

ผลของแบคทีเรียกลุ่มตรึงก๊าซไนโตรเจนแบบอิสระต่อการเจริญเติบโตของ
ต้นกล้าโกงกางใบใหญ่

Effects of Non-Symbiotic Nitrogen Fixing Bacteria on Growth of Red Mangrove, *Rhizophora mucronata* Lam., Seedlings

สุบัตติต นิมรัตน์^{1*} สุพรรณณี ช่อนกลิ่น¹ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย¹

Subuntith Nimrat^{1*} Supanee Sonklin¹ and Verapong Vuthiphandchai¹

Received: May 26, 2020; Revised: September 17, 2020; Accepted: September 18, 2020

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียตรึงก๊าซไนโตรเจนที่เจริญแบบอิสระต่อคุณสมบัติของดินและการเจริญเติบโตของต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ 1) ชุดควบคุม (ไม่เติมแบคทีเรีย) 2) เติม *Bacillus* sp. SN1 3) เติม *Bacillus* sp. SN2 และ 4) เติมแบคทีเรียผสม SN1+SN2+SN3 จากการเพาะต้นกล้านาน 37 วัน พบว่าการเติม *Bacillus* sp. SN1 และ *Bacillus* sp. SN2 และแบคทีเรียผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 ช่วยเพิ่มความสูงและน้ำหนักต้นกล้าโกงกางใบใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ปริมาณแอมโมเนียมในดินของชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* sp. SN1 มีค่าสูงที่สุด (1.55 ± 0.02 พีพีเอ็ม) รองลงมาคือ *Bacillus* sp. SN2 และ *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 โดยมีค่าเท่ากับ 0.93 ± 0.008 และ 0.45 ± 0.000 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ในขณะที่ดินในชุดควบคุมไม่พบแอมโมเนียมเลย ปริมาณฟอสฟอรัสในดินของชุดที่เติม *Bacillus* sp. SN2 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 1.04 ± 0.110 พีพีเอ็ม ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม (0.99 ± 0.005 พีพีเอ็ม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การเติมแบคทีเรียทั้ง 3 รูปแบบ ไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินที่ใช้เพาะต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ การศึกษานี้สรุปได้ว่า *Bacillus* sp. SN1, *Bacillus* sp. SN2 และแบคทีเรียผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 มีศักยภาพในการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืชป่าชายเลน และลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

คำสำคัญ : โกงกางใบใหญ่; ไนโตรเจน; ฟอสฟอรัส; แบคทีเรีย; บาซิลลัส

¹ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

¹ Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri

* Corresponding Author E - mail Address: subunti@buu.ac.th

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of non-symbiotic nitrogen fixing bacteria on soil properties and growth of red mangrove (*Rhizophora mucronata*) seedlings. The experiment was divided into 4 treatments: 1) control (no bacterial inoculation), 2) addition of *Bacillus* sp. SN1, 3) addition of *Bacillus* sp. SN2, and 4) addition of a mixture of *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3. After planting seeds for 37 days, the addition of *Bacillus* sp. SN1, *Bacillus* sp. SN2 or mixed inoculum of *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 significantly ($P < 0.05$) increased length and weight of seedlings. Additionally, the highest ammonium concentration was observed in *Bacillus* sp. SN1-treated soil (1.55 ± 0.02 ppm), followed by soil treated with *Bacillus* sp. SN2 (0.93 ± 0.008 ppm) and *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 (0.45 ± 0.000 ppm), respectively while no ammonium was detected in the control. Concentration of available phosphorus in *Bacillus* sp. SN2-treated soil was 1.04 ± 0.110 ppm, which was significantly ($P < 0.05$) higher than that of the control (0.99 ± 0.005 ppm). Addition of the three forms of nitrogen-fixing *Bacillus* had no effects on pH and organic matter in the soil. In conclusion, *Bacillus* sp. SN1, *Bacillus* sp. SN2 and a mixture of *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 had the potential use as biofertilizer to promote the growth of mangrove-tree seedlings and reduce the use of chemical NP fertilizers.

Keywords: *Rhizophora mucronata*; Nitrogen; Phosphorus; Bacteria; *Bacillus*

บทนำ

ป่าชายเลนเป็นสังคมพืชที่ประกอบด้วยพันธุ์ไม้หลายชนิดหลายสกุล เป็นพืชที่มีใบเขียวตลอดทั้งปี พบได้ทั่วไปตามพื้นที่ชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ อ่าว ทะเลสาบและเกาะ ที่มีลักษณะน้ำทะเลท่วมถึงในช่วงที่น้ำทะเลขึ้นสูงสุดในประเทศต่าง ๆ แถบเขตร้อนในทวีปเอเชีย อเมริกาใต้และแอฟริกา เช่น อินโดนีเซีย มาเลเซีย อินเดีย ไทย บราซิล ไนจีเรีย เป็นต้น [1] พื้นที่ป่าชายเลนในประเทศไทยอยู่กระจัดกระจายตามชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ภาคกลางและภาคใต้ รวม 23 จังหวัด เมื่อปี พ.ศ. 2539 ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าชายเลนทั้งสิ้น 1,047,390 ไร่ [2] พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทยประกอบด้วยพันธุ์ไม้ 168 ชนิด โดยพันธุ์ไม้ป่าชายเลนที่เป็นพันธุ์ไม้หลักส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ไม้โกงกาง (*Rhizophoraceae*) จำนวน 10 ชนิด ที่อยู่ในสกุลไม้โกงกาง ไม้พังกาหัวสุม ไม้โปรงและไม้รังกะแทะ และวงศ์เหิงอกปลาหมอ (*Acanthaceae*) จำนวน 6 ชนิด รวมทั้งวงศ์ไม้ตะแบก (*Lythraceae*) [3]

โกงกางใบใหญ่เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่มีความสูงประมาณ 20 - 30 เมตร พบทั่วไปตามริมคลอง แม่น้ำและชายฝั่งทะเลที่มีน้ำเค็มท่วมถึง ไม้โกงกางได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน อาทิเช่น การใช้ทำฟืนและถ่านที่ให้ความร้อนสูง เสาค้ำยัน เปลือกของไม้โกงกางนำมาสกัดสารแทนนินและฟีนอลธรรมชาติที่มีราคาถูก และยังสามารถนำมาใช้ทำเป็นสีย้อม สารฟอกหนัง กาวสำหรับติดไม้ เนื้อไม้โกงกาง

สามารถนำมาแปรรูปเพื่อใช้ในงานก่อสร้าง เฟอร์นิเจอร์และเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ [4] การบุกรุกป่าชายเลนเพื่อใช้ประโยชน์จากไม้โกงกางและการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์อื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นการทำนาเกลือ ฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล การประมง การท่องเที่ยวและที่พักอาศัย ทำให้พื้นที่ป่าชายเลนลดลงอย่างมาลง ผลกระทบต่อระบบนิเวศในวงกว้าง [5] ในปัจจุบันมีหน่วยงานราชการ กลุ่มอนุรักษ์และประชาชนทั่วไปตื่นตัวกับปัญหานี้มากขึ้น มีการฟื้นฟูป่าชายเลนที่ถูกทำลายหลายแห่ง เช่น ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี และศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ และสถานีวิจัยพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 5 จังหวัดชลบุรี เป็นต้น โดยการนำพันธุ์ต้นกล้าโกงกางใบใหญ่มาปลูกทดแทนเพื่อฟื้นฟูสภาพป่าชายเลนให้มีสภาพกลับมาสมบูรณ์เป็นพื้นที่แนวป้องกันชายฝั่ง เป็นแหล่งอาศัยของสัตว์น้ำนานาชนิด แต่อย่างไรก็ตามการเพาะพันธุ์ต้นโกงกางใบใหญ่มักประสบปัญหา คือ อัตราการรอดตายค่อนข้างต่ำและอัตราการเจริญเติบโตช้า

ระบบนิเวศป่าชายเลนเป็นระบบที่มีความซับซ้อนประกอบด้วย สิ่งมีชีวิตและพืชหลากหลายชนิดทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุต่าง ๆ มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุคาร์บอน แต่อย่างไรก็ตามป่าชายเลนมักมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่ำ ไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืชป่าชายเลน ปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการขาดแคลนไนโตรเจน คือ การสูญเสียจากการพัดพาของคลิ่น การเกิดกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) และลักษณะของดินป่าชายเลน [6] ดังนั้นการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนมาช่วยในการปลูกกล้าพันธุ์พืชป่าชายเลนเพื่อเพิ่มธาตุอาหารชนิดนี้ลงในดินให้เพียงพอับความต้องการจึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

แบคทีเรียกลุ่มตรึงก๊าซไนโตรเจนที่เจริญอยู่อย่างอิสระในธรรมชาติ (Non-Symbiotic Nitrogen Fixing Bacteria) พบได้ทั่วไปทั้งสภาวะที่มีออกซิเจน (Obligate Aerobe) เช่น *Archromobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Derxia*, *Mycobacterium* และ *Arthrobacter* สภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย (Facultative Anaerobe) เช่น *Aerobacter*, *Klebsiella* และ *Pseudomonas* และสภาวะไม่มีออกซิเจน เช่น *Clostridium*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Desulfovibrio* และ *Methanobacterium* [7] แบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศที่มีประมาณ 78 % ให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียด้วยกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen Fixation) โดยอาศัยกิจกรรมเอนไซม์กลุ่ม Nitrogenase Complex [8] - [9] แอมโมเนียที่เกิดขึ้นนี้พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง หรือละลายน้ำรวมกับไฮโดรเจนไอออนกลายเป็นแอมโมเนียมที่พืชสามารถนำไปสังเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนได้ และแบคทีเรียสามารถใช้สารชนิดนี้และเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่นเพื่อเข้าสู่วัฏจักรไนโตรเจนต่อไป [10] จะเห็นได้ว่าการเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดินด้วยแบคทีเรียกลุ่มตรึงไนโตรเจนเป็นการเพิ่มธาตุอาหารในดินที่มีประสิทธิภาพและยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายจากปุ๋ยที่มีราคาแพงในการเพาะพันธุ์ต้นกล้าพืชป่าชายเลนได้อีกด้วย

การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียกลุ่มตรึงก๊าซไนโตรเจนที่เจริญแบบอิสระ ได้แก่ *Bacillus* sp. SN1, SN2 และ SN3 ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้ป่าชายเลนที่มักนำต้นกล้ามาปลูกทดแทนเพื่อฟื้นฟูสภาพป่าชายเลนในหลายพื้นที่ของประเทศไทย รวมทั้งสถานีวิจัยพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 5 จังหวัดชลบุรี

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาเบื้องต้นก่อนหน้านั้นได้ศึกษาถึงความสามารถในการเจริญในน้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที ของแบคทีเรียกลุ่มตรึงก๊าซไนโตรเจนที่เจริญแบบอิสระจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus* sp. SN1, SN2, SN3 และ SN4 ทั้งแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมแบบ 2 3 และ 4 สายพันธุ์เข้าด้วยกันพบว่า *Bacillus* sp. SN1, SN2 และแบคทีเรียผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 มีการเจริญในน้ำทะเลได้ดีที่สุด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงคัดเลือกแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ที่มีขั้นตอนการวิจัยมีดังนี้

1. การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย ดัดแปลงจาก [11]

นำแบคทีเรียกลุ่มตรึงก๊าซไนโตรเจนทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus* sp. SN1, SN2 และ SN3 ที่เก็บรักษาในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มาเลี้ยงบนอาหาร Alkaline Nitrogen-Free Agar ที่ประกอบด้วย (g/L) Glucose 2.0, Dipotassium Hydrogen Phosphate (K_2HPO_4) 1.0, Magnesium Sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5, Ferric Chloride ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 0.1, Calcium Carbonate ($CaCO_3$) 2.0 และ Agar 15.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงใน 0.85 % NaCl Solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อให้มีความหนาแน่นเซลล์ 10^9 CFU/ml เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียแบบเดี่ยว ส่วนการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียแบบผสม (SN1, SN2 และ SN3) ให้นำสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การปลูกต้นโกงกางใบใหญ่

คัดเลือกฝักโกงกางที่มีคุณภาพดี ได้แก่ ฝักที่ไม่มีรอยแผลจากแมลงศัตรูพืชหรือรอยโรคจากเชื้อก่อโรคพืช (รูปที่ 1) บันทึกข้อมูลฝักโกงกาง ได้แก่ ความยาวและน้ำหนักเปียก แล้วนำฝักโกงกางใบใหญ่ไปปักชำต่อไป

นำดินจากป่าชายเลนบริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 5 จังหวัดชลบุรี บรรจุใส่ถุงเพาะชำชนิดเจาะรูขนาด 3×7 นิ้ว ถุงละ 500 กรัม อัดดินให้แน่นนำฝักโกงกางใบใหญ่ในส่วนของรากจุ่มในสารแขวนลอยเซลล์ทั้ง 4 ชนิด ที่มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^9 CFU/ml นาน 30 นาที [12] ก่อนนำไปปักชำในดินที่เตรียมไว้ (1 ฝักต่อดิน 1 ถุง) โดยแบ่งเป็น 15 ต้นต่อชุดการทดลอง จากนั้นนำต้นกล้าไปไว้ในโรงเพาะชำที่คลุมด้วยตาข่ายพลาสติกแสงร้อยละ 50 อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของโรงเพาะชำอยู่ระหว่าง 26 - 32 องศาเซลเซียส และร้อยละ 70 - 75 ตามลำดับ ในวันแรกหลังการปักฝักโกงกางประมาณ 30 นาที ให้รดน้ำด้วยน้ำทะเลความเข้มข้น 30 พีพีที หลังจากนั้นรดด้วยน้ำจืดทุกวันในปริมาณ 25 มิลลิลิตร ต่อ 1 ถุง และเติมสารแขวนลอยเซลล์ความเข้มข้นประมาณ 10^9 CFU/ml ตามชุดการทดลอง ถุงละ 10 มิลลิลิตร ทุก ๆ 7 วัน สำหรับชุดควบคุมเป็นฝักโกงกางที่ไม่ได้จุ่มลงในสารแขวนลอยเซลล์ แต่จุ่มลงใน 0.85 % NaCl Solution และทุก ๆ 7 วัน เติม 0.85 % NaCl Solution แทนการเติมสารแขวนลอยเซลล์ เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 37 วัน นำต้นกล้าโกงกางใบใหญ่มาวัดการเจริญเติบโต ได้แก่ วัดความสูงและชั่งน้ำหนักเปียก



รูปที่ 1 ฝักกล้วยงาใบใหญ่ที่มีคุณภาพดี สมบูรณ์

3. การวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน

นำดินของแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ ดินสำหรับต้นกล้วยงาที่เดิมแบคทีเรียเดียวสายพันธุ์ SN1 และ SN2 และแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ SN1, SN2 และ SN3 ในช่วงก่อนเพาะต้นกล้วย 1 ชั่วโมง หลังเพาะต้นกล้วย 30 นาที และดินในวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 37) มาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี ดังนี้

3.1 แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ด้วยเทคนิค Colorimetric [13]

นำดิน 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมนิโตรเจนไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรอง แล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรองปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมนิโตรเจนไฮดรอกไซด์และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ปริมาตร 5 และ 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของแอมโมเนียมจากกราฟมาตรฐานแอมโมเนียมคลอไรด์

3.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง [13]

ชั่งดิน 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เติมน้ำลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วควมให้เข้ากันก่อนวัดประมาณ 30 นาที ในระหว่างนั้นควรคนตัวอย่างดินเป็นระยะ ๆ และนำตัวอย่างไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทำการสอบเทียบกับค่าสารละลายมาตรฐานที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และ 10.0 เรียบร้อยแล้ว บันทึกผลการทดสอบทั้ง 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3 ปริมาณอินทรีย์วัตถุด้วยวิธีการเผา (Loss on Ignition) [13]

ชั่งดินที่ผ่านตะแกรงร่อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร จำนวน 10 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องขนาดเล็กที่จดบันทึกน้ำหนักแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปลอ่ยให้เย็นในโถดูดความชื้น นำดินตัวอย่างไปอบอีกครั้งที่อุณหภูมิ 360 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำถ้วยกระเบื้องออกมาทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น นำไปชั่งน้ำหนักหลังเผา แล้วคำนวณหาน้ำหนักที่หายไป และคำนวณค่า Organic Matter (%)

$$\text{Organic Matter (\%)} = (\text{น้ำหนักดินที่หายไป} / \text{น้ำหนักดินก่อนเผา}) \times 100$$

3.4 ปริมาณฟอสฟอรัสในรูปที่มีประโยชน์ (Available Phosphorus) ด้วยวิธีของ Olsen [13]

ซึ่งตัวอย่างดิน 5 กรัม ที่ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิตร เติมน้ำยา 0.05 M NaHCO_3 (pH 8.5) ในอัตราส่วนดินต่อน้ำยาเท่ากับ 1:20 เขย่าให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 คูณสารละลายที่กรองได้ปริมาตร 5 มิลลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิตร เติมสารละลายผสม (Ammonium Molybdate-Antimony Potassium Tartrate Solution, Ascorbic Acid Solution และ Sulfuric Acid) ปริมาตร 4 มิลลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของฟอสฟอรัส โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (Potassium Dihydrogen Phosphate)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลมาคำนวณเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) แบบ One-Way ANOVA และเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Duncan's Multiple Range Test

ผลการทดลอง

1. การเจริญเติบโตของต้นกล้าโกงกางใบใหญ่

จากการเพาะกล้าโกงกางใบใหญ่ที่มีคุณภาพดีจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 5 (ชลบุรี) ด้วยการเติมแบคทีเรียกลุ่มตรึงก๊าซไนโตรเจนแบบหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสม พบว่าการเติม *Bacillus* sp. SN1 SN2 และ SN3 ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมช่วยให้ต้นกล้าโกงกางใบใหญ่เจริญเติบโตได้ดีเมื่อต้นกล้าอายุได้ 7 วัน ฝักโกงกางใบใหญ่เริ่มมีการแตกหมวกใบ เมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน ต้นกล้ามีการแตกใบคู่แรก และเมื่ออายุ 37 วัน ต้นกล้ามีความสูงเพิ่มขึ้น มีใบและยอดที่สมบูรณ์ (รูปที่ 2(ก)) จากการสังเกตรากของต้นกล้าโกงกางที่เติม *Bacillus* sp. SN1, SN2 และแบคทีเรียผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 มีการแตกแขนงและเจริญได้ดีกว่าต้นกล้าในชุดควบคุม (รูปที่ 2(ข))

ต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ที่ได้รับ *Bacillus* sp. SN2 มีความสูงเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 8.70 ± 0.89 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับต้นกล้าในชุดควบคุม (8.30 ± 1.01 เซนติเมตร) และ *Bacillus* sp. SN1 (8.24 ± 0.59 เซนติเมตร) ดังตารางที่ 1

ส่วนน้ำหนักของต้นกล้าโกงกางใบใหญ่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* sp. SN1 ที่มีค่าเท่ากับ 12.73 ± 1.93 กรัม รองลงมาคือ ต้นกล้าที่เติม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 และ *Bacillus* sp. SN2 ที่เพิ่มขึ้น 8.64 ± 2.67 และ 8.42 ± 2.54 กรัม ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นล้วนมากกว่าชุดควบคุม (7.80 ± 1.48 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 1



(ก) ลำต้น ใบและยอดของต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่



(ข) รากของต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่

รูปที่ 2 ลักษณะต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ใน (1) ชุดควบคุม (2) เติม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 (3) เติม *Bacillus* sp. SN2 และ (4) เติม *Bacillus* sp. SN1 ที่มีอายุ 37 วัน

ตารางที่ 1 ความสูงและน้ำหนักเปียกที่เพิ่มขึ้นของต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ที่เติมหรือไม่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมที่มีอายุ 37 วัน

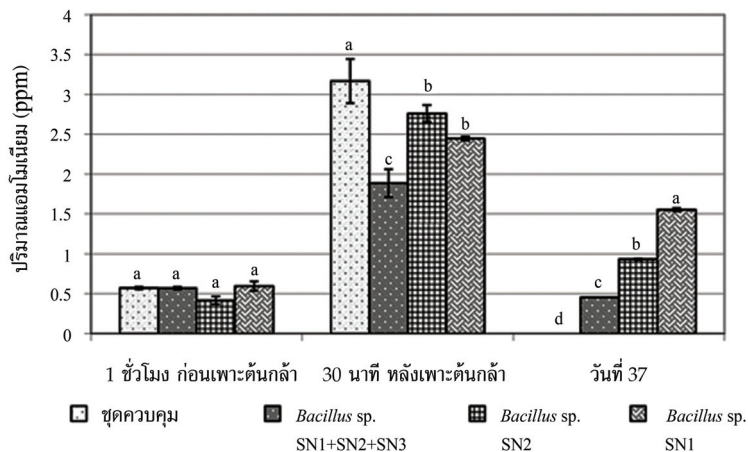
ชุดการทดลอง	ความสูงของต้นที่เพิ่มขึ้น (เซนติเมตร)	น้ำหนักเปียกของต้น ที่เพิ่มขึ้น (กรัม)
ชุดควบคุม	8.30 ± 1.01^a	7.80 ± 1.48^a
<i>Bacillus</i> sp. SN1+SN2+SN3	8.47 ± 0.17^{ab}	8.64 ± 2.67^b
<i>Bacillus</i> sp. SN2	8.70 ± 0.89^b	8.42 ± 2.54^b
<i>Bacillus</i> sp. SN1	8.24 ± 0.59^a	12.73 ± 1.93^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. ปริมาณแอมโมเนียมในดิน

ปริมาณแอมโมเนียมในดินของทุกชุดการทดลองก่อนเพาะต้นกล้า 1 ชั่วโมง มีค่าอยู่ในช่วง 0.42 ± 0.049 - 0.59 ± 0.059 พีพีเอ็ม ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) หลังการเพาะต้นกล้าและรดด้วยน้ำทะเล 30 นาที ปริมาณแอมโมเนียมในดินของชุดควบคุมมีค่าสูงที่สุด (3.16 ± 0.277 พีพีเอ็ม) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดที่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 3 ชุดการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามในวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 37) ปริมาณแอมโมเนียมในดินของชุดการทดลองที่เติม *Bacillus* sp. SN1 มีค่าสูงที่สุด (1.55 ± 0.02 พีพีเอ็ม) รองลงมาคือ *Bacillus* sp. SN2 และ *Bacillus* sp.

SN1+SN2+SN3 ที่มีค่าเท่ากับ 0.93 ± 0.008 และ 0.45 ± 0.000 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ในขณะที่ดินในชุดควบคุมไม่พบแอมโมเนียมไนโตรเจนในดินเลย (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในดินที่ใช้เพาะชำต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ที่เดิมหรือไม่เดิมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมตลอดระยะเวลา 37 วัน

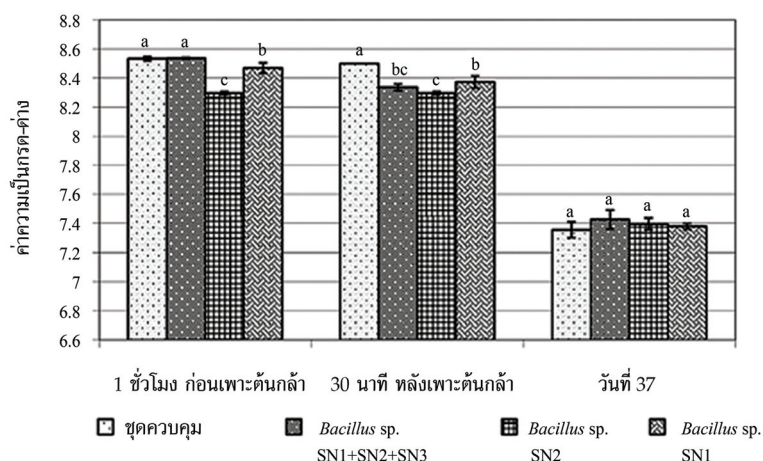
ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

3. ค่าความเป็นกรด-ด่างในดิน

ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินก่อนเพาะต้นกล้า 1 ชั่วโมง มีความเป็นด่าง โดยดินในชุดควบคุมและชุดที่เติม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.53 ± 0.015 และ 8.54 ± 0.006 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หลังการเพาะต้นกล้า 30 นาที ค่าความเป็นกรด-ด่างในดินของทุกชุดการทดลองลดลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 8.30 ± 0.012 - 8.50 ± 0.000 และในวันที่ 37 ของการเพาะกล้า ตัวอย่างดินในทุกชุดการทดลองมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลางมากขึ้นอยู่ในช่วง 7.36 ± 0.055 - 7.43 ± 0.065 และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังรูปที่ 4

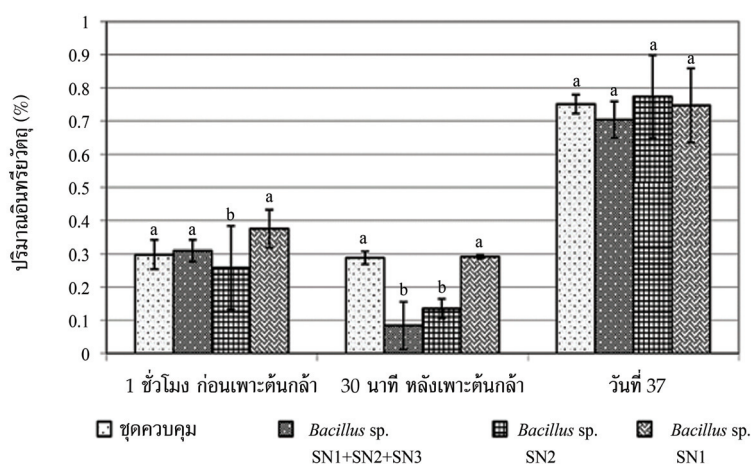
4. ปริมาณอินทรีย์วัตถุ

ก่อนการเพาะต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินของชุดควบคุม ชุดที่เติม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 และ *Bacillus* sp. SN1 มีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 0.298 ± 0.044 - 0.375 ± 0.050 % ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และมีค่าลดลงเล็กน้อยหลังการเพาะและร่นน้ำทะเล 30 นาที ส่วนในวันที่ 37 ของการทดลอง ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินของทุกชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยมีค่าเท่ากับ 0.704 ± 0.055 - 0.774 ± 0.125 % และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างกันดังรูปที่ 5



รูปที่ 4 ค่าความเป็นกรด-ต่างของดินที่ใช้เพาะชำต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ที่เดิมหรือไม่เดิมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน แบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมตลอดระยะเวลา 37 วัน

ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง



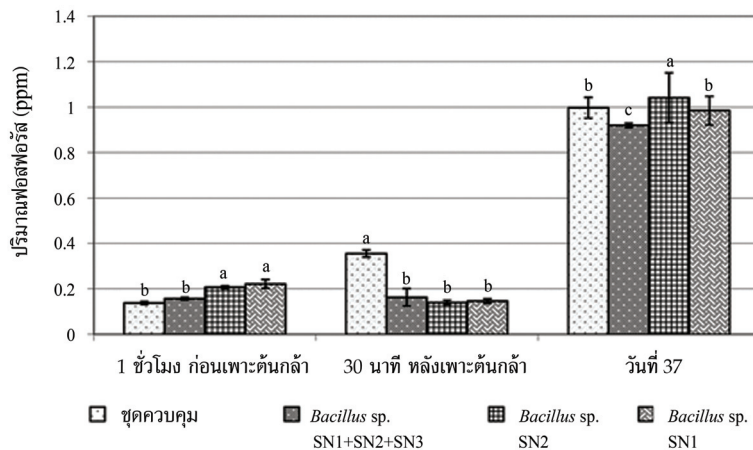
รูปที่ 5 ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินที่ใช้เพาะชำต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ที่เดิมหรือไม่เดิมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมตลอดระยะเวลา 37 วัน

ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

5. ปริมาณฟอสฟอรัสในดิน

ก่อนการเพาะต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ ปริมาณฟอสฟอรัสในดินของชุดที่เดิม *Bacillus* sp. SN2 และ *Bacillus* sp. SN1 มีค่าใกล้เคียงกันเท่ากับ 0.21 ± 0.006 และ 0.22 ± 0.019 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าดินในชุดควบคุมและชุดที่เดิมแบคทีเรียผสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หลังการเพาะกล้า 30 นาที ปริมาณฟอสฟอรัสในดินของชุดควบคุมเพิ่มขึ้นเป็น 0.36 ± 0.016 พีพีเอ็ม และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดที่เดิมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 3 กลุ่ม และในวันที่ 37 ของการทดลอง

ปริมาณฟอสฟอรัสในดินของชุดที่เติม *Bacillus* sp. SN2 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 1.04 ± 0.110 พีพีเอ็ม ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม (0.99 ± 0.005 พีพีเอ็ม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ปริมาณฟอสฟอรัสในดินที่ใช้เพาะชำต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ที่เติมหรือไม่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบเชื้อเดี่ยวและแบบเชื้อผสมตลอดระยะเวลา 37 วัน

ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

1. การเจริญเติบโตของต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเพาะต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ด้วยเทคนิค Root Dipping คือจุ่มปลายฝักโก่งกางใบใหญ่ในสารแขวนลอยเซลล์ และเติมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียตรึงก๊าซไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ทุก 7 วัน สามารถเพิ่มความสูงและน้ำหนักของต้นกล้าโก่งกางใบใหญ่ได้ โดยการเติม *Bacillus* sp. SN2 ทำให้ความสูงของต้นกล้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการเติม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3, *Bacillus* sp. SN1 และ *Bacillus* sp. SN2 ทำให้น้ำหนักต้นกล้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วยการใช้แบคทีเรียประสมผลสำเร็จในพืชหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น การเติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน 3 ชนิด คือ *Azotobacter chroococcum*, *A. virelandii* และ *A. beijerinckii* แบบหัวเชื้อเดี่ยวช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักราก ความยาวราก น้ำหนักต้นกล้า พื้นที่ใบและการผลิตสารรงควัตถุ (คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์) ของต้นกล้าโก่งกางใบเล็ก (*R. apiculata*) และโก่งกางใบใหญ่ได้อย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าที่ไม่ได้รับแบคทีเรีย [14] ผลการทดลองคล้ายกันนี้รายงานโดย Rahman, M. M., Sabir, A. A., Mukta, J. A., Khan, M. M. A., Mohi-Ud-Din, M., Miah, M. G., Rahman, M. M., and Islam, M. T. [11] ที่พบว่าการเติม *Bacillus amyloliquefaciens* BChi1 และ *Paraburkholderia fungorum* BRRh-4 สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของสตรอว์เบอร์รี่ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานความสำเร็จในการเพิ่มน้ำหนักรากและการงอกของเมล็ดด้วยการเติมหัวเชื้อผสมระหว่าง *Rhizobium*, *B. subtilis* OSU-142 และ *B. megaterium* M-3 ในการเพาะถั่วลูกไก่ (Chickpea) [15]

ผลการศึกษาในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้อาจมีบทบาททางตรงและทางอ้อมในการเพิ่มความยาวและน้ำหนักของต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ โดยปกติแล้วแบคทีเรียที่เติมลงไปนั้นสามารถเพิ่มปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ [16] สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าดินในชุดควบคุมไม่หลงเหลือแอมโมเนียมในดินเลย ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อเดี่ยวคือ *Bacillus* sp. SN1 และ *Bacillus* sp. SN2 และหัวเชื้อผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 ดินมีปริมาณแอมโมเนียมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันสุดท้ายของการทดลอง และการเติม *Bacillus* sp. SN2 สามารถเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสในดินอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การเพิ่มขึ้นของธาตุอาหารทั้งสองกลุ่มอาจเป็นปัจจัยโดยตรงที่ทำให้ความสูงและน้ำหนักของต้นกล้าโกงกางใบใหญ่เพิ่มขึ้น

นอกเหนือจากการเพิ่มไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้แล้ว แบคทีเรียที่เติมลงในดินอาจเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ด้วยการสังเคราะห์สารที่มีประโยชน์ต่าง ๆ ได้แก่ Indole Acetic Acid และซีเคอร์โรฟอร์ เป็นต้น [9] โดย Indole Acetic Acid เป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินที่มีบทบาทเร่งการเจริญเติบโตของพืช เช่น การเพิ่มความสูง การเพิ่มพื้นที่ผิวและความยาวของราก และบทบาทต่อกระบวนการหลั่งสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของจุลินทรีย์และโครงสร้างกลุ่มจุลินทรีย์บริเวณรากพืช [17] ส่วนซีเคอร์โรฟอร์จัดเป็นสารชีวโมเลกุลที่ผลิตจากแบคทีเรีย สารชนิดนี้สามารถจับกับเหล็กในรูปเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ได้ดีและถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ [18] แบคทีเรียสกุล *Bacillus* หลายชนิดมีความสามารถในการผลิต Indole Acetic Acid และซีเคอร์โรฟอร์ เช่น *Bacillus* sp., *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* เป็นต้น [19] - [21] การเติมแบคทีเรียยังมีบทบาทในการปรับโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของรากพืช เพิ่มการดูดซึมธาตุอาหารหลัก อาหารรองและอาหารเสริมต่าง ๆ และช่วยกระตุ้นการแสดงออกของยีนส์ในพืชที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต [16], [22] จากกลไกเหล่านี้จึงทำให้พืชได้รับสารอาหารได้ง่ายขึ้นและครบถ้วนตามความต้องการและส่งผลให้การเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้นนั่นเอง แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการผลิตสารที่มีประโยชน์และความสัมพันธ์ระหว่าง *Bacillus* sp. SN1, *Bacillus* sp. SN2 และแบคทีเรียผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 กับรากต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

การศึกษาในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการเติมหัวเชื้อผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการเติมหัวเชื้อเดี่ยว คือ *Bacillus* sp. SN1 และ *Bacillus* sp. SN2 สังเกตได้จากน้ำหนักและความสูงต้นกล้าโกงกาง รวมถึงปริมาณแอมโมเนียมในดิน ซึ่งจากการศึกษาของ Yu, X., Liu, X., Zhu, T. H., Liu, G. H., and Mao, C. [23] ได้พบว่าการเติมแบคทีเรียผสมสองกลุ่มมีผลต่อความสูงของลำต้น ความยาวและน้ำหนักราก และปริมาณฟอสฟอรัสและไนโตรเจนในดินที่ใช้เพาะกล้าวอลนัท (*Juglans regia* L.) แตกต่างกัน โดยพบว่าแบคทีเรียผสมระหว่าง *Pseudomonas chlororaphis* และ *Arthrobacter pascens* มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มธาตุอาหาร แต่ในขณะที่แบคทีเรียผสมระหว่าง *B. megaterium* และ *A. pascens* ไม่มีผลการเจริญเติบโตและธาตุอาหาร ผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียผสมในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาจมีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลกัน (Synergistic Activity) หรือความสัมพันธ์แบบปฏิปักษ์ (Antagonistic Activity) ก็ได้ [23]

ดังนั้นคาดว่าปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 อาจจะเกือบลูกกันในระดับหนึ่ง แต่ยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อเดี่ยว คือ *Bacillus* sp. SN1 และ SN2

2. คุณสมบัติของดิน

ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในทุกชุดการทดลองก่อนเพาะต้นกล้าและหลังเพาะต้นกล้าในวันแรกของการทดลองมีความเป็นด่างใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 8.30 ± 0.012 - 8.54 ± 0.006 และเมื่อเพาะต้นกล้าโกองกางใบใหญ่นาน 37 วัน ดินมีความเป็นกลางเพิ่มมากขึ้น โดยมีค่าระหว่าง 7.36 ± 0.055 - 7.43 ± 0.065 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะดินที่ใช้เพาะกล้าเป็นดินป่าชายเลนและมีการรดด้วยน้ำทะเลหลังปักฝักโกองกางใบใหญ่ ตามปกติแล้วน้ำทะเลส่วนมากมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 [24] แต่หลังจากนั้นรดต้นกล้าด้วยน้ำจืดทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยน้ำจืดที่ใช้รดต้นกล้าในครั้งนี้มีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7.4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินเพาะต้นกล้าโกองกางใบใหญ่ที่มีความเป็นกลางมากขึ้นน่าจะส่งผลทำให้เกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินเพิ่มสูงขึ้น เช่น การตรึงก๊าซไนโตรเจนเพื่อเปลี่ยนมาเป็นแอมโมเนียมและการละลายฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ ดังที่สังเกตได้จากผลการทดลองในครั้งนี้ จนส่งผลให้ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินที่เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 37 ของการเพาะต้นกล้าโกองกางใบใหญ่นอกจากนี้ผลการศึกษาในครั้งนี้ยังสังเกตได้ว่าปริมาณแอมโมเนียมในดินหลังการปักชำของทุกชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเกิดจากการรดต้นกล้าหลังการปักชำด้วยน้ำทะเล ซึ่งเป็นการรดด้วยน้ำทะเลเพียงครั้งเดียว หลังจากนั้นรดด้วยน้ำจืดทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง จึงอาจทำให้ปริมาณแอมโมเนียมสะสมในดินค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาอื่นของการทดลอง สอดคล้องกับคุณภาพน้ำทะเลพื้นที่ชายฝั่งบริเวณอ่าวชลบุรีถึงบางแสนที่สำรวจโดยกรมควบคุมมลพิษ ในปี พ.ศ. 2562 พบว่าปริมาณแอมโมเนียมรวมมีค่าอยู่ระหว่าง 8.6 - 332 ไมโครกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร [25]

ความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์มีการศึกษามากมายแพร่หลายและยาวนาน แต่การนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อปรับปรุงคุณภาพดินสำหรับการเพาะต้นกล้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชป่าชายเลนยังมีการศึกษาน้อยมาก การใช้จุลินทรีย์ปรับปรุงคุณภาพดินถือเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมเนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมีบางชนิดไม่มีประสิทธิภาพ พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ เช่น ปุ๋ยฟอสฟอรัส ประมาณ 75 - 90 % ของปริมาณที่เติมลงในดินมักจับตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับธาตุโลหะในดินและถูกตรึงอยู่กับอนุภาคดิน [26] การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. SN1, *Bacillus* sp. SN2 และแบคทีเรียผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 มีศักยภาพในการเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้กับต้นกล้าโกองกางใบใหญ่ สอดคล้องกับการศึกษาของ Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., and Gobi, T. A. [27] ที่รายงานว่า *B. polymyxa* สายพันธุ์ BcP26 ช่วยปรับปรุงคุณภาพดินที่ขาดธาตุอาหารให้มีธาตุอาหารไนโตรเจนเพิ่มสูงขึ้นจึงส่งผลให้ข้าวโพดเจริญเติบโตได้ดีและดูดซึมธาตุอาหารไนโตรเจนมาใช้ได้อย่างเพียงพอ นอกจากนี้ Elkoca, E., Kantar, F., and Sahin, F. [15] พบว่าการเติมแบคทีเรียตรึงก๊าซไนโตรเจน คือ *Rhizobium* และ *B. subtilis* OSU-142 ร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต คือ *B. megaterium* M-3 แบบหัวเชื้อเดี่ยว แบคทีเรียผสมสองชนิดและแบคทีเรียผสมทั้งสามชนิดสามารถเพิ่มธาตุอาหารไนโตรเจนในดิน ส่งผลให้ความสูง ความยาวราก ปริมาณคลอโรฟิลล์ น้ำหนักปมราก และผลผลิตของถั่วลูกไก่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักลำดับที่สองต่อจากไนโตรเจนที่มักมีในปริมาณจำกัดในดิน ทั้ง ๆ ที่ธาตุอาหารชนิดนี้พบได้ทั่วไปทั้งในรูปสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ [28] การที่ธาตุอาหารชนิดนี้มีปริมาณอย่างจำกัดสำหรับพืช เนื่องจากฟอสฟอรัสมักอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ในขณะที่พืชสามารถใช้ฟอสฟอรัสในรูปละลายน้ำเพียงสองชนิดเท่านั้น ได้แก่ รูปโมโนเบสิกไอออน (H_2PO_4^-) และไดเบสิกไอออน (HPO_4^{2-}) ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน กล่าวคือ พืชจะใช้ฟอสเฟตในรูปไดเบสิกไอออนเมื่อดินมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง [29] - [30] นอกจากนี้หากดินมีสภาพเป็นกรดต่ำกว่า 6.5 จะทำให้ฟอสฟอรัสเกาะติดกับอะลูมิเนียมและแร่เหล็ก แต่ถ้าดินมีความเป็นด่างสูงจะทำให้ฟอสฟอรัสเกาะติดกับแคลเซียม ทำให้พืชดูดซึมฟอสฟอรัสไปใช้ไม่ได้ แม้ว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่วัดได้จะมีค่าสูงก็ตาม [10] ดังนั้นการเติมจุลินทรีย์จึงเป็นการเพิ่มฟอสฟอรัสในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยอาศัยกิจกรรมการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์และยังช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมีได้อีกด้วย จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า *Bacillus* sp. SN2 สามารถเพิ่มฟอสเฟตในดินในระหว่างการเพาะกล้าโกงกางใบใหญ่ ส่งผลให้ความยาวและน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการศึกษาของ Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., and Gobi, T. A. [27] ที่พบว่า *B. polymyxa* สายพันธุ์ BcP26 ช่วยเพิ่มฟอสฟอรัสในดินที่ขาดธาตุอาหารส่งผลให้ข้าวโพดดูดซึมธาตุอาหารฟอสฟอรัสได้มากขึ้นและเจริญเติบโตได้ตามปกติแล้วแบคทีเรียหลายสกุลมีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น *Bacillus*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Serratia* เป็นต้น [30] การศึกษาความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสของ *Bacillus* sp. SN1 และ *Bacillus* sp. SN2 และตัวเชื้อผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 จึงควรมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การเติมแบคทีเรียแบบตัวเชื้อเดี่ยว คือ *Bacillus* sp. SN1 และ *Bacillus* sp. SN2 และตัวเชื้อผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 ช่วยเพิ่มความสูงและน้ำหนักของต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ นอกจากนี้การเติมแบคทีเรียทั้ง 3 รูปแบบยังช่วยเพิ่มแอมโมเนียมในดินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รวมทั้งการเติม *Bacillus* sp. SN2 สามารถเพิ่มฟอสฟอรัสในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ในดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้นการศึกษานี้สรุปได้ว่า *Bacillus* sp. SN1, *Bacillus* sp. SN2 และแบคทีเรียผสม *Bacillus* sp. SN1+SN2+SN3 มีศักยภาพในการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืชป่าชายเลนและลดการใช้ปุ๋ยเคมีในโตรเจนและฟอสฟอรัส ทำให้มีต้นกล้าโกงกางใบใหญ่ที่แข็งแรงสำหรับการส่งเสริมและแจกจ่ายกลุ่มนักอนุรักษ์และประชาชนทั่วไปที่มีความสนใจในการปลูกป่าชายเลนเพื่ออนุรักษ์ระบบนิเวศที่มีความสำคัญให้คงอยู่กับประเทศไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการวิจัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์เรือนเพาะชำ

สำหรับการเพาะต้นกล้า รวมทั้งขอบคุณ คุณเกษม รัตนศิริ และเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยนาทรายกร ป่าชายเลนที่ 5 จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความเอื้อเฟื้อดินป่าชายเลน และฝึกกองกางใบใหญ่สำหรับการทดลอง

References

- [1] Aksornkoae, S. (1998). **Ecology of Mangrove Forest**. 2nd ed. Bangkok: Kasetsart University
- [2] Charupatt, T. and Charupatt, J. (1997). Application of Geographical Information from Landsat-5 TM for Monitoring the Change in Mangrove Forest Areas in Thailand. In **Proceeding of the 10th National Conference of Mangrove Forest Ecosystem**. pp. 1-8. National Research Council of Thailand: Bangkok
- [3] Bunyavejvchewin, S. and Buasalee, R. (2011). **Mangrove Forest: Ecosystem and Plant Species**. Bangkok: Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation
- [4] Yeesun, S. and Tateh, S. (2018). Effect of During Different Immersing in Sea Water on First Cople Sprout of Pod (*Rhizophora apiculata*). In **Proceeding of the 10th Rajamangala University of Technology National Conference**. pp. 756-763. Trang: Research and Development Institute, Rajamangala University of Technology Srivijaya
- [5] Reis, C. R. G., Nardoto, G. B., and Oliveira, R. S. (2017). Global Overview on Nitrogen Dynamics in Mangroves and Consequences of Increasing Nitrogen Availability for These Systems. **Plant and Soil**. Vol. 410, No. 1-2, pp. 1-19. DOI: 10.1007/s11104-016-3123-7
- [6] Reef, R., Feller, I. C., and Lovelock, C. E. (2010). Nutrition of Mangroves. **Tree Physiology**. Vol. 30, Issue 9, pp. 1148-1160. DOI: 10.1093/treephys/tpq048
- [7] Rao, N. S. S. (1995). **Soil Microorganisms and Plant Growth**. 3rd ed. New Delhi: Oxford & IBH Publishing
- [8] Kim, J. and Ress, D. C. (1994). Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. **Biochemistry**. Vol. 33, No. 2, pp. 389-397. DOI: 10.1021/bi00168a001
- [9] Ahemad, M. and Kibret, M. (2014). Mechanisms and Applications of Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Current Perspective. **Journal of King Saud University - Science**. Vol. 26, Issue 1, pp. 1-20. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001
- [10] Nimrat, S. (2006). **Soil Microbiology**. Bangkok: Odeon Store
- [11] Rahman, M. M., Sabir, A. A., Mukta, J. A., Khan, M. M. A., Mohi-Ud-Din, M., Miah, M. G., Rahman, M. M., and Islam, M. T. (2018). Plant Probiotic Bacteria *Bacillus* and *Paraburkholderia* Improve Growth, Yield and Content of Antioxidants in Strawberry Fruit. **Scientific Reports**. Vol. 8, No. 1, pp. 1-11. DOI: 10.1038/s41598-018-20235-1
- [12] Khan, S. and Pariari, A. (2012). Effect of N-Fixing Biofertilizers on Growth, Yield and Quality of Chilli (*Capsicum annuum* L.). **The Bioscan**. Vol. 7, No. 3, pp. 481-482
- [13] Attanandana, T. and Chanchareonsook, J. (1999). **Soil and Plant Analysis**. 7th ed. Bangkok: Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University

- [14] Ravikumar, S., Kathiresan, K., Maria Ignatiammal, S. T., Selvam, M. B., and Shanthi, S. (2004). Nitrogen-Fixing Azotobacters from Mangrove Habitat and Their Utility as Marine Biofertilizers. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Vol. 312, Issue 1, pp. 5-17. DOI: 10.1016/j.jembe.2004.05.020
- [15] Elkoca, E., Kantar, F., and Sahin, F. (2008). Influence of Nitrogen Fixing and Phosphorus Solubilizing Bacteria on the Nodulation, Plant Growth, and Yield of Chickpea. **Journal of Plant Nutrition**. Vol. 31, Issue 1, pp. 157-171. DOI: 10.1080/01904160701742097
- [16] Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Hindawi Publishing Corporation Scientifca**. Vol. 2012, pp. 1-15. Article ID 963401, DOI: 10.6064/2012/963401
- [17] Spaepen, S., Das, F., Luyten, E., Michiels, J., and Vanderleyden, J. (2009). Indole-3-Acetic Acid-Regulated Genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. **FEMS Microbiology Letters**. Vol. 291, Issue 2, pp. 195-200. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01453.x
- [18] Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L. L., and Krishnamurthy, L. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobia: Challenges and Opportunities. **3 Biotech**. Vol. 5, pp. 355-377. DOI: 10.1007/978-3-319-64982-5_7
- [19] Zaidi, A., Khan, M. S., Saif, S., Rizvi, A., Ahmed, B., and Shahid, M. (2017). Role of Nitrogen-Fixing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Sustainable Production of Vegetables: Current Perspective. In: **Zaidi A., Khan M. (eds) Microbial Strategies for Vegetable Production**. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-54401-4_3
- [20] Sharma, S. K., Ramesh, A., and Johri, B. N. (2013). Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting *Bacillus amyloliquefaciens* Strain sks_bnj_1 and Its Influence on Rhizosphere Soil Properties and Nutrition of Soybean (*Glycine max* L. Merrill). **Journal of Virology and Microbiology**. Vol. 2013, Article ID 446006, DOI: 10.5171/2013.446006
- [21] Szilagyi-Zecchin, V. J., Ikeda, A. C., Hungria, M., Adamoski, D., KavaCordeiro, V., Glienke, C., and Galli-Terasawa, L. V. (2014). Identification and Characterization of Endophytic Bacteria from Corn (*Zea mays* L.) Roots with Biotechnological Potential in Agriculture. **AMB Express**. Vol. 4, pp. 2-9. DOI: doi: 10.1186/s13568-014-0026-y
- [22] Costa, J. M. and Loper, J. E. (1994). Characterization of Siderophore Production by the Biological Control Agent *Enterobacter cloacae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI (USA)**. Vol. 7, Issue 4, pp. 440-448
- [23] Yu, X., Liu, X., Zhu, T. H., Liu, G. H., and Mao, C. (2012). Co-Inoculation with Phosphate-Solubilizing and Nitrogen-Fixing Bacteria on Solubilization of Rock Phosphate and Their Effect on Growth Promotion and Nutrient Uptake by Walnut. **European Journal of Soil Biology**. Vol. 50, pp. 112-117. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2012.01.004
- [24] Department of Marine and Coastal Resources. (2018). **pH Value of Seawater**. Access (3 April 2020). Available (<https://www.dmcr.go.th/detailAll/23961/nws/141>)

- [25] Pollution Control Department, Ministry of Natural Resources and Environment. (2019). **Marine Water Quality along the Coastline of Thailand in 2019**. Access (31 August 2020). Available (http://www.pcd.go.th/info_serv/water.html)
- [26] Egamberdiyeva, D. (2007). The Effect of Plant Growth Promoting Bacteria on Growth and Nutrient Uptake of Maize in Two Different Soils. **Applied Soil Ecology**. Vol. 36, pp. 184-189. DOI: DOI: 10.1016/j.apsoil.2007.02.005
- [27] Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., and Gobi, T. A. (2013). Phosphate Solubilizing Microbes: Sustainable Approach for Managing Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils. **SpringerPlus**. Vol. 2, DOI: 10.1186/2193-1801-2-587
- [28] Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A., and Oves, M. (2009). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in the Remediation of Metal Contaminated Soils. **Environmental Chemistry Letters**. Vol. 7, Issue 1, pp. 319-350
- [29] Mala, T. (2003). **Organic Fertilizer and Bio-Fertilizer**. Bangkok: Kasetsart University
- [30] Bhattacharyya, P. N. and Jha, D. K. (2012). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Vol. 28, pp. 1327-1350. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9