจน เช่น *P. riboflavin* และ *P. Shermanii* ใช้ แอลอัลลานีน ซัคซิเนต และไกลซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 0.200 และ 0.040 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Rhee *et al.,* 1987; Menon and Shemin, 1967) และ *B. cereus* ใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น สามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 2.1 มิลลิโมลาร์ (Ahn, 2007)

5. กลุ่มแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจน *C. thermoaceticum* ใช้กลูโคส แอลซีสตีน และ แอลซีสเทอีน เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน นอกจากนี้ *M. barkeri* จะใช้เมทานอล methanol และ 2 - ออกโซกลูตาเรต (2 - oxoglutarate) สำหรับ *M. thermoautotrophicum* ใช้ก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ($H_2 + CO_2$) เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 155 0.400 และ 0.200 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Shoji *et al.,* 1989; Lin *et al*., 1989)

กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตพืช

กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกมีสมบัติเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งจะช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากจะใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ในพืช ส่งเสริมศักยภาพในการสังเคราะห์แสง รวมทั้งยังมีกลไกที่จะทำให้พืชสามารถทนต่อสภาวะความเครียดจากสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ (Wu *et al*., 2018; Memon *et al*., 2009; Liu *et al.,* 2013) ซึ่งการใช้ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตพืช มีดังนี้

1. กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการงอกของเมล็ดพืช

กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกมีบทบาทสำคัญต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืช โดยจะช่วยกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน เช่น superoxide dismutase (SOD) peroxidase (POD) และ ascorbate peroxidase (APX) และ lipid peroxidase (LOP) โดยเฉพาะภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ (Nishihara *et al*., 2003; Li *et al*., 2011; Liu *et al*., 2011) ซึ่งเอนไซม์ต้านออกซิเดชันดังกล่าว จะทำงานร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เรียกว่า ระบบต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะเป็นกลไกหลักในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการทางสรีระวิทยา และชีวเคมี เช่น การหายใจ และการสังเคราะห์แสง โดยปฏิกิริยารีดักชัน - ออกซิเดชันที่เกิดจากกระบวนการต่างๆ เหล่านี้จะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น ได้แก่ superoxide (O_2^-) และ hydroxyl radical (OH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ค่อนข้างแรงสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ได้ง่ายโดยเฉพาะ hydroxyl radical นั้นมีฤทธิ์แรงมากทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโมเลกุลอื่นๆ ได้ทุกชนิด ทำให้โมเลกุลของโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิกเสียหายได้ง่าย และส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ เยื่อหุ้มเซลล์ และสารพันธุกรรมต่างๆ ทำงานผิดพลาดไปส่วน hydrogen peroxide (H_2O_2) ไม่ใช่อนุมูลอิสระแต่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์

และเปลี่ยนรูปไปเป็นอนุมูลอิสระได้ง่าย โดยเฉพาะในสภาพที่มีโลหะหนักจึงมีชื่อเรียกโมเลกุลเหล่านี้รวมๆกันว่า active oxygen species (AOS) หรือ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งมีความจำเป็นต้องมีการควบคุมอนุมูลอิสระเหล่านี้เพื่อไม่ให้มีปริมาณผิดปกติจนก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือส่งสัญญาณผิดพลาดขึ้น (Chotanakoon *et al.,* 2015) โดยมีรายงานการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จะช่วยเพิ่มอัตราการหายใจซึ่งมีความจำเป็นต่อการงอกของเมล็ด เนื่องจากจะได้พลังงานเพื่อใช้ในการงอกของเมล็ด (Juanjaun *et al*., 2014) ซึ่งจากการศึกษาการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการงอกของเมล็ดพืชหลายชนิด พบว่า ความเข้มข้นของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ใช้ในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดของดอก *Elymus nutans* แต่เมื่อใช้ในความเข้มข้นมากขึ้น คือ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ยับยั้งการงอกของเมล็ดดังกล่าว (Fu *et al*., 2014) สำหรับการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในพริก *Capsicum annuum* พบว่าความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้อัตราการงอกของเมล็ดสูงสุด (Korkmaz and Korkmaz, 2009) ในขณะที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ จะมีผลต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาด *Brassica rapa* L. (Chon, 2003) นอกจากนี้มีการศึกษาการกระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ด้วยเทคนิค seed priming ร่วมกับการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยเปรียบเทียบกับการใช้น้ำเปล่า พบว่า การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยการแช่เมล็ดพันธุ์ข้าว มีผลทำให้เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ผ่านการเร่งอายุโดยอุณหภูมิและความชื้นมีเปอร์เซ็นต์การงอก และดัชนีการงอก (seed germination index) เพิ่มขึ้น 10.22 และ 40.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการทดสอบในเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ได้ผ่านการเร่งอายุมีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase peroxidase เพิ่มขึ้น 144 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงส่งผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวเพิ่มขึ้น (Kanto *et al*., 2015)

2. กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการเจริญเติบโตของพืช

2.1. การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนไซโตไคนินที่ชื่อเบนซิลอะดีนีนซึ่งเป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ นอกจากนี้มีรายงานว่ากรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกยังไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (nitrate reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการใช้ไนเทรต (nitrate assimilation) เอนไซม์ดังกล่าวมีผลต่อการนำไนเทรตเข้าสู่พืช ไนเทรตในดินจะถูกนำผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์รากพืชแล้วจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรท์ตรงบริเวณรากหรือถูกส่งไปยังลำต้นผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ (Nishihara *et al*., 2003) จึงช่วยในการเจริญเติบโตของข้าว ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด ดังนี้

2.1.1 การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกกับข้าวนั้นสามารถนำมาใช้ได้ทั้งแช่เมล็ด และการฉีดพ่น โดยพบว่ากรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต ผลผลิตและคุณภาพผลผลิตของข้าว เช่น การฉีดพ่นกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่อยู่ในรูปฟรีซดรายน์ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ที่ใบข้าวระยะแตกกอ และแตกช่อดอก พบว่า มีผลทำให้ความสูง ความยาวรวง ความยาวใบ การแตกกอ ผลผลิตและคุณภาพผลผลิตทั้งจำนวนเมล็ดต่อรวง เมล็ดดีต่อรวง และน้ำหนักข้าวเปลือกต่อ 100 เมล็ด เพิ่มขึ้น (อังคณา และคณะ, 2561) รวมทั้งการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลิกความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร กับข้าวบาร์เลย์ (*Hardium vulgar* L.) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 141 และ 108 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Tanaka *et al*., 1992)

2.1.2 การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผัก กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อฉีดพ่นบริเวณใบและรากนอกจากจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผักแล้วยังส่งผลต่อผลผลิตเพิ่มมากขึ้น 10 - 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีรายงานว่าเมื่อฉีดพ่น ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร กับผักขม (*Spinacia oleracea*) ผักกาดก้านขาว (*Brassica campestris* L. supsp. *Napus*) กระเทียม (*Alium satiyum* L.) และหัวไชเท้า (*Raphanus sativas* var. *radicula* DC) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 140 140 139 163 และ 145 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Tanaka *et al*., 1992)

2.1.3 การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่ว การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกความเข้มข้นต่ำกว่า 15 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่ว ซึ่งการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกแช่เมล็ดพันธุ์พืชตระกูลถั่ว 3 ชนิด ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ และถั่วพุ่ม เป็นเวลา 8 ชั่วโมง มีผลทำให้ความยาวราก และลำต้นเหนือดิน ของพืชตระกูลถั่วทั้ง 3 ชนิด เพิ่มขึ้น 52 และ 41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้นของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 15 - 25 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้พื้นที่ใบของถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ และถั่วพุ่ม เพิ่มขึ้น 159 296 และ 76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Binduroy and Vivekanandan, 1998)

2.2 การใช้จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยตรงต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สำหรับการใช้จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยตรงนั้น มีการศึกษาการนำจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* มาผลิตเป็นกล้าเชื้อโดยใช้ฟางข้าวและแกลบดำเป็นวัสดุพยุงหรือรองรับ ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 cfu ต่อกรัม เมื่อนำมาทดสอบต่อค่าดัชนีการงอกของเมล็ดข้าว พบว่า สายพันธุ์ TK103 ใช้ปริมาณ 1 กรัมต่อน้ำ 3,000 มิลลิลิตร สายพันธุ์ PP803 ใช้ปริมาณ 1 กรัมต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร สายพันธุ์ P1 ใช้ปริมาณ 1 กรัมต่อน้ำ 500 มิลลิลิตร สำหรับผลการทดลองในสภาพโรงเรือน พบว่า ปุ๋ยชีวภาพกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้ง 3 สายพันธุ์ให้ผลดีต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวในระยะต้นกล้าทั้งภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม โดยมีผลทำให้น้ำหนักแห้งของรากเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการที่มีปริมาณของน้ำหนักแห้งของรากข้าวเพิ่มขึ้นนี้อาจส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของข้าวในระยะให้ผลผลิตซึ่งเป็นผลจากความสามารถในการผลิต กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก สำหรับผลการทดลองภาคสนามต่อการเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิ 105 ในพื้นที่นาอินทรีย์และข้าวพันธุ์ กข 41 ในพื้นที่นาดินเค็ม พบว่า ปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีคุณสมบัติที่ดีในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว ได้แก่ ความสูง เมล็ดต่อรวง และผลผลิตต่อไร่ ซึ่งมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตัวช่วยพยุงและกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำเปล่า (ดวงพร และ ธนวันต์, 2557)

2.3 การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะเครียดของพืช

การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในการปลูกพืชในสภาวะความเครียดและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเค็ม ความแห้งแล้ง อุณหภูมิ เป็นต้น ซึ่งสภาพแวดล้อมต่างๆ ดังกล่าวจะทำให้พืชเกิดสภาวะเครียด มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ เปลี่ยนแปลงและเกิดการกระตุ้น (activation) หรือการกด (repression) วิถีชีวเคมี (biochemical pathway) พืชจะมีกลไกการลดความเครียดลงโดยการปรับเปลี่ยน กระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ และการรักษาสมดุลของอิออนและน้ำภายในและภายนอกเซลล์ผ่านโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้าย (transporters) เช่น aquaporins transporter (Ouziad *et al*., 2006) โดยการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในการปลูกพืชในสภาวะที่มีความเค็ม พบว่า สามารถช่วยควบคุมการทำงานของโปรตีน aquaporins ที่ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายอิออนและน้ำในใบพืชตระกูลแตง และยังส่งเสริมให้พืชทนต่อสภาพความเค็มได้ (Yan *et al.,* 2014) นอกจากนี้ในการทดสอบในมะเขือเทศ พบว่า

กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกมีผลต่อการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน aquaporins ในต้นกล้ามะเขือเทศ (Yang *et al*., 2014) และยังมีผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสง ปริมาณคลอโรฟิลล์ และน้ำหนักสดของต้นกล้ามะเขือเทศเพิ่มขึ้น (Zhao *et al*., 2015) สำหรับการปลูกข้าวในดินเค็มนั้นความเค็มที่เพิ่มสูงขึ้นในดินทำให้พืชเกิดการขาดน้ำ ชักนำการเกิด Reactive oxygen species (Balesstrasse *et al*., 2006) นำไปสู่การเกิดกระบวนการลิปิดเพอรอกซิเดส (lipid peroxidase) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ไขมันถูกทำลายจากที่พืชสร้างขึ้นเนื่องจากความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ไปออกซิไดซ์กรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ในเซลล์เป็นสาเหตุให้เกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์ตาย (Inze and Montagu, 2002) ซึ่งจากการศึกษาของกัญญารัตน์ และคณะ (2557) การที่ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้รับกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ความเข้มข้น 0.01 ไมโครโมลาร์ก่อนที่จะได้รับสภาวะความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์อาจทำให้ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถปรับตัวกระตุ้นการทำงานของกลไกต่างๆ ในเซลล์ เช่น การควบคุมปริมาณการเกิด ROS ให้อยู่ในระดับที่ไม่กระทบต่อการเจริญเติบโต ทำให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นในสภาวะความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ นอกจากนี้โซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ของพืชลดลง ซึ่งมีผลต่อกระบวนสังเคราะห์แสง และลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส (Chlorophyllase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Conceicao, 2004) ดังนั้นการปรับปรุงให้พืชมีความสามารถในการเจริญเติบโตภายใต้สภาพความเค็มได้ดีขึ้นโดยการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกภายใต้สภาวะความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ได้ จึงช่วยเพิ่มการสะสมของคลอโรฟิลล์ภายใต้สภาวะเครียดดังกล่าว ซึ่งนำไปสู่อัตราการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น โดยผลการศึกษาพบว่า การใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* ที่ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกความเข้มข้น 2.67 ไมโครโมลาร์ ช่วยเพิ่มการเจริญของรากและน้ำหนักแห้งของข้าวในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Nunkaew *et al*., 2014)

3. การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อคุณภาพของผลผลิตพืช

กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกนอกจากจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตพืชแล้ว ยังมีผลต่อคุณภาพของผลผลิตพืชหลายชนิดด้วย เช่น ปริมาณน้ำตาล กิจกรรมของเอนไซม์ สารฟลาโวนอยด์ และสารแอนโทไซยานิน ซึ่งพบว่าการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะเพิ่มแอนโทไซยานินในแปะก๊วย (Xu *et al*., 2011) ในเปลือกของผลแอปเปิ้ล และลิ้นจี่ (Chen *et al*., 2015; Feng *et al*., 2015) โดยส่วนใหญ่การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการเพิ่มคุณภาพของพืชนั้นจะใช้ในรูปแบบการฉีดพ่นในระยะต่างๆ ได้แก่ การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทางใบในช่วงระยะการออกดอกขององุ่นอายุ 2 ปี สามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักสด สีของผล และความหวานขององุ่น (Watanabe *et al*., 2006) การฉีดพ่น 20 วัน ก่อนการเก็บเกี่ยวแอปเปิ้ล ส่งผลต่อการพัฒนาสีของแอปเปิ้ล (Wang *et al.,* 2004) รวมทั้งช่วยในเพิ่มคุณภาพของสตรอว์เบอร์รี่ ได้แก่ เพิ่มเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง น้ำตาล และกรดซิตริก (Iwai *et al.,* 2005)

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรนั้น นอกจากจะคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพแล้ว การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์หรือชีวภัณฑ์เป็นสิ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากเกษตรกรจะสามารถนำผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่การเกษตรได้อย่างง่าย สะดวก และมีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องมีรูปแบบและการใช้วัสดุรองรับที่เหมาะสมและส่งผลต่อการมีชีวิตและกิจกรรมของจุลินทรีย์ ดังนี้

1. รูปแบบผลิตภัณฑ์ (formulation)

รูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในระดับแปลงนั้น มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยจะต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เพียงพอต่อการเกิดประสิทธิภาพต่อพืช ซึ่งจะต้องพิจารณาถึงความมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ตั้งแต่ในกระบวนการผลิต การเก็บรักษา และการขนส่งจนถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่ ซึ่งปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์เมื่อนำไปใช้ในพื้นที่การเกษตร เช่น แสง กรณีที่เมื่อใส่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์แล้วอยู่บนดินและกระทบกับแสงโดยตรง (Zohar - Perez *et al*., 2003) รวมทั้งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติของดิน เช่น เนื้อดิน อุณหภูมิ และความเป็นกรดเป็นด่าง หรือกรณีที่ใช้จุลินทรีย์ในการเคลือบหรือคลุกกับเมล็ดพันธุ์พืชก็ต้องคำนึงถึงผลกระทบจากวัสดุที่ใช้ในการเคลือบหรือคลุกเมล็ดด้วย นอกจากนั้นจะต้องพิจารณาถึงวิธีการนำผลิตภัณฑ์นั้นไปใช้ประโยชน์ เช่น การหว่าน การฉีดพ่น หรือการเคลือบเมล็ด ชนิดของพืช ช่วงเวลาการใช้ในพืชแต่ละชนิด เครื่องมือที่ใช้ และความสะดวกของเกษตรกร เป็นต้น (Deaker *et al*., 2004; Malusa *et al*., 2012; Bashan *et al*., 2014) รูปแบบของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ ประกอบด้วย รูปแบบของแข็ง ของเหลว และสารละลาย โดยรูปแบบที่เป็นของแข็ง ได้แก่ รูปแบบผง หรือเม็ด โดยทั่วไปจะนำไปใช้ในการเคลือบเมล็ดและใช้เป็นสารปรับปรุงดิน (Bashan *et al*., 2014)

2. ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบการตรึงเซลล์ด้วยวิธีหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนต

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โดยใช้รูปแบบการตรึงเซลล์ด้วยวิธีหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก (Duarte *et al*., 2013) ซึ่งอัลจิเนตเป็นโพลีแอนไอออนที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล และจะเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายไอออนของโลหะ เช่น อะลูมินั่มไอออน แบเรียมไอออน และแคลเซียมไอออน ได้มีการนำอัลจิเนตมาใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพในการตรึงเซลล์หรือการตรึงเอนไซม์ ทั้งในแบบห่อหุ้มเซลล์ (entrapment) และการห่อหุ้มด้วยแคปซูล (encapsulation) ซึ่งจะสามารถป้องกันการสลายตัวของสารจากความร้อน แสง ความชื้น และยังช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ลดการระเหยหรืออัตราการถ่ายเทมวลของสารสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก ช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษา และสามารถควบคุมการปลดปล่อยของสารที่ถูกกักเก็บได้ (Madene *et al*., 2006) นอกจากนี้อัลจิเนตยังเป็นสารจากธรรมชาติที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายได้ในดิน ทำให้มีการปลดปล่อยจุลินทรีย์อย่างช้าๆ ลงไปในดิน (Bashan 1998; van Elsas and Heijnen, 1990) โดยได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาจุลินทรีย์ด้านต่างๆ เช่น จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช (DeLucca *et al*., 1990; Fravel *et al*., 1985; Lewis and Papavizas, 1985; Russo *et al*., 1996) แบคทีเรียละลายฟอสเฟต และแบคทีเรียสร้างสารเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น *Azotobacter brasilense* และ *P. fluorescens* (Vassilev *et al*., 1997; Bashan, 1986) สำหรับการศึกษาการใช้อัลจิเนตเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ และเพื่อการเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตอยู่รอดได้ในผลิตภัณฑ์นั้น พบว่า สายพันธุ์จุลินทรีย์และความเข้มข้นของอัลจิเนตมีผลต่อการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ (Grosso and Favaro - Trindade, 2004) ซึ่งจากการศึกษาความเข้มข้นของอัลจิเนตต่อการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ *B. bifidum* ที่ห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ จะมีชีวิตรอดได้มากกว่าการใช้อัลจิเนตความเข้มข้น 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (Lee and Heo, 2000) แต่การใช้อัลจิเนตความเข้มข้น 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ สามารถที่จะทำให้ *Lactobacillus cacei* มีชีวิตรอดได้ไม่แตกต่างกัน (Mandal *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการผสมอัลจิเนตกับวัสดุชนิดอื่นๆ ในการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ โดยจากการศึกษาของ Wu *et al*. (2012) ศึกษาการใช้ส่วนผสมของอัลจิเนต แป้ง และเบนโทไนต์ กับกลุ่มจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยขนาดเจลที่ได้มีขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจล 0.98 ถึง 1.41 มิลลิเมตร มีผลทำให้จุลินทรีย์สามารถมีชีวิตอยู่รอดในเม็ดเจล และเมื่อนำไปใส่ในดินก็สามารถปลดปล่อยจุลินทรีย์จากเม็ดเจลสู่สภาพแวดล้อมในดินได้ รวมทั้งมีการศึกษาการใช้อัลจิเนตสำหรับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช โดยจากการศึกษาของฤดีกร และคณะ (2554) ศึกษาการพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* ในรูปแบบเจลบีดเพื่อใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในสภาพเรือน ผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของอัลจิเนตเจลบีดที่เหมาะสมคือ 1 - 3 เปอร์เซ็นต์ และเจลบีดมีขนาด 2 มิลลิเมตร ซึ่งเจลบีดที่ได้มีสมบัติทางกายภาพที่ดีสามารถปลดปล่อยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* ในปริมาณที่เหมาะสม

3. วัสดุรองรับจุลินทรีย์ (carriers)

วัสดุรองรับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์จะช่วยทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ โดยจะช่วยปกป้องการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยลักษณะของวัสดุรองรับที่ดีต้องไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ มีความชื้นที่เหมาะสม ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสม ผลิตได้ง่าย ปั้นเป็นก้อนได้ง่าย สามารถฆ่าเชื้อได้โดยการนึ่งฆ่าเชื้อและใช้รังสีแกมมา มีปริมาณเพียงพอ ราคาไม่แพง และไม่เป็นอันตรายต่อพืช เป็นต้น (Somasegaran and Hoben, 1994) วัสดุรองรับมีทั้งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น พีท ปุ๋ยหมัก ขี้เลื่อย วัสดุอนินทรีย์ เช่น เวอร์มิคูไลต์ คาร์โอลิไนต์ ซีโอไลต์ และทัลก์ (talc) เป็นต้น (Heijnen *et al*., 1993)

3.1 การใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุรองรับ

ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุรองรับที่นำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์หลายชนิด เนื่องจากปุ๋ยหมักเป็นปุ๋ยอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ จนกระทั่งได้วัสดุที่มีความคงทนต่อการย่อยสลาย ช่วยเพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุให้แก่ดิน เป็นแหล่งกำเนิดของธาตุอาหารพืช ทั้งธาตุหลัก ธาตุรอง และจุลธาตุ เป็นแหล่งอาหารและพลังงานแก่จุลินทรีย์ดิน ควบคุมสมบัติทางกายภาพของดิน เช่น โครงสร้างดิน ความร่วนซุย การระบายน้ำ และการแลกเปลี่ยนอากาศของดิน เป็นต้น (กรมพัฒนาที่ดิน, 2551) โดยมีการนำปุ๋ยหมักชนิดต่างๆ มาใช้ประโยชน์เป็นวัสดุหลักของการทำปุ๋ยอินทรีย์เม็ด และเป็นวัสดุรองรับที่ดี (มงคล, 2551) การใช้ปุ๋ยหมักร่วมกับปุ๋ยชีวภาพช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพให้สูงขึ้นในการเพิ่มผลผลิตพืช และคงความมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติได้ดีขึ้น (Chen, 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุรองรับเชื้อ *Trichoderma harzianum* UD12 - 102 ควบคุมโรคต้นเน่าของมะเขือเทศ พบว่า ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุรองรับที่ดีในการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช โดยเชื้อ *T. harzianum* สามารถมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการทดสอบการปลูกเชื้อโรคพืชเข้าไปในมะเขือเทศเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (Suriyagamon *et al*., 2018) รวมทั้งการใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุรองรับในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพ พบว่าสามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ ได้แก่ *Azotobacter Azospirillum* แบคทีเรียละลายฟอสเฟต และเอนโดไฟติกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ไม่แตกต่างจากการใช้พีทเป็นวัสดุรองรับ โดยมีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ระหว่าง 10^9 - 10^{11} cfu ต่อกรัม ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ (Setiawati *et al*., 2016)

3.2 การใช้พีทมอสเป็นวัสดุรองรับ

พีทมอสเป็นวัสดุอินทรีย์ที่มีการนำมาใช้เป็นวัสดุรองรับอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม (Somasengaran, 1991) และจากการศึกษาการใช้พีทมอสในการผลิตผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย *A. brasilense* สามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้เป็นระยะเวลา 4 เดือน โดยมีปริมาณเชื้อ 10^7 cfu ต่อกรัม (Bashan, 1998) นอกจากนี้การใช้เป็นวัสดรองรับสำหรับแบคทีเรีย *P. fluorescens* และผลิตภัณฑ์ผสมของเชื้อ *P. chlororaphis* (PA23) และ *B. subtilis* (CBE4) สามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

ได้เป็นระยะเวลา 8 เดือน และมากกว่า 6 เดือน ตามลำดับ (Vidhyasekaran and Muthamilan, 1995; Kavitha *et al*., 2003; Nakkeeran *et al*., 2004) แต่การใช้พีทมอสยังมีข้อจำกัด คือ มีต้นทุนสูงและจะต้องใช้สารช่วยเกาะยึดกับเมล็ดและต้องใช้ให้หมดในครั้งเดียว (อมรรัตน์ และสริญญา, 2559)

3.3 การใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับ

วัสดุอนินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นวัสดุรองรับ เช่น เพอร์ไลต์ ภูไมท์ เบนโทไนต์ และเวอร์มิคูไลต์ เป็นต้น (Smith, 1992) เพอร์ไลต์เป็นหินภูเขาไฟที่มีองค์ประกอบของอะลูมินั่มซิลิเกต นอกจากจะนำมาใช้ในการปลูกพืชแล้วยังมีการนำมาใช้เป็นวัสดุรองรับในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นวัสดุที่นึ่งฆ่าเชื้อได้ง่ายและไม่มีสารพิษที่ส่งผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ โดยสามารถใช้เป็นวัสดุรองรับของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Rhizobium* และแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง (Albareda *et al*., 2008) ซึ่งจากการทดสอบการใช้เพอร์ไลต์ และพีท เป็นวัสดุรองรับของผลิตภัณฑ์ *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* (strain ISP23 และ ISP42) และ ผลิตภัณฑ์ผสมของ *R. tropici* และ *B. megaterium* พบว่า เพอร์ไลต์มีผลทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณสูงเท่ากับการใช้พีท (DaZa *et al*., 2000) สำหรับภูไมท์หรือพัมมิช (pumice) เป็นหินแก้วภูเขาไฟชนิดหนึ่งที่เกิดจากหินอัคนีประเภทหินร้อนที่เย็นตัวลงบนผิวโลกหรือนอกผิวโลกทำให้หินที่เย็นตัวและแข็งตัวแล้วเกิดรูโพรงขนาดเล็กมากในเนื้อหินคล้ายฟองน้ำซึ่งองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ซิลิกาและอะลูมินา ส่วนใหญ่ใช้ในการปรับปรุงดิน ทำให้ดินร่วนซุย ช่วยในการการระบายน้ำและอากาศ รวมทั้งช่วยในการดูดซับธาตุอาหารพืช ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยเคมีมากขึ้น (ปิยะ, 2556) นอกจากนี้ยังมีการนำภูไมท์มาใช้ในเป็นวัสดุรองรับจุลินทรีย์ด้วย (Smith, 1995)

การปลูกข้าวในประเทศไทย

1. ความสำคัญของข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) นอกจากเป็นพืชอาหารของประเทศไทยแล้วยังเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญ ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา ตลาดข้าวได้ขยายอย่างต่อเนื่องไปสู่ทุกภูมิภาคของโลก ปัจจุบันประชากรกว่า 3,000 ล้านคน ทั่วทุกมุมโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ข้าวจึงมีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยขับเคลื่อนโดยภาคการค้าระหว่างประเทศที่มีสัดส่วนมูลค่ากว่าร้อยละ 70 ของผลิตภัณฑ์มวลรวมทั้งประเทศ (GDP) การส่งออกข้าวซึ่งเป็นผลผลิตหลักของประเทศไทยจึงเป็นส่วนหนึ่งของรายได้ของประเทศ (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดสุโขทัย, 2561) สำหรับการเพาะปลูกข้าวนั้น จากการรายงานของสำนักเศรษฐกิจการเกษตร (2560) ในปี 2560 ประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกข้าวนาปรัง 59,220,823 ไร่ ให้ผลผลิต 24,934,349 ตัน โดยมีผลผลิตต่อไร่เฉลี่ย 454 กิโลกรัมต่อไร่ โดยพันธุ์ข้าวโดยทั่วไปสามารถจำแนกตามการตอบสนองต่อช่วงแสงได้ 2 ประเภท คือ ข้าวไวต่อช่วงแสง เป็นข้าวที่ออกดอกเฉพาะเมื่อช่วงเวลากลางวันสั้นกว่า 12 ชั่วโมง ดังนั้น พันธุ์ข้าวประเภทนี้จึงปลูกและให้ผลผลิตได้ปีละหนึ่งครั้ง หรือปลูกได้เฉพาะในฤดูนาปี เช่น ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 กข15 เป็นต้น ส่วนข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง เป็นข้าวที่ออกดอกเมื่อข้าวมีระยะเวลาการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตตามอายุจึงใช้ปลูกและให้ผลผลิตได้ตลอดทั้งปี หรือปลูกได้ในฤดูนาปรัง บางครั้งจึงเรียกว่า ข้าวนาปรัง เช่น กข 7 ชัยนาท 1 สุพรรณบุรี 1 และปทุมธานี 1 เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2548) สำหรับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นข้าวเจ้าที่ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุเก็บ เกี่ยวประมาณ 120 วัน และสามารถให้ผลผลิตข้าวเปลือกเฉลี่ยประมาณ 806 กิโลกรัมต่อไร่ มีลักษณะเด่นอื่น ๆ ได้แก่ มีการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยดี ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง โรคใบหงิก และโรคใบสีส้ม ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยกระโดดหลังขาว (กรมการข้าว, 2551)

2. ปัญหาในการผลิตข้าว

การผลิตข้าวนั้นปุ๋ยถือเป็นปัจจัยการผลิตที่สำคัญและเป็นต้นทุนหลักในการผลิตข้าวโดยส่วนมากเกษตรกรนิยมใช้ปุ๋ยเคมี เนื่องจากหาซื้อง่าย สะดวกในการใช้ มีธาตุอาหารหลักที่ละลายออกมาอยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ทันที และข้าวมีการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยเคมีได้ดี (พักตร์เพ็ญ และคณะ, 2559) โดยค่าใช้จ่ายด้านปุ๋ยเคมีเป็นส่วนประกอบหลักของต้นทุนการผลิตข้าวโดยคิดเป็นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด (ธนกฤต และคณะ, 2555) ซึ่งการใช้ปุ๋ยเคมีในปริมาณมากทำให้ต้นทุนการผลิตต่อไร่สูงขึ้น ข้อมูลสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2559) รายงานต้นทุนการผลิตข้าวประมาณ 10,600 บาทต่อตันข้าวเปลือก นอกจากนี้การใช้ปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นเวลานานโดยไม่มีการจัดการที่ดีจะส่งผลให้ดินเกิดความเสื่อมโทรม ซึ่งความเสื่อมโทรมของดินปรากฏขึ้นหลายรูปแบบ เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ดินแบนทึบ การอุ้มน้ำลดลง (กรมพัฒนาที่ดิน, 2558ก) ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาปัจจัยการผลิตที่จะช่วยในการเพิ่มผลผลิต ลดการใช้ปุ๋ยเคมี ซึ่งจะส่งผลในการลดต้นทุนการผลิต จึงเป็นแนวทางที่สำคัญและน่าสนใจที่จะมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อส่งเสริมสู่เกษตรกร สำหรับกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เป็นแนวทางในการนำมาใช้ประโยชน์ในการปลูกข้าว เนื่องจากกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีบทบาทในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิลิน ฮีม ยูบิควิโนนสามารถเพิ่มปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง และยังช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต และผลผลิตพืชต่างๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ มันฝรั่ง กระเทียม ถั่วแดง (Hotta *et al.,* 1997) และข้าวขาวดอกมะลิ 105 (กัญญารัตน์ และคณะ, 2557) ซึ่งการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่มีบทบาทในการสังเคราะห์แสงของพืชนั้นจะส่งผลต่อผลผลิตและคุณภาพผลผลิตของข้าวด้วย เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากการสังเคราะห์แสงในส่วนเหนือดินปริมาณมากตั้งแต่ก่อนออกดอกจะช่วยลดเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบ และเพิ่มเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีได้ ผลผลิตของเมล็ดจะต่ำหากสารอาหารที่ได้รับในระยะที่เมล็ดกำลังพัฒนาถูกจำกัด (ยงยุทธ และคณะ, 2558) ซึ่งมีรายงานการวิจัยการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในข้าว พบว่า มีการใช้ทั้งในรูปแบบกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ และในรูปแบบของจุลินทรีย์ เช่น การใช้กลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ได้แก่ *R. palustris และ R. sphaerides* (Nunkaew *et al.*, 2012) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญในสภาพทั้งมีออกซิเจน ออกซิเจนน้อย และไม่มีออกซิเจนแต่มีแสง (Kim *et al.*, 2010) จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในนาข้าวน้ำขังซึ่งเป็นแหล่งอาศัยตามธรรมชาติของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ซึ่ง Saikeur *et al.* (2009) ได้แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากดินนาข้าวจังหวัดนครศรีธรรมราช นอกจากกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแล้วยังมีแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และ *Pseudomonas* ผลิตกรด 5 อะมิโนลีวูลินิก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน และมีวิถีการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยใช้วิถี C_5 เช่นเดียวกันกับกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงดังกล่าวข้างต้น (Nishimura *et al.,* 1981) อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้มีรายงานการวิจัยในนาข้าวค่อนข้างน้อย แต่เป็นกลุ่มที่เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ได้เนื่องจากเป็นกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนจึงสามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อได้โดยใช้เครื่องมือที่ไม่ยุ่งยาก เช่น เครื่องเขย่าและถังหมัก เป็นต้น ดังนั้นการวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จากแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง และแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน โดยจะคัดเลือกแบคทีเรียที่มีการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในปริมาณสูงเพื่อใช้ทดสอบในการปลูกข้าว

ข้อมูลดินและสมบัติของดินที่ใช้ในการทดลอง

ชุดดินเดิมบาง (Doem bang series: Db) เป็นกลุ่มชุดดินที่ 7 มีการจำแนกดิน Fine, kaolinitic, isohyperthermic Aeric (Plinthic) Endoaqualfs โดยวัตถุต้นกำเนิดเกิดจากตะกอนน้ำพามาทับถมอยู่บนตะพักลำน้ำเก่าระดับต่ำหรือเนินตะกอนน้ำพารูปพัด ในสภาพพื้นที่ราบเรียบถึงค่อนข้างราบเรียบ

มีความลาดชัน 0 - 2 เปอร์เซ็นต์ พบอยู่ทั่ว ๆ ไปในภาคกลาง ในเรื่องของสัณฐานดินนั้น ชุดดินเดิมบางเป็นดินลึก มีการระบายน้ำค่อนข้างเลว น้ำซึมผ่านได้ช้า การไหลบ่าของน้ำบนผิวดินช้า ดินบนเป็นดินร่วนเหนียวปนทรายหรือดินร่วนปนดินเหนียว สีน้ำตาลปนเทา ดินล่างเป็นดินร่วนปนดินเหนียว ดินเหนียวหรือดินเหนียวปนทรายแป้ง มีสีเทาปนน้ำตาลหรือสีน้ำตาลปนเทา มีจุดประสีน้ำตาลแก่ สีน้ำตาลปนเหลือง สีเหลืองปนน้ำตาล จะพบศิลาแลงอ่อนปนอยู่ในดินล่างภายในความลึก 150 เซนติเมตร มีปริมาณ 5 - 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ด้านสมบัติทางเคมีที่สำคัญ พบว่าดินชุดนี้ มีปริมาณอินทรียวัตถุต่ำทั้งชั้นดินบนและล่าง สำหรับความอุดมสมบูรณ์ในส่วนของชั้นดินบน มีค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกปานกลาง ร้อยละการอิ่มตัวด้วยด่างต่ำ ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ต่ำ และค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ระหว่าง 5.0 - 6.0 สำหรับดินล่าง มีค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกสูง ร้อยละการอิ่มตัวด้วยด่างปานกลาง ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ปานกลาง โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ต่ำ และมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ระหว่าง 6.0 - 8.0 ข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์ ชุดดินนี้เป็นดินที่มีการระบายน้ำค่อนข้างเลว มีน้ำท่วมในฤดูฝน ข้อเสนอแนะในการใช้ประโยชน์ ใช้ในการทำนาควรมีการปรับปรุงบำรุงดิน โดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ เช่น ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมักควบคู่กับปุ๋ยเคมี เพื่อปรับปรุงสมบัติทางกายภาพของดินให้ดีขึ้นและช่วยเพิ่มธาตุอาหารพืชให้แก่ดิน นอกจากนี้ในช่วงฤดูแล้งหลังการเก็บเกี่ยวข้าวแล้ว ถ้ามีแหล่งน้ำเพียงพอก็อาจจะใช้ปลูกพืชไร่อายุสั้นบางชนิดและพืชผักสวนครัวได้ดี พบทั่วไปในจังหวัดสุพรรณบุรี ชัยนาท กาญจนบุรี และราชบุรี ส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์ในการทำนา (กรมพัฒนาที่ดิน, 2558ข) สำหรับการจัดชั้นความเหมาะสมของที่ดินสำหรับการปลูกข้าวนาปี ของกลุ่มชุดดินที่ 7 จัดอยู่ในชั้นที่ 2 หรือ S2 เหมาะสมปานกลาง และความอุดมสมบูรณ์อยู่ในระดับปานกลาง (สิตารินทร์ และคณะ, 2552) ซึ่งตามโครงการบริหารจัดการพื้นที่เกษตรในเขต Zoning จะใช้ข้อมูลเขตเหมาะสมพืชเศรษฐกิจมาเป็นตัวกำหนดพื้นที่ที่มีศักยภาพในการเพิ่มผลผลิตพืชโดยพื้นที่ที่จัดอยู่ในชั้นความเหมาะสมสูงและปานกลาง การพัฒนาควรดำเนินการปรับปรุงแก้ไขเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน รวมทั้งมีการจัดการที่ดินที่เหมาะสม ลดต้นทุนการผลิต มาตรการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ควรคำนึงถึงเรื่องการปรับปรุงบำรุงดินเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน โดยสามารถนำนวัตกรรมและเทคโนโลยีต่างๆ ของกรมพัฒนาที่ดินและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนองค์ความรู้และภูมิปัญญาชาวบ้านไปบูรณาการปรับใช้ให้เหมาะสมในแต่ละพื้นที่ (ปราโมทย์, 2559) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้คัดเลือกชุดดินเดิมบางซึ่งเป็นกลุ่มชุดดินที่ 7 เพื่อใช้ในการทดลอง

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลา เริ่มต้นเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2558 สิ้นสุดเดือน กันยายน พ.ศ. 2560

สถานที่ดำเนินการ 1) ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ และโรงเรือนกระจก กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

2) แปลงเกษตรกรปลูกข้าว ตำบลทุ่งสมอ อำเภอพนมทวน จังหวัดกาญจนบุรี

วิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์

1) สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ อุปกรณ์เครื่องแก้ว และเครื่องมือในการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์

2) อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงเก็บตัวอย่าง พลั่วตักขนาดเล็ก และกล่องบรรจุตัวอย่าง

3) เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ทางเคมีและจุลินทรีย์
4) ปุ๋ยหมัก
5) พีทมอส
6) เพอร์ไลต์
7) ภูไมท์
8) รำข้าว
9) ปุ๋ยเคมี
10) เมล็ดพันธุ์ข้าว
11) กระถาง

2. วิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์

ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าว ที่ระดับความลึกของดิน 0 - 15 จากพื้นที่ 14 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม ชัยนาท พระนครศรีอยุธยา สระบุรี อ่างทอง สุพรรณบุรี ขอนแก่น นครราชสีมา ตาก สุโขทัย กำแพงเพชร และนครสวรรค์ แล้วนำมาเก็บในตู้เย็นเพื่อใช้ในการแยกแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ต่อไป

2.2 การแยกแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก มีขั้นตอนดังนี้

1) การแยกแบคทีเรียในกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน

นำตัวอย่างดินมาแยกแบคทีเรียโดยใช้อาหาร King 's B medium ประกอบด้วย โปรติโอส เปบโตน 20 กรัม โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.5 กรัม กลีเซอรอล 15 มิลลิลิตร วุ้น 15 - 18 กรัม น้ำ 1,000 มิลลิลิตร (King *et al*., 1954) โดยทำการแยกแบคทีเรียด้วยวิธี soil dilution plating method ซึ่งจะนำสารละลายดินมาเจือจางตามลำดับส่วน แล้วจึงนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง King 's B medium บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน จะปรากฏโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีขีดเชื้อ (streak plate) และทำการขีดเชื้อหลายๆ ครั้ง (restreak) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมเพื่อใช้เป็นต้นตอเชื้อ (stock culture) ในการทดสอบต่อไป

2) การแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน

นำตัวอย่างดินมาแยกแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sistrom’s minimal media (Madukasi *et al*., 2010) ดังนี้

2.1) นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Sistrom’s minimal media broth ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 150 x 15 มิลลิเมตร แล้วปิดทับด้วย liquid paraffin ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วหนาประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อให้การเลี้ยงเชื้ออยู่ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีแสง ที่ระดับความเข้มแสงประมาณ 3,500 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟทังสเตนขนาด 100 วัตต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 - 10 วัน

2.2) แยกเชื้อจากตัวอย่างที่เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีชมพู ส้ม แดง และน้ำตาล ซึ่งแสดงว่ามีแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีขีดเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Sistrom’s minimal media แล้วนำไปบ่มไว้ในโถเพาะเชื้อแบบไม่มีอากาศ (anaerobic jar) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีแสง ที่ระดับความเข้มแสงประมาณ 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 - 10 วัน ทำการแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) เมื่อเห็นโคโลนีเดี่ยวให้เลือก

โคโลนีเดี่ยวที่มีสีชมพู ส้ม แดง และน้ำตาล เก็บเป็นต้นตอเชื้อในอาหาร Sistrom’s minimal media เพื่อไว้ทำการทดสอบต่อไป

2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

1) การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

1.1) การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรียในกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน

1.1.1) สุ่มเลือกเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ในกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนเพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา จำนวน 4 ไอโซเลต มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว King ’s B medium เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้ L - alanine เป็นสารตั้งต้น (Rhee *et al*., 1987) เพื่อให้จุลินทรีย์ใช้ในการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

1.1.2) เก็บตัวอย่างสารละลายเชื้อที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำ มาวิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ตามวิธีการของ Mauzerall and Granick (1956) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ 50 ไมโครลิตร เติม 1 โมลาร์ของ sodium acetate buffer pH 4.7 จำนวน 450 ไมโครลิตร และ acetylacetone จำนวน 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม Ehrlish’s Reagent จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (Sigma Co. Ltd.)

1.2) การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน

1.2.1) สุ่มเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา จำนวน 10 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเหลว Sistrom’s minimal media โดยใช้กรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (Anderson *et al*., 1983) ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่มีความเข้มแสงประมาณ 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

1.2.2) เก็บตัวอย่างสารละลายเชื้อที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 5 และ 10 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ตามวิธีการของ Mauzerall and Granick (1956) เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกออกซิเจน

2) การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

จากผลการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรีย จะได้ระดับความเข้มข้นของ L- alanine และ glutamic acid ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรีย และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม นำมาทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ที่แยกได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกตามวิธีการของ Mauzerall and Granick (1956)

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในห้องปฏิบัติการ

1) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกสูงสุด จำนวน 10 ไอโซเลต เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในห้องปฏิบัติการ

2) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ประกอบด้วย 11 ตำรับการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ 1 ควบคุม (น้ำกลั่น)
ตำรับการทดลองที่ 2 แบคทีเรียไอโซเลต KBRN 1/3
ตำรับการทดลองที่ 3 แบคทีเรียไอโซเลต KBRN 7/1
ตำรับการทดลองที่ 4 แบคทีเรียไอโซเลต KBRN 9/3
ตำรับการทดลองที่ 5 แบคทีเรียไอโซเลต KBRN 11/3
ตำรับการทดลองที่ 6 แบคทีเรียไอโซเลต KBRN 12/1
ตำรับการทดลองที่ 7 แบคทีเรียไอโซเลต KBRN 13/5
ตำรับการทดลองที่ 8 แบคทีเรียไอโซเลต KBRN 14/3
ตำรับการทดลองที่ 9 แบคทีเรียไอโซเลต KBRN 15/1
ตำรับการทดลองที่ 10 แบคทีเรียไอโซเลต KBRP 1/1
ตำรับการทดลองที่ 11 แบคทีเรียไอโซเลต KBRP 3/3

3) ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1) การเตรียมแบคทีเรีย นำแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลต ที่จะใช้ในการทดสอบมาเลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ตามลำดับ นำมาปั่นเหวี่ยง แล้วแยกตะกอนที่เป็นส่วนของเซลล์แบคทีเรียมาใช้ในการทดลอง

3.2) การเตรียมเมล็ดข้าว และการปลูกทดสอบ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในข้าว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง ใช้พันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวไวต่อช่วงแสง ใช้พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยนำเมล็ดข้าวแช่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะบนจานเพาะที่มีกระดาษซับที่ชุ่มด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 2 วัน เลือกเมล็ดข้าวงอกขนาดเดียวกันวางบนกระดาษตะกั่วที่เจาะรู แผ่นละ 10 เมล็ด ลอยกระดาษตะกั่วที่วางเมล็ดข้าวแล้วในบีกเกอร์ที่มีน้ำผสมแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ตามตำรับการทดลอง อัตรา 1 : 1 แล้วนำมาบ่มภายใต้แสงสว่าง 6,000 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน (ดัดแปลงมาจากวิธีการของพรพิมล และวัฒนาลัย, 2554)

4) การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

4.1) เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของข้าว ได้แก่ วัดความสูงของต้น และความยาวของราก

4.2) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test

2.5 การจำแนกแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปจำแนกเชื้อโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล รายละเอียดในภาคผนวก ค

1) การสกัดดีเอนเอของแบคทีเรีย โดยใช้ชุดสกัด Wizard Genomic DNA Purification

2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 16S rRNA ดวยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

2.6 การศึกษารูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

2.6.1 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรีย (microbial inoculum)

1) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จำนวน 2 ไอโซเลต คือ แบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 และ KBRN 9/3 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเอียง แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 - 2 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มหลอดนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

2) เขี่ยเชื้อจากหลอดทดลอง 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลวที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ โดยเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ อาหาร NB และ King 's B medium

3) นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

4) เก็บตัวอย่างสารละลายแบคทีเรียทุกๆ 4 ชั่ว โมง เป็นเวลา 32 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย โดยวิธี Dilution plate count method เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด

2.6.2 การศึกษาชนิดของวัสดุรองรับเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

1) การศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในรูปแบบการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนต

1.1) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 6 ตำรับการทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิต กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรีย KBRN 7/1 และ KBRN 9/3 ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ 1 แบคทีเรีย KBRN 7/1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
ตำรับการทดลองที่ 2 แบคทีเรีย KBRN 9/3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
ตำรับการทดลองที่ 3 แบคทีเรีย KBRN 7/1 + KBRN 9/3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
ตำรับการทดลองที่ 4 แบคทีเรีย KBRN 7/1 เก็บรักษาในตู้เย็น
ตำรับการทดลองที่ 5 แบคทีเรีย KBRN 9/3 เก็บรักษาในตู้เย็น
ตำรับการทดลองที่ 6 แบคทีเรีย KBRN 7/1 + KBRN 9/3 เก็บรักษาในตู้เย็น

1.2) ขั้นตอนการดำเนินการ

การเตรียมและการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในรูปแบบการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนต (รัชพล และคณะ, 2555) มีดังนี้

1.2.1) การเลี้ยงแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก นำแบคทีเรีย จำนวน 2 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความขุ่นของแบคทีเรีย (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร หลังจากนั้นเจือจางด้วยอาหารชนิดเดียวจนได้ค่า OD เท่ากับ 0.1 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

1.2.2) นำสารละลายแบคทีเรีย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อแยกเซลล์

1.2.3) นำเซลล์ที่ปั่นแยกได้ใส่ในบีกเกอร์ เติมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.2.4) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายผสม ฉีดผ่านรูเข็มขนาด 0.8 × 3 มิลลิลิตร หยดลงในสารสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งจะปรากฏเป็นเม็ดเจลเกิดขึ้นทันทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ นำเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนนำไปใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้ออีกครั้ง และเก็บที่อุณหภูมิ 2 สภาวะ คือ อุณหภูมิห้องและตู้เย็นตามตำรับการทดลอง

1.2.5) เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในรูปแบบการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ ได้แก่ ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน และทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 12 เดือน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี dilution plate count method และวิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ตามวิธีของ Mauzerall and Granick (1956) ต่อไป

2) การศึกษาชนิดของวัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

นำปุ๋ยอินทรีย์และวัสดุอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ ปุ๋ยหมักจากกากอ้อย ปุ๋ยหมักจากเปลือกไม้ยูคาลิปตัส และพีทมอส เพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบวัสดุรองรับจุลินทรีย์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 9 ตำรับการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ 1 ปุ๋ยหมักกากอ้อย + แบคทีเรีย KBRN 7/1
ตำรับการทดลองที่ 2 ปุ๋ยหมักกากอ้อย + แบคทีเรีย KBRN 9/3
ตำรับการทดลองที่ 3 ปุ๋ยหมักกากอ้อย + แบคทีเรีย KBRN 7/1 + KBRN 9/3
ตำรับการทดลองที่ 4 ปุ๋ยหมักเปลือกไม้ยูคาลิปตัส + แบคทีเรีย KBRN 7/1
ตำรับการทดลองที่ 5 ปุ๋ยหมักเปลือกไม้ยูคาลิปตัส + แบคทีเรีย KBRN 9/3
ตำรับการทดลองที่ 6 ปุ๋ยหมักเปลือกไม้ยูคาลิปตัส + แบคทีเรีย KBRN 7/1 + KBRN 9/3
ตำรับการทดลองที่ 7 พีทมอส + แบคทีเรีย KBRN 7/1
ตำรับการทดลองที่ 8 พีทมอส + แบคทีเรีย KBRN 9/3
ตำรับการทดลองที่ 9 พีทมอส + แบคทีเรีย KBRN 7/1 + KBRN 9/3

3) การศึกษาชนิดของวัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

นำวัสดุอนินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ เพอร์ไลต์ และ ภูไมท์ เพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบวัสดุรองรับจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 6 ตำรับการทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ 1 เพอร์ไลต์ + แบคทีเรีย KBRN 7/1
ตำรับการทดลองที่ 2 เพอร์ไลต์ + แบคทีเรีย KBRN 9/3
ตำรับการทดลองที่ 3 เพอร์ไลต์ + แบคทีเรีย KBRN 7/1 + KBRN 9/3
ตำรับการทดลองที่ 4 ภูไมท์ + แบคทีเรีย KBRN 7/1
ตำรับการทดลองที่ 5 ภูไมท์ + แบคทีเรีย KBRN 9/3
ตำรับการทดลองที่ 6 ภูไมท์ + แบคทีเรีย KBRN 7/1 + KBRN 9/3

4) ขั้นตอนการดำเนินงานศึกษาชนิดของวัสดุอินทรีย์และอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับ

4.1) นำวัสดุรองรับอินทรีย์ และอนินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบไปวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุ ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ธาตุอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติของวัสดุอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

ชนิดวัสดุ	OM (%)	N (%)	P_2O_5 (%)	K_2O (%)	CaO (%)	MgO (%)	S (%)	pH (1:1)
ปุ๋ยหมักกากอ้อย	22.71	1.03	2.61	0.61	10.21	0.93	0.32	7.01
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้	34.52	1.14	0.92	1.27	20.17	0.85	0.19	8.08
พีทมอส	87.27	1.06	0.27	0.31	3.85	0.58	0.19	5.80
เพอร์ไลต์	4.33	0.05	0.11	0.12	0.06	0.01	0.01	9.09
ภูไมท์	4.80	0.04	0.08	0.18	0.27	0.12	0.07	8.52

4.2) การเตรียมกล้าเชื้อ นำแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรีย KBRN 7/1 และ KBRN 9/3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาตามผลการทดลอง 2.6.1 คือ 20 ชั่วโมง

4.3) นำกล้าเชื้อแบคทีเรียใส่ลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรของกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการขยายเพิ่มปริมาณเชื้อ แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

4.4) นำเชื้อมาผสมกับวัสดุรองรับชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลองตามตำรับการทดลองข้างต้น ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้สารละลายแบคทีเรีย 50 มิลลิลิตร ในวัสดุรองรับ 300 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปผึ่งในที่ร่มประมาณ 3 - 5 วัน หรือจนกระทั่งความชื้นของวัสดุไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปบรรจุในถุงพลาสติกเก็บในที่ร่มเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ และกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ต่อไป

4.5) การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุรองรับในแต่ละตำรับการทดลอง ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ ได้แก่ ทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน และทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 12 เดือน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี dilution plate count method และ วิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ตามวิธีของ Mauzerall and Granick (1956) ต่อไป

4.6) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test

2.6.3 การศึกษาวิธีการขยายเชื้อจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุรองรับ

คัดเลือกรูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ จากการศึกษาชนิดของวัสดุรองรับ คือ ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในปุ๋ยหมักเป็นตัวแทนในการศึกษาวิธีการขยายเชื้อ ดังนี้

1) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 7 ตำรับการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ 1 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก 25 กรัม + ปุ๋ยหมัก 100 กิโลกรัม + รำ 1%
ตำรับการทดลองที่ 2 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก 25 กรัม + ปุ๋ยหมัก 200 กิโลกรัม + รำ 1%
ตำรับการทดลองที่ 3 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก 25 กรัม + ปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัม + รำ 1%

ตำรับการทดลองที่ 4 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก 25 กรัม + กากน้ำตาล 5 ลิตร + น้ำ 50 ลิตร

ตำรับการทดลองที่ 5 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก 25 กรัม + กากน้ำตาล 2.5 ลิตร + น้ำ 50 ลิตร

ตำรับการทดลองที่ 6 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก 25 กรัม + กากส่าเหล้า 5 ลิตร + น้ำ 50 ลิตร

ตำรับการทดลองที่ 7 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก 25 กรัม + กากส่าเหล้า 2.5 ลิตร + น้ำ 50 ลิตร

2) ขั้นตอนการดำเนินการ มีดังนี้

2.1) นำวัสดุที่ใช้ในการขยายเชื้อ ได้แก่ ปุ๋ยหมัก รำละเอียด กากน้ำตาล และกากส่าเหล้า ได้แก่ ปริมาณอินทรียวัตถุ ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สมบัติของวัสดุที่ใช้ในการขยายเชื้อผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

ชนิดวัสดุ	OM (%)	N (%)	P_2O_5 (%)	K_2O (%)	pH (1:1)
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้	22.71	1.03	2.61	0.61	7.01
รำละเอียด	82.0	0.95	3.95	1.54	6.20
กากน้ำตาล	48.0	0.725	0.070	0.620	4.75
กากส่าเหล้า	4.72	0.09	0.01	0.30	3.44

2.2) การขยายเชื้อแบบแห้ง 3 วิธีการ เพื่อใช้ในตำรับการทดลองที่ 1 2 และ 3 ดังนี้

- ใช้หัวเชื้อจากผลิตภัณฑ์ 25 กรัม ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก 100 กิโลกรัม ผสมรำ 1% (กรมพัฒนาที่ดิน, 2556ก)
- ใช้หัวเชื้อจากผลิตภัณฑ์ 25 กรัม ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก 200 กิโลกรัม ผสมรำ 1%
- ใช้หัวเชื้อจากผลิตภัณฑ์ 25 กรัม ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัม ผสมรำ 1%

2.3) การขยายเชื้อแบบเหลว 4 วิธีการ เพื่อใช้ในตำรับการทดลองที่ 4 5 6 และ 7 ดังนี้

- ใช้หัวเชื้อจากผลิตภัณฑ์ 25 กรัม ขยายเชื้อในกากน้ำตาล 5 ลิตร ต่อ น้ำ 50 ลิตร (อัตราส่วน 1 : 10) (กรมพัฒนาที่ดิน, 2556ก)
- ใช้หัวเชื้อจากผลิตภัณฑ์ 25 กรัม ขยายเชื้อในกากน้ำตาล 2.5 ลิตร ต่อ น้ำ 50 ลิตร (อัตราส่วน 1 : 20)
- ใช้หัวเชื้อจากผลิตภัณฑ์ 25 กรัม ขยายเชื้อในกากส่าเหล้า 5 ลิตร ต่อ น้ำ 50 ลิตร (อัตราส่วน 1 : 10)
- ใช้หัวเชื้อจากผลิตภัณฑ์ 25 กรัม ขยายเชื้อในกากส่าเหล้า 2.5 ลิตร ต่อ น้ำ 50 ลิตร (อัตราส่วน 1 : 20)

2.4) การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ตัวอย่าง

- เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ขยายเชื้อ ทุกๆ 1 วัน เป็นเวลา 10 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยวิธี Dilution plate count method

2.5) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test

2.7 การศึกษาอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในดินกรดสภาพโรงเรือนทดลอง

1) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 12 ตำรับทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ 1 ควบคุม

ตำรับการทดลองที่ 2 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน

ตำรับการทดลองที่ 3 ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน

ตำรับการทดลองที่ 4 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับการทดลองที่ 5 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน

ตำรับการทดลองที่ 6 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน

ตำรับการทดลองที่ 7 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับการทดลองที่ 8 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน

ตำรับการทดลองที่ 9 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน

ตำรับการทดลองที่ 10 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่

ตำรับการทดลองที่ 11 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน

ตำรับการทดลองที่ 12 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน

2) ขั้นตอนการดำเนินงาน

2.1) การเก็บตัวอย่างดิน และการเตรียมดิน

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่เดียวกันกับที่จะใช้ทดลองในสภาพแปลงทดลอง ต.ทุ่งสมอ อ.พนมทวน จ.กาญจนบุรี โดยใช้ชุดดินเดิมบาง นำตัวอย่างดินมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม และบดร่อนผ่านตะแกรงร่อนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของตะแกรง 2 มิลลิเมตร ชั่งตัวอย่างดินใส่ถุงพลาสติกถุงละ 10 กิโลกรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบรรจุใส่กระถางทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 นิ้ว ใส่ส่วนผสมต่างๆ ตามตำรับทดลอง เติมน้ำในกระถางจนท่วมผิวดินทำการปักดำกล้าข้าวจากกล้าที่เตรียมไว้ ลงในกระถางที่บรรจุดินไว้ดูแลรักษาต้นข้าวจนถึงอายุเก็บเกี่ยวผลผลิต

2.2) การเตรียมแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ใช้ในการทดลอง ดังนี้

นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 25 กรัม ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัม ผสมรำข้าวละเอียด 3 กิโลกรัม ตั้งกองปุ๋ยหมักเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ให้มีความสูงประมาณ 50 เซนติเมตร

ปรับความชื้นด้วยน้ำให้ได้ 70 เปอร์เซ็นต์ กองไว้ในที่ร่มเป็นเวลา 2 วัน (ตามผลการทดลองศึกษาวิธีการขยายเชื้อ)

2.3) การใส่ปัจจัยการผลิตในแต่ละตำรับการทดลอง

2.3.1) ตำรับการทดลองที่ 1 แปลงควบคุมไม่ใส่ปัจจัย

2.3.2) ตำรับการทดลองที่ 2 การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน ความต้องการธาตุอาหารของข้าวไม่ไวแสง เท่ากับ ปริมาณไนโตรเจน 18 กิโลกรัมต่อไร่ ปริมาณฟอสฟอรัส 6 กิโลกรัมต่อไร่ และปริมาณโพแทสเซียม 6 กิโลกรัมต่อไร่ โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 7 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วกระถาง (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

2.3.3) ตำรับการทดลองที่ 3 การใส่ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน โดยแบ่งใส่ 2 ครั้งดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 3.5 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วกระถาง

2.3.4) ตำรับการทดลองที่ 4 ถึง ตำรับการทดลองที่ 12 เป็นการเปรียบเทียบอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย 100 - 500 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งอ้างอิงตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยชีวภาพ พด.12 ที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัม (กรมพัฒนาที่ดิน, 2556ก) และเปรียบเทียบอัตราการใช้เพิ่มขึ้นและลดลงจากอัตราคำแนะนำดังกล่าว มีรายละเอียดดังนี้

ตำรับการทดลองที่ 4 การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก และรำข้าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วไปคลุกเคล้ากับดินก่อนปลูกข้าว

ตำรับการทดลองที่ 5 ดังนี้

- การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก และรำข้าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วไปคลุกเคล้ากับดินก่อนปลูกข้าว
- การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน แบ่งใส่ 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 7 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วกระถาง

ตำรับการทดลองที่ 6 ดังนี้

- การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก และรำข้าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วไปคลุกเคล้ากับดินก่อนปลูกข้าว
- การใส่ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน แบ่งใส่ 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 3.5 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วกระถาง

ตำรับการทดลองที่ 7 การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก และรำข้าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วไปคลุกเคล้ากับดินก่อนปลูกข้าว

ตำรับการทดลองที่ 8 ดังนี้

- การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก และรำข้าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วไปคลุกเคล้ากับดินก่อนปลูกข้าว
- การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน แบ่งใส่ 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 7 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วกระถาง

ตำรับการทดลองที่ 9 ดังนี้

- การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก และรำข้าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วไปคลุกเคล้ากับดินก่อนปลูกข้าว
- การใส่ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน แบ่งใส่ 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 3.5 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วกระถาง

ตำรับการทดลองที่ 10 การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก และรำข้าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วไปคลุกเคล้ากับดินก่อนปลูกข้าว

ตำรับการทดลองที่ 11 ดังนี้

- การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก และรำข้าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วไปคลุกเคล้ากับดินก่อนปลูกข้าว
- การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน แบ่งใส่ 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 7 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วกระถาง

ตำรับการทดลองที่ 12 ดังนี้

- การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ นำผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก และรำข้าวเป็นเวลา 2 วัน แล้วไปคลุกเคล้ากับดินก่อนปลูกข้าว
- การใส่ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน แบ่งใส่ 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 3.5 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วกระถาง

2.4) การปลูกข้าว

ใช้พันธุ์ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง คือ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 ทำการเพาะกล้าข้าว เป็นเวลา 1 เดือน นำไปปักดำในกระถางที่บรรจุดินและปัจจัยตามตำรับการทดลอง จำนวน 1 ต้นต่อกระถาง

2.5) การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างก่อนการทดลองที่ระดับความลึก 0 - 15 เซนติเมตร โดยสุ่มจำนวน 15 จุด และนำมาผสมกันเพื่อส่งวิเคราะห์ และทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการเก็บผลผลิตข้าว ในแต่ละกระถาง นำดินที่เก็บมาจากแปลงทดลองไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นบดให้ละเอียดและผสมคลุกเคล้าดินให้มีความสม่ำเสมอ นำดินส่วนหนึ่งมาร่อนผ่านตะแกรง 2 มิลลิเมตร วิเคราะห์สมบัติทางเคมีดิน ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน

การเก็บข้อมูลพืช ได้แก่ ความสูง จำนวนต้นต่อกอ น้ำหนักเมล็ดดีต่อรวง เมล็ดลีบต่อรวง และผลผลิตข้าว

2.6) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test

2.8 การศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกร่วมกับการจัดการดินกรดเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตข้าวในสภาพแปลงทดลอง

1) การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Completely Block Design, RCBD) ทำการทดลอง 6 ตำรับการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

ตำรับการทดลองที่ 1 ควบคุม (ไม่ใส่ปัจจัย)
ตำรับการทดลองที่ 2 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน
ตำรับการทดลองที่ 3 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน + ปูนโดโลไมท์ (ตามความต้องปูน)
ตำรับการทดลองที่ 4 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่
ตำรับการทดลองที่ 5 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์
ตำรับการทดลองที่ 6 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน

2) ขั้นตอนการดำเนินงาน

2.1) ดำเนินการทดลองในดินกรด พื้นที่แปลงปลูกข้าวของเกษตรกร ตำบลทุ่งสมอ อำเภอพนมทวน จังหวัดกาญจนบุรี ชุดดินเดิมบาง

2.2) การเตรียมเมล็ดพันธุ์และการปลูก

2.2.1) ปลูกข้าว พันธุ์สุพรรณบุรี 1 โดยใช้อัตรา 7 กิโลกรัมต่อไร่

2.2.2) การเพาะกล้าข้าว เตรียมแปลงตกกล้า โดยไถดะ ทิ้งไว้ 7 - 15 วัน ไถแปร ปล่อยน้ำเข้านา แช่ขี้ไถ คราดปรับระดับผิวดินแล้วทำเทือก หว่านเมล็ดข้าวที่เตรียมไว้ให้สม่ำเสมอทั่วแปลง อัตราเมล็ดพันธุ์ 7 กิโลกรัมต่อไร่ โดยให้แปลงเพาะกล้ามีความชื้นเพียงพอสำหรับการงอก เพิ่มระดับน้ำตามการเจริญเติบโตของต้นข้าว อย่าให้น้ำท่วมต้นข้าว เพาะกล้าอายุประมาณ 1 เดือน

2.2.3) การปลูกข้าว ปลูกข้าวด้วยวิธีการปักดำ โดยใช้ระยะปักดำ ในระยะห่าง 20 X 20 เซนติเมตร ปักดำจับละ 3 ต้น โดยใช้ต้นกล้าอายุประมาณ 1 เดือน

2.3) การเตรียมแปลงปลูก

2.3.1) เตรียมแปลงทดลองขนาด 5 x 5 เมตร จำนวนทั้งหมด 18 แปลง ระยะระหว่างแปลง 1 เมตร ระยะปักดำประมาณ 20 x 20 เซนติเมตร ระยะร่องน้ำ 1 เมตร พื้นที่เก็บข้อมูลการในแต่ละแปลงขนาด 2 X 4 เมตร

2.3.2) การวางแปลงทดลองตามผังแปลงทดลอง ดังนี้

T2	T4	T3
T1	T5	T6
T3	T1	T4
T5	T2	T1
T4	T3	T2
T6	T6	T5
Block 1	Block 2	Block 3

2.4) การใส่ปัจจัยการผลิต และการดูแลรักษาหลังจากปลูก

ตำรับการทดลองที่ 1 แปลงควบคุมไม่ใส่ปัจจัย

ตำรับการทดลองที่ 2 การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน ความต้องการธาตุอาหารของข้าวไม่ไวแสง ประกอบด้วย ปริมาณไนโตรเจน 18 กิโลกรัมต่อไร่ ปริมาณฟอสฟอรัส 6 กิโลกรัมต่อไร่ และปริมาณโพแทสเซียม 6 กิโลกรัมต่อไร่ โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 7 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วแปลง

ตำรับการทดลองที่ 3

- การใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน ใส่วิธีการเดียวกันกับตำรับการทดลองที่ 2
- การใส่ปูนโดโลไมท์ ตามค่าวิเคราะห์ความต้องปูนเท่ากับ 156 กิโลกรัมต่อไร่ หว่านทั่วแปลงหมักทิ้งไว้ 7 วัน ก่อนปักดำ เพื่อยกระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินเป็น 6.5 เนื่องจาก ค่าความเป็นกรดเป็นด่างระดับนี้จะเกิดผลดีต่อพืช เช่น ทำให้ความเป็นประโยชน์ของธาตุ

อาหารของพืชเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะฟอสฟอรัส โมลิบดีนั่ม รวมทั้งปริมาณไอออนของสารละลายดินในธาตุบางชนิดที่มีมากเกินไปอาจเกิดพิษกับพืชได้ (ปิยะ, 2556) ย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ความต้องการปูนในห้องปฏิบัติการนั้น ปริมาณปูนที่จะต้องใส่ โดยมากเมื่อนำไปใส่ในพื้นที่แล้ว จะไม่สามารถยกระดับความเป็นกรดเป็นด่างของดินได้ตามที่วิเคราะห์ ทั้งนี้เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ปูนถูกชะล้างไปบ้าง ทำปฏิกิริยากับน้ำชลประทานหรือน้ำฝนที่มีปฏิกิริยาเป็นกรด เป็นต้น (สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน, 2547) โดยจากการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโดโลไมต์ มีค่าความสามรถในการสะเทินกรด หรือ ค่าสมมูลแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate equivalent; CCE) 108 เปอร์เซ็นต์ CaO 32.87 เปอร์เซ็นต์ MgO 19.22 เปอร์เซ็นต์

ตำรับการทดลองที่ 4 การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ทำการขยายเชื้อแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยใช้ผงเชื้อ 25 กรัม ขยายเชื้อในปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัม ผสมรำข้าวละเอียด 3 กิโลกรัม ตั้งกองปุ๋ยหมักเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ให้มีความสูงประมาณ 50 เซนติเมตร ปรับความชื้นด้วยน้ำให้ได้ 70 เปอร์เซ็นต์ กองไว้ในที่ร่มเป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปหว่านให้ทั่วแปลงก่อนปักดำ

ตำรับการทดลองที่ 5

- การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ วิธีการเดียวกันกับตำรับการทดลองที่ 4
- การใส่ปูนโดโลไมท์ ตามค่าวิเคราะห์ความต้องปูนเท่ากับ 156 กิโลกรัมต่อไร่ หว่านทั่วแปลงหมักทิ้งไว้ 7 วัน ก่อนปักดำ

ตำรับการทดลองที่ 6

- การใส่ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ วิธีการเดียวกันกับตำรับการทดลองที่ 4
- การใส่ปูนโดโลไมท์ ตามค่าวิเคราะห์ความต้องปูนเท่ากับ 156 กิโลกรัมต่อไร่ หว่านทั่วแปลงหมักทิ้งไว้ 7 วัน ก่อนปักดำ
- การใส่ปุ๋ยเคมีอัตราครึ่งหนึ่งตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 18 - 46 - 0 อัตรา 3.5 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 - 0 - 60 อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่ รองพื้นก่อนปักดำ ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46 - 0 - 0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวอายุ 60 วันหลังปลูก โรยให้ทั่วแปลง

2.5) การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.5.1) การเก็บตัวอย่างดิน

การเก็บตัวอย่างก่อนการทดลองที่ระดับความลึก 0 - 15 เซนติเมตร โดยสุ่มจำนวน 15 จุด และนำมาผสมกันเพื่อส่งวิเคราะห์ และทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการเก็บผลผลิตข้าว โดยสุ่มเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 0 - 15 เซนติเมตร จำนวน 3 จุดต่อแปลง แล้วรวมตัวอย่างเป็น 1 ตัวอย่าง นำดินที่เก็บมาจากแปลงทดลอง ไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นบดให้ละเอียดและผสมคลุกเคล้าดินให้มีความสม่ำเสมอ นำดินส่วนหนึ่งมาร่อนผ่านตะแกรง 2 มิลลิเมตร วิเคราะห์สมบัติทางเคมีดิน ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน

2.5.2) การเก็บข้อมูลด้านการเจริญเติบโตข้าว ดังนี้

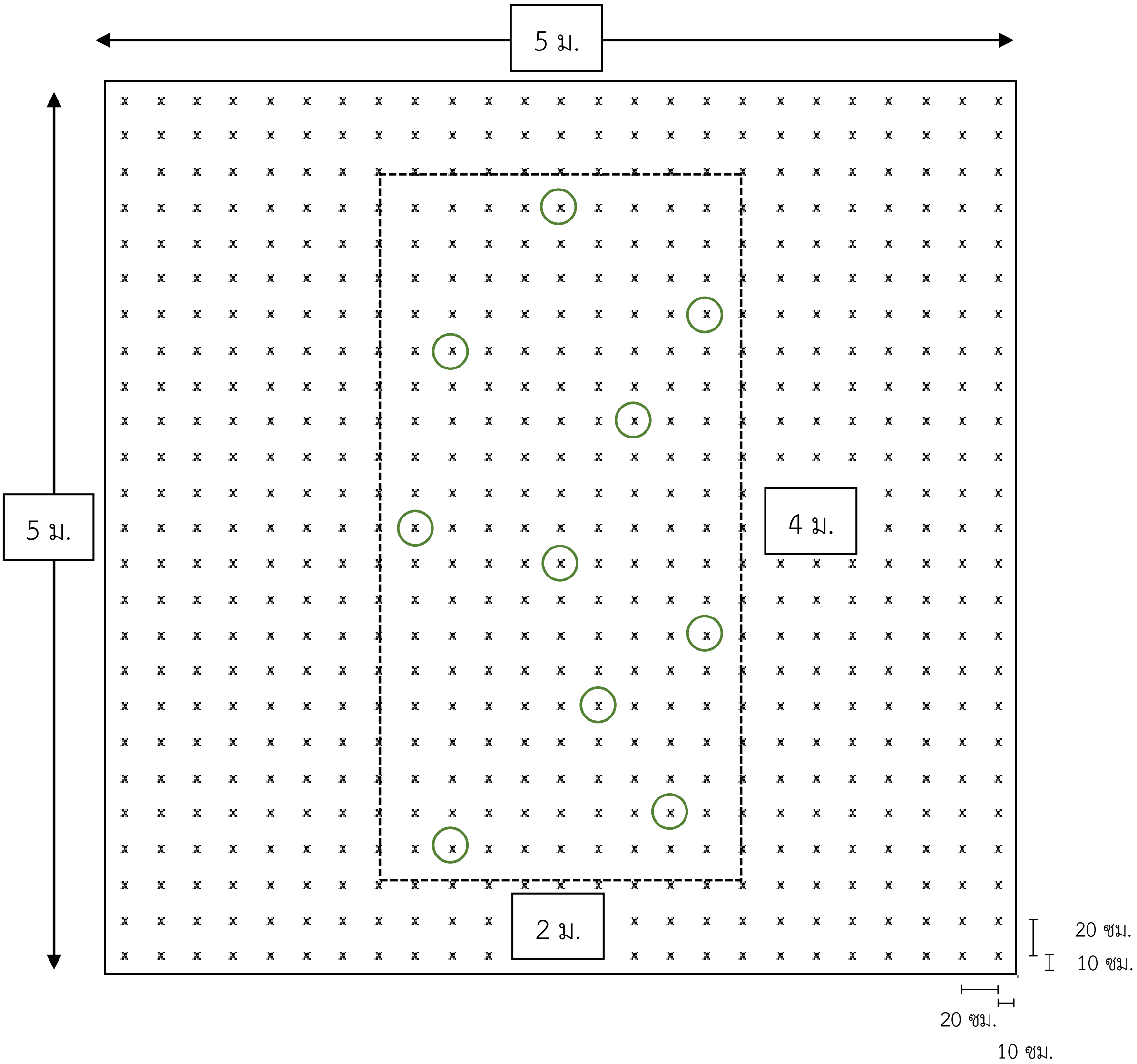
- วัดความสูงข้าว โดยสุ่มวัดแปลงละ 10 กอ

- นับจำนวนต้นต่อกอที่ระยะแตกกอสูงสุด โดยสุ่มวัดแปลงละ 10 กอ
- องค์ประกอบของผลผลิต ในแต่ละแปลงย่อย ได้แก่ น้ำหนักเมล็ดดี น้ำหนักเมล็ดลีบ
- บันทึกผลผลิตข้าวที่ระดับความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บเกี่ยวจากพื้นที่เก็บเกี่ยวขนาด 2 x 4 ตารางเมตร

2.6) การเก็บข้อมูลผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ โดยบันทึกค่าใช้จ่ายต่างๆ เช่น ค่าวัตถุดิบ ค่าเตรียมแปลง และค่าแรงต่างๆ

2.7) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test



ภาพที่ 6 แสดงระยะปลูก พื้นที่เก็บข้อมูล และพื้นที่เก็บเกี่ยวข้าวในแต่ละแปลงย่อย

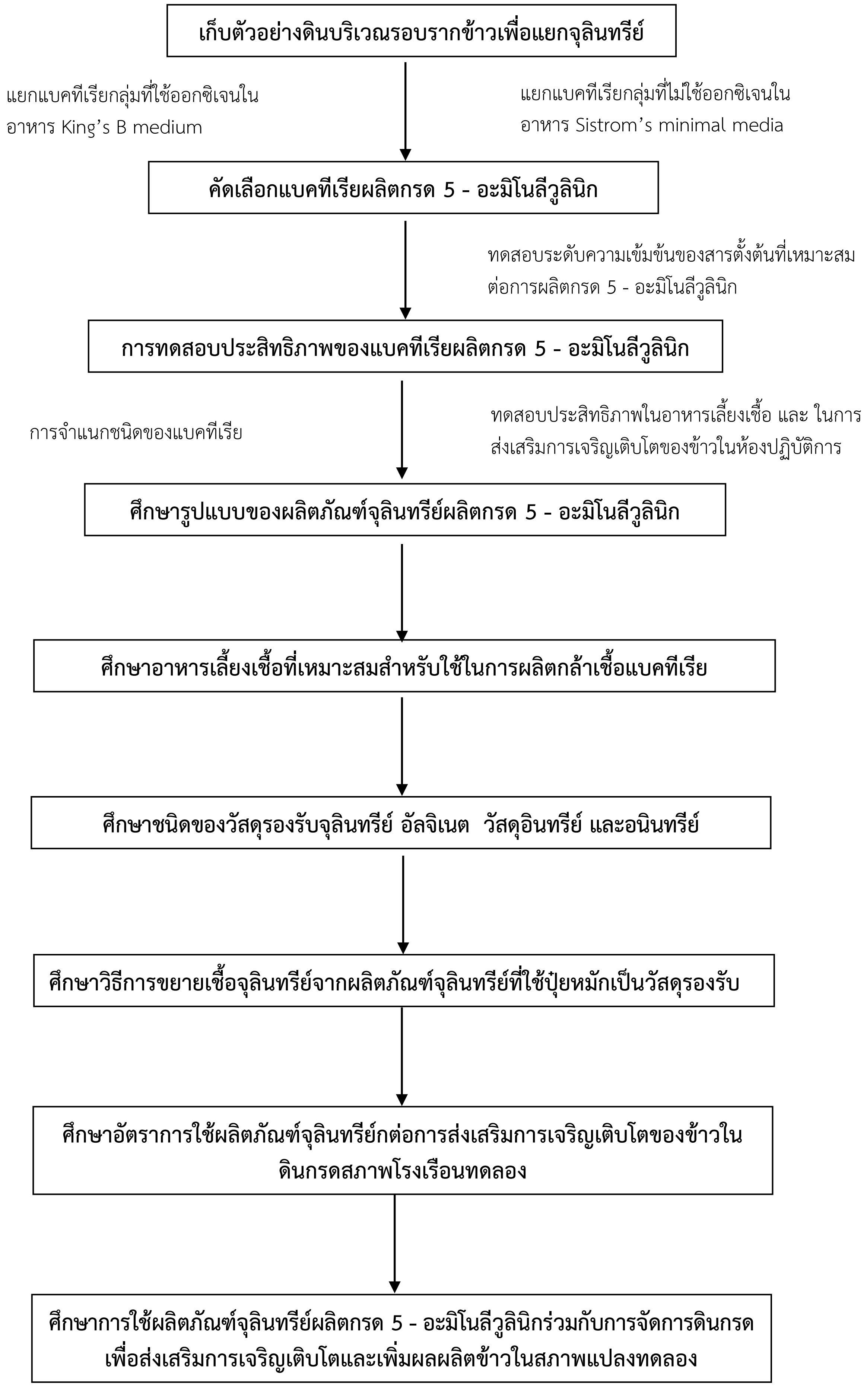
หมายเหตุ: 1. พื้นที่แปลงย่อยขนาด 5 x 5 เมตร

2. X หมายถึง ต้นข้าวที่ปลูกในระยะ 20 X 20 เซนติเมตร

3. -------- หมายถึง พื้นที่เก็บเกี่ยวผลผลิตข้าว 2 X 4 เมตร

4. ○ หมายถึง ตำแหน่งที่สุ่มเก็บข้อมูลความสูงต้นข้าว จำนวนต้นต่อกอ

แผนผังวิธีการดำเนินงานวิจัย


เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากข้าวเพื่อแยกจุลินทรีย์
แยกแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนใน อาหาร King’s B medium
แยกแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนใน อาหาร Sistrom’s minimal media
คัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก
ทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสม ต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก
การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก
การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย
ทดสอบประสิทธิภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ในการ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในห้องปฏิบัติการ
ศึกษารูปแบบของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก
ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรีย
ศึกษาชนิดของวัสดุรองรับจุลินทรีย์ อัลจิเนต วัสดุอินทรีย์ และอนินทรีย์
ศึกษาวิธีการขยายเชื้อจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุรองรับ
ศึกษาอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์กต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวใน ดินกรดสภาพโรงเรือนทดลอง
ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกร่วมกับการจัดการดินกรด เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตข้าวในสภาพแปลงทดลอง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการแยกแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวในพื้นที่ 14 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม ชัยนาท พระนครศรีอยุธยา สระบุรี อ่างทอง สุพรรณบุรี ขอนแก่น นครราชสีมา ตาก สุโขทัย กำแพงเพชร และนครสวรรค์ รวมทั้งสิ้น 149 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แยกจากดินบริเวณรอบรากข้าว

แหล่งที่มาของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างดิน
จ. ปทุมธานี	11
จ. นนทบุรี	10
จ. นครปฐม	17
จ. ชัยนาท	7
จ. พระนครศรีอยุธยา	29
จ. สระบุรี	5
จ. อ่างทอง	3
จ. สุพรรณบุรี	2
จ. ขอนแก่น	16
จ. นครราชสีมา	6
จ. ตาก	15
จ. สุโขทัย	3
จ. กำแพงเพชร	10
จ. นครสวรรค์	15
รวม	**149**

1.2 การแยกแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

1.2.1 การแยกแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน

จากการนำตัวอย่างดินมาทำการแยกแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ King’s B medium สามารถแยกแบคทีเรียได้ ทั้งหมด 35 ไอโซเลต ได้แก่ KBRK 1/1 KBRK 1/2 KBRN 1/3 KBRN 2/4 KBRN 3/1 KBRN 3/2 KBRN 4/2 KBRN 4/3 KBRN 5/1 KBRN 5/3 KBRN 6/1 KBRN 6/3 KBRN 6/4 KBRN 7/1 KBRN 7/2 KBRN 7/3 KBRN 7/4 KBRN 9/2 KBRN 9/3 KBRN 11/3 KBRN 12/1 KBRN13/1 KBRN 13/2 KBRN 13/5 KBRN 14/2 KBRN 14/3 KBRP 15/1 KBRP 1/1 KBRP 2/1 KBRP 2/5 KBRP 3/3 KBRP 3/4 KBRP 4/2 KBRP 4/3 และ KBRP 5/2

1.1.2 การแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มไม่ใช้ออกซิเจน

จากการนำตัวอย่างดินมาทำการแยกแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไม่ใช้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sistrom's mimimal medium สามารถแยกแบคทีเรียได้ 25 ไอโซเลต ได้แก่ PR2 RAYT16/2 RAYT136 RCN9 RCN44 RCN47 RKPP27 RN9 RN12 RN12/1 RN13 RN13/2 RN16/3 RNKS36 RNKS41 RNPP29 RNPP30 RP2 RP125 RSK3 RSK4 RSK10 RSP145 RT11 และ 31/1

2. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

2.1 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

2.1.1 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน

จากการสุ่มเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน 4 ไอโซเลต ได้แก่ KBRN 15/1 KBRP 5/2 KBRP 2/1 และ KBRK 1/1 มาทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยใช้กรดอะมิโนชนิด L - alanine เป็นสารตั้งต้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 4 ระดับ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ได้สูงสุดที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 5 - 7 วัน แต่การใช้ L - alanine เป็นสารตั้งต้นที่ระดับความเข้มข้นมากขึ้นไม่มีผลในการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่จุลินทรีย์ผลิตได้ สำหรับความเข้มข้นของ L - alanine ที่มีผลต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ที่นำมาทดสอบ พบว่า การใช้ L - alanine ที่ระดับความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด โดยแบคทีเรีย KBRN 15/1 สามารถผลิตได้สูงสุด 21.76 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน รองลงมา คือ แบคทีเรีย KBRP 5/2 สามารถผลิตได้สูงสุด 21.54 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน สำหรับแบคทีเรียไอโซเลต KBRK 1/1 และKBRP 2/1 สามารถผลิตได้สูงสุด 11.86 และ 10.86 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน ดังนั้น จึงเลือกระดับความเข้มข้นของ L - alanine 15 กรัมต่อลิตร และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ของแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนที่คัดแยกได้ทั้งหมดจากดินต่อไป ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกทางชีวภาพนั้น เกิดจากจุลินทรีย์หลายกลุ่ม แต่ในการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มนั้น จะใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน เช่น กลูตาเมต ไกลซีน และอะลานีน เป็นต้น โดยพบว่า *P. riboflavina* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน จะใช้อะลานีนเป็นสารตั้งต้นและสามารถสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิได้ 0.25 มิลลิโมลาร์ (Rhee *et al.*, 1987)

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg l^{-1}) ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของ L - alanine และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน

ไอโซเลต/ระดับความเข้มข้นของ L-alanine	ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
KBRN 15/1 0 กรัมต่อลิตร	8.41	9.58	9.49	9.64	9.24	9.62	14.99
KBRN 15/1 5 กรัมต่อลิตร	8.19	8.30	6.53	12.99	16.24	15.97	15.83
KBRN 15/1 10 กรัมต่อลิตร	7.14	6.85	13.15	17.39	17.38	16.71	15.42
KBRN 15/1 15 กรัมต่อลิตร	7.82	5.91	6.27	10.86	17.94	21.54	21.76
KBRP 5/2 0 กรัมต่อลิตร	7.81	7.21	8.09	9.38	11.71	8.98	7.76
KBRP 5/2 5 กรัมต่อลิตร	7.60	6.56	5.64	5.84	7.17	8.34	10.55
KBRP 5/2 10 กรัมต่อลิตร	7.44	7.02	6.08	6.34	6.85	6.47	6.43
KBRP 5/2 15 กรัมต่อลิตร	7.37	6.49	6.14	6.34	10.41	21.54	8.54
KBRP 2/1 0 กรัมต่อลิตร	6.92	7.32	7.52	8.37	8.81	8.22	10.35
KBRP 2/1 5 กรัมต่อลิตร	6.78	6.12	6.38	7.30	7.91	8.96	10.13
KBRP 2/1 10 กรัมต่อลิตร	7.79	6.55	5.78	6.31	9.25	10.69	9.98
KBRP 2/1 15 กรัมต่อลิตร	7.12	6.28	6.37	9.60	8.52	7.50	10.86
KBRK 1/1 0 กรัมต่อลิตร	6.95	7.61	8.56	10.67	11.47	11.72	7.51
KBRK 1/1 5 กรัมต่อลิตร	7.15	6.98	6.56	6.26	6.30	8.28	6.94
KBRK 1/1 10 กรัมต่อลิตร	7.56	7.06	6.31	6.22	7.18	9.06	11.27
KBRK 1/1 15 กรัมต่อลิตร	6.97	6.74	6.31	6.23	6.83	8.56	11.86
ค่าเฉลี่ย	7.44	7.03	7.20	8.73	10.26	11.51	11.20

2.1.2 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มไม่ใช้ออกซิเจน

จากการสุ่มเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มไม่ใช้ออกซิเจน จำนวน 10 ไอโซเลต มาทดสอบระดับความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อการสร้างกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยใช้กรดอะมิโนชนิด glutamic acid เป็นสารตั้งต้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 4 ระดับ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่า การใช้ glutamic acid ที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้การผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ของแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต มีค่าสูงสุด และที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 10 วัน แบคทีเรียสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ได้มากกว่าการเลี้ยงเชื้อระยะเวลา 5 วัน โดยแบคทีเรียรหัส Ry 11 สามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 5.88 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือแบคทีเรียรหัส 12/1 ผลิตได้ 5.81 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ พรพิมล และวัฒนาลัย (2554) พบว่า แบคทีเรีย *P. acidipropionici* ใช้กลูตาเมตเป็นสารตั้งต้นซึ่งมีผลทำให้แบคทีเรียเพิ่มการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองที่ไม่ใช้กลูตาเมต และแบคทีเรีย *A. nidulans* ใช้กลูตาเมตเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 0.38 ไมโครโมลาร์ (Anderson *et al.*, 1983) ส่วนแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodovulum* sp. สามารถสังเคราะห์ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ กลูตาเมต หรือไกลซีนเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงสุด 2.0 ไมโครโมลาร์ (Noparatnaraporn *et al.*, 2000) นอกจากนี้การใช้โซเดียมกลูตาเมตในการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. พบว่ามีผลทำให้การเจริญและการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้นได้เท่ากับ 1.94 มิลลิโมลาร์ (Sasaki *et al.*, 1995) เนื่องจากในกระบวนการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ของแบคทีเรีย กลูตาเมตสามารถเปลี่ยน α - ketoglutarate โดยอาศัยปฏิกิริยา transaminases และในวัฏจักร TCA ก็จะเปลี่ยน α - ketoglutarate เป็น succinyl CoA และเมื่อรวมกับไกลซีนก็จะเปลี่ยนไปเป็นกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ดังนั้นแบคทีเรียในแต่ละชนิดจะมีชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 10 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ glutamic acid 10 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น

ไอโซเลต	**ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg l^{-1})**	
	5 วัน	**10 วัน**
JN 14	4.43	5.49
18/2	4.41	5.36
Ry 11	5.06	5.88
PR 2	4.12	5.28
RN 12	4.41	5.18
SSk 4/1	4.48	5.25
31/1	4.26	5.09
Ry 9	4.42	5.55
RN 13	4.95	5.22
12/1	4.69	5.81
ค่าเฉลี่ย	4.52	5.41

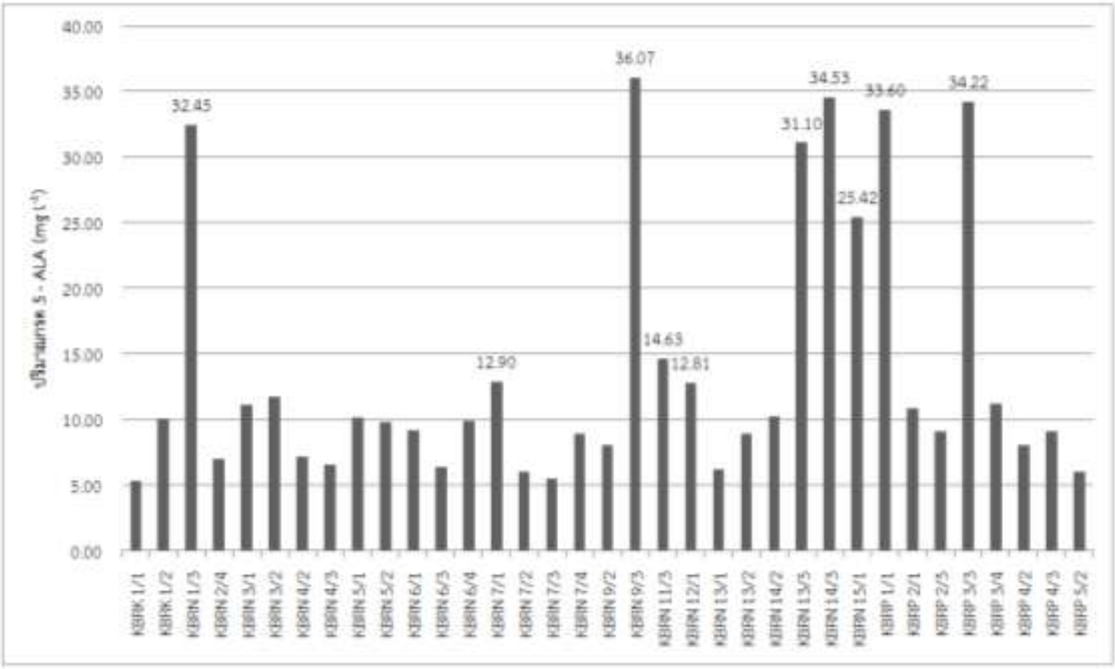
2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แยกได้จากดิน

2.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน

จากผลการทดลองระดับความเข้มข้นของ L - alanine ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 15 กรัมต่อลิตร และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน ซึ่งข้อมูลนี้นำมาทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่มไม่ใช้ออกซิเจนที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด จำนวน 35 ไอโซเลต ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 7 พบว่า แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.36 - 36.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแบคทีเรียรหัส KBRN 9/3 สามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด คือ 36.07 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ KBRN 14/3 ผลิตได้ 34.53 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KBRK 1/1 ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ต่ำสุด คือ 5.36 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบคทีเรียที่ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด 10 อันดับแรก ได้แก่ แบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 KBRP 3/3 KBRN 15/1 KBRN 11/3 KBRN 12/1 KBRN 1/3 KBRP 1/1 KBRN 9/3 KBRN 14/3 และ KBRN 13/5 สามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ในช่วง 12.81 - 36.07 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 6 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แบคทีเรียผลิตได้ในอาหารเหลว King’s B medium ที่ใช้ L - alanine 15 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น

ลำดับที่	ไอโซเลต	กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg l^{-1})	ลำดับที่	ไอโซเลต	กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg l^{-1})
1	KBRK 1/1	5.36	19	KBRN 9/3	36.07
2	KBRK 1/2	10.06	20	KBRN 11/3	14.63
3	KBRN 1/3	32.45	21	KBRN 12/1	12.81
4	KBRN 2/4	7.02	22	KBRN 13/1	6.25
5	KBRN 3/1	11.09	23	KBRN 13/2	8.94
6	KBRN 3/2	11.78	24	KBRN 13/5	31.1
7	KBRN 4/2	7.18	25	KBRN 15/1	25.42
8	KBRN 4/3	6.55	26	KBRN 14/2	10.27
9	KBRN 5/1	10.17	27	KBRN 14/3	34.53
10	KBRN 5/2	9.83	28	KBRP 1/1	33.6
11	KBRN 6/1	9.2	29	KBRP 2/1	10.86
12	KBRN 6/3	6.36	30	KBRP 2/5	9.13
13	KBRN 6/4	9.93	31	KBRP 3/3	34.22
14	KBRN 7/1	12.9	32	KBRP 3/4	11.25
15	KBRN 7/2	6.02	33	KBRP 4/2	8.09
16	KBRN 7/3	5.5	34	KBRP 4/3	9.1
17	KBRN 7/4	8.97	35	KBRP 5/2	6.07
18	KBRN9/2	8.07			



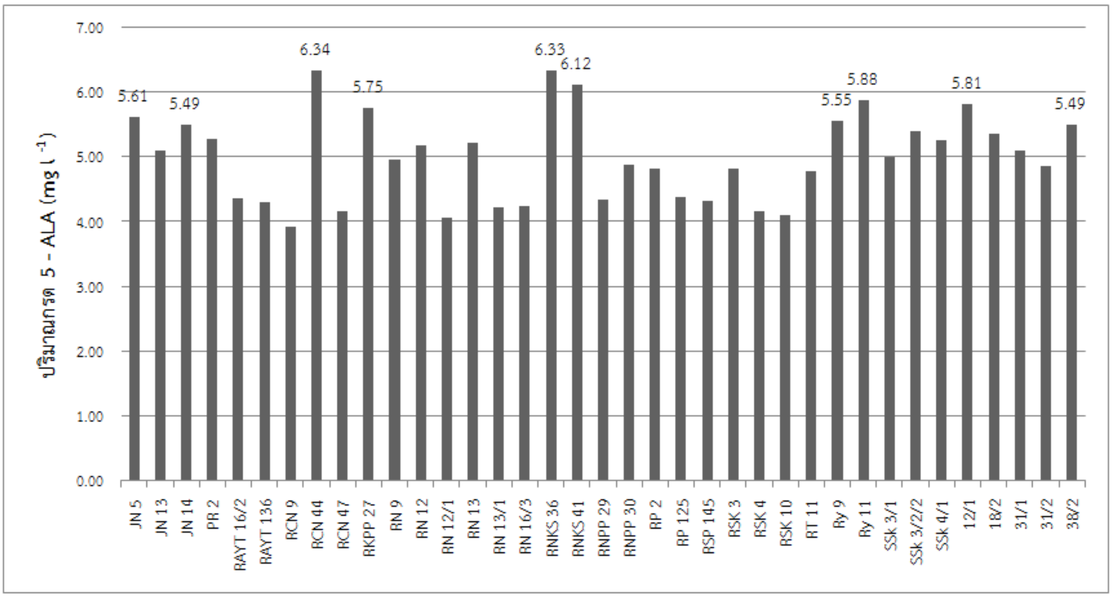
ภาพที่ 7 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แบคทีเรียผลิตได้ในอาหารเหลว King’s B medium ที่ใช้ L - alanine 15 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน

จากผลการทดลองระดับความเข้มข้นของ glutamic acid ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกของแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 10 กรัมต่อลิตร และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 10 วัน จึงได้นำข้อมูลนี้มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้จำนวน 25 ไอโซเลต พร้อมกับเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากโครงการคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ในตะกอนอินทรีย์พื้นที่ทะเลสาบสงขลาของกองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ JN 14 18/2 Ry 11 SSk 4/1 31/2 Ry 9 12/1 JN 5 JN 13 SSk 3/1 SSk 3/2/2 และ 38/2 รวมทั้งสิ้น 37 ไอโซเลต ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 8 พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกมีค่าอยู่ในช่วง 3.91 - 6.34 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบคทีเรียรหัส RCN 44 สามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด 6.34 มิลลิกรัมต่อลิตร และรหัส RCN 9 ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ต่ำสุด 3.91 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไอโซเลตที่ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูง 10 ลำดับแรก ได้แก่ ไอโซเลต JN14 Ry11 RKPP27 RNKS41 Ry9 RCN44 RNKS36 12/1 JN5 และ 38/2 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 5.49 - 6.34 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกสามารถสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ เช่น *R. Palustris* *R. capsulatus* และ *R. spheriodes* โดยการใช้กลูตาเมตเป็นสารตั้งต้นของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะช่วยในการสังเคราะห์ได้มากยิ่งขึ้น (Koh and Song, 2007; Noparatnaraporn *et al*., 2000; Kantha *et al*., 2010; Kars and Alparslan, 2013)

ตารางที่ 7 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แบคทีเรียผลิตได้ในอาหารเหลว Sistrom's minimal media เป็นเวลา 10 วัน ที่ใช้ glutamic acid 10 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น

ลำดับที่	ไอโซเลต	กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg l^{-1})	ลำดับที่	ไอโซเลต	กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg l^{-1})
1	JN 5	5.61	20	RNPP 30	4.87
2	JN 13	5.1	21	RP 2	4.82
3	JN 14	5.49	22	RP 125	4.37
4	PR 2	5.28	23	RSP 145	4.31
5	RAYT 16/2	4.36	24	RSK 3	4.81
6	RAYT 136	4.29	25	RSK 4	4.15
7	RCN 9	3.91	26	RSK 10	4.1
8	RCN 44	6.34	27	RT 11	4.78
9	RCN 47	4.16	28	Ry 9	5.55
10	RKPP 27	5.75	29	Ry 11	5.88
11	RN 9	4.95	30	SSk 3/1	5
12	RN 12	5.18	31	SSk 3/2/2	5.39
13	RN 12/1	4.05	32	SSk 4/1	5.25
14	RN 13	5.22	33	12/1	5.81
15	RN 13/1	4.21	34	18/2	5.36
16	RN 16/3	4.23	35	31/1	5.09
17	RNKS 36	6.33	36	31/2	4.85
18	RNKS 41	6.12	37	38/2	5.49
19	RNPP 29	4.33			



ภาพที่ 8 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่แบคทีเรียผลิตได้ในอาหารเหลว Sistrom's minimal media เป็นเวลา 10 วัน ที่ใช้ glutamic acid 10 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้น

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน จำนวนทั้งสิ้น 72 ไอโซเลต พบว่า แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด 10 อันดับแรก มีค่าในช่วง 12.81 - 36.07 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มไม่ใช้ออกซิเจนสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด 10 อันดับแรก มีค่าอยู่ในช่วง 5.49 - 6.34 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน ในผลการศึกษานี้มีค่าใกล้เคียงและมากกว่าปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. acidipropionici* ซึ่งผลิตได้ 13.4 - 20.6 มิลลิกรัมต่อลิตร (พรพิมล และวัฒนาลัย, 2554) สำหรับการศึกษาการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จากการศึกษาของ อังคณา (2556) แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนกรดจากพื้นที่ดินเปรี้ยวในจังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่า *R. palustris* JP255 สามารถกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้ 2.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินกิที่ผลิตจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากผลการศึกษาในครั้งนี้

ดังนั้นจากการทดลองนี้แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนมีประสิทธิภาพในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงกว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนที่ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด 10 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 KBRP 3/3 KBRN 15/1 KBRN 11/3 KBRN 12/1 KBRN 1/3 KBRP 1/1 KBRN 9/3 KBRN 14/3 และ KBRN 13/5 เพื่อนำไปทดสอบผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวในสภาพห้องปฏิบัติการต่อไป

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการเจริญเติบโตของข้าว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวไม่ไวแสงพันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวไวแสงพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สารละลายแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 10 ไอโซเลต ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 ดังนี้

1) การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1

จากการวัดความความสูง และความยาวรากของข้าวปทุมธานี 1 ที่อายุ 7 วัน พบว่า ความสูงของข้าวในทุกตำรับการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีความสูงอยู่ในช่วง 3.02 - 6.25 เซนติเมตร แต่การใส่เชื้อรหัส KBRN 9/3 มีแนวโน้มทำให้ความสูงของข้าวสูงสุด 6.25 เซนติเมตร รองลงมาคือ เชื้อรหัส KBRN 13/5 มีความสูง 5.80 เซนติเมตร โดยเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ พบว่า มีความสูงเพิ่มขึ้น 22.55 และ 13.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับความยาวราก พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการใส่เชื้อไอโซเลต KBRN 9/3 มีผลให้ความยาวรากสูงสุด 5.98 เซนติเมตร โดยเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ พบว่า ความยาวรากเพิ่มขึ้น 21.54 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกับการใส่เชื้อรหัส KBRN 14/3 KBRP 3/3 และ KBRN 12/1 ซึ่งมีความยาวรากเท่ากับ 2.67 2.85 และ 2.38 เซนติเมตร ตามลำดับ

2) การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวขาวดอกมะลิ 105

จากผลการวัดความสูง และความยาวรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่อายุ 7 วัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามการใส่เชื้อทั้ง 10 ไอโซเลต มีผลทำให้ข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความสูงอยู่ในช่วง 4.52 - 6.40 เซนติเมตร โดยการใส่เชื้อรหัส KBRN 7/1 มีผลให้ความสูงมากที่สุด โดยเพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 13.27 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความยาวรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 อยู่ในช่วง 4.03 - 6.97 เซนติเมตร และการใส่เชื้อรหัส KBRN 13/5 มีผลให้ความยาวรากของข้าวมีค่ามากที่สุด โดยเพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 49.25 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ พบว่า การใช้แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว 2 สายพันธุ์ ได้ทั้งด้านความสูงและความยาวราก โดยแบคทีเรียในแต่ละไอโซเลตจะมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ซึ่งกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ถือเป็นทั้งสารที่ใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมในพืช และเป็นสารที่ใช้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Wu *et al*., 2018) โดยมีการศึกษาวิจัยที่พบว่าการใช้แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก หลายสายพันธุ์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ เช่น *R. palustris* ช่วยเพิ่มการเจริญของรากและน้ำหนักแห้งของข้าวในสภาวะที่มีเกลือ (Nunkaew *et al*., 2014) แบคทีเรีย Propionic acid bacteria ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวหอมปทุมธานี 1 และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทั้งความสูง ความยาวราก และจำนวนราก (พรพิมล และวัฒนาลัย, 2554)

ตารางที่ 8 ความสูงและความยาวรากของข้าวปทุมธานี 1 และขาวดอกมะลิ 105 ที่อายุ 7 วัน จากการใส่แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ตำรับการทดลอง	ข้าวปทุมธานี 1		ข้าวขาวดอกมะลิ 105	
	ความสูง (ซม.)	ความยาวราก(ซม.)	ความสูง (ซม.)	ความยาวราก(ซม.)
1. ควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ)	5.10	4.92 abc	5.65	4.67
2. KBRN 1/3	4.67	5.60 ab	5.10	4.30
3. KBRN 7/1	4.83	5.53 ab	6.40	5.75
4. KBRN 9/3	6.25	5.98 a	4.85	5.25
5. KBRN 11/3	5.08	4.13 abc	5.67	5.32
6. KBRN 12/1	4.82	2.38 c	5.85	5.80
7. KBRN 13/5	5.80	5.85 a	5.45	6.97
8. KBRN 14/3	3.02	2.67 c	5.45	5.78
9. KBRN 15/1	4.40	5.57 ab	5.28	4.03
10. KBRP 1/1	5.05	4.33 abc	6.05	6.68
11. KBRP 3/3	4.55	2.85 bc	4.52	4.98
F-test	ns	*	ns	ns
CV (%)	14.73	21.10	16.84	28.93

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

จากการศึกษากิจกรรมของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ 3 ไอโซเลต คือ KBRN 7/1 KBRN 9/3 และ KBRN 13/5 นำไปจำแนกชนิดของเชื้อโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า KBRN 7/1 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Pseudomonas putida* โดยมีเปอร์เซ็นต์ Identities เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ KBRN 9/3 และ KBRN 13/5 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Bacillus thuringiensis* มีเปอร์เซ็นต์ Identities เท่ากับ 100 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas putida* KBRN 7/1 และ *Bacillus thuringiensis* KBRN 9/3 นำไปศึกษารูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อไป

3. ผลการศึกษารูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

3.1 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรีย (microbial inoculum)

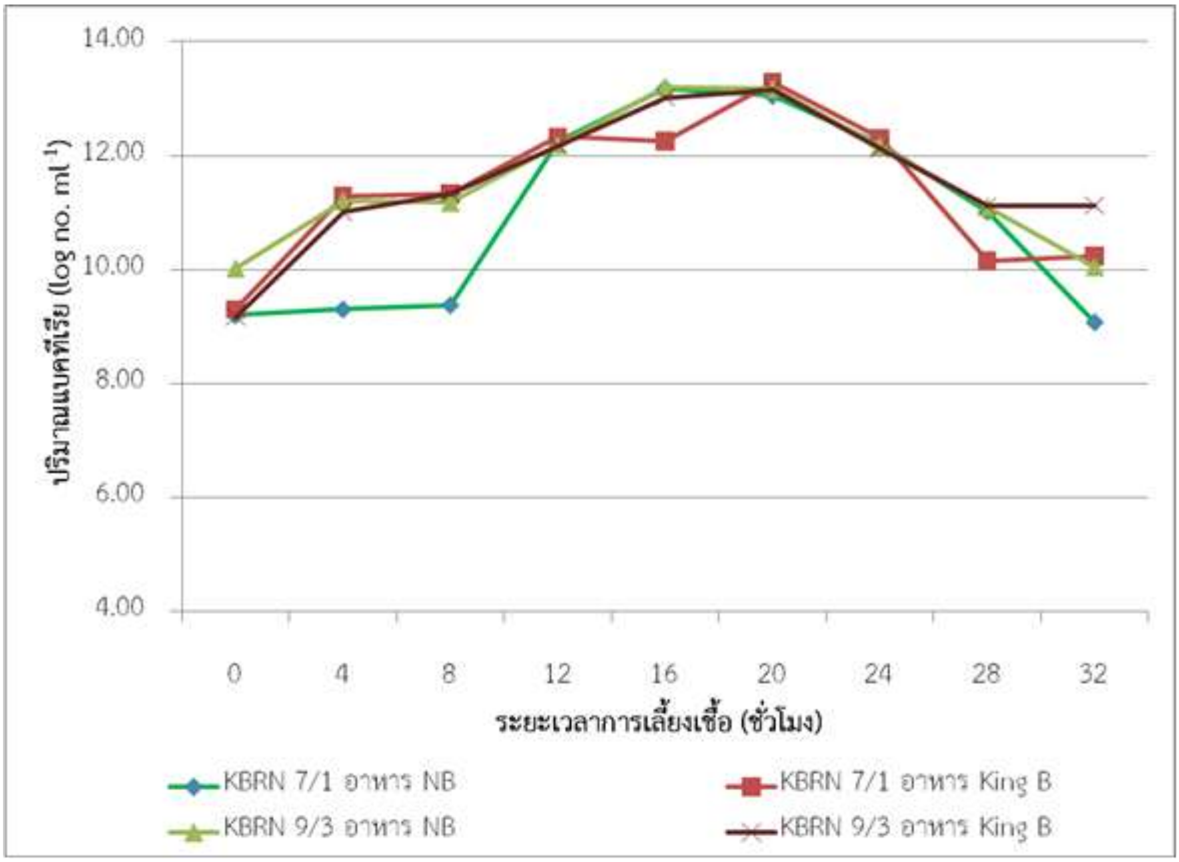
จากการนำแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่คัดเลือกได้จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 และ KBRN 9/3 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวโดยเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ NB และ King 's B medium และทำการเก็บตัวอย่างสารละลายแบคทีเรียในระหว่างการเลี้ยงเชื้อทุกๆ 4 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 9 พบว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลาการเลี้ยงเชื้อ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ ในช่วงแรก 0 - 8 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อยู่ในช่วง 1.04×10^{9} - 2.16×10^{11} cfu ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในช่วงที่สอง คือ 8 - 16 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุด 1.61×10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นในช่วงที่สาม คือ 16 - 20 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อจะค่อนข้างคงที่ โดยมีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 1.78×10^{12} - 1.61×10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร และในช่วงที่สี่ คือ 20 - 32 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อจะลดลง โดยมีปริมาณเชื้อต่ำสุด คือ 1.40×10^{10} cfu ต่อมิลลิลิตร สำหรับการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ในการเลี้ยงแบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 พบว่า ในระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ คือ 0 - 8 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB มีปริมาณสูงกว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร King 's B medium โดยปริมาณแบคทีเรียสูงสุดในอาหาร King 's B medium คือ 2.10×10^{11} cfu ต่อมิลลิลิตร แต่หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียในแต่ละระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณใกล้เคียงกัน สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียรหัส KBRN 9/3 พบว่า การเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดในแต่ละระยะมีปริมาณเชื้อใกล้เคียงกันทั้งในอาหาร NB และ King 's B medium

จากผลการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารในการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต สอดคล้องกับการศึกษาของ Johnsen and Nielsen (1999) ได้เปรียบเทียบสูตรอาหารในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* พบว่า อาหาร King 's B medium สามารถนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวได้มากกว่าสูตรอื่นที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้ แบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ยังสามารถเจริญเพิ่มปริมาณได้ดีในอาหาร NB (Abd-Alrazaq and Alkhfaji, 2018) ซึ่งโดยทั่วไปจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความต้องการสารอาหารของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลิอิก เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ธาตุอาหารรองและธาตุอาหารเสริม เช่น แมงกานีส สังกะสี โคบอลก์ เป็นโคแฟกเตอร์ รวมทั้งสารอินทรีย์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญอีกด้วย (Jadhav *et al*., 2018) สำหรับสูตรอาหาร King 's B medium จะประกอบด้วย proteose peptone ซึ่งได้จากการย่อยสลายของโปรตีนชนิดต่างๆ เช่น เคซีน เจลาติน ให้ได้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรต และวิตามิน ส่วนอาหาร NB นอกจาก peptone แล้วยังมี beef extract ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้เป็นแหล่ง คาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน เกลือแร่ และวิตามินที่ละลายน้ำได้ ดังนั้น ในการเลี้ยงแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ King 's B medium สามารถนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อได้ โดยระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ 16 - 20 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ได้คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ NB เพื่อใช้ในการศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในรูปแบบต่างๆ ในการทดลองต่อไป เนื่องจากส่วนผสมที่ใช้ในการเตรียมอาหาร NB ไม่ยุ่งยากและสะดวกในการเตรียมมากกว่าอาหาร King 's B medium

ตารางที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (cfu ml^{-1}) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างกัน

ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	เชื้อรหัส KBRN 7/1 *P. putida*		เชื้อรหัส KBRN 9/3 *B. thuringenesis*	
	อาหาร NB	อาหาร King 's B	อาหาร NB	อาหาร King 's B
0	$1.60x10^{9}$	$1.99x10^{9}$	$1.03x10^{10}$	$1.47x10^{11}$
4	$2.02x10^{9}$	$1.91x10^{11}$	$1.58x10^{11}$	$1.04x10^{9}$
8	$2.40x10^{9}$	$2.10x10^{11}$	$1.48x10^{11}$	$2.16x10^{11}$
12	$1.77x10^{12}$	$2.13x10^{12}$	$1.54x10^{12}$	$1.50x10^{12}$
16	$1.53x10^{13}$	$1.78x10^{12}$	$1.61x10^{13}$	$1.04x10^{13}$
20	$1.12x10^{13}$	$1.93x10^{13}$	$1.51x10^{13}$	$1.43x10^{13}$
24	$1.60x10^{12}$	$2.03x10^{12}$	$1.47x10^{12}$	$1.32x10^{12}$
28	$1.05x10^{11}$	$1.40x10^{10}$	$1.25x10^{11}$	$1.28x10^{11}$
32	$1.20x10^{9}$	$1.71x10^{10}$	$1.10x10^{10}$	$1.33x10^{11}$



ภาพที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างกัน

3.2 การศึกษาชนิดของวัสดุรองรับเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

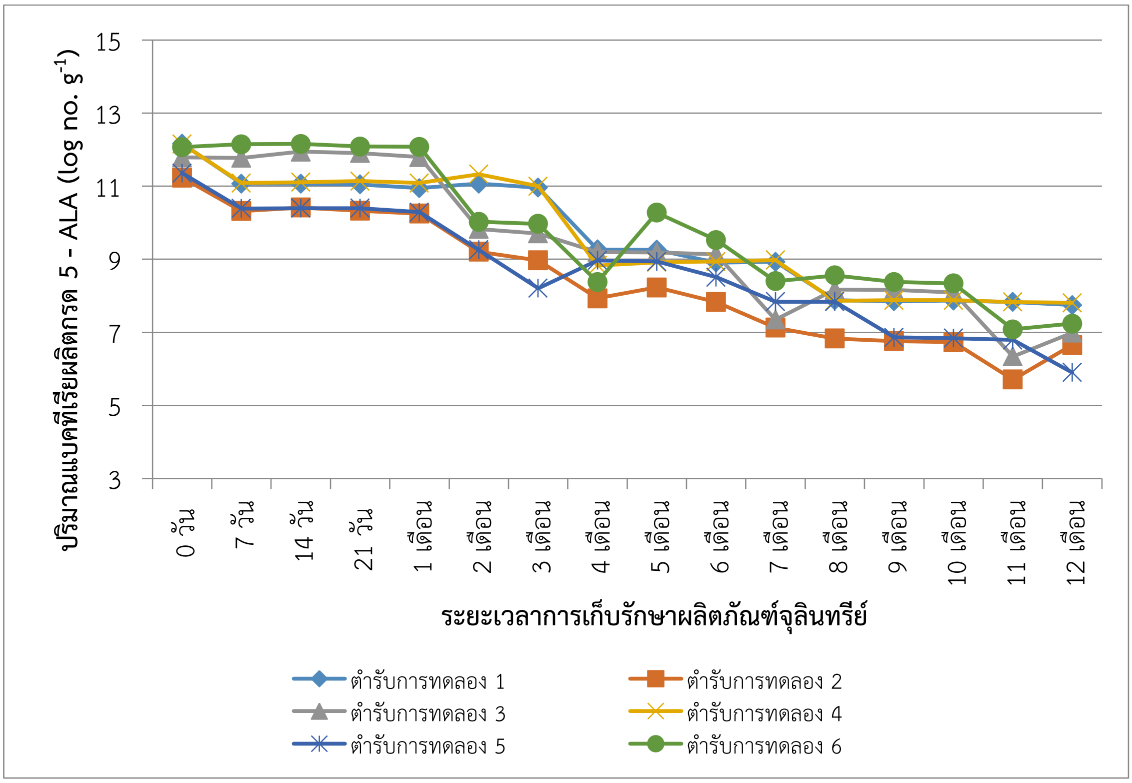
3.2.1 การผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในรูปแบบการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนต

จากการศึกษารูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์แบบตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนต โดยเปรียบเทียบการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม 2 ไอโซเลต คือ KBRN 7/1 KBRN 9/3 แล้วนำไปเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ ตำรับการทดลองที่ 1 - 3 อุณหภูมิห้อง และตำรับการทดลองที่ 4 - 6 ตู้เย็น เก็บตัวอย่างในแต่ละตำรับการทดลองในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 0 - 12 เดือน นำไปนับปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก และวิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ได้ผลการทดลอง ดังนี้

1) ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มด้วยอัลจิเนต

จากการนับปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในแต่ละตำรับการทดลองที่เก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในช่วงเวลา 0 - 12 เดือน ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1 และ ภาพที่ 10 พบว่า ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เริ่มต้น อยู่ระหว่าง 11.24 - 12.17 log no. ต่อกรัม และหลังจากเก็บรักษาในช่วงเวลา 0 - 2 เดือน ปริมาณแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย โดยมีปริมาณในช่วง 9.21 - 12.17 log no. ต่อกรัม และหลังจากเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นระยะเวลา 3 - 12 เดือน ปริมาณแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งที่ระยะเวลา 12 เดือน มีปริมาณแบคทีเรียในแต่ละตำรับการทดลองอยู่ในช่วง 5.90 - 7.81 log no. ต่อกรัม รวมทั้งปริมาณแบคทีเรียในตำรับการทดลองที่ 6 คือการใช้เชื้อผสมรหัส KBRN 7/1 และ KBRN 9/3 ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น มีปริมาณเชื้อสูงสุดในแต่ละระยะเวลาการเก็บรักษา ยกเว้นในการเก็บรักษาที่ 2 3 7 11 และ 12 เดือน เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ 2 ระดับ พบว่า สภาพการเก็บรักษาได้ทั้ง 2 อุณหภูมิไม่แตกต่างกัน

จากการพิจารณาปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกรูปแบบการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนต เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์มาตรฐานของกรมพัฒนาที่ดินในระเบียบกรมพัฒนาที่ดินว่าด้วยการใช้เครื่องหมายรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ได้กำหนดปริมาณจุลินทรีย์แต่ละชนิดในสารเร่งประเภทจุลินทรีย์สำหรับผลิตปุ๋ยหมัก และน้ำหมักชีวภาพต้องไม่น้อยกว่า 1.0×10^7 cfu ต่อกรัม หรือ 7.00 log no ต่อกรัม (กรมพัฒนาที่ดิน, 2556ข) จากผลการทดลองพบว่า ตำรับการทดลองที่ 1 แบคทีเรีย KBRN 7/1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตำรับการทดลองที่ 4 แบคทีเรีย KBRN 7/1 เก็บรักษาในตู้เย็น และ ตำรับการทดลองที่ 6 แบคทีเรียผสมที่เก็บรักษาในตู้เย็น มีปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่เก็บรักษาตลอดช่วงเวลา 0 - 12 เดือน อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของกรมพัฒนาที่ดินตามระเบียบกรมพัฒนาที่ดินว่าด้วยการใช้เครื่องหมายรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตทางการเกษตร สำหรับตำรับการทดลองที่ 2 แบคทีเรีย KBRN 9/3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตำรับการทดลองที่ 3 แบคทีเรียผสมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และตำรับการทดลองที่ 5 แบคทีเรีย KBRN 9/3 ที่เก็บรักษาในตู้เย็น มีปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ตามเกณฑ์มาตรฐานของกรมพัฒนาที่ดินในช่วงการเก็บรักษา 0 - 7 เดือน 0 - 10 เดือน และ 0 - 8 เดือน ตามลำดับ

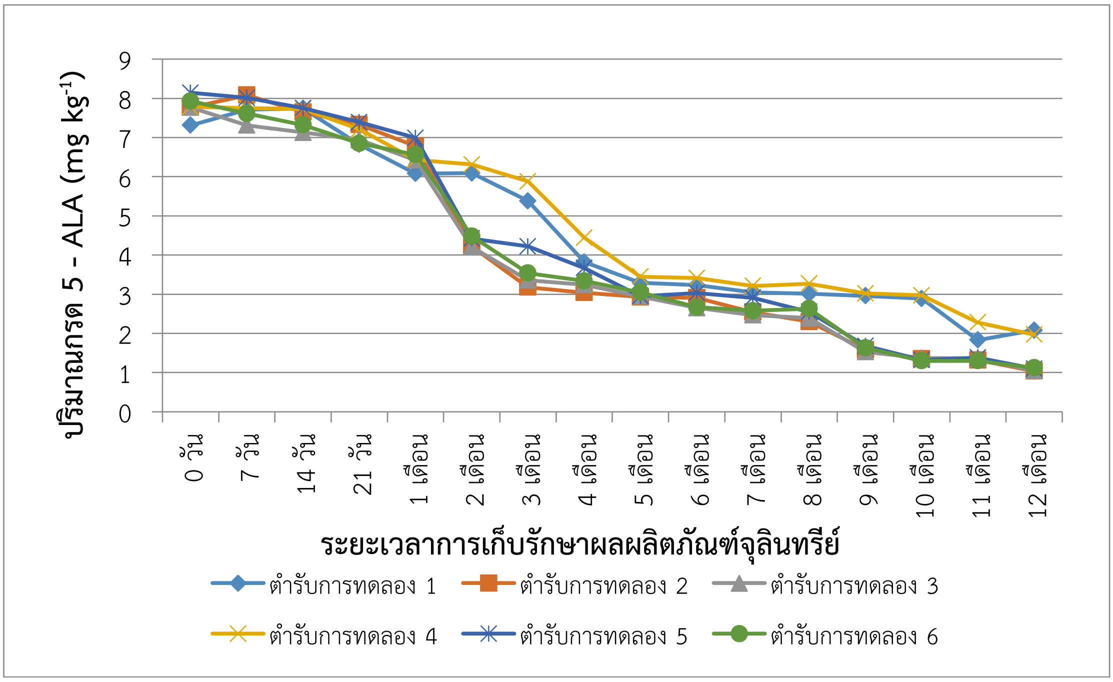


ภาพที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

2) ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มด้วยอัลจิเนต

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตในช่วงการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ระหว่าง 0 - 12 เดือน โดยเปรียบเทียบการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อเดี่ยว 2 ไอโซเลต คือ KBRN 7/1 KBRN 9/3 และ ใช้เชื้อผสม ทั้ง 2 ไอโซเลต โดยเปรียบเทียบการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ 2 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิห้องและตู้เย็น ผลการทดลองดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 2 และภาพที่ 11 พบว่า ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์อยู่ในช่วง 7.31 - 8.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ตั้งแต่ 7 วัน ถึง 12 เดือน ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลิวูลินิกในแต่ละตำรับการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรด 5 - อะมิโนลิวูลินิกในแต่ละช่วงเวลา สามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงได้เป็น 3 ช่วง คือ ในช่วงแรกตั้งแต่ 0 - 1 เดือน ยกเว้นในตำรับการทดลองที่ใช้แบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 ที่เก็บรักษาไว้ทั้ง 2 อุณหภูมิ พบว่า กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ โดยมีปริมาณในช่วง 6.08 - 8.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การเปลี่ยนแปลงในช่วงที่สอง ตั้งแต่ 1 - 5 เดือน กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในแต่ละตำรับการทดลองส่วนใหญ่จะลดลงอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นการเปลี่ยนแปลงในช่วงที่สาม หลังจากเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ 5 - 12 เดือน ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะลดลงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ โดยมีปริมาณต่ำสุดที่ระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ 12 เดือน มีปริมาณ 1.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบการใช้แบคทีเรีย 2 ไอโซเลต พบว่า แบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 มีปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก มากกว่า KBRN 9/3 โดยเฉพาะในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 2 - 12 เดือน ทั้ง 2 อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ ซึ่ง

ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลีนิกในผลิตภัณฑ์แบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 ที่อุณหภูมิห้อง และตู้เย็น อยู่ในช่วง 1.83 - 6.09 และ 1.97 - 6.31 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์แบคทีเรียรหัส KBRN 9/3 ที่อุณหภูมิห้อง และตู้เย็น อยู่ในช่วง 1.04 - 4.22 และ 1.10 - 4.22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในตู้เย็นมีปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก มากกว่าที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตามสำหรับในการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มด้วยอัลจิเนตของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ทั้ง 2 ไอโซเลต เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน แล้วยังมีกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่ำสุด คือ 1.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Sasaki *et al.* (1997) และ Hotta *et al.* (1997) พบว่า ความเข้มข้น ของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 0.06 - 6 มิลลิโมลต่อลิตร สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้หลายชนิด



ภาพที่ 11 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

3.2.2 การศึกษาชนิดของวัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

จากการนำปุ๋ยอินทรีย์และวัสดุอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ ปุ๋ยหมักจากกากอ้อย ปุ๋ยหมักจากเปลือกไม้ยูคาลิปตัส และพีทมอส มาใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลนิก และดำเนินการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ระหว่าง 0 - 12 เดือน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก และกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ได้ผลการทดลองดังนี้

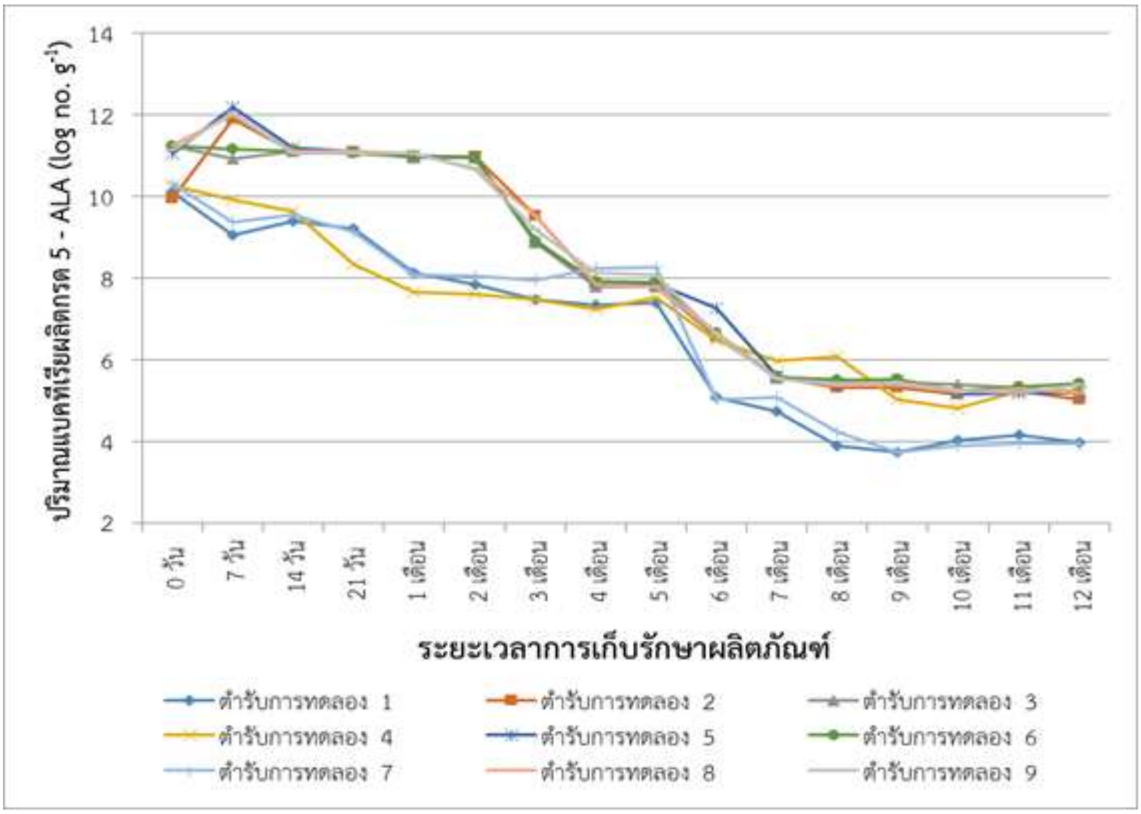
1) ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์ 3 ชนิด เป็นวัสดุรองรับ ผลการทดลองดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 3 และภาพที่ 12

พบว่า ปริมาณแบคทีเรียในแต่ละตำรับการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกช่วงเวลาที่ทดลอง 0 - 12 เดือน ซึ่งปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 9.94 - 11.26 log no. ต่อกรัม สำหรับปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้เชื้อเดี่ยวของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต และเชื้อผสม พบว่า ตำรับการทดลองที่ใช้แบคทีเรียรหัส KBRN 9/3 และเชื้อผสมจะมีผลทำให้แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก มากกว่าตำรับการทดลองที่ใช้แบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในแต่ละตำรับการทดลองสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 คือ ตำรับการทดลองที่ 1 4 และ 7 เป็นตำรับการทดลองที่ใช้แบคทีเรียรหัส KBRN 7/1 การเปลี่ยนแปลงในช่วงแรก คือ 0 - 5 เดือน ปริมาณแบคทีเรียจะค่อนข้างคงที่และลดลงเล็กน้อย และเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในช่วง 5 - 9 เดือน ปริมาณแบคทีเรียจะลดลงอย่างชัดเจน และหลังจากนั้นในช่วง 9 - 12 เดือน ปริมาณแบคทีเรียจะค่อนข้างคงที่ สำหรับกลุ่มที่สอง คือ ตำรับการทดลองที่ 2 3 5 6 8 และ 9 เป็นตำรับการทดลองที่ใช้แบคทีเรียรหัส KBRN 9/3 และเชื้อผสม การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในช่วงแรก 0 - 2 เดือน ปริมาณแบคทีเรียจะค่อนข้างคงที่และลดลงเล็กน้อย และเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในช่วง 2 - 7 เดือน ปริมาณแบคทีเรียจะลดลง และหลังจากนั้นในช่วง 7 - 12 เดือน ปริมาณแบคทีเรียจะค่อนข้างคงที่

สำหรับการใช้วัสดุรองรับ 3 ชนิด ในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก พบว่า การใช้ปุ๋ยหมักกากอ้อย ปุ๋ยหมักเปลือกไม้ยูคาลิปตัส และพีทมอส มีปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในช่วง 0 - 5 เดือน ตามเกณฑ์มาตรฐานของกรมพัฒนาที่ดินในระเบียบกรมพัฒนาที่ดินว่าด้วยการใช้เครื่องหมายรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตทางการเกษตร และมาตรฐานปุ๋ยชีวภาพของประเทศอินโดนีเซีย โดยในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า 1.0×10^7 cfuต่อกรัม หรือ 7.00 log no. ต่อกรัม (กรมพัฒนาที่ดิน, 2556ข; Setiawati *et al*., 2016) จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ปุ๋ยหมักกากอ้อย ปุ๋ยหมักเปลือกไม้ยูคาลิปตัส และพีทมอส ในช่วงการเก็บรักษา 0 - 5 เดือน มีปริมาณแบคทีเรียในช่วง 7.34 - 11.88 7.23 - 12.19 และ 7.79 - 11.99 log no. ต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งวัสดุทั้ง 3 ชนิดมีสมบัติที่เหมาะสมในการเป็นวัสดุรองรับ โดยมีทั้งธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และอินทรียวัตถุ ซึ่งปุ๋ยหมักเปลือกไม้จะมีธาตุอาหารหลักสูงกว่าวัสดุทั้ง 2 ชนิด โดยมีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม 1.14 0.92 และ 1.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยหมักกากอ้อย ปุ๋ยหมักเปลือกไม้ยูคาลิปตัส และพีทมอส มีค่า 22.71 34.52 และ 87.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งสมบัติที่สำคัญของวัสดุรองรับ คือ ความสามารถในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ได้ในระยะเวลานานโดยยังคงมีปริมาณเชื้อที่เหมาะสมและเกิดประสิทธิภาพเมื่อนำไปใช้ประโยชน์ โดยจะเกี่ยวข้องกับปริมาณธาตุอาหารและอินทรียวัตถุที่อยู่ในวัสดุรองรับแต่ละชนิด จากการผลการศึกษาของ Rosiana *et al*. (2013) พบว่า การใช้ปุ๋ยหมักจากแหนแดงซึ่งมีปริมาณธาตุอาหารสูงเป็นวัสดุรองรับสำหรับผลิตปุ๋ยชีวภาพเมื่อนำไปใส่ลงในดินมีผลทำให้ปริมาณแบคทีเรีย *Azotobacter* sp. สูงกว่าการใช้ปุ๋ยหมักชนิดอื่น ซึ่งประเทศอินโดนีเซียมีการใช้ปุ๋ยหมักจากแหนแดงและเศษพืชแห้งเป็นวัสดุรองรับในการผลิตระดับอุตสาหกรรม (Noviana and Raharjo, 2009) นอกจากนี้พีทมอสเป็นวัสดุอินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้เป็นวัสดุรองรับอย่างแพร่หลาย นอกจากจะไม่เป็นพิษต่อแบคทีเรียแล้วพีทมอสเป็นวัสดุที่ดูดซับน้ำได้ดี ไม่เป็นก้อน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายโดยเฉพาะในการเคลือบเมล็ดพืช และยังสามารถรักษาสภาพการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างได้ดี (Somasegaran and Hoben, 1985) นอกจากนี้ยังมีการนำส่วนผสมของพีทมอสและ

ปุ๋ยหมักมาใช้เป็นวัสดุรองรับจุลินทรีย์ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. (Noviana and Raharjo, 2009)

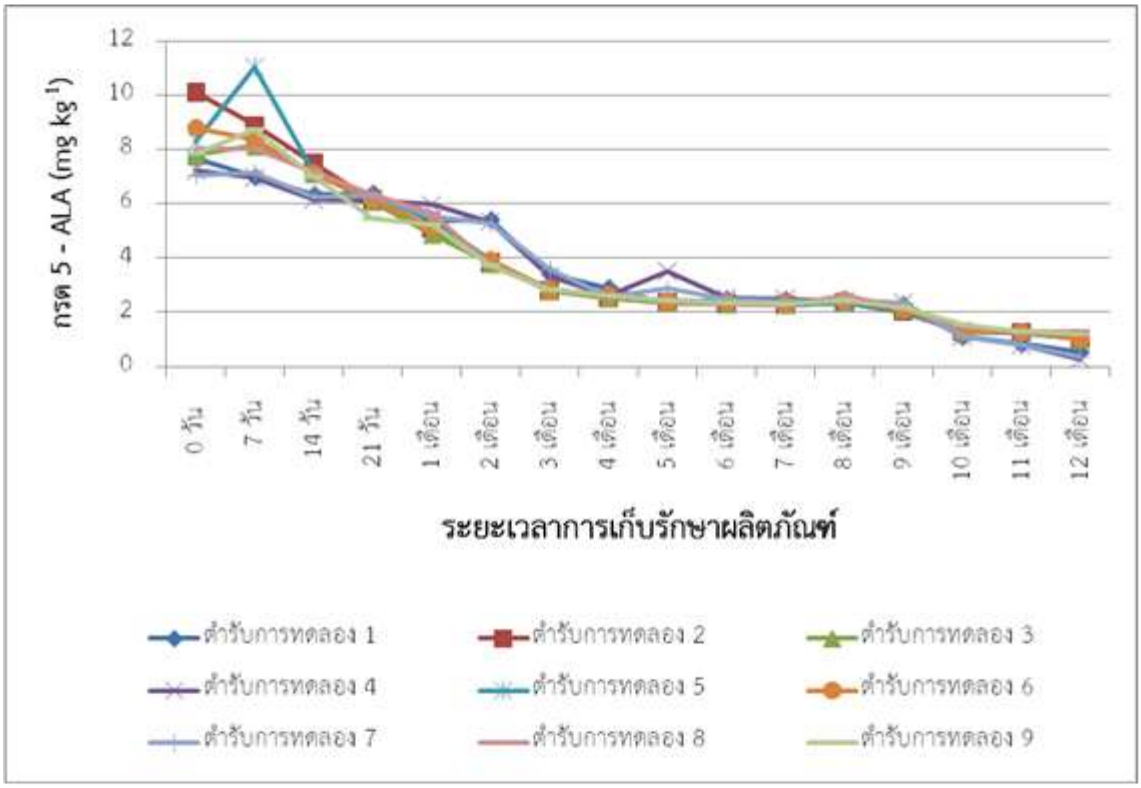


ภาพที่ 12 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

2) ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ที่ใช้วัสดุอินทรีย์ 3 ชนิด เป็นวัสดุรองรับ ผลการทดลองดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 4 และภาพที่ 13 พบว่า ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในแต่ละตำรับการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกช่วงเวลา 0 - 12 เดือน ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกเริ่มต้นอยู่ในช่วง 7.05 - 10.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยตำรับการทดลองที่ 2 การใช้ปุ๋ยหมักกากอ้อยในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รหัส KBRN 9/3 มีปริมาณมากที่สุด สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกสามารถแบ่งได้เป็น 3 ช่วง คือ ช่วงแรก 0 - 4 เดือน ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก มีปริมาณลดลงอย่างชัดเจนในทุกตำรับการทดลอง มีปริมาณอยู่ในช่วง 2.51 - 11.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากนั้นในช่วง 5 - 9 เดือน ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะค่อนข้างคงที่ มีปริมาณอยู่ในช่วง 2.02 - 3.52 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 10 - 12 เดือน ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย และในตำรับการทดลองที่ 4 การใช้ปุ๋ยหมักเปลือกไม้ยูคาลิปตัสในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รหัส KBRN 7/1 มีปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่ำที่สุด คือ 0.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก สอดคล้องกับผลวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าระยะเวลาการเก็บรักษาในช่วง 0 - 5 เดือน แบคทีเรียใน

ผลิตภัณฑ์จะมีปริมาณสูงซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่วิเคราะห์ได้ หลังจากการเก็บรักษา 5 เดือน ปริมาณทั้งแบคทีเรีย และกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะลดลง



ภาพที่ 13 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

3.2.3 การศึกษาชนิดของวัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

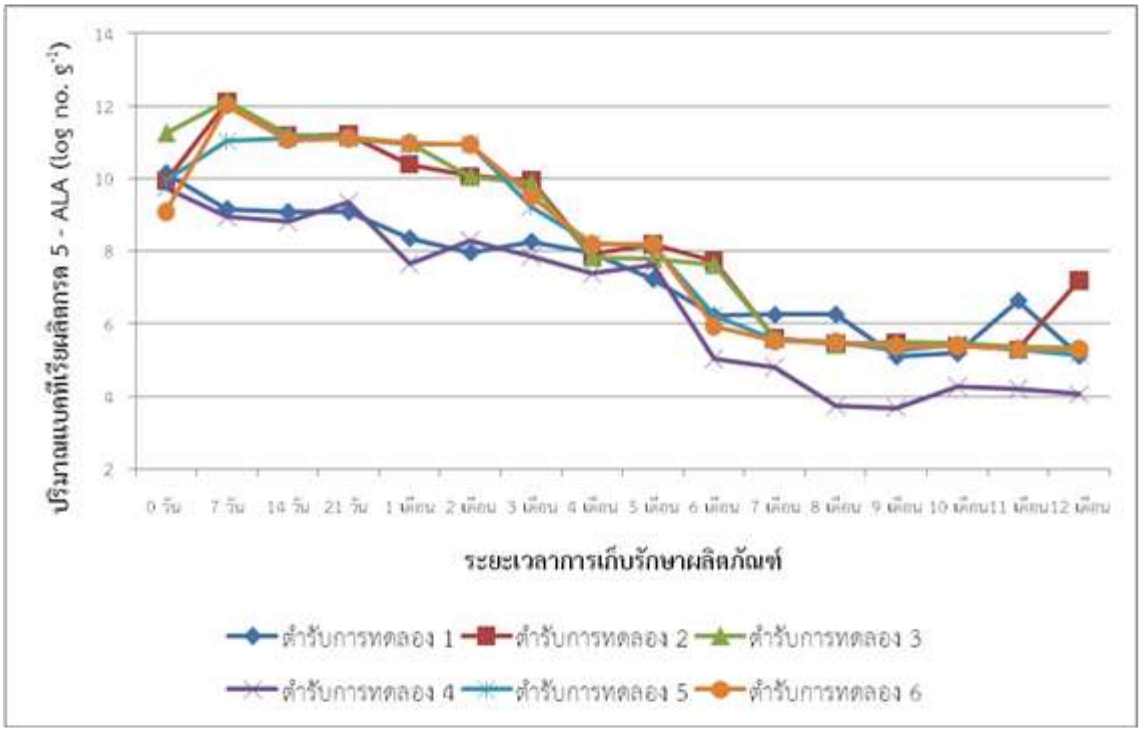
จากการนำวัสดุอนินทรีย์ 2 ชนิด ประกอบด้วย เพอร์ไลต์ และภูไมท์ มาใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก และดำเนินการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 0 - 12 เดือน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก และกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ได้ผลการทดลองดังนี้

1) ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์ 2 ชนิด เป็นวัสดุรองรับ ผลการทดลองดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 5 และภาพที่ 14 พบว่า ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 9.08 - 11.25 log no. ต่อกรัม โดยตำรับการทดลองที่ 3 การใช้เพอร์ไลต์ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อผสม มีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด และตำรับการทดลองที่ 6 การใช้ภูไมท์ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อผสม มีปริมาณแบคทีเรียน้อยที่สุด สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในช่วง 0 - 12 เดือน พบว่า ในช่วง 0 - 3 เดือน ปริมาณแบคทีเรียในตำรับการทดลองที่ใช้แบคทีเรียรหัส KBRN 9/3 และเชื้อผสมมีปริมาณแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ และมีปริมาณมากกว่าตำรับการทดลองที่ 1 และ 4 ซึ่งเป็นตำรับการทดลองที่ใช้เพอร์ไลต์และภูไมท์ในการเก็บรักษาแบคทีเรีย

รหัส KBRN 7/1 หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียจะลดลงจนถึงระยะเวลาการเก็บรักษา 7 เดือน และที่ระยะเวลา 8 - 12 เดือน ปริมาณแบคทีเรียจะค่อนข้างคงที่

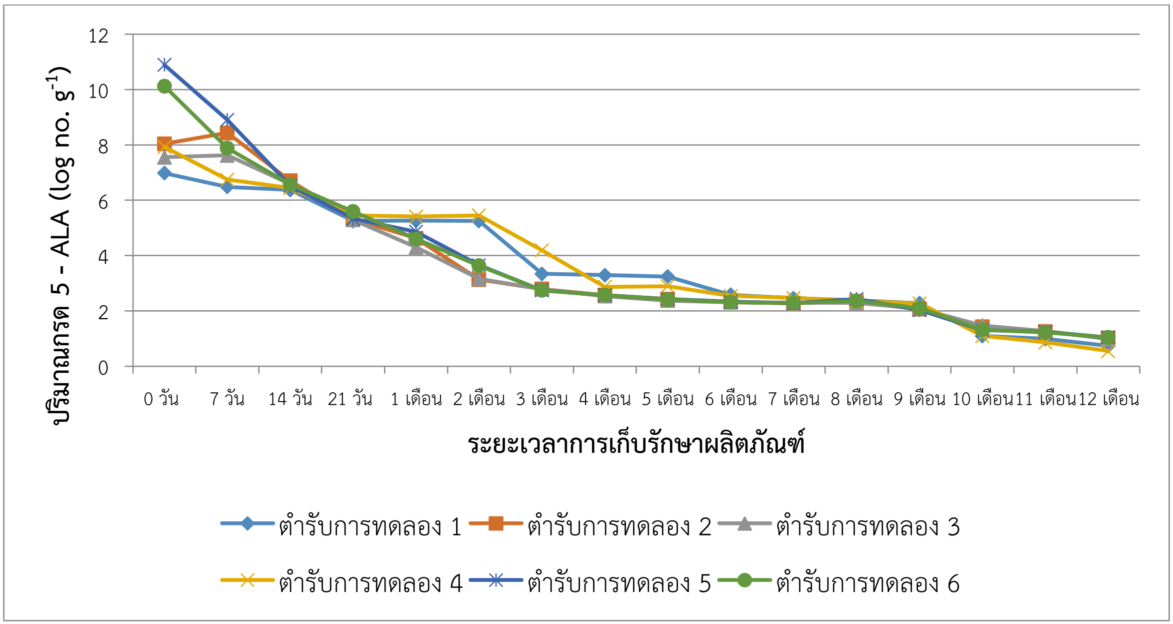
สำหรับการใช้เพอร์ไลต์และภูไมท์เป็นวัสดุรองรับนั้น พบว่า เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์มาตรฐานของกรมพัฒนาที่ดินในระเบียบกรมพัฒนาที่ดินว่าด้วยการใช้เครื่องหมายรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตทางการเกษตร การใช้เพอร์ไลต์เป็นวัสดุรองรับสามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้ 6 เดือน ในขณะที่ภูไมท์เป็นวัสดุรองรับสามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้ 5 เดือน ซึ่งวัสดุรองรับที่เป็นวัสดุประเภทอนินทรีย์นั้นมีข้อดีคือ มีอายุการใช้งานนาน มีความคงทนของโครงสร้าง และไม่ทำปฏิกิริยากับสารละลายธาตุอาหาร (อิทธิสุนทร, 2545) และได้มีการศึกษาการใช้เพื่อเป็นวัสดุรองรับจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น มีการรายงานว่าสามารถใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกับวัสดุอนินทรีย์ในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินได้ (Toyota, 2008) ใช้เป็นวัสดุรองรับเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยพบว่าการใช้เพอร์ไลต์ ฟองน้ำ ทรายละเอียด ทรายหยาบ ใยสังเคราะห์ และเม็ดดินเผา มีผลทำให้ปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* อยู่ในช่วง 3.80 - 4.2 log cfu ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีวัสดุรองรับ ปริมาณเชื้อราดังกล่าว มีปริมาณ 1.80 log cfu ต่อมิลลิลิตร (ปาณิศา และคณะ, 2559) อย่างไรก็ตามการพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรนั้น รูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมจะต้องยังคงมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้นาน คงประสิทธิภาพ และง่ายต่อการนำไปใช้ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ประกอบด้วย โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกัน ความเข้ากันได้ระหว่างวัสดุรองรับและผนังเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิที่เป็นเป็นประโยชน์ต่อพืชมีประสิทธิภาพเมื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีเทียบเท่ากับเชื้อสดที่เตรียมจากห้องปฏิบัติการ และวัสดุที่จะนำมาผลิตควรจะพิจารณาการใช้วัสดุที่มีในท้องถิ่นที่มีราคาถูก และสามารถใช้ได้กับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน (Jiamwijit, 2002)



ภาพที่ 14 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

2) ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์ 2 ชนิด เป็นวัสดุรองรับ ผลการทดลองดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 6 และภาพที่ 15 พบว่า ปริมาณ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ที่ใช้วัสดุรองรับอนินทรีย์ 2 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติในทุกช่วงของการเก็บรักษา 0 - 12 เดือน โดยตำรับการทดลองที่ 5 การใช้ภูไมท์เป็นวัสดุรองรับในแบคทีเรีย KBRN 9/3 มีปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกมากที่สุด คือ 10.89 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และตำรับการทดลองที่ 1 การใช้เพอร์ไลต์เป็นวัสดุรองรับในแบคทีเรีย KBRN 7/1 มีปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่ำที่สุด คือ 6.98 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะลดลงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 4 เดือน หลังจากนั้น 5 - 9 เดือน ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจะค่อนข้างคงที่ และหลังจากนั้นจะลดลงเล็กน้อย โดยมีปริมาณต่ำสุด 0.55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับชนิดของวัสดุรองรับ พบว่าการใช้ภูไมท์ในช่วงแรกของการเก็บรักษา คือ 0 - 14 วัน มีปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกมากกว่าการใช้เพอร์ไลต์ แต่หลังจากนั้นการใช้วัสดุรองรับทั้ง 2 ชนิดจะมีปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ใช้วัสดุรองรับทั้ง 2 ชนิดสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกันด้วย

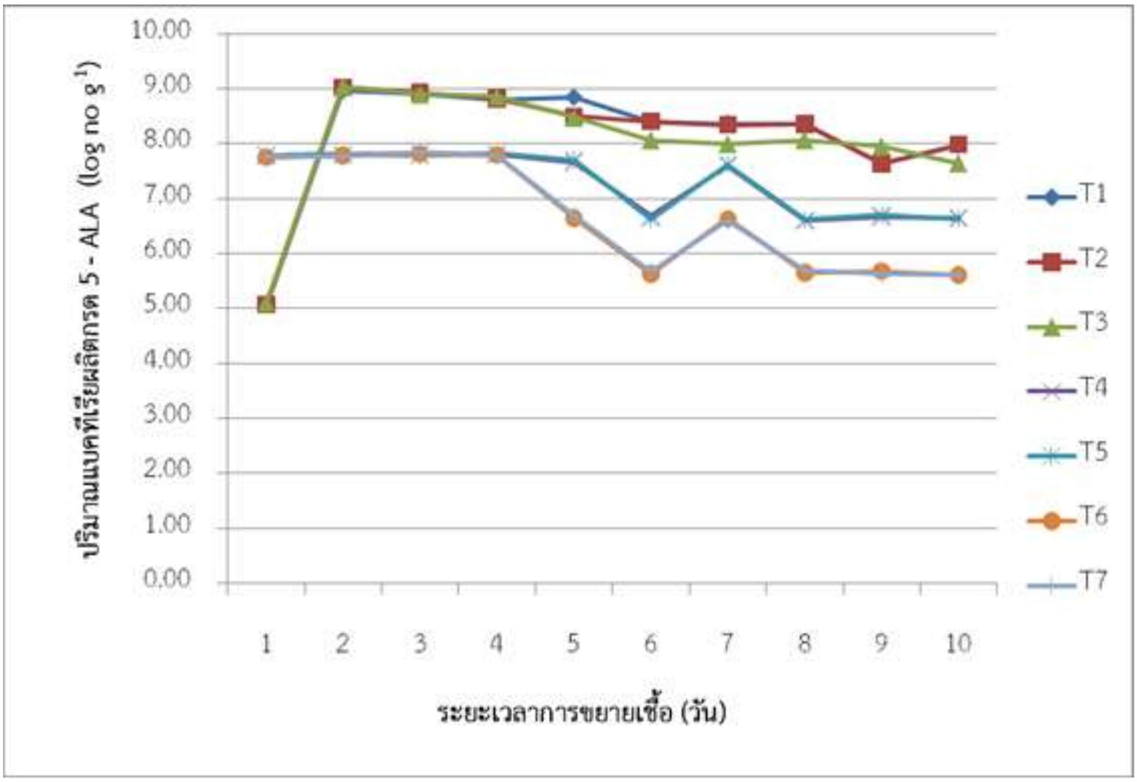


ภาพที่ 15 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

3.2.4 ศึกษาวิธีการขยายเชื้อจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุรองรับ

จากการศึกษาการใช้วัสดุรองรับอินทรีย์และอนินทรีย์เพื่อนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ จึงได้คัดเลือกผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุรองรับเป็นตัวแทนในการศึกษาวิธีการขยายเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นคำแนะนำที่เหมาะสมที่จะให้เกษตรกรสามารถนำไปขยายเชื้อเองได้ในการนำไปใช้ประโยชน์ในระดับพื้นที่ โดยศึกษาเปรียบเทียบการขยายเชื้อแบบแห้งซึ่งใช้วัสดุในการขยายเชื้อ คือ ปุ๋ยหมักและรำข้าวในสัดส่วนต่างๆ 3 สัดส่วน และการขยายเชื้อแบบเหลวโดยใช้กากน้ำตาลและกากส่าเหล้าในสัดส่วนต่างๆ 2 สัดส่วน โดยนำไปขยายเชื้อเป็นเวลา 10 วัน และดำเนินการเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 16 พบว่า

ตำรับการทดลองที่ 1 2 และ 3 ซึ่งเป็นการขยายเชื้อแบบแห้งโดยใช้ปุ๋ยหมักและรำข้าว มีปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกอยู่ในช่วง 5.04 - 9.04 log no. ต่อกรัม ซึ่งมีปริมาณมากกว่าการขยายแบบเหลวที่ใช้กากน้ำตาลและกากส่าเหล้า ที่มีปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกอยู่ในช่วง 5.60 -7.84 log no. ต่อมิลลิลิตร สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในตำรับการทดลองที่ 1 2 และ 3 การขยายเชื้อแบบแห้ง พบว่า ปริมาณแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ระยะเวลาการขยายเชื้อ 2 วัน และตำรับการทดลองที่ 3 การขยายเชื้อโดยใช้ปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัม รำข้าว 3 กิโลกรัม เชื้อ 25 กรัม มีปริมาณแบคทีเรียสูงสุด คือ 9.04 log no. ต่อกรัม หลังจากนั้นปริมาณเชื้อค่อนข้างคงที่ จนถึงการขยายเชื้อ 8 วัน และมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยจนถึง 10 วัน ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรีย 7.98 log no. ต่อกรัม การใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุสำหรับขยายเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากมีองค์ประกอบของอินทรียวัตถุ ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญ โดยการเพิ่มอินทรียวัตถุให้กับดินโดยเฉพาะสภาพดินที่เสื่อมโทรมซึ่งมีปริมาณอินทรียวัตถุต่ำมากนั้น การเพิ่มอินทรียวัตถุจะมีผลทำให้ปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์บางชนิดในดินเพิ่มมากขึ้นโดยทำให้เกิดกิจกรรมในขบวนการต่างๆ อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Nishio and Kusano, 1980) สำหรับตำรับการทดลองที่ 4 5 6 และ 7 การขยายเชื้อแบบเหลวโดยใช้กากน้ำตาลและกากส่าเหล้า พบว่า ปริมาณเชื้อทั้ง 4 ตำรับการทดลองมีปริมาณเชื้อสูงสุดที่ระยะเวลาการขยายเชื้อ 1 - 4 วัน โดยมีปริมาณสูงสุด 7.93 log no. ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นมีปริมาณเชื้อลดลง แต่อย่างไรก็ตาม ที่ระยะเวลาการขยายเชื้อ 5 - 10 วัน ตำรับการทดลองที่ 4 และ 5 การใช้กากน้ำตาล มีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 6.59 - 7.70 log no. ต่อมิลลิลิตร มีปริมาณมากกว่าตำรับการทดลองที่ 6 และ 7 การใช้กากส่าเหล้า ซึ่งมีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 5.60 - 6.70 log no. ต่อมิลลิลิตร กากน้ำตาลและกากส่าเหล้าเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม ซึ่งมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ รวมทั้งมีการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ เนื่องจากกากน้ำตาลจะมีปริมาณน้ำตาลอยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (จักรินทร์ และคณะ, 2547) ส่วนกากส่าเหล้ามีองค์ประกอบหลักเป็นสารอินทรีย์มีไนโตรเจน 935 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไชยยุทธ, 2528) มีการศึกษาการใช้กากน้ำตาลในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยพบว่า *Bacillus subtlilis* สายพันธุ์ B31 สามารถใช้ซูโครสที่มีอยู่ปริมาณมากในกากน้ำตาลได้ดี และกากน้ำตาลยังประกอบด้วยกรดอะมิโนและวิตามินแร่ธาตุที่ทนความร้อนได้ดี เช่น riboflavin pantothenic acid และ biotin ซึ่งได้มีการพัฒนาสูตรอาหารให้มีราคาถูกลงโดยใช้ กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน (พันทิพา, 2539 และอภิเชษฐ์, 2554) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR 1338 โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เป็นกากน้ำตาลและกากเซลล์ยีสต์ ทดแทนการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในระดับอุตสาหกรรม สำหรับกากส่าเหล้ามีการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในการผลิตน้ำหมักจากเศษผัก พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสม คือ เศษผัก 3 กิโลกรัม กากน้ำตาล 0.5 กิโลกรัม กากส่าเหล้า 2.5 ลิตร และน้ำ 1 ลิตร (ศุภัชญา, 2550)



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อ 1 - 10 วัน

4. ผลการศึกษาอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในดินกรดสภาพโรงเรือนทดลอง

จากผลการศึกษาอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตข้าวในดินกรดสภาพโรงเรือนกระจก ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของดิน

4.1.1 สมบัติทางเคมีของดินก่อนการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างดินก่อนการทดลองที่ระดับความลึก 0 - 15 เซนติเมตร โดยสุ่มจำนวน 15 จุด และนำมาคลุกเคล้าให้เข้ากันให้เป็น 1 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์สมบัติของดิน พบว่า ดินมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.75 ดินเป็นกรดปานกลาง ปริมาณอินทรียวัตถุ 0.87 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในระดับต่ำ ปริมาณธาตุฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 9.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จัดอยู่ในระดับต่ำ และปริมาณธาตุโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 32.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จัดอยู่ในระดับต่ำ (ตารางที่ 10 และตารางภาคผนวกที่ 7) อย่างไรก็ตามในการเจริญเติบโตของข้าวจำเป็นต้องใช้ทั้งธาตุอาหารหลักและธาตุรอง ซึ่งนอกจากการปรับปรุงดินแล้ว การใช้ปุ๋ยเคมีก็เป็นการเพิ่มธาตุอาหารให้กับข้าวเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต โดยข้าวไวแสงและไม่ไวแสงต้องการธาตุอาหารที่แตกต่างกัน สำหรับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ซึ่งเป็นข้าวไม่ไวแสงต้องการไนโตรเจน 18 กิโลกรัมต่อไร่ ฟอสฟอรัส 6 กิโลกรัมต่อไร่ และโพแทสเซียม 6 กิโลกรัมต่อไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

4.1.2 สมบัติทางเคมีของดินหลังการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างดินในกระถางหลังเก็บผลผลิตข้าว ทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 ดังนี้

1) ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน พบว่า ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินหลังการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าอยู่ในช่วง 6.03 - 6.73 ซึ่งดินเป็นกรดเล็กน้อยถึงกลาง โดยค่าความเป็นกรดเป็นด่างเพิ่มขึ้นจากก่อนการทดลองเล็กน้อย สำหรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชทั่วไป อยู่ในช่วง 5.5 - 7.0 และถ้ามีค่าต่ำกว่า 6.5 จะแนะนำให้ใช้ปูนเพื่อยกระดับความเป็นกรดเป็นด่างของดิน แต่ในกรณีดินนาเมื่ออยู่ในสภาพน้ำขังจะทำให้เกิดปฏิกิริยาดินเข้าใกล้ค่าความเป็นกลางมากขึ้น (วิภาวรรณ, 2558) ดังนั้นค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินหลังการทดลองจึงเพิ่มขึ้นและมีค่าใกล้กับค่าความเป็นกลาง

2) อินทรียวัตถุในดิน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าอยู่ในช่วง 0.97 - 1.18 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในระดับต่ำถึงค่อนข้างต่ำ และเพิ่มขึ้นจากก่อนการทดลองเล็กน้อย สำหรับในตำรับการทดลองที่มีการใช้ปุ๋ยหมักในอัตราต่างกันทั้ง 100 300 และ 500 กิโลกรัมต่อไร่ พบว่าปริมาณอินทรียวัตถุในดินมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ตำรับการทดลองที่ใส่ปุ๋ยหมักมีแนวโน้มของการเพิ่มอินทรียวัตถุในดินมากกว่าการใช้ปุ๋ยเคมี เนื่องจากการใช้ปุ๋ยหมักซึ่งเป็นปุ๋ยอินทรีย์เป็นการเพิ่มอินทรียวัตถุลงไปในดิน แต่ปริมาณอินทรียวัตถุที่เพิ่มขึ้นหลังการทดลองไม่มาก อาจเกิดจากอัตราการใช้ปุ๋ยหมัก และเกิดการย่อยสลายของอินทรียวัตถุจากกิจกรรมจุลินทรีย์ในดินที่ใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2551) ซึ่งอินทรียวัตถุถือเป็นแหล่งธาตุอาหารที่สำคัญในดิน ซึ่งไนโตรเจนสวนใหญ่ในดินมาจากอินทรียวัตถุในดิน และยังมีองค์ประกอบของฟอสฟอรัส 20 - 80 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งกำมะถันอีกด้วย ในดินนาส่วนใหญ่ไนโตรเจนมาจากอินทรียวัตถุในดิน 50 - 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นปริมาณอินทรียวัตถุในดินจึงบงบอกถึงปริมาณไนโตรเจนที่จะปลดปลอยออกมาของดินที่ปลูกข่าว รวมทั้งจะช่วยเพิ่มค่าความจุในการแลกเปลี่ยนประจุบวก หรือ CEC และทำใหฟอสฟอรัสและเหล็กเป็นประโยชนต่อพืช (ทัศนีย์, 2550)

3) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยตำรับการทดลองที่ 12 การใช้แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน มีปริมาณสูงสุด คือ 36.55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จัดอยู่ในระดับสูง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับตำรับการทดลองที่ 11 แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน มีปริมาณ 26.83 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จัดอยู่ในระดับสูง อย่างไรก็ตามในทุกตำรับการทดลองมีปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง อาจเนื่องจากการใส่ปัจจัยการผลิตทั้งปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ลงไปในดิน รวมทั้งในสภาพน้ำขังฟอสฟอรัสจะละลายออกมาได้มากเนื่องจาก $FePO_4.2H_2O$ เปลี่ยนเป็น $Fe_3(PO_4)_2.8H_2O$ ซึ่งจะละลายได้มากกว่า รวมทั้งเมื่อสารประกอบของฟอสเฟตที่ตกตะกอน หรือถูกเคลือบดวย ferric oxyhydroxide ถูกรีดิวซ ทำใหฟอสเฟตถูกปลดปลอยออกมาในสารละลายดิน การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเหล็กและอะลูมินั่ม และการแลกเปลี่ยนของประจุลบซึ่งจะไปไล่ที่ฟอสเฟตที่ถูกตรึงอยู่ด้วยเหล็กและอะลูมินั่มออกไซด์ เป็นต้น (ทัศนีย์, 2550) นอกจากนี้การใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยเคมีทั้ง 2 อัตร คือ ตามค่าวิเคราะห์ดิน และครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดินมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นเนื่องจากส่วนหนึ่งมาจากการใส่ปุ๋ยเคมี และอาจเกิดจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. putida* และ *B. thuringiensi* โดยจากการรายงาน พบว่า จุลินทรีย์ดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มพีจีพีอาร์เป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายแบบ ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน การละลายธาตุอาหาร และการสร้างซิเดอร์โรฟอร์ (siderophore) เป็นต้น (ธนากร, 2557) ซึ่งปริมาณ

ฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้นอาจมาจากกิจกรรมการละลายฟอสเฟตจากกลไกของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งอาจไม่ใช่บทบาทของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยตรงต่อการเพิ่มฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน

4) โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดย ตำรับการทดลองที่ 4 การใช้แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ มีปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มากที่สุด คือ 26.47 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และไม่แตกต่างกันทางสถิติกับตำรับการทดลองที่ 8 การใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน มีปริมาณ 26.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวมทั้งพบว่าตำรับที่ใส่ปุ๋ยเคมี จุลินทรีย์ และปุ๋ยหมัก มีปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มากกว่าตำรับควบคุม และการใช้ปุ๋ยเคมีร่วมกับจุลินทรีย์ที่ขยายในปุ๋ยหมัก มีผลทำให้โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มากกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างเดียว อาจเนื่องจากโพแทสเซียมที่ได้มาจากทั้งปุ๋ยหมักและปุ๋ยเคมีจึงยังมีปริมาณหลังการทดลองมากกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างเดียว อย่างไรก็ตามปริมาณโพแทสเซียมหลังการทดลองจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทดลองเนื่องจากข้าวมีการดูดสะสมโพแทสเซียมไปใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งการดูดสะสมโพแทสเซียมในส่วนเหนือดินจะเพิ่มขึ้นตามอายุข้าวและลดลงเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่ระยะแก่ โดยเมื่อข้าวอายุ 112 วัน จะมีการดูดสะสมโพแทสเซียมในฟางและเมล็ด 35.42 กิโลกรัมโพแทสเซียมต่อไร่ (ยงยุทธ, 2558ก) สำหรับบทบาทของกรดอะมิโนลีวูลินิกอาจไม่ส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน แต่เกิดจากกลไกของแบคทีเรียในกลุ่มพีจีพีอาร์ในการละลายแร่ธาตุในดินในลักษณะเดียวกันกับฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์

ตารางที่ 10 สมบัติทางเคมีของดินก่อนและหลังการทดลองในสภาพโรงเรือนกระจก

ตำรับการทดลอง	pH (1:1)	OM (%)	P (มก./กก.)	K (มก./กก.)
ก่อนการทดลอง	5.75	0.87	9.25	32.40
หลังการทดลอง				
1. ควบคุม	6.07	1.14	19.20 bcd	18.77 e
2. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	6.30	0.97	12.83 d	22.53 bcd
3. ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	6.27	1.09	17.70 cd	20.40 de
4. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่	6.50	0.97	14.30 d	26.47 a
5. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	6.67	1.01	15.37 d	24.20 abc
6. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	6.57	1.13	17.13 d	25.30 ab
7. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่	6.60	1.18	20.33 bcd	24.27 abc
8. แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	6.23	1.12	15.70 d	26.33 a
9. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	6.73	1.14	26.43 bc	25.23 ab
10. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่	6.03	1.10	17.53 cd	23.73 abc
11. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	6.37	1.18	26.83 ab	25.20 ab
12. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	6.23	1.17	36.55 a	24.03 abc
F-test	ns	ns	**	**
CV (%)	4.15	11.77	29.63	8.69

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT
ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4.2 การเจริญเติบโตของข้าว

จากการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของข้าวในด้านความสูงและจำนวนต้นต่อกอเมื่ออายุเก็บเกี่ยวข้าว แล้วนำมาวิเคราะห์สถิติ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11 ดังนี้

1) ความสูง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 112.0 - 122.3 เซนติเมตร และตำรับการทดลองที่มีการใช้ปัจจัยการผลิตมีแนวโน้มส่งผลให้ความสูงมากกว่าตำรับควบคุม แต่การใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 300 และ 500 กิโลกรัมต่อไร่ มีความสูงต้นข้าวใกล้เคียงกัน คือ 119.3 118.3 และ 116.3 เซนติเมตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับการทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 และ 300 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน และครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน มีผลทำให้ความสูงของข้าวมากกว่าการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายในปุ๋ยหมักอย่างเดียว โดยพบว่าตำรับการทดลองที่ 5 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน มีความสูงต้นข้างใกล้เคียงกับ ตำรับการทดลองที่ 8 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน และตำรับการทดลองที่ 9 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน โดยมีความสูง 122.3 122.0 และ 122.0 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในอัตราที่เหมาะสมจะส่งผลต่อความสูงของข้าวได้ สอดคล้องกับการศึกษาของพรพิมล และวัฒนาลัย (2554) พบว่า การใช้สารละลายกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และขาวดอกมะลิ 105 โดยมีความสูงเพิ่มขึ้น 101.80 และ 139.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การทดสอบการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกในการปลูกข้าวในกระถาง เมื่อครบ 20 วัน พบว่า ความสูงและน้ำหนักแห้งต้นเพิ่มขึ้นมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจากการทดลองนี้เมื่อพิจารณาการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมี และส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในด้านความสูง ในตำรับการทดลองที่ 9 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสม

2) การแตกกอ พบว่า จากการเก็บข้อมูลจำนวนต้นต่อกอไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยจะอยู่ในช่วง 3.3 - 4.7 ต้นต่อกอ ซึ่งตำรับการทดลองที่ใช้ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินมีผลทำให้แนวโน้มจำนวนต้นต่อกอมากที่สุด เนื่องจากในระยะการเจริญเติบโตในช่วงนี้ ธาตุอาหารมีบทบาทสำคัญโดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัส การแตกกอจะเกิดขึ้นรวดเร็วเมื่อส่วนเหนือดินของข้าวมีไนโตรเจนมากกว่า 35 กรัมไนโตรเจนต่อกิโลกรัม และฟอสฟอรัสมากกว่า 2.5 กรัมฟอสฟอรัสต่อกิโลกรัม (ยงยุทธ และคณะ, 2558) ดังนั้นจึงพบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจึงไม่ส่งผลชัดเจนในการแตกกอเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน

ตารางที่ 11 ความสูง และจำนวนต้นต่อกอของข้าวในสภาพโรงเรือนกระจก

ตำรับการทดลอง	ความสูง (ซม.)	จำนวนต้นต่อกอ
1. ควบคุม	114.3	4.3
2. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	120.7	4.7
3. ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	118.0	4.0
4. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่	119.3	3.3
5. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	122.3	4.0
6. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	121.0	4.3
7. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่	118.3	4.3
8. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	122.0	3.6
9. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	122.0	3.6
10. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่	116.3	3.6
11. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	112.0	3.6
12. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	116.0	3.6
F-test	ns	ns
CV (%)	3.24	16.90

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.3 องค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตข้าว

จากการเก็บข้อมูลองค์ประกอบผลผลิต ได้แก่ เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี และเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบต่อรวง รวมทั้งผลผลิตข้าว แล้วนำมาวิเคราะห์สถิติ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 ดังนี้

1) เมล็ดดีต่อรวง พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งการใช้ปัจจัยการผลิตทั้งปุ๋ยเคมี ปุ๋ยหมัก และจุลินทรีย์มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีมากกว่าตำรับควบคุม โดยตำรับการทดลองที่ 2 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวงมากที่สุด คือ 83.73 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าใกล้เคียงกับตำรับการทดลองที่ 7 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก

อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวงมากที่สุด คือ 81.74 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 และ 500 กิโลกรัมต่อไร่ มีแนวโน้มมีค่าเมล็ดดีมากกว่าการใช้อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีเป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพของเมล็ดข้าว ซึ่งในการเติมเต็มเมล็ดในช่วงหลังดอกบานนั้นมาจากคาร์โบไฮเดรตที่ใบสังเคราะห์ได้ในระยะสุกแก่ และเคลื่อนย้ายไปยังเมล็ดประมาณ 60 - 70 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเมล็ดเมื่อเก็บเกี่ยว (ยงยุทธ และคณะ, 2558) ซึ่งกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก เป็นสารที่ช่วยในการเพิ่มคลอโรฟิลล์และส่งเสริมในการสังเคราะห์แสงของพืช (Mohr and Schopfer, 1995) ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญในระยะการสร้างเมล็ดของข้าวด้วย

2) เมล็ดลีบต่อรวง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตำรับควบคุมมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบมากที่สุด 30.62 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ตำรับการทดลองที่ 2 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบน้อยที่สุด 16.27 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในระยะการเติมเต็มเมล็ดไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญ โดย 70 เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนที่เคยสะสมในส่วนเหนือดิน จะเคลื่อนย้ายไปยังเมล็ดเพื่อสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นหากไนโตรเจนไม่เพียงพอก็จะส่งผลต่อเมล็ดลีบได้ นอกจากนี้การใส่ปุ๋ยโพแทสเซียมก็มีอิทธิพลต่อการเกิดเมล็ดลีบของข้าวเช่นกัน (ยงยุทธ, 2558ก)

3) ผลผลิตข้าว พบว่า ผลผลิตข้าวต่อกระถางมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตำรับการทดลองที่ 5 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับ ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินให้ผลผลิตมากที่สุด คือ 20.06 กรัม ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับตำรับการทดลองที่ 2 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน ตำรับการทดลองที่ 3 ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน ตำรับการทดลองที่ 6 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับ ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน และตำรับการทดลองที่ 8 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยมีผลผลิต 19.99 18.95 18.95 และ 19.31 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบอัตราการใช้แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก พบว่า อัตรา 300 และ 500 กิโลกรัมต่อไร่ ให้ผลผลิตข้าวมากกว่า อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งมีผลผลิต 17.13 16.87 และ 14.36 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ

ดังนั้นจากผลการการศึกษาอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในดินกรดสภาพโรงเรือนทดลอง จึงได้คัดเลือกอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 300 กิโลกรัมต่อไร่ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองในสภาพแปลงทดลองต่อไป เนื่องจากการเจริญเติบโต คือ จำนวนต้นต่อกอ องค์ประกอบผลผลิต ได้แก่ เมล็ดดี เมล็ดลีบ และผลผลิตต่อกระถาง มีค่ามากกว่าการใช้แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 100 กิโลกรัมต่อไร่ แต่ใกล้เคียงกับ 500 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งเป็นอัตราการใช้ที่มากกว่าโดยจะมีผลต่อต้นทุนการผลิตด้วย

ตารางที่ 12 เมล็ดดีต่อรวง เมล็ดลีบต่อรวง และผลผลิตข้าวในสภาพโรงเรือนกระจก

ตำรับการทดลอง	เมล็ดดีต่อรวง (%)	เมล็ดลีบต่อรวง (%)	ผลผลิตต่อกระถาง (ก.)
1. ควบคุม	69.38d	30.62 a	12.98 cd
2. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	83.73 a	16.27 d	19.99 a
3. ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	75.59 bcd	24.41 abc	18.95 a
4. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่	77.64 abc	22.36 bcd	14.36 bcd
5. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	74.51 cd	25.49 ab	20.06 a
6. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	74.91 bcd	25.09 abc	18.95 a
7. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่	81.74 ab	19.26 cd	17.13 ab
8. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	77.48 abc	22.52 bcd	19.31 a
9. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	79.37 abc	20.63 bcd	17.77 ab
10. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่	79.53 abc	20.47 bcd	16.87 abc
11. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	81.06 abc	18.94 bcd	12.18 d
12. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ขยายในปุ๋ยหมัก อัตรา 500 กิโลกรัมต่อไร่ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	79.16 abc	20.84 bcd	16.83 abc
F-test	**	*	*
CV (%)	4.15	19.65	16.03

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT

* หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

5. ผลการศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกร่วมกับการจัดการดินกรดเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตข้าวในสภาพแปลงทดลอง

5.1 การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินก่อนการทดลอง ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันกับการทดลองในสภาพโรงเรือนกระจก (ตารางที่ 10) และเก็บตัวอย่างดินหลังเก็บผลผลิตข้าว ที่ระดับความลึก 0 - 15 เซนติเมตร นำมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13 ดังนี้

1) ความเป็นกรดเป็นด่างของดินหลังการทดลอง พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยตำรับการทดลองที่ 3 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับปูนโดโลไมท์ มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างมากที่สุดและไม่แตกต่างกันกับตำรับการทดลองที่ 5 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปูนโดโลไมท์ และตำรับการทดลองที่ 6 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปูนโดโลไมท์ และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน ซึ่งมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.03 6.03 และ 5.83 ตามลำดับ โดยค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินหลังการทดลองในตำรับการทดลองที่มีการใส่ปูนโดโลไมท์ จะเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับดินก่อนการทดลอง เนื่องจากการใส่ปูนโดโลไมท์เป็นการยกระดับความเป็นกรดเป็นด่างของดิน โดยสามารถยกระดับจากกรดจัดเป็นกรดเล็กน้อย ซึ่งปูนโดโลไมท์เป็นปูนในรูปคาร์บอเนตที่เกิดจากตะกอนของแคลเซียมและแมกนีเซียมทับถมกันจึงมีทั้งแคลเซียมและแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบมีค่าความสามารถในการสะเทินกรดได้ไม่ต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2558ก)

2) อินทรียวัตถุในดินหลังการทดลอง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 2.14 - 2.37 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในระดับปานกลาง และอินทรียวัตถุหลังการทดลองเพิ่มขึ้นจากก่อนการทดลองซึ่งมีค่า 0.87 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแปลงดังกล่าวเกษตรกรมีการไถกลบเศษวัชพืชลงไปในดินจึงส่งผลต่อการเพิ่มอินทรียวัตถุดังกล่าว แต่เมื่อพิจารณาในแต่ละตำรับการทดลอง พบว่าการใช้แบคทีเรียผลิตกรด 5 อะมิโนลีวูลินิกที่ขยายเชื้อในปุ๋ยหมักไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของอินทรียวัตถุในดิน รวมทั้งปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัมเป็นอัตราที่ยังไม่เห็นผลถึงการเพิ่มอินทรียวัตถุในดินชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการใช้ปุ๋ยหมักอัตราต่างๆต่อการปรับปรุงบำรุงดิน พบว่า การใช้อัตรา 2 4 และ 6 ตันต่อไร่ มีผลทำให้อินทรียวัตถุเพิ่มขึ้น 0.59 0.6 และ 0.66 เปอร์เซ็นต์ โดยในตำรับควบคุมมีอินทรียวัตถุในดิน 0.52 เปอร์เซ็นต์ (วรรณลดา และคณะ, 2527)

3) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินหลังการทดลอง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 18.37 - 22.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จัดอยู่ในระดับสูง โดยตำรับที่ 6 การใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปูนโดโลไมท์ และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์มากที่สุด คือ 22.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งฟอสฟอรัสที่ได้มาจากทั้งปุ๋ยเคมี และปุ๋ยหมักที่ใช้ในการขยายเชื้อจากผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ซึ่งใช้ปุ๋ยหมักจากเปลือกไม้ยูคาลิปตัส มีปริมาณฟอสฟอรัส 0.92 เปอร์เซ็นต์ (ตารางภาคผนวกที่ 7) นอกจากนี้ในการขังน้ำเพื่อปลูกข้าวมีผลทำให้ฟอสฟอรัสในดินสูงขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนรูปของเฟอริกฟอสเฟตเป็นเฟอรัสฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ และในสภาพการขังน้ำยังทำให้การแพร่ของฟอสเฟตไอออนในดินมีมากขึ้นด้วย โดยบทบาทที่สำคัญของฟอสฟอรัสต่อข้าว ได้แก่ เพิ่มการแตกรากแขนง เพิ่มดัชนีพื้นที่ใบ เพิ่มจำนวนแขนงและจำนวนรวงต่อกอ เป็นต้น (ยงยุทธ , 2558ข)

4) โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินหลังการทดลอง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 39.77 - 42.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จัดอยู่ในระดับต่ำ โดยตำรับการทดลองที่ 6 การใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปูนโดโลไมท์ และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน มีปริมาณโพแทสเซียมมากที่สุด รวมทั้งการใช้ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินมีแนวโน้มทำให้โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินมากกว่าตำรับการทดลองอื่น อย่างไรก็ตามปริมาณโพแทสเซียมในดินหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตอยู่ในระดับต่ำ อาจเนื่องจากข้าวดูดสะสมโพแทสเซียมในส่วนต่างๆของข้าวประกอบด้วย ฟางข้าว 85 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ด 15 เปอร์เซ็นต์ และการดูดสะสมโพแทสเซียมของข้าวจะเพิ่มตามอายุข้าว แต่จะลดลงเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่ระยะแก่ โดยโพแทสเซียมจะมีบทบาทสำคัญในการขยายขนาดของเซลล์ การสังเคราะห์แสง ส่งเสริมการลำเลียงสารอินทรีย์ รักษาสมดุลย์ของประจุในเซลล์ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และช่วยให้พืชต้านทานโรคพืช (ยงยุทธ, 2558ก)

ตารางที่ 13 สมบัติทางเคมีของดินหลังการทดลองในสภาพแปลงทดลอง

ตำรับทดลอง	pH (1:1)	OM (%)	P (มก./กก.)	K (มก./กก.)
1. ควบคุม	5.43 bc	2.14	20.80	39.90
2. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	5.33 bc	2.22	21.73	40.07
3. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน + ปูนโดโลไมท์	6.03 a	2.19	20.43	40.07
4. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่	5.23 c	2.17	21.03	41.90
5. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์	6.03 a	2.22	18.37	39.77
6. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	5.83 ab	2.37	22.00	42.00
F test	*	ns	ns	ns
CV (%)	5.24	8.61	24.76	12.56

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

5.2 การเจริญเติบโตของข้าว

จากการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของข้าวในด้านความสูงและจำนวนต้นต่อกอเมื่ออายุเก็บเกี่ยวข้าว แล้วนำมาวิเคราะห์สถิติ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14 ดังนี้

1) ความสูง พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยตำรับการทดลองที่ 2 และ 3 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน และปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินร่วมกับการใช้โดโลไมท์ มีผลทำให้ความสูงมากที่สุดคือ 122.50 และ 123.80 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับตำรับการทดลองที่ 6 การใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปูนโดโลไมท์ และปุ๋ยเคมี

ครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน ซึ่งมีความสูง 120.40 เซนติเมตร และตำรับควบคุมมีความสูงน้อยที่สุด คือ 112.27 เซนติเมตร

2) การแตกกอ พบว่า จำนวนต้นต่อกอของข้าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าอยู่ในช่วง 10.43 - 12.17 ต้นต่อกอ โดยตำรับควบคุมมีการแตกกอน้อยที่สุด และตำรับการทดลองที่ 2 การใช้ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินมีการแตกกอมากที่สุด ส่วนในตำรับการทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก พบว่า ตำรับการทดลองที่ 6 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปูนโดโลไมท์และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน มีจำนวนต้นต่อกอ 11.67 ต้นต่อกอ ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยธาตุอาหารที่มีบทบาทสำคัญในการแตกกอคือไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยการแตกกอของข้าวนั้นจะทำให้ข้าวสามารถแข่งขันในการใช้แสงและทรัพยากรอื่นๆจากสิ่งแวดล้อม สามารถชดเชยจำนวนต้นที่ขาดหายไปในกรณีที่มีจำนวนต้นต่อพื้นที่น้อย โดยในการทำนาหว่านนั้นพันธุ์ข้าวที่แตกกอมากจะมีผลทำให้ผลผลิตสูงขึ้นด้วย (ยงยุทธ และคณะ, 2558)

สำหรับการใช้แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของข้าว ทั้งด้านความสูง และการแตกกอ เนื่องจาก กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แสง การเจริญเติบโต และผลผลิตพืช รวมทั้งเพิ่มการสะสมน้ำตาลในพืช (Hotta *et al.*, 1997) โดยการสังเคราะห์แสงของพืชโดยเฉพาะข้าวมีผลทำให้ข้าวเปลี่ยนพลังงานแสงไปเป็นน้ำหนักแห้ง โดยคาร์โบไฮเดรตทั้งน้ำตาลและแป้งที่ได้จากการสังเคราะห์แสงจะใช้ในการเจริญเติบโตของข้าวทั้งต้นและใบ จึงส่งผลต่อการแตกกอของข้าวด้วย (ยงยุทธ และคณะ, 2558) ดังนั้นกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวทั้งในด้านความสูงและการแตกกอ โดยพบว่า การใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas palustris* ที่ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ความเข้มข้น 2.67 ไมโครโมลาร์ ช่วยเพิ่มการเจริญของรากและน้ำหนักแห้งของข้าว (Nunkaew *et al.*, 2014) การใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยมีความสูงเพิ่มขึ้น 101.18 เปอร์เซ็นต์ และ 139.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร จะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของรากและจำนวนรากของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ 90.67 เปอร์เซ็นต์ และ 93.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเพิ่มการเจริญเติบโตของราก และจำนวนรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้ 157.97 เปอร์เซ็นต์ และ 193.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (พรพิมล และวัฒนาลัย, 2554) นอกจากนี้ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอื่นๆ เช่น หญ้าข้าวไรท์ (*Leymus chinensis*) โดยการใช้ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ความสูงของพืชเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับควบคุมที่ไม่ใส่ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยมีความสูง 35.75 37.17 และ 34.50 เซนติเมตร ตามลำดับ (Ahmad Anjum *et al.*, 2016) การใช้ในผักกาดหอม จะมีความสูงเพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 26.2 เป็น 32.1 เซนติเมตร (Xu *et al.,* 2012)

ตารางที่ 14 ความสูง และจำนวนต้นต่อกอของข้าวในสภาพแปลงทดลอง

ตำรับการทดลอง	ความสูง (ซม.)	จำนวนต้นต่อก่อ
1. ควบคุม	112.27 b	10.43
2. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	122.50 a	12.17
3. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน + ปูนโดโลไมท์	123.80 a	11.53
4. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่	115.20 b	11.30
5. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์	113.73 b	10.63
6. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	120.40 a	11.67
F-test	**	ns
CV(%)	1.73	10.79

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

5.3 องค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตข้าว

จากการเก็บข้อมูลองค์ประกอบผลผลิต ได้แก่ เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี และเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบต่อรวง รวมทั้งผลผลิตข้าว แล้วนำมาวิเคราะห์สถิติ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 ดังนี้

1) เมล็ดดีต่อรวง

จากการสุ่มรวงข้าวมาแปลงละ 10 รวง นับจำนวนเมล็ดดีหาค่าเฉลี่ยต่อรวง นำค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดดีต่อรวง แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 79.25 - 82.25 เปอร์เซ็นต์ โดยตำรับการทดลองที่ 6 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปูนโดโลไมท์ และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวงมากที่สุด และตำรับควบคุมมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวงน้อยที่สุด

2) เมล็ดลีบต่อรวง

จากการสุ่มรวงข้าวมาแปลงละ 10 รวง นับจำนวนเมล็ดลีบหาค่าเฉลี่ยต่อรวง นำค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดลีบต่อรวง แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งข้อมูลจะสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 18.17 - 20.75 เปอร์เซ็นต์ โดยตำรับควบคุมจะมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบทากที่สุด และตำรับการทดลองที่ 6 จะมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบน้อยที่สุด

3) ผลผลิตข้าว

จากการเก็บข้อมูลผลผลิตข้าวในพื้นที่ 2 x 4 ตารางเมตร และชั่งหาน้ำหนักที่ความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์ นำค่าผลผลิตมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม จากผลผลิตข้าวในตำรับการทดลองที่มีการใช้ปุ๋ยเคมี โดโลไมท์ และผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย มีผลทำให้ข้าวมีผลผลิตมากกว่าตำรับควบคุม โดยตำรับที่ 2 ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินให้ผลผลิตข้าวมากที่สุด คือ 1,285 กิโลกรัมต่อไร่ สำหรับการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 300 กิโลกรัมต่อไร่ ให้ผลผลิตข้าว 981 กิโลกรัมต่อไร่ แต่เมื่อใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน และโดโลไมท์ให้ผลผลิต 1,099 กิโลกรัมต่อไร่ โดยคิดเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 4.51 และ 17.54 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียร่วมกับโดโลไมท์ไม่ส่งผลทำให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียอย่างเดียว อาจเนื่องจากความเป็นกรดเป็นด่างของดินในตำรับการทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโดยไม่ใส่ปูน อยู่ในระดับกรดเล็กน้อยจึงไม่เห็นผลจากการใส่โดโลไมท์เพิ่มเข้าไปมากนัก

จากผลการศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อองค์ประกอบและผลผลิตข้าว โดยช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี และผลผลิตข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sumei and Weijin (2004) พบว่า กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกมีผลต่อคุณภาพเมล็ดและผลผลิตข้าวลูกผสม สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตเมล็ด 6.97 - 12.02 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มน้ำหนัก 1000 เมล็ดได้ 0.28 - 1.46 เปอร์เซ็นต์ แต่จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการใช้ผลิตผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกอย่างเดียวให้ผลผลิตข้าวที่ใกล้เคียงกับตำรับควบคุม แต่เมื่อใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดินจะส่งผลให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากสมบัติของกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (nitrate reductase) มีผลต่อการนำไนเทรตเข้าสู่ราก (Tanaka *et al.*, 1992) และเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Seiji and Murooka, 2001) ซึ่งจากการศึกษา Mishra and Srivastava (1983) พบว่าการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกช่วยกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยเฉพาะการใช้ร่วมกับโพแทสเซียมไนเทรตมีผลทำให้การสะสมของไนโตรเจนและโปรตีนในข้าวโพดสูงขึ้น นอกจากนี้ Iwai *et al.* (2005) พบว่าการใช้ปุ๋ยไนเทรตร่วมกับกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จะสามารถเพิ่มผลผลิตของปาปริกาและสตรอว์เบอรี่ เนื่องจากพืชสามารถดูดไนเทรตเพิ่มขึ้น นอกจากนี้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกยังมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตพืชชนิดอื่นๆ เช่น ผักกาดหอมที่ใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จะมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม โดยเพิ่มจาก 4.3 เป็น 6.01 กิโลกรัมต่อตารางเมตร (Xu *et al.*, 2012) หญ้าข้าวไรท์ (*Leymus chinensis*) พบว่า ระดับความเข้มข้น 10 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ผลผลิต คือน้ำหนักสดของพืชเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับควบคุมที่ไม่ใส่ กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยมีน้ำหนักสด 0.416 0.491 0.621 และ 0.389 กรัม ตามลำดับ (Ahmad Anjum *et al.*, 2016)

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวง เมล็ดลีบต่อรวง และผลผลิตข้าวในสภาพแปลงทดลอง

ตำรับการทดลอง	เมล็ดดีต่อรวง (%)	เมล็ดลีบต่อรวง (%)	ผลผลิต (กก./ไร่)
1. ควบคุม	79.25	20.75	935
2. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	80.33	19.67	1,285
3. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน + ปูนโดโลไมท์	81.92	18.08	780
4. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่	80.58	19.42	981
5. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์	80.17	19.92	941
6. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	82.25	18.17	1,099
F-test	ns	ns	ns
CV(%)	3.34	14.63	28.43

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยการใช้ DMRT

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

5.4 ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ

จากการประเมินค่าใช้จ่ายและผลตอบแทนในการปลูกข้าว จากตำรับการทดลองและวิธีการแบบต่างๆ ซึ่งรายละเอียดดังแสดงในตารางผนวกที่ 10 และตารางที่ 16 พบว่า ตำรับการทดลองที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจสูงสุด คือ 5,540 บาทต่อไร่ รองลงมา คือ ตำรับการทดลองที่ 6 การใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปูนโดโลไมท์ และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดินให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ 4,336.5 บาทต่อไร่ โดยใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน และเพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุมคิดเป็น 9.65 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 16 ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจจากการปลูกข้าว

ตำรับการทดลอง	ผลผลิต (กก./ไร่)	รายได้ (บาท/ไร่)	ต้นทุนรวม (บาท/ไร่)	รายได้สุทธิ (บาท/ไร่)
1. ควบคุม	935	6,545	2,590	3,955
2. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน	1,285	8,995	3,455	5,540
3. ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน + ปูนโดโลไมท์	780	5,460	3,759	1,701
4. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่	981	6,867	2,620	4,247
5. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์	941	6,587	2,924	3,663
6. ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ + ปูนโดโลไมท์ + ปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน	1,099	7,693	3,356.5	4,336.5

สรุปผลการทดลอง

1) การคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจากตัวอย่างดินบริเวณรากข้าว 149 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas putida* KBRN 7/1 และ *Bacillus thuringenesis* KBRN 9/3 โดยสามารถผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกโดยใช้ L - alanine ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้น ในระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน ผลิตได้ 12.90 และ 36.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2) การทดสอบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิค ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในห้องปฏิบัติการ พบว่า *P. putida* KBRN 7/1 มีผลทำให้ความสูงและความยาวของรากข้าวหอมมะลิ 105 เพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 13.27 และ 23.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ *B. thuringenesis* KBRN 9/3 มีผลให้ความสูง และความยาวของรากข้าวปทุมธานี 1 เพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 22.55 และ 21.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3) การศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก *P. putida* KBRN 7/1 หรือ และ *B. thuringenesis* KBRN 9/3สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อได้ ในอาหาร NB และ King 's B medium โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุดที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 20 ชั่วโมง มีปริมาณแบคทีเรียอยู่ในช่วง 1.04×10^{13} - 1.93×10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร

4) การศึกษาวัสดุรองรับในการผลิตผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย ในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์แบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต ของแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 2 สายพันธุ์ สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้เป็นระยะเวลา 10 เดือน เก็บในตู้เย็นได้ 12 เดือน การใช้วัสดุอินทรีย์และอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ การใช้ปุ๋ยหมักกากอ้อย ปุ๋ยหมักเปลือกไม้ยูคาลิปตัส และพีทมอส สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลา 5 เดือน เพอร์ไลต์ และภูไมท์ เก็บรักษาได้ 6 เดือน และ 5 เดือน ตามลำดับ

5) วิธีการขยายเชื้อแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก คือ การใช้ปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัม รำข้าว 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 25 กรัม สามารถขยายได้สูงสุดที่ระยะเวลาการขยายเชื้อ 2 วัน มีปริมาณเชื้อ 9.04 log no. ต่อกรัม

6) การใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน มีผลทำให้การเจริญเติบโต และผลผลิตข้าวในสภาพโรงเรือนมากที่สุด และเมื่อนำมาทดสอบในสภาพแปลง พบว่า การใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก อัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ ปูนโดโลไมท์ และปุ๋ยเคมีครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน มีผลทำให้การเจริญเติบโต และผลผลิตข้าวสูงสุด โดยให้ผลผลิต 1,099 กิโลกรัมต่อไร่ เพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 17.54 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจสูงสุด คือ 4,336.5 บาทต่อไร่ เพิ่มขึ้นจากตำรับควบคุม 9.65 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยรูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก 2 สายพันธุ์ คือ *P. putida* และ *B. thuringenesis* ซึ่งได้ทั้งผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ วิธีการขยายเชื้อ และอัตราการใช้ประโยชน์ในการปลูกข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 แต่เนื่องจากการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกต่อการเพิ่มผลผลิตข้าวยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างไรก็ตามการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์จะส่งผลทางด้านผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบการใช้กรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นกับการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ รวมทั้งการวัดปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในสภาพแปลงทดลองด้วย เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นการศึกษา การใช้กรด 5 - อะมโนลีวูลินิกกับการเพิ่มผลผลิตข้าวมากกว่าการใช้ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การศึกษาในพืชชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะพืชผัก เช่น ผักขม (*Spinacia oleracea*) ผักกาดก้านขาว (*Brassica campestris* L. supsp. *Napus*) กระเทียม (*Alium satiyum* L.) และหัวไชเท้า (*Raphanus sativas* var. *radicula* DC) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 139 - 163 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน จึงน่าจะมีแนวทางการศึกษาต่อยอดในพืชผักต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับ

1) ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพผลิตสารเสริมการเจริญเติบโตของพืชกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก จำนวน 2 สายพันธุ์

2) ได้รูปแบบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตสารเสริมการเจริญเติบโตของพืชกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก เพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตข้าว

3) ได้อัตราการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผลิตสารเสริมการเจริญเติบโตของพืชกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก ในการปลูกข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง พันธุ์สุพรรณบุรี 1

4) เผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับผลงานวิจัยในการประชุม สัมมนาวิชาการ การจัดนิทรรศการ สู่นักวิชาการ เพื่อนำไปศึกษาต่อยอดงานวิจัยจุลินทรีย์ที่สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2551. **คู่มือการจัดการอินทรียวัตถุเพื่อปรับปรุงบำรุงดินและเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน.** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

____. 2558ก. **คู่มือการพัฒนาที่ดินสำหรับหมอดินอาสาและเกษตรกร.** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

____. 2558ข. **ชุดดินภาคกลางความรู้พื้นฐานเพื่อการเกษตร.** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

____. 2556ก. **เทคโนโลยีชีวภาพกรมพัฒนาที่ดิน.** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

____. 2556ข. **ระเบียบกรมพัฒนาที่ดินว่าด้วยการใช้เครื่องหมายรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตทางการเกษตร.** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กรมการข้าว. 2551. **องค์ความรู้เรื่องข้าว.** แหล่งที่มา : http://www. brrd.in.th/rkb, 17 มิถุนายน 2563.

กรมวิชาการเกษตร. 2548. **คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ.** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กัญญารัตน์ ด้วงสีเกาะ, ศรีสม สุวรรณวงศ์, มาลี ณ นคร และ ณรงค์ วงศ์กันทรากร. 2557. อิทธิพลของกรดอะมิโนลีวูลินิกต่อการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นไขมันในข้าวที่ได้รับสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์, น. 123 - 130. **ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จักรินทร์ เพ็ชรงาม, กรศักดิ์ รัตตมณี และ มณีรัตน์ ติรนันทกุล. 2547. การบำบัดน้ำกากส่าเหล้าแบบชีวเคมีของโรงงานผลิตแอลกอฮอล์. **ว.วิจัยและฝึกอบรม สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.** 3: 51 - 59.

ไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. 2528. **การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังการกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์.** สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

ดวงพร คันธโชติ และ ธนวันต์ กันทา. 2557. **การผลิตปุ๋ยชีวภาพจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในรูปแบบของแข็งเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในนาข้าวดินเค็ม.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ทัศนีย์ อัตตะนันทน์. 2550. **ดินที่ใช้ปลูกข้าว.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธนกฤต เขียวอร่าม, นันทวัฒน์ ศรีอำไพ, อำพล แพบุตร, อุไร กาลปักษ์ และ รุ่งนภา อังคุณี. 2555. **ศึกษาปัจจัยและแนวทางการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ในการทำนาในพื้นที่อำภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี.** คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี, เพชรบุรี.

ธนากร แสงสง่า. 2557. พีจีพีอาร์: บทบาทในการส่งเสริมและป้องกันพืชภายใต้สภาวะเครียด. **ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 4: 553 - 570.

ปราโมทย์ ยาใจ. 2559. **แนวทางการปรับเปลี่ยนพืชทดแทนข้าวนาปรัง เพื่อแก้ปัญหาภัยแล้งอย่างยั่งยืนในพื้นที่ลุ่มน้ำเจ้าพระยา.** กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ปาณิศา ประสม, คเณศ ใจเก่งกาจ และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2559. ผลของวัสดุรองรับอนินทรีย์ในการคงระดับจำนวนประชากรของเชื้อรา *Trichoderma* sp. และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Pythium* sp. ในสารละลายธาตุอาหารของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. ว.**พืชศาสตร์สงขลานครินทร์** 3: 36 - 46.

ปิยะ ดวงพัตรา. 2556. **สารปรับปรุงดิน.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรพิมล เกียรติภาพันธ์ และ วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2554. การใช้สารสกัดกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกจากจุลินทรีย์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช. **ในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย**. 35 น.

พักตร์เพ็ญ ภูมิพันธ์, วรภัทร ลัคนทินวงค์, ชวินทร์ ปลื้มจิตร และ ภิรญา ชมพูผิว. 2559. การเปรียบเทียบระหว่างปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์คุณภาพสูงต่อคุณภาพข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1. **ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 24: 753 - 765.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2539. **การผลิตอาหารสัตว์.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

มงคล ต๊ะอุ่น, สมบูรณ์ ประภาพรรณพงษ์, เชาว์วัช หนูทอง และ ณัฐภูมิ สุขแก้ว. 2551. **คู่มือการผลิตปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด - ปั้นเม็ด.** สำนักพิมพ์เกษตรกรรมธรรมชาติ, กรุงเทพฯ.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2558ก. โพแทสเซียมของข้าว, น. 276 - 292. ใน ยงยุทธ โอสถสภา, บรรณาธิการ. **ดิน ธาตุอาหาร และปุ๋ยข้าว.** สมาคมดินและปุ๋ยแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

____. 2558ข. ฟอสฟอรัสของข้าว, น. 261 - 275. ใน ยงยุทธ โอสถสภา, บรรณาธิการ. **ดิน ธาตุอาหารและปุ๋ยข้าว.** สมาคมดินและปุ๋ยแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

____, บุญดิษฐ์ วรินทร์รักษ์ และ สิริมา ปั้นศิริ. 2558. การเจริญเติบโตของข้าว, น. 186 - 217. ใน ยงยุทธ โอสถสภา, บรรณาธิการ. **ดิน ธาตุอาหาร และปุ๋ยข้าว.** สมาคมดินและปุ๋ยแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

รัชพล พะวงศ์รัตน์, มาลินี อันภักดี และ สุทธิเดช ปรีชารัมย์. 2555. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากใบตองโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปที่แตกต่างกัน. Veridian E-Journal 6: 1025 - 1036.

ฤดีกร วิวัฒนปฐพี, อัจฉรา เพ็งหนู, มานะ กาญจนมณีเสถียร, วิวัฒน์ พิชญากร และ จารุณี หนูมาก. 2554. **การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปแบบเจลบีดที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์นานและสลายตัวทางชีวภาพเพื่อใช้ควบคุมโรคพืช.** คณะเภสัชศาสตร์ และคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วรรณลดา สุนันทพงษ์ศักดิ์, พิทยากร ลิ่มทอง, เสียงแจ๋ว พิริยพฤนต์, เลิศชัย พูนพน และ กาญจนา กีรตวัฒนา. 2527. **อิทธิพลของปุ๋ยหมักต่อกิจกรรมจุลินทรีย์และคุณสมบัติบางประการในดินกับการเจริญเติบโตของข้าวโพดในดินชุดมาบบอน.** กรมพัฒนาที่ดิน, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

วิภาวรรณ ท้ายเมือง. 2558. ธรรมชาติของดินนา, น. 61 - 78. ใน ยงยุทธ โอสถสภา, บรรณาธิการ. **ดิน ธาตุอาหาร และปุ๋ยข้าว.** สมาคมดินและปุ๋ยแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

ศุภัชญา ชนชนะชัย. 2550. **การใช้น้ำกากส่าของโรงงานสุราในการทำน้ำสกัดชีวภาพ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 2560. สิ่งประดิษฐ์ชีวภัณฑ์ 5 - อะมิโนลีวูลินิก. แหล่งที่มา: http://www. rdi.rmutsv.ac.th/_info/sites/default/files/newsletter5-01-2560.pdf, 14 มิถุนายน 2563.

สำนักงานเกษตรและสหกรณ์สุโขทัย. 2561. **ข้อมูลเพื่อการวางแผนและพัฒนาการเกษตรรายสินค้า ข้าว**. สำนักงานปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สุโขทัย.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2559**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

____. 2560. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2560**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน. 2547. **คู่มือการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน น้ำ ปุ๋ย พืช วัสดุปรับปรุงดินและการวิเคราะห์เพื่อตรวจรับรองมาตรฐานสินค้า.** กรมพัฒนาที่ดิน, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สิตารินทร์ ทองปุสสะวัลย์, พรชัย ชัยสงคราม, สุภาณี ศักดาเยี่ยงยงค์, พิมพ์พร พรพรหมินทร์ และกิตตินันท์ วรอนุวัฒนกุล. 2552**. เขตการใช้ที่ดินพืชเศรษฐกิจข้าวนาปี.** กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อภิเชษฐ์ หมื่นอร่าม. 2554. ผลของกากน้ำตาลและกากเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียกรดแลกติก. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49**. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อมรรัตน์ ชุมทอง และ สริญญา ขุนรายา. 2559. การพัฒนาสูตรตำรับไรโซเบียมในรูปแบบเจลเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วลิสง. **ว.พืชศาสตร์สงขลานครินทร์.** 3: 44 - 49.

อังคณา ใสเกื้อ. 2556. การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนกรด/ชอบกรดจากเขตดินเปรี้ยวในจังหวัดนครศรีธรรมราช และส่งเสริมการผลิตชีวมวลและกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก โดยเทคนิค Plackett-Burman. **ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร. ธัญบุรี** 3: 74 - 89.

____, ชุติมา แกมกิจ, ธนากรณ์ ดาสุด และ อรพิน รัตนสุภา. 2561. การผลิตปุ๋ยนาโนจากกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิกที่จับกับไคโตซานเพื่อนำไปเพิ่มผลผลิตและคุณภาพข้าวหอมนิล *(Oryza sativa* L.) ในพื้นที่จำกัด. **ระบบสารสนเทศงานวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมรา**ช. แหล่งที่มา: https://riss.rmutsv.ac.th/upload/doc/201910/nNrCyUDkNIxn81yBbb1B/nNrCyUDkNIxn81yBbb1B.pdf, 9 มิถุนายน 2563.

อิทธิสุนทร นันทกิจ. 2545. การปลูกพืชในวัสดุปลูก (substrate culture). ใน **เอกสารประกอบการอบรมการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน รุ่นที่ 4.** คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

Abd - Alrazaq, Z. and A. Alkhfaji. 2018. Bee collected pollen load (BCPL) as alternative culture media for bacterial and yeast growth. **J. Pharm. Sci. Res.** 10: 830 - 835.

Ahmad Anjum, S., J. Li, J. Lv, X. Zong, L. Wang, A. Yang, R. Yan, Z. Ali, J. Song, and S. Wang. 2016. Regulation mechanism of exogenous ALA on growth and physiology of *Leymus chinensis* (Trin.) under salt stress. **Chilean J. Agric. Res**. 76: 314 - 320.

Ahn, K. 2007. Production of 5 - Aminolevulinic acid (ALA) by *Bacillus cereus* 1-1. **Korean J. Microbiol**. 43: 304 - 310.

Akram, N.A. and M. Ashraf. 2013. Regulation in plant stress tolerance by a potential plant growth regulator, 5 - aminolevulinic acid. **J. Plant Growth Regul.** 32: 663 - 679.

____, ___ and F. Al - Qurainy. 2012. Aminolevulinic acid - induced changes in some key physiological attributes and activities of antioxidant enzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants under saline regimes. **Sci. Hortic**. 142: 143 - 148.

Albareda, M., D.N. Rodríguez - Navarro and M. Camacho. 2008. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biol. Biochem.** 40: 2771 - 2779.

Anderson, T., T. Briseid, T. Nesbakken, J. Ormerod, R. Sirevaag and M. Thorud. 1983. Mechanism of systhesis of 5 - aminolevulinic acid in purple, green and blue-green bacteria. **FEMS. Microbiol. Lett.** 19: 303 - 306.

Avissar, Y.J. 1980. Biosynthesis of 5 - aminolevulinate from glutamate in *Anabaena variabilis*. **Biochim. Biophys. Acta.** 613: 220 - 228.

____, J.G. Ormerod and S.I. Beale. 1989. Distribution of δ-aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototrophic bacterial groups. **Arch. Microbiol.** 151: 513 - 519.

Balesstrasse, K.B., S.M. Gallego and M. L. Tomaro. 2006. Oxidation of the enzymes. **J. Pharm. Sci.** 89: 1335 - 1341.

Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 1089 - 1098.

____. 1998. Inoculants of plant growth - promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnol. Adv**. 16: 729 - 770.

____, L.E. de - Bashan, S. R. Prabhu and J. P. Hernandez. 2014. Advances in plant growth promoting bacteria inoculant technology: formulation and practical perspectives. **Plant Soil**. 378: 1 - 33.

Beale, S. 1970. The biosynthesis of δ-aminolevulinic acid in *Chlorella.* **Plant Physiol.** 45: 504 - 506.

Binduroy, C. and M. Vivekanandan. 1998. Role of aminolevulinic acid in improveing biomass production in *Vigna catjung, V. mungo, and V. radiate*. **Biol. Plant**. 41: 211 - 215.

Bradshaw, R.E., S.W.C. Dixon, D.C. Raitt and T.M. Pillar. 1993. Isolation and nucleotide sequence of the 5 - aminolevulinate synthase gene from *Aspergillus nidulans*. **Curr. Genet.** 23: 501 - 507.

Bunke, A., O. Zerba, H. Schmid, H.P. Merkle and B. Gander. 2000. Degradation mechanism and stability of 5 - aminolevulinic acid. **J. Pham. Sci.** 89: 1335 - 1341.

Chen, J.H. 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility, pp. 89 - 99. In Z.S. Chen and T. Vearasilp, eds. **International Workshop on Sustained Management of the Soil - Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use**. Land development Department, Bangkok, Thailand.

Chen, L., Y. Guo, G. Bai, J. Sun and Y. Li. 2015. Effect of 5 - aminolevulinic acid and genistein on accumulation of polyphenol and anthocyanin in Qinyang apples. **J. Anim. Plant Sci.** 25: 68 - 79.

Chen, W.C., J.H. Yen, C.S. Chang and Y.S. Wang. 2009. Effect of herbicide butachlor on soil microorganisms and on nitrogen - fixing abilities in paddy soil . **Ecotox. Environ. sate.** 72: 120 - 127 .

Chon, S.U. 2003. Herbicidal activity of δ-aminolevulinic acid on several plants as affected by application methods. **Korean J. Crop Sci.** 48: 50 - 55.

Chotanakoon, K., P. Kaewsorn, P. Chulaka and W. Chanprasert. 2015. Effect of hydropriming on pepper seed quality of 2 cultivars. **Agricultural. Sci. J.** 46: 617 - 620.

Conceicao, V.S. 2004. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. **Sci. Hortic**. 103: 93 - 99.

Daza, A., C. Santamaria, D. N. Rodriguez - Navarro, M. Camacho, R. Orive and F. Temprona. 2000. Perlite as a carrier for bacteria inoculants. **Soil Biol. Biochem.** 32: 567 - 572.

De Blois, A.W., R.J.E. Grouls, E.W. Ackerman and W.J.A. Wijdeven. 2002. Development of a stable solution of 5 - aminolaevulinic acid for intracutaneous injection in photodynamic therapy. **Laser Med. Sci**. 17: 208 - 215.

Deaker, R., R. J. Roughley and I. R. Kennedy. 2004. Legume seed inoculation technology - a review. **Soil Biol. Biochem**. 36: 1275 - 1288.

Delucca, A.J., W.J.J. Connick, D.R. Fravel, J.A. Lewis and J.M. Bland. 1990. The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. **J. Ind. Microbiol**. 6: 129 - 134.

Donnelly R.F., D.I.J. Morrow, P.A. McCarron, P. Juzenas and A.D. Woolfson. 2006. Pharmaceutical analysis of 5-aminolevulinic acid in solution and in tissues. **J. Photoch. Photobio. B.** 89: 59 - 71.

Donnelly, R.F., P.A. McCarron and A. David Woolfson. 2007. Derivatives of 5 - aminolevulinic acid for photodynamic therapy. **Perspect Medicin Chem**. 1: 49 - 63.

Duarte, J.C., J.A.R. Rodrigues, P.A.S. Moran, G.P. Valenca and J.R. Nunhez. 2013. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. **Amb. Express**. 3: 1 - 8.

Feng, S., M.F. Li, F. Wu, W.L. Li and S.P. Li. 2015. 5 - Aminolevulinic acid affects fruit coloration, growth, and nutrition quality of *Litchi chinensis* Sonn.cv. Feizixiao in Hainan, tropical China. **Sci. Hortic. (Amsterdam)** 193: 188 - 194.

Fravel, D.R., J.J. Marois, R.D. Lumsden and W.J. Connick. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate - clay matrix. **Phytopathology** 75: 774 - 777.

Fu, J., Y. Sun, X. Chu, Y. Xu and T. Hu. 2014. Exogenous 5 - aminolevulenic acid promotes seed germination in *Elymus nutans* against oxidative damage induced by cold stress. **PLoS ONE** 9: 1 - 11.

Gibson, K.D., W.G. Laver and A. Neuberger. 1958. Initial stage in the biosynthesis of porphyrins, the formation of 5 - aminolevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. **Biochem. J.** 70: 71 - 81.

Grosso, C.F.R. and C.S. Favaro - Trindade. 2004. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized in *B. lactis* in yoghurt. **Braz. J. Microbiol.** 35: 151 - 156.

Heijnen, C.E., S.L.C.F. Burgers and J.A. Van veer. 1993. Metabolic activity and population dynamics of *Rhizobia* introduced into unamended and bentonite amended loamy sand. **Appl. Environ. Microbiol**. 59: 743 - 747.

Hotta, Y., T. Tanaka, H. Tanaka, Y. Takeuchi and M. Konnai. 1997. Improvement of cold resistant in rice seedling by 5 - aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 61: 2025 - 2028.

____, ___, L. Bingshan, Y. Takeuchi and M. Konnal. 1998. Improvement of cold resistance in rice seedlings by 5 - aminolevulinic acid**.** **J. Pest. Sci.** 23: 29 - 33.

Inze , D. and M.V. Montagu. **Oxidative Stress in Plants**. Taylor & Francis, London.

Iwai, K, A. Saito, J. Leeuwen, T. Tanaka and Y. Takeuchi. 2005. A new functional fertilizer containing 5 - aminolevulinic acid promoted hydroponically grown vegetables in the Netherlands. **Acta Hort** 697: 351 - 355.

Jadhav, P., M. Sonne, A. Kadam, S. Patil, K. Dahigaonkar and J. K. Oberoi. 2018. Formulation of cost effective alternative bacterial culture mediau fruit and vegetables waste. **Int. J. Cur. Res. Rev**. 10: 6 - 15.

Jahn, D., E. Verkamp and D. Soll. 1992. Glutamyl - transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. **Trends Biochem. Sci.** 17:21 5 - 218.

Jiamwijit, J. 2002. **Formulation of *Bacillus* sp. MK007 for control *Curvularia lunata*, the causal of seed disculorization of rice**. M.Sc. Thesis, Kasetsart University.

Johnsen, K. and P. Nielsen. 1999. Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic - polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterization**.** **FEMS. Microbiology Letters** 173: 155 - 162.

Jugenson, J.E., S.I. Beale and R.F. Troxler. 1976. Biosynthesis of 5 - aminolevulinic acid in the unicellular *Rhodophyta*, *Cyanidium caldarium.* **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 69: 149 - 157.

Kantha, T., C. Chaiyasut, D. Kantachote, S. Sukrong and A. Muangprom. 2010. Selection of photosynthetic bacteria producing 5 - aminolevulinic acid from soil of organic saline paddy fields from the Northeast region of Thailand. **Afr. J. Microbiol. Res.** 4: 1848 - 1855.

Kars, G. and A. Ceylan. 2013. Biohydrogen and 5 - aminolevulinic acid production from waste barley by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a biorefinery concept. **Int. J. Hydrogen Energ.** 38: 5573 - 5579.

____ and U. Alparslan. 2013. Valorization of sugar beet molasses for the production of biohydrogen and 5 - aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a biorefinery concept. **Int. J. Hydrog. Energy**. 38: 14488 - 14494.

Kavitha, K., S. Nakkeeran, G. Chandrasekar, W.G.D. Fernando, S. Mathiyazhagan, P. Renukadevi and A. S. Krishnamoorthy. 2003. Role of antifungal antibiotics, siderophores and IAA production in biocontrol of *Pythium aphanidermatum* inciting damping off in tomato by *Pseudomonas chlororaphis* and *Bacillus subtilis*, pp. 493 - 497. In **Proceedings of the 6th International Workshop on PGPR.** IISR, Calicut.

Kanto, U., K. Jutamanee, Y. Osotsapar, W. Chai - arree and S. Jattupornpong. 2015. Promotive effect of priming with 5 - aminolevulinic acid on seed germination capacity, seedling growth and antioxidant enzyme activity in rice subjected to accelerated ageingtTreatment. **Plant Prod. Sci.** 18: 443 - 454.

Kim, M.S., Y.K. Oh, I.K. Lee and E.I. Kim. 2010. **Production of recombinant photosynthetic bacteria which produces molecular hydrogen in a light independent manner and hydrogen evolution melthod using above strain.** U.S. Patet us 2010 - 3734.

King E.O., M.K. Ward and D.E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyucuanin and fluorescin. **I. Lab. Clin. Med.** 44: 301 - 307.

Kipe-Nolt, J.A. and E. Stevens. 1980. Biosynthesis of 5 - aminolevulinic acid from glutamate in *Agmenellum quadruplicatus.* **Plant Physiol**. 65: 125 - 128.

Koh, R. H. and H. G. Song. 2007. Effects of application of *Rhodopseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. **J. Microbiol. Biotechnol**. 17: 1805 - 1810.

Korkmaz, A. 2012. Abiotic stress responses in plants, pp. 215 - 234. In P. Ahmad and M.N.V. Prasad, eds. **Effects of Exogenous Application of 5 - Aminolevulinic Acid in Crop Plants**. Springer Science Business Media, New York, NY.

____ and Y. Korkmaz. 2009. Promotion by 5 - aminolevulenic acid of pepper seed germination and seedling emergence under low temperature stress. **Sci. Hortic. (Amsterdam)** 119: 98 - 102.

Kosar, F., N.A. Akram and M. Ashraf. 2015. Exogenously - applied 5 - aminolevulinic acid modulates some key physiological characteristics and antioxidative defense system in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under water stress. **S. Afr. J. Bot.** 96: 71 - 77.

Kuk, Y.I., G.S. Lim, S.U. Chon, T.E. Hwang and J.O. Guh. 2003. Efects of 5 - aminolevulinic acid on growth and inhibition of various plant species. **Korean J. Crop Sci**. 48: 127 - 133.

Lee, K.Y. and T.R. Heo. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulate gastric juices and bile salt solution. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 869 - 873

Lewis, J. A. and G. C. Papavizas. 1985. C haracteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in the soil. **Plant. Pathol**. 34: 571 - 577.

Li, D.M., J. Zhang, W.J. Sun, Q. Li, A .H. Dai and J.G. Bai. 2011. 5 - Aminolevulinic acid pretreatment mitigates drought stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity. **Sci. Hortic.** 130: 820 - 828.

Lin, D., N. Nishio and S. Nagai. 1989. Production of 5 - aminolevulinic acid by methanogens. **J. Ferment. Bioeng**. 68: 88 - 91.

Liu, D., L.T. Wu, M.S. Naeem, H.B. Liu and X.Q. Deng. 2013. 5 - Aminolevulinic acid enhances photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant system in oilseed rape under drought stress. **Acta Physiol. Plant** 35: 2747 - 2759.

____, D., Z.F. Pei, M.S. Naeem, D.F. Ming, H.B. Liu, F. Khan and W.J. Zhou. 2011. 5 - Aminolevulinic acid activates antioxidative defence system and seedling growth in *Brassica napus* L. under water - deficit stress. **J. Agron. Crop Sci.** 197: 284 - 295.

Madene, A., M. Jacquot, J. Scher, and S. Desobry. 2006. Flavor encapsulation and controlled release - a review. **Int. J. Food Sc. Technol.** 41: 1 - 21

Madukasi, E.I., X.I. Dai, H. Chunhua and J.J. Zhou. 2010. Potentials of phototrophic bacteria in treating pharmaceutical wastewater. **Int. J. Environ. Sci. Tech**. 7: 165 - 174.

Malusa, E., L. Sas-Paszt and J. Ciesielska. 2012. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **Sci. World J.** 2012: 1 - 12.

Mandal, S., A.K. Puniya and K. Singh. 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC - 298 . **Int. Dairy. J**. 16: 1190 - 1195.

Mauzerall, D. and S. Granick. 1956. The occuraence and determination of aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. **J. Biol. Chemis.** 219: 435 - 440.

Memon, S.A., X. Hou, L. Wang and Y. Li. 2009. Promotive effect of 5 - aminolevulinic acid on chlorophyll, antioxidative enzymes and photosynthesis of Pakchoi (*Brassica campestris* ssp. chinensis var. communis Tsen et Lee). **Acta Physiol. Plant**. 31: 51 - 57.

Menon, I. A. and D. Shemin. 1967. Concurrent decrease of enzymic acitivities concerned with the synthesis of co - enzyme B_{12} and of propionic in *Propionibateria.* **Arch. Biochem. Biophys.** 121: 304 - 310.

Mishra, S. N. and H. S. Srivastava. 1983. Stimulation of nitrate reductase activity by delta aminolevulinic acid in excised maize leaves. **Experientia** 39: 1118 - 1120.

Miyachi, N., T. Tanaka, S. Nishikawa, H. Takeya and Y. Hotta. 1998. Preparation and chemical properties of 5 - aminolevulinic acid and its derivatives. **Porphyrins** 7: 342 - 347.

Mohr, H. and P. Schopfer. 1995. **Plant Physiology.** Springer - Verlag, Berlin.

Naeem, M.S., Z.L. Jin, G.L. Wan, D. Liu, H.B. Liu, K. Yoneyama and W.J. Zhou. 2010. 5 - Aminolevulinic acid improves photosynthetic gas exchange capacity and ion uptake under salinity stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Plant Soil**. 332: 405 - 415.

Nakkeeran, S., K. Kavitha, S. Mathiyazhagan, W.G.D. Fernando, G. Chandrasekar and P. Renukadevi. 2004. Induced systemic resistance and plant growth promotion by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA-23 and *Bacillus subtilis* strain CBE4 against rhizome rot of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Can. J. Plant Pathol.** 26: 417 - 418.

Neidle, E. and S. Kaplan. 1993. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides hem*A and *hem*T genes, encoding two 5 - aminolevulinic acid synthase isozymes. **J. Bacteriol.** 175: 2292 - 2303.

Nguyen, H., H.S. Kim and S. Jung. 2016. Altered tetrapyrrole metabolism and transcriptome during growth - promoting actions in rice plants treated with 5 - aminolevulinic acid. **Plant Growth Regul.** 78: 133 - 144.

Nishihara, E., K. Kondo, M.M. Parvez, K. Takahashi, K. Watanabe and K. Tanaka, 2003. Role of 5 - aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). **J. Plant Physiol**. 160: 1085 - 1091.

Nishikawa, S., K. Watanabe, T. Tanaka, N. Miyachi, Y. Hotta and Y. Murooka. 1999. *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5 - aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. **J. Biosci. Bioeng.** 87: 798 - 804.

Nishimura, Y., M. Shimadzu and H. Lizuka. 1981. Bacterio chlorophy ll formation in radiation - resistant. *Pseudomonas radiora*. **J. Gen. Microbiol**. 27: 427 - 430.

Nishio, M. and S. Kusano. 1980. Fluctuation patterns of microbial numbers in soil applied with compost. **Soil Sci. Plant Nutr.** 26: 581 – 593.

Noparatnaraporn, N., M. Watanabe and K. Sasaki. 2000. Extracellular formation of 5 - aminolevulinic acid by intact cells of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. under various pH conditions. **World J. Microbiol. Biotechnol**. 16: 313 - 315.

Noviana, L. and dan B. Raharjo. 2009. Viabilitas Rhizobakteri *Bacillus* sp. DUCC BR-K1.3 pada media pembawa tanah gambut Ddsubstitusi dengan padatan Llmbah cair industri rokok. **Bioma**. 11: 30 - 39.

Novo, M., G. Huttman and H. Diddens. 1996. Chemical instability of 5 - aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** 34: 143 - 148.

____, ____, H. Kanzaki, T. Nitoda and R. J. Ritchie. 2014. Effects of 5 - aminolevulinic acid (ALA) - containing supernatants from selected *Rhodopseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCI stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. Electron**. J. Biotechnol**. 17: 19 - 26.

Nunkaew, T, D. Kantachote, H. Kanzaki, T. Nitoda and R. J. Ritchie. 2014. Effects of 5 - aminolevulinic acid (ALA) - containing supernatants from selected *Rhodopseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCI stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. Electron**. J. Biotechnol**. 17: 19 - 26.

____, ____, T. Nitoda and H. Kanzaki. 2012. The use of rice straw broth as an appropriate medium to isolate purple nonsulfur bacteria from paddy fields. **Electron J Biotechnol**. 15. 1 -12.

Okada, H., T. Tanaka and T. Nomura. 2012. **Method for producing 5 - aminolevulinic acid hydrochloride**. U.S. Patents 8,148,574 B2.

Ouziad, F., P. Wilde, E. Schmelzer, U. Hildebrandt and H. Bothe. 2006. Analysis of expression of aquaporins and Na^+ /H^+ transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress. **Environ Exp. Bot.** 57: 177 - 186.

Pfaltz, A. and S. Anwar. 1984. Synthesis of α-aminoketones via selective reduction of acyl cyanides. **Tetrahedron Letters**. 25: 2977 - 2980.

Phung, T.H. and S. Jung. 2014. Perturbed porphyrin biosynthesis contributes to differential herbicidal symptoms in photodynamically stressed rice *(Oryza sativa)* treated with 5 - aminolevulinic acid and oxyfluorfen. **Pest. Biochem. Physiol.** 116: 103 - 110.

Rebeiz, C.A., A. Montazer-zouhoor, H.J. Hopen and S.M. WU. 1984. Photodynamic herbicide I. concept and phenomenology. **Enzyme Microb. Techno.** 6: 390 - 401.

____, J.A. Juvilc and C.C. Rebeiz. 1988. Photodynamic insecticides I. concept and phenomenology. **Pestic. Biochem. Physio.** 30: 11 - 27.

Rhee, H.I., K. Murata and A. Kimura. 1987. Formulation of the herbicide 5 - aminolevulinic acid form L - alanine and 4,5 dioxovalerate by *Pseudomonas riboflavin*. **Agric. Biol. Chem.** 51: 1701 - 1702.

Rosiana, F., T. Turmuktini, Y. Yuwariah, M. Arifin and dan T. Simarmata. 2013. Aplikasi kombinasi kompos jerami, kompos azolla dan pupuk hayati untuk meningkatkan jumlah populasi bakteri penambat nitrogen dan produktivitas tanaman padi berbasis Ipat-Bo. **Agrovigor**. 6: 16 - 22.

Roy, C.B. and M. Vivekanandan. 1998. Role of aminolevulinic acid in improveing biomass production in *Vigna catjung*, *V. mungo*, and *V. radiate*. **Biol. Plant**. 41: 211 - 215.

Russo, A., Y. Moenne-Loccoz, S. Fedi, P. Higgis, A. Fenton, D. N. Dowling, M. O'Reagen and F. O'Gara. 1996. Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 44: 546 - 549.

Saikeur, A., W. Choorit, P. Prasertsan, D. Kantachote and K. Sasaki. 2009. Influence of precursors and inhibitor on the production of extracellular 5 - aminolevulinic acid and biomas by *Rhodopseudomonas palustris*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 73: 987 - 992.

Sakai, A. and W. Larcher. 1987. **Frost Survival of Plants**. Eco-logical Studies 62.

Sasaki, K., M. Watanabe and N. Nishio. 1997. Inhibition of 5 - aminolevulinic acid (ALA) dehydratase by undissociated levulinic acid during ALA extracellular formation by Rhodobacter sphaeroides. **Biotech. Lett.** 19: 421 - 424.

____, ___, T. Tanaka and Y. Hotta. 1995. 5 - Aminolevu-linic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 11: 361 - 336.

____, ___, and ___. 2002. biosynthesis, Biotechnological production and applications of 5 aminolevulinic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 58: 23 - 29.

Sasikala, C. and C.V. Ramana. 1995. **Biotechnological Potential of Anoxygenic Phtototrophic Bacteria II. Biopolyester, Biopesticide, Biofuel and Biofertilizer**. Academic Press, New York.

____, ____, and P.R. Rao. 1994. 5 - Aminolevulinic acid : a potential herbicide/ insecticide from microorganism. **Biotechnol. Prog.** 10: 451 - 459.

Seiji, N. and Y. Murooka. 2001. 5 - Aminolevulinic acid : production by fermentation, and agricultural and biomedical applications. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev**. 18: 150 - 170.

Setiawati, M.R., S. Pujawati and H. Diyan. 2016. *Azolla pinnata* and litter plants compost as alternative materials for peat substitute carrier on solid biofertilizer formulations. **Academic J. Sci.** 06(1): 365 - 372.

Shemin, D. and C.S. Russell. 1953. δ - Aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. **J. Am. Chem. Soc**. 75: 4873 - 4874.

Shoji, K.A., N. Nishio and S. Nagai. 1989. Production of extracellular 5 - aminolevulinic acid by *Clostridium thermoaceticum* grown in minimal medium. **Biotechnol. Lett**. 11: 567 - 572.

Smith, R.S. 1992. Legume inoculant formulation and application. **Can. J. Microbiol.** 38: 485 - 492.

___. 1995. Inoculant formulations and applications to meet changing needs, pp. 653 - 657. In I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. I. Romanov and W. E. Newton, eds. **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**, Kluwer Academic, Dodrecht, The Netherlands.

Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1994. **Handbook for *Rhizobia*: Methods in Legume - *Rhizobium* Technology**. University of Hawaii, NifTAL Project. Edi. Springer-Verlag, USA.

Sumei, Y. and W. Weijin. 2004. Effects of 5 - aminolevulinic acid on grain filling and yield of the two line japonica hybrid rice. **J. Huazhong Univ.** 23: 495 - 499.

Sun, Y.P., J. Liu, R.X. Cao, Y.J. Huang, A.M. Hall and C.B. Guo. 2017. Effects of 5 - aminolevulinic acid treatment on photosynthesis of strawberry. **Photosynthetica** 55: 276 - 284.

Suriyagamon, S., P. Nutchanat, B. Wandee, R. Nuntavun and M. Wiyada. 2018. Compost seed of *Trichoderma harzianum* UD12-102 in controlling collar and stem rot of tomato caused by *Sclerotium rolfsii*. **Environ. Nat. Resour. J.** 16: 20 - 28.

Tanaka, T., K. Takahashi, T. Hotta, Y. Takeuchi and M. Konnai. 1992. Promotive effects of 5 - aminolevulinic acid on yield of several crops, pp. 237 - 241. In **Proceedings of the 19th Annual Meeting of Plant Growth Regulator Society of America**. Plant Growth Regulator Society of America, Washington DC.

Tangprasittipap, A. and P. Prasertsan. 2002. 5 - Aminolevulinic acid from photosynthetic the two line Japonica hybrid rice. **J. Huazhong Univ.** 23: 495 - 499.

Toyota, K. 2008. Suppressive mechanisms of used pumice to bacterial wilt of tomato and their application into biological control in hydroponic pumice culture, pp. 159 - 178. In L. Tian - xiao, ed. **Soil Ecology Research Developments**. Nova Science Publishers, Inc. New York

Van Elsas, J. D. and C. E. Heijnen. 1990. Methods for the introduction of bacteria into soil: A review. **Biol. Fertil. Soils** 10: 127 - 133.

Vassilev, N., M. Toro, M. Vassileva, R. Azcon and J. M. Barea. 1997. Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. **Biores. Technol.** 61: 29 - 32.

Vidhyasekaran, P. and M. Muthamilan. 1995. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. **Plant. Dis.** 79: 782 - 786.

Virgin, H.I. and B. McEwen. 1995. Effect of 5 - aminolevulinic acid on the pigment content of dark-grown hypocotyls of *Phaseolus vulgaris*. **Physiol. Plant**. 121:258 - 264.

Wang, L.J., W.B. Jiang and B.J. Huang. 2004. Promotion of 5 - aminolevulinic acid on photosynthesis of melon (*Cucumis melo*) seedlings under low light and chilling stress conditions. **Physiol. Plant.** 121: 258 - 264.

Watanabe, K., E. Nishihara, S. Watanabe, T. Tanaka, K. Takahashi and Y. Takeuchi. 2006. Enhancement of growth and fruit maturity in 2-year-old grapevines cv. Delaware by 5 - aminolevulinic acid. **Plant Growth Regul**. 49: 35 - 42.

Wu, Y., W. liao, M.M. Dawuda, L. Hu and J. Yu. 2018. 5 - Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review. **Plant growth regul.** 87: 357 - 374.

Wu, Z., L. Guo, S. Qin and C. Li. 2012. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 39: 317 - 327.

Xu, F., S. Y. Cheng, J. Zhu W. W. Zhang and Y. Wang. 2011. Effects of 5 - aminolevulinic acid on chlorophyll, photosynthesis, soluble sugar and flavonoids of ginkgo biloba**.** **Not. Bot. Hortic. Agrobo**. 39: 41 - 47.

____, W. Wang and D. Yu. 2012. Effect of 5 - aminolevulinic acid on yield and quality of lettuce in sunlit greenhouse. **Afr. J. Biotechnol**. 11: 11591 - 11594.

Xu, L., W. Zhang, B. Ali, F. Islam, J. Zhu and W. Zhou. 2015. Synergism of herbicide toxicity by 5-aminolevulinic acid is related to physiological and ultra - structural disorders in crickweed (*Malachium aquaticum* L.). **Pestic. Biochem. Phys**. 125: 53 - 61.

Yan, F., D. Qu, Y. Y. Zhao and X. H. Hu. 2014. Effects of exogenous 5 - aminolevulinic acid on PIP1 and NIP aquaporin gene expression in seedlings of cucumber cultivars subjected to salinity stress. **Genet. Mol. Res.** 13: 2563 - 2573.

Yang, M., K. Yin, Y. Guo, E. Ma and J. Zhang 2011. A photosensitivity insecticide, 5 aminolevulinic acid, exerts effective toxicity to Oxyachinensis (Orthoptera: Acridoidea) **Agri. Sci. China**. 10: 1056 - 1063.

Yang, Z., Z. Chang, L. Sun, J. Yu and B. Huang. 2014. Physiological and metabolic effects of 5 - aminolevulinic acid for mitigating salinity stress in creeping bentgrass. **PLoS ONE** 9: 1 - 25.

Zhang, Z.J., H.Z. Li, W. JZhou, Y. Takeuchi and K. Yoneyama 2006. Effect of 5 - aminolevulinic acid on development and salt tolerance of potato (*Solanam tuberosum* L.) microtubers *in vitro*. J. **Plant Growth Regul**. 49: 27 - 34.

Zhang, Z.P., M.M. Miao and C.L. Wang. 2015. Effects of ALA on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and gene expression, and regulation of proline accumulation in tomato seedlings under NaCl stress. **J. Plant Growth Regul**. 34: 637 - 650.

Zhao, Y.Y., F. Yan, L.P. Hu, X.T. Zhou, Z.R. Zou and L.R. Cui. 2015. Effects of exogenous 5 - aminolevulinic acid on photosynthesis, stomatal conductance, transpiration rate and PIP gene expression of tomato seedlings subject to salinity stress. **Gene. Mol. Res**. 14 : 6401 - 6412.

Zhen, A., Z.L. Bie, Y. Huang, Z.X. Liu and M.L. Fan. 2012. Effects of 5 - aminolevulinic acid on the H_2O_2 - content and antioxidative enzyme gene expression in NaCl - treated cucumber seedlings. **Biol. Plant**. 56: 566 - 570.

Zohar-Perez, C., L. Chernin, I. Chet and A. Nussinovitch. 2003. Structure of dried cellular alginate matrix containing fillers provides extra protection for microorganisms against UVC radiation. **J. Radiat. Res. (Tokyo)** 160: 198 - 204.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร King's B medium

Proteose peptone	20	กรัม
K_2HPO_4	1.5	กรัม
$MgSO_4$ $7H_2O$	1.5	กรัม
Glycerol	15	กรัม
H_2O	1000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สูตรอาหาร NB

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
H_2O	1000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การจำแนกแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก

1) การสกัดดีเอนเอของแบคทีเรีย โดยใช้ชุดสกัด Wizard Genomic DNA Purification มีขั้นตอนดังนี้

1.1) นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ แล้วนำแบคทีเรียปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube)

1.2) นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง

1.3) เติม Nuclei lysis solution 600 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.4) เติม RNase solution 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 - 60 นาที เติม Protein precipitation solution 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

1.5) ดูดส่วนใส ใส่หลอดใหม่แล้วเติม isopropanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสทิ้งล้างตะกอนด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Rehydration solution 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 16S rRNA ดวยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตรประกอบด้วยดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร dNTPs 0.25 มิลลิโมลาร์ (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 0.40 ไมโครลิตร, 1X buffer 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, 0.5 ไมโครโมลาร์ universal primer 16S rDNA (16S 9f: GAG TTT GAT CCT GGC TCA และ16S 1512 r: ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT) และ 2.5 unit Taq DNA Polymerase ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มต้น หรือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที annealing

ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ 5 ไมโครลิตร นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis บนอะกาโรสเจล (agarose gel) 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer และผลผลิตพีซีอาร์อีกส่วนนำวิเคราะห์ลำดับเบส

ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (log no. g^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

ตำรับการทดลอง	0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน	7 เดือน	8 เดือน	9 เดือน	10 เดือน	11 เดือน	12 เดือน
1	12.17 a	11.07 c	11.07 c	11.05 b	10.95 c	11.07 b	10.96 a	9.27 a	9.26 b	8.91 bc	8.93 a	7.88 c	7.85 c	7.87 c	7.83 a	7.75 a
2	11.24 c	10.32 d	10.42 d	10.33 c	10.25 d	9.21 c	8.97 c	7.93 b	8.23 c	7.83 d	7.13 d	6.83 d	6.76 d	6.73 d	5.71 e	6.65 c
3	11.79 b	11.78 b	11.95 b	11.91 a	11.80 b	9.83 d	9.71 b	9.20 a	9.19 b	9.14 ab	7.35 d	8.17 b	8.16 b	8.09 b	6.34 d	6.99 bc
4	12.16 a	11.09 b	11.11 c	11.14 b	11.09 c	11.33 a	11.00 a	8.83 a	8.92 b	8.94 bc	8.98 a	7.86 c	7.88 c	7.88 c	7.83 a	7.81 a
5	11.36 c	10.39 d	10.40 d	10.40 c	10.29 d	9.26 e	8.21 d	8.97 a	8.94 b	8.51 c	7.84 c	7.84 c	6.86 d	6.84 d	6.79 c	5.90 d
6	12.07 a	12.15 a	12.16 a	12.09 a	12.08 a	10.03 c	9.97 b	8.38 a	10.28 a	9.53 a	8.40 b	8.56 a	8.38 a	8.34 a	7.08 b	7.24 b
F test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	3.36	6.22	6.29	6.25	6.46	8.37	10.69	6.21	7.56	6.73	9.53	6.95	8.40	8.42	11.44	10.04

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg kg^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์รูปแบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

ตำรับการทดลอง	0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน	7 เดือน	8 เดือน	9 เดือน	10 เดือน	11 เดือน	12 เดือน
1	7.31	7.71 b	7.74 a	6.82 c	6.08 e	6.09 b	5.38 b	3.82 b	3.29 b	3.23 ab	3.05 b	3.01 b	2.96 b	2.89 b	1.83 b	2.08 a
2	7.77	8.08 a	7.65 a	7.33 a	6.78 b	4.22 d	3.18 f	3.04 f	2.93 d	2.91 cd	2.54 d	2.30 f	1.58 de	1.35 c	1.32 c	1.04 d
3	7.77	7.31 c	7.13 c	6.94 c	6.42 d	4.21 d	3.36 e	3.24 e	2.94 d	2.65 d	2.47 e	2.39 e	1.53 e	1.37 c	1.36 c	1.05 d
4	7.78	7.75 b	7.73 a	7.21 b	6.43 d	6.31 a	5.88 a	4.44 a	3.45 a	3.41 a	3.21 a	3.27 a	3.02 a	2.97 a	2.28 a	1.97 b
5	8.14	8.01 a	7.75 a	7.39 a	6.99 a	4.42 c	4.22 c	3.67 c	2.95 d	3.03 bc	2.91 c	2.55 d	1.68 c	1.32 c	1.38 c	1.10 c
6	7.93	7.61 b	7.32 b	6.85 c	6.56 c	4.48 c	3.54 d	3.34 d	3.05 c	2.67 d	2.58 d	2.63 c	1.63 cd	1.30 c	1.30 c	1.12 c
F test	ns	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	5.58	3.53	3.43	3.42	4.59	18.47	24.90	13.16	6.65	10.73	10.27	13.18	32.55	41.53	25.76	33.15

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT
ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (log no. g^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

ตำรับการทดลอง	0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน	7 เดือน	8 เดือน	9 เดือน	10 เดือน	11 เดือน	12 เดือน
1	10.09 e	9.05 d	9.38 b	9.21 b	8.13 b	7.85 b	7.48 b	7.34 bc	7.39 b	5.07 c	4.72 d	3.88 c	3.74 d	4.03 c	4.14 b	3.98 e
2	9.94 f	11.88 a	11.10 a	11.08 a	10.97 a	10.96 a	9.52 a	7.86 ab	7.78 ab	6.56 b	5.57 b	5.31 b	5.30 b	5.16 a	5.22 a	5.03 d
3	11.23 a	10.93 b	11.09 a	11.10 a	10.95 a	10.94 a	8.86 a	7.79 ab	7.78 ab	6.59 b	5.56 b	5.51 b	5.43 ab	5.39 a	5.30 a	5.20 cd
4	10.27 d	9.91 c	9.62 b	8.34 c	7.66 c	7.61 b	7.46 b	7.23 c	7.53 c	6.47 b	5.96 a	6.08 a	5.03 c	4.81 b	5.22 a	5.22 bc
5	11.04 c	12.19 a	11.19 a	11.11 a	11.00 a	10.94 a	8.92 a	7.89 ab	7.86 ab	7.26 a	5.60 b	5.37 b	5.50 a	5.16 a	5.19 a	5.17 cd
6	11.24 a	11.15 b	11.10 a	11.06 a	10.96 a	10.95 a	8.89 a	7.91 ab	7.89 ab	6.65 b	5.58 b	5.49 b	5.51 a	5.24 a	5.33 a	5.41 a
7	10.30 d	9.36 d	9.55 b	9.12 b	8.08 bc	8.05 b	7.94 b	8.24 a	8.26 a	5.02 c	5.06 c	4.23 c	3.74 d	3.88 c	3.95 c	3.93 e
8	11.26 a	11.99 a	11.09 a	11.09 a	11.06 a	10.67 a	9.52 a	7.83 ab	7.79 ab	6.64 b	5.54 b	5.35 b	5.40 ab	5.20 a	5.29 a	5.19 cd
9	11.14 b	12.06 a	11.05 a	11.06 a	11.04 a	10.65 a	9.17 a	8.13 a	8.07 a	6.59 b	5.53 b	5.41 b	5.43 ab	5.25 a	5.19 a	5.38 ab
F test	**	**	**	**	**	**	**	*	*	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	4.99	10.84	7.51	10.73	14.84	15.10	9.68	5.21	4.23	11.85	6.91	13.27	14.11	11.38	10.43	11.24

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็น
** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 4 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg kg^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

ตำรับการทดลอง	0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน	7 เดือน	8 เดือน	9 เดือน	10 เดือน	11 เดือน	12 เดือน
1	7.69 d	6.99 e	6.34 c	6.39 a	5.39 bcd	5.41 a	3.41 ab	2.90 a	2.33 c	2.49 b	2.46 a	2.37 cd	2.27 b	1.09 d	0.83 c	0.53 c
2	10.11 a	8.90 b	7.51 a	6.14 ab	5.10 cd	3.83 cd	2.79 c	2.51 d	2.37 c	2.31 e	2.28 c	2.36 d	2.02 e	1.29 c	1.26 b	1.02 b
3	7.80 d	8.15 d	7.13 b	6.10 b	4.88 d	3.80 de	2.79 c	2.53 cd	2.35 c	2.32 d	2.29 c	2.35 d	2.12 d	1.29 c	1.28 ab	1.02 b
4	7.24 e	6.97 e	6.16 c	6.11 b	5.97 a	5.34 ab	3.32 b	2.64 b	3.52 a	2.54 a	2.50 a	2.41 bc	2.35 a	1.09 d	0.81 c	0.27 d
5	8.30 e	11.04 a	7.19 b	6.24 ab	5.44 bcd	3.91 c	2.83 c	2.61 b	2.44 c	2.39 c	2.27 c	2.35 d	2.03 e	1.28 c	1.26 ab	1.01 b
6	8.80 b	8.38 cd	7.12 b	6.15 ab	5.13 cd	3.90 c	2.83 c	2.61 b	2.39 c	2.37 c	2.30 c	2.44 b	2.12 d	1.29 c	1.27 ab	1.02 b
7	7.05 e	7.16 e	6.26 c	6.31 ab	5.54 bc	5.27 b	3.59 a	2.56 c	2.87 b	2.47 b	2.38 b	2.39 cd	2.34 a	1.09 d	0.81 c	0.35 cd
8	8.04 cd	8.02 d	7.21 b	6.36 ab	5.66 ab	3.73 e	2.83 c	2.61 b	2.38 c	2.31 e	2.27 c	2.61 a	2.17 cd	1.45 b	1.28 ab	1.27 a
9	7.86 d	8.73 bc	7.02 b	5.44 c	5.25 cd	3.74 e	2.83 c	2.63 b	2.43 c	2.34 de	2.30 c	2.45 b	2.18 c	1.55 a	1.30 a	1.18 ab
F test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	11.11	14.98	7.15	4.83	6.68	17.03	10.96	4.16	14.92	3.53	3.80	3.37	5.49	12.88	19.66	43.37

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (log no. g^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

ตำรับการทดลอง	0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน	7 เดือน	8 เดือน	9 เดือน	10 เดือน	11 เดือน	12 เดือน
1	10.14 b	9.16 d	9.08 b	9.07 b	8.35 b	7.96 c	8.26 b	7.95	7.23	6.22 b	6.25 a	6.26 a	5.10 c	5.19 b	6.64	5.12
2	9.93 c	12.11 a	11.18 a	11.21 a	10.39 a	10.07 b	9.94 a	7.91	8.19	7.73 a	5.61 b	5.44 b	5.47 a	5.39 a	5.29	7.20
3	11.25 a	12.13 a	11.21 a	11.15 a	10.98 a	10.05 b	9.88 a	7.84	7.80	7.63 a	5.60 b	5.44 b	5.49 a	5.46 a	5.36	5.34
4	9.75 d	8.94 e	8.81 b	9.36 b	7.66 b	8.29 c	7.85 b	7.39	7.62	5.03 c	4.81 c	3.74 c	3.69 d	4.27 c	4.21	4.06
5	9.94 c	11.03 c	11.11 a	11.11 a	10.94 a	10.94 a	9.23 a	8.22	8.14	6.22 b	5.56 b	5.49 b	5.28 b	5.44 a	5.29	5.15
6	9.08 e	12.02 b	11.06 a	11.11 a	10.97 a	10.94 a	9.51 a	8.19	8.20	5.94 b	5.53 b	5.50 b	5.38 ab	5.41 a	5.29	5.31
F test	**	**	**	**	**	**	**	ns	ns	**	**	**	**	**	ns	ns
CV (%)	6.65	12.83	10.39	9.29	14.38	12.81	9.88	6.23	6.62	15.71	7.78	14.78	12.80	8.57	19.58	27.86

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 6 ปริมาณกรด 5 - อะมิโนลีวูลินิก (mg kg^{-1}) ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้วัสดุอนินทรีย์เป็นวัสดุรองรับที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน

ตำรับการทดลอง	0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน	7 เดือน	8 เดือน	9 เดือน	10 เดือน	11 เดือน	12 เดือน
1	6.98 e	6.48 d	6.37 b	5.25 b	5.26 a	5.25 b	3.34 b	3.29 a	3.24 a	2.58 a	2.46 a	2.38 b	2.28 a	1.09 c	0.99 b	0.73 b
2	8.04 c	8.43 b	6.70 a	5.32 ab	4.62 c	3.13 d	2.79 c	2.57 c	2.42 c	2.31 b	2.28 c	2.34 bc	2.06 b	1.43 a	1.25 a	1.02 a
3	7.55 d	7.62 c	6.58 ab	5.29 ab	4.30 d	3.15 d	2.79 c	2.53 c	2.37 d	2.31 b	2.30 b	2.29 c	2.08 b	1.47 a	1.27 a	0.98 a
4	7.92 c	6.74 d	6.44 b	5.45 ab	5.41 a	5.45 a	4.19 a	2.87 b	2.89 b	2.54 a	2.47 a	2.34 bc	2.27 a	1.09 c	0.86 c	0.55 c
5	10.89 a	8.90 a	6.52 ab	5.33 ab	4.86 b	3.65 c	2.74 c	2.57 c	2.42 c	2.33 b	2.27 d	2.43 a	2.03 b	1.30 a	1.24 a	1.04 a
6	10.12 b	7.88 c	6.57 ab	5.59 a	4.60 c	3.63 c	2.74 c	2.57 c	2.41 c	2.31 b	2.28 c	2.36 b	2.10 b	1.32 a	1.22 a	1.04 a
F test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	17.03	11.71	2.11	3.48	8.40	24.18	17.68	10.24	12.88	5.07	3.84	2.17	5.06	12.27	14.05	22.28

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีการ DMRT

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 7 ระดับความรุนแรงของความเป็นกรดเป็นด่างของดิน (pH, ดิน : น้ำ = 1:1)

ระดับ	ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดิน
เป็นกรดรุนแรงมากที่สุด	< 3.5
เป็นกรดรุนแรงมาก	3.5-4.5
เป็นกรดจัดมาก	4.6-5.0
เป็นกรดจัด	5.1-5.5
เป็นกรดปานกลาง	5.6-6.0
เป็นกรดเล็กน้อย	6.1-6.5
เป็นกลาง	6.6-7.3
เป็นด่างเล็กน้อย	7.4-7.8
เป็นด่างปานกลาง	7.9-8.4
เป็นด่างจัด	8.5-9.0
เป็นด่างจัดมาก	> 9.0

ที่มา : สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน (2547)

ตารางภาคผนวกที่ 8 ระดับอินทรียวัตถุในดิน (soil organic matter)

ระดับ	อินทรียวัตถุ (%)
ต่ำมาก	< 0.5
ต่ำ	0.5-1.0
ค่อนข้างต่ำ	1.0-1.5
ปานกลาง	1.5-2.5
ค่อนข้างสูง	2.5-3.5
สูง	3.5-4.5
สูงมาก	> 4.5

ที่มา : สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน (2547)

ตารางภาคผนวกที่ 9 ระดับธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน

ธาตุอาหาร	ระดับความเป็นประโยชน์ต่อพืช (มล./กก.)				
	ต่ำมาก	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	สูงมาก
ฟอสฟอรัส (P)	< 3	3-10	11-15	16-45	> 45
โพแทสเซียม (K)	< 30	30-60	61-90	91-120	> 120
แคลเซียม (Ca)	< 400	400-1000	101-200	2001-4000	> 4000
แมกนีเซียม (Mg)	< 36	36-120	121-365	366-975	> 975
กำมะถัน (S)	< 5	5-10	11-20	21-30	> 30

ที่มา : สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน (2547)

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของข้าวแต่ละตำรับการทดลอง

รายการ	ตำรับการทดลอง					
	1	2	3	4	5	6
1.ค่าแรงงาน (บาท/ไร่)						
- ไถดะ ไถแปร และคราด	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500
- ปลูกข้าวปักดำ	300	300	300	300	300	300
- ใส่ปุ๋ยและผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์	100	100	100	100	100	100
- เก็บเกี่ยว (ใช้รถ)	550	550	550	550	550	550
2. ค่าวัสดุ (บาท/ไร่)						
- เมล็ดพันธุ์ข้าว	140	140	140	140	140	140
- ปุ๋ยเคมี สูตร 18 - 46 - 0	-	80	80	-	-	40
- ปุ๋ยเคมี สูตร 46 - 0 - 0	-	653	653	-	-	326.5
- ปุ๋ยเคมี สูตร 0 - 0 - 60	-	132	132	-	-	66
- รำข้าว	-	-	-	30	30	30
- ปูนโดโลไมท์	-	-	304	-	304	304
รวมต้นทุน (บาท/ไร่)	2,590	3,455	3,759	2,620	2,924	3,356.5
ผลผลิต (ตัน/ไร่)	935	1,285	780	981	941	1,099
รายได้ (บาท/ไร่)	6,545	8,995	5,460	6,867	6,587	7,693
รายได้สุทธิ (บาท/ไร่) ไม่คิดค่าปุ๋ยหมัก	3,955	5,540	1,701	4,247	3,663	4,336.5

หมายเหตุ : - ค่าแรง 300 บาทต่อคนต่อวัน

- ราคาปุ๋ยเคมี สูตร 18 - 46 - 0 เท่ากับ 11,398 บาทต่อตัน (ตำรับที่ 2 ใช้ 7 กิโลกรัมต่อไร่ ตำรับที่ 3 5 และ 6 ใช้ 3.5 กิโลกรัมต่อไร่)
- ราคาปุ๋ยเคมี สูตร 46 - 0 - 0เท่ากับ 16,330 บาทต่อตัน (ตำรับที่ 2 ใช้ 40 กิโลกรัมต่อไร่ ตำรับที่ 3 5 และ 6 ใช้ 20 กิโลกรัมต่อไร่)
- ราคาปุ๋ยเคมี สูตร 0 - 0 - 60 เท่ากับ 13,200 บาทต่อตัน (ตำรับที่ 2 ใช้ 10 กิโลกรัมต่อไร่ ตำรับที่ 3 5 และ 6 ใช้ 5 กิโลกรัมต่อไร่)
- ราคารำ 10 บาทต่อกิโลกรัม (ใช้ 3 กิโลกรัมต่อไร่)
- ราคาเมล็ดพันธุ์ 20 บาทต่อกิโลกรัม (ใช้อัตรา 7 กิโลกรัมต่อไร่)
- ราคาข้าวเปลือกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 7 บาทต่อกิโลกรัม (ใช้ 20 กิโลกรัมต่อไร่)
- ปูนโดโลไมท์ 2 บาทต่อกิโลกรัม (ใช้ 156 กิโลกรัมต่อไร่)