รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตปุ๋ยชีวภาพจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในรูปแบบของแข็งเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในนาข้าวดินเค็ม

Production of biofertilizer from photosynthetic bacteria in a solid form to enhance rice growth in saline paddy field

คณะนักวิจัย

รศ. ดร. ดวงพร คันธโชติ

ดร. ธนวันต์ กันทา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ปี 2555 และ 2556
รหัสโครงการ SCI550313S
กันยายน 2557

สารบัญ

สารบัญ	**หน้า**
สารบัญตาราง	II
สารบัญรูป	III
กิตติกรรมประกาศ	VI
บทคัดย่อภาษาไทย	VII
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	VIII
บทที่ 1	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	2
บทที่ 2	
การทดลอง	7
บทที่ 3	
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	14
บทที่ 4	
สรุปผลการทดลอง	67
ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	67
เอกสารอ้างอิง	68
การเผยแพร่ผลงาน	72

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. จำนวนการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการวางแผนแบบ Central Composite Design	8
2. ค่าความเป็นกรดด่างของการผสมตัวช่วยพยุงในอัตราส่วนต่างๆ โดยใช้ Central Composite Design	19
3. การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปัจจัยที่มีผลต่อค่า pH	20
4. ปริมาณการอยู่รอดของกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในรูปของแข็งร่วน	40
5. ค่าความเป็นกรดด่างของกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในรูปของแข็งร่วน	41
6. ค่าการนำไฟฟ้าของกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในรูปของแข็งร่วน	41
7. ค่าการลดลงของความชื้นของกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในรูปของแข็งร่วน	42
8. ผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ระดับการเจือจางต่างๆต่อดัชนีการงอกของเมล็ดข้าว	44
9. ผลการเปรียบเทียบปริมาณการผลิต ALA ในวันที่ให้ปริมาณสูงสุดของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ โดยวิธี colorimetric และ HPLC	49
10. ความสามารถในการลดปริมาณการปล่อยก๊าซมีเทน (CH_4) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ของกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	52
11. ผลของปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแต่ละสายพันธุ์ต่อความสูงของข้าวหอมมะลิ	54
12. ผลของปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแต่ละสายพันธุ์ต่อการเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิ	54
13. การเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตของการทำนาข้าวอินทรีย์ใน 1 ฤดูกาล	56
14. ผลของปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 3 สายพันธุ์ได้แก่ TK103, PP803 และ TN114 ต่อความสูงของข้าวพันธุ์ กข 41	60
15. ผลของปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียสังเคราะห์แสง 3 สายพันธุ์ได้แก่ TK103, PP803 และ TN114 ต่อการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ กข 41	60
16. การเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตของการทำนาข้าวดินเค็มใน 1 ฤดูกาล	61

สารบัญรูป

รูป	หน้า
1. ปริมาณการอยู่รอดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเมื่อเลี้ยงในตัวช่วยพยุง 5 ชนิด ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง	15
2. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง	16
3. ค่าการนำไฟฟ้า (EC) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ภายใต้สภาวะไร้แสง	17
4. ค่าการลดลงของความชื้นของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง	18
5 ปริมาณฟางข้าวและแกลบดำที่มีผลต่อค่า pH วิเคราะห์โดยใช้ Contour plot และ 3D plot	21
6. ค่าความเป็นกรดด่างของตัวช่วยพยุง 2 ชนิดที่ผสมกันที่อัตราส่วนต่างๆ ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง	21
7. เปอร์เซ็นต์การลดลงของความชื้นตัวช่วยพยุง 2 ชนิดที่ผสมกันที่อัตราส่วนต่างๆภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง	22
8. ค่า pH ของตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าว และแกลบดำ ผสมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ปรับความชื้นต่างกัน	24
9. ค่า EC ของตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าว และแกลบดำ ผสมกับเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ปรับความชื้นต่างกัน	25
10. ปริมาณการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ผสมกับตัวช่วยพยุงฟางข้าว และแกลบดำที่ปรับความชื้นต่างกัน	27
11. การลดลงของความชื้นของตัวช่วยพยุงที่ผสมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ระดับความชื้นต่างกัน	28
12. ค่า pH ของตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าว และแกลบดำ ผสมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดยใช้สารปรับความชื้นต่างๆ	30
13. ค่า EC ของตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าว และแกลบดำ ผสมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง แต่ละสายพันธุ์ โดยใช้สารปรับความชื้นต่างๆ	31
14. ปริมาณการอยู่รอดของตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าว และแกลบดำ ผสมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้สารปรับความชื้นต่างๆ	33
15. การลดลงของความชื้นของตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าว และแกลบดำ ผสมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดยใช้สารปรับความชื้นต่างๆ	34
16. ค่า pH ของตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าวและแกลบดำผสมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างกัน (cfu/g) ซึ่งปรับความชื้นเป็น 40% ด้วยน้ำมะพร้าวเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ	36

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป	หน้า
17. ค่า EC ของตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าวและแกลบดำผสมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างกัน (cfu/g) ซึ่งปรับความชื้นเป็น 40% ด้วยน้ำมะพร้าวเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ	37
18. ปริมาณการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างกัน (cfu/g) ซึ่งปรับความชื้นเป็น 40% ด้วยน้ำมะพร้าวในตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าวและแกลบดำ	38
19. การลดลงของความชื้นของตัวช่วยพยุงที่ผสมกันระหว่างฟางข้าวและแกลบดำผสมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ที่มีเชื้อปริมาณเริ่มต้นต่างกัน (cfu/g) ซึ่งปรับความชื้นเป็น 40% ด้วยน้ำมะพร้าว	39
20. ปริมาณของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ที่เจือจางตามความเข้มข้นต่างๆ	43
21. ความสูงของต้นข้าวอายุ 1 เดือนภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม	45
22. ความยาวรากของต้นข้าวอายุ 1 เดือนภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม	45
23. น้ำหนักสดของลำต้นของต้นข้าวอายุ 1 เดือนภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม	46
24. น้ำหนักแห้งของลำต้นของต้นข้าวอายุ 1 เดือนภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม	46
25. น้ำหนักสดของรากของต้นข้าวอายุ 1 เดือนภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม	47
26. น้ำหนักแห้งของรากของต้นข้าวอายุ 1 เดือนภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม	47
27. ความสามารถของกล้าเชื้อในการผลิตสาร ALA โดยใช้วิธี colorimetric	49
28. ปริมาณการเจริญของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ของการทดสอบความสามารถในการผลิต ALA	50
29. การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ในการทดสอบความสามารถในการผลิต ALA	51
30. การเจริญเติบโตของต้นข้าวอินทรีย์ ณ พื้นที่ทำนาอินทรีย์ ต.ริมใต้ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่	55
31. อัตราการปลดปล่อยก๊าซมีเทนระหว่างการเพาะปลูกข้าว 1 รอบ	57
32. ปริมาณก๊าซมีเทนทั้งหมดที่ถูกปลดปล่อยตลอดฤดูเพาะปลูกข้าว 1 รอบ	58
33. การเปลี่ยนแปลงของ PNSB ในนาข้าวอินทรีย์ระหว่างการเพาะปลูก	58

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป	หน้า
34. อัตราการปลดปล่อยก๊าซมีเทนระหว่างฤดูเพาะปลูกพื้นที่ทดลอง อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา	63
35. ปริมาณก๊าซมีเทนทั้งหมดที่ถูกปลดปล่อยตลอดฤดูเพาะปลูกพื้นที่ทดลอง อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา	63
36. การเปลี่ยนแปลงของ PNSB ในนาข้าวอินทรีย์ระหว่างการเพาะปลูกพื้นที่ทดลอง อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา	64

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณแพทย์หญิง เพชรา หล่อวิทยา เจ้าของนาอินทรีย์ที่ ต. ริมใต้ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ และคุณเอี้ยน บุญเผือกเจ้าของนาดินเค็มที่ ต. ตะเครียะ อ. ระโนด จ. สงขลา เป็นอย่างยิ่งที่ได้อนุญาติให้ใช้ที่นาเพื่อการวิจัยนี้ ตลอดจนอำนวยความสะดวกให้เป็นอย่างดีจึงทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและหน่วยงานต่างๆภายในมหาวิทยาลัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์เพื่อการศึกษาวิจัย เช่น หน่วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และที่สำคัญยิ่งคือแหล่งทุนสำหรับนักวิจัยหลังปริญญาเอกของนางสาว ธนวันต์ กันทา จากคณะวิทยาศาสตร์ และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รวมทั้งแหล่งทุนอุดหนุนการวิจัยเงินรายได้ประจำปี 2555 และ 2556 (SCI550313S) ที่สนับสนุนเงินอุดหนุนงานวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่มีส่วนช่วยเสนอแนะเพื่อทำให้งานวิจัยมีคุณภาพ และขอขอบคุณบุคลากรสายสนับสนุนที่คอยอำนวยความสะดวกทั้งของภาควิชา คณะวิทยาศาสตร์ และสำนักวิจัยและพัฒนา

ดวงพร คันธโชติ

(หัวหน้าโครงการวิจัย)

บทคัดย่อ

ความไม่เป็นพิษต่อพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากในการเลือกใช้ปุ๋ยชีวภาพ รวมทั้งวัสดุพยุงที่ใช้ต้องสามารถรักษาประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพได้ดีจนกว่านำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นวัสดุพยุงซึ่งผสมระหว่างฟางข้าวและแกลบดำในอัตราส่วน 4:1 ถูกนำมาใช้เป็นวัสดุพยุงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีศักยภาพเป็นปุ๋ยชีวภาพ *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ TK103 PP803 และ P1 โดยตรวจสอบความเป็นปุ๋ยชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของข้าว โดยใช้เมล็ดข้าวสายพันธุ์ที่ไวต่อความเค็มมาวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อพืช และประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตในสภาวะความเครียดจากความเค็มที่ระดับ 0.25% NaCl การผลิตสาร 5-aminolevulinic acid (ALA) และความสามารถต่อการลดก๊าซเรือนกระจก (CH_4 และ CO_2) จากผลการทดลองพบว่าปุ๋ยชีวภาพทุกชุดการทดลองไม่มีความเป็นพิษต่อพืชเมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสมซึ่งแสดงด้วยค่าดัชนีการงอก (germination index: GI) ในช่วง 105-117% แม้ว่าชุดควบคุมที่มีเฉพาะวัสดุพยุงมีค่าดัชนีการงอกเพียง 94% ก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น จากกลุ่มปุ๋ยชีวภาพที่ทดลองทั้งหมดพบว่าปุ๋ยชีวภาพที่มีสายพันธุ์ PP803 เป็นชุดที่ดีที่สุดสำหรับการกระตุ้นการเจริญของต้นกล้าข้าวในดินเค็ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อความสูงและความยาวรากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมวัสดุพยุงและน้ำกลั่น ส่วนการศึกษาในนาข้าวจำลองภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง เป็นเวลา 10 วัน พบว่าปุ๋ยชีวภาพที่ระดับปริมาณเหมาะสมมีแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีชีวิตในช่วง 6.7-6.8 log cfu/ml และสายพันธุ์ PP803 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิต ALA ได้ 2.61 μM และสามารถลดการปลดปล่อย CH_4 และ CO_2 ได้ 100% และ 47% ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำไปตรวจสอบความเป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว โดยพิจารณาผลในการเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าว (พันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข 41 สำหรับนาข้าวอินทรีย์และนาข้าวดินเค็ม ตามลำดับ) และผลต่อการลดการปลดปล่อย CH_4 โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดสอบ (ปุ๋ยชีวภาพ 3 ชุด และปุ๋ยอินทรีย์ 1 ชุด) และ 2 ชุดควบคุม (ชุดควบคุมวัสดุพยุง : วัสดุพยุงซึ่งไม่มีปุ๋ยชีวภาพ และชุดควบคุมน้ำ : ไม่มีวัสดุพยุงและไม่มีปุ๋ย) พบว่าชุดการทดสอบต่างๆมีผลต่อการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยผลผลิตข้าวหอมมะลิสามารถเรียงลำดับได้ดังนี้ TN114 (นำมาใช้แทน P1) > ปุ๋ยอินทรีย์ > TK103 ~ PP803 > ชุดควบคุมวัสดุพยุง > ชุดควบคุมน้ำ ขณะที่ผลผลิตของข้าวพันธุ์ กข 41 มีลำดับคือ PP803 > TK103 ~ TN114 > ปุ๋ยอินทรีย์ > ชุดควบคุมวัสดุพยุง ~ ชุดควบคุมน้ำ สำหรับผลในการลดการปลดปล่อยก๊าซ CH_4 ซึ่งคำนวณจากการปลดปล่อยก๊าซ CH_4 ปริมาณทั้งหมด (kg/ha) ในหนึ่งรอบการเพาะปลูกในนาอินทรีย์สามารถเรียงลำดับได้ดังนี้ ปุ๋ยอินทรีย์ > ชุดควบคุมวัสดุพยุง > ชุดควบคุมน้ำ > TK103 > TN114 > PP803 ขณะที่การปลดปล่อยก๊าซ CH_4 ในนาข้าวดินเค็มสามารถเรียงลำดับได้ดังนี้ ปุ๋ยอินทรีย์> ชุดควบคุมทั้งสอง ~ TN114 > TK103 > PP803 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าปุ๋ยชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีสายพันธุ์ PP803 มีประสิทธิภาพสูงต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นข้าวในดินเค็มและลดการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกได้ดีที่สุดทั้งในนาข้าวอินทรีย์และนาดินเค็ม

คำสำคัญ : กรด 5-aminolevulinic ปุ๋ยชีวภาพ การปลดปล่อยก๊าซมีเทน ข้าว ดินเค็ม *Rhodopseudomonas palustris*

ABSTRACT

No phytotoxicity is one of the most important criterions for the use of biofertilizers and their carriers must be able to efficiently maintain their activity until used. Hence, a carrier that consisted of a mixture of rice straw and rice husk ash in a ratio 4: 1 with potential biofertilizers (*Rhodopseudomonas palustris* TK103, PP803 and P1) were investigated for the growth of rice. A sensitive rice seed germination assay was used to test phytotoxicity and investigations were also made on the efficacy of the biofertilizers to ameliorate rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*) growth under salt stress produced by 0.25% NaCl, to produce 5-aminolevulinic acid (ALA) and to reduce global warming gas emissions (CH_4 and CO_2). No phytotoxicity was found under optimal concentrations of any of the biofertilizers tested as the germination index (GI) was in the range of 105-117% although the carrier had a 94% GI when compared with distilled water. Among the biofertilizers tested, strain PP803 was the best to ameliorate rice seedlings growth in soil under salt stress, particularly on plant height and root length when compared with carrier and water controls. In a paddy field model study using microaerobic light conditions for 10 days, and optimal concentrations of biofertilizers provided viable cells in the range of 6.7-6.8 log cfu/ml and strain PP803 was the most effective fertilizer to produce maximum ALA (2.61 µM) and reduce 100% CH_4 and 47% CO_2 emissions. Hence, these biofertilizers were further investigated for their abilities to enhance the growth of rice (Jasmine 105 and GoKo: กข 41 for organic and saline paddy fields) and to reduce CH_4 emissions. There were 4 treatments (3 biofertilizers and 1 organic fertilizer) and 2 controls (carrier without addition of biofertilizer: carrier and no fertilizer: water). The Jusmine grain rice yield significantly increased in the order of TN114 (P1 was replaced by TN114) > organic fertilizer > TK103 ~ PP803 > carrier control > control. However, the grain rice yield of GoKo 41 was in the degree of PP803 > TK103 ~ TN114 > organic fertilizer > carrier control ~ control. CH_4 emission based on total CH_4 flux (kg/ha) in one crop rice cycle of organic paddy fields was in the order of organic fertilizer > carrier control > control > TK103 > TN114 > PP803. CH_4 emission in saline paddy fields was in the degree of organic fertilizer > both controls ~ TN114 > TK103 > PP803. It can be conclude that among biofertilizers tested, the strain PP803 could be powerful agents to ameliorate growth of rice in saline soil and to enhance rice yield, and with the best biofertilizer to reduce greenhouse gases emissions in both non saline and saline paddy fields.

Keywords: 5-aminolevulinic acid, biofertilizer, methane emissions, rice, *Rhodopseudomonas palustris*, saline soil