ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในนาข้าวอินทรีย์และนาข้าวที่ใช้สารเคมี และการประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ

สุรางค์รัตน์ พันแสง

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในนาข้าวอินทรีย์และนาข้าวที่ใช้สารเคมี และการประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ

สุรางค์รัตน์ พันแสง

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในนาข้าวอินทรีย์และนาข้าวที่ใช้สารเคมี และการประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ"

ของ สุรางค์รัตน์ พันแสง

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จีรพร เพกเกาะ)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร.สงกรานต์ เชื้อครุฑ)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร.นิตยา ไชยเนตร)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ดร.บวร คุณากรนุรักษ์)

อนุมัติ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในนาข้าวอินทรีย์และนาข้าวที่ใช้สารเคมี และการประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ

ผู้วิจัย สุรางค์รัตน์ พันแสง
ประธานที่ปรึกษา ดร.สงกรานต์ เชื้อครุฑ
กรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล
ดร.นิตยา ไชยเนตร

ประเภทสารนิพนธ์ วิทยานิพนธ์ ปร.ด. เทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2565
คำสำคัญ ไซยาโนแบคทีเรีย, นาข้าวอินทรีย์, นาข้าวที่ใช้สารเคมี, ปุ๋ยชีวภาพ

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างดินนาข้าวก่อนฤดูเพาะปลูกในแปลงเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมี ในเขตภาคเหนือตอนล่าง 3 จังหวัด ได้แก่ เพชรบูรณ์ พิจิตร และอุทัยธานี โดยเก็บอย่างละ 3 แปลงย่อย รวมทั้งหมด 18 แปลงย่อย นำดินมาอบให้แห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและเคมีของดิน ผลการวิเคราะห์ พบว่า ดินนาแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ มีค่า pH เป็นกลาง (7.0-7.3) ในขณะที่แปลงที่ใช้สารเคมี มีค่า pH เป็นกรด (5.2-5.4) เนื้อดินเป็นดินเหนียว (clay) ยกเว้นแปลงนาในจังหวัดพิจิตรเป็นดินร่วนเหนียวปนทรายแป้ง (silty clay loam) ในแปลงสารเคมีและแปลงเกษตรอินทรีย์มีลักษณะเป็นดินร่วน (loam) ดินในแปลงเกษตรอินทรีย์ มีความหนาแน่นรวม ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูงกว่าแปลงที่ใช้สารเคมี การศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในดินนาเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมี ทำการเก็บตัวอย่างดิน 2 ระยะ ได้แก่ ระยะก่อนฤดูเพาะปลูกและระยะข้าวออกรวง นำมาเจือจางและเลี้ยงบนอาหาร BG11 และ $BG11_0$ ผลการศึกษาพบว่า จำนวนของไซยาโนแบคทีเรียบนอาหาร BG11 มีมากกว่าอาหาร $BG11_0$ และจำนวนของไซยาโนแบคทีเรียของดินในระยะข้าวออกรวง มีปริมาณมากกว่าดินในระยะก่อนฤดูเพาะปลูก ความหลากหลายของสกุลไซยาโนแบคทีเรียในนาข้าวแปลงเกษตรอินทรีย์มีมากกว่าแปลงนาที่ใช้สารเคมีเพียงเล็กน้อย และเมื่อนำมาจำแนกในระดับสกุลพบไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 3 อันดับ 8 ครอบครัว 12 สกุล มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว จำนวน 12 ไฮโซเลท ลักษณะเป็นเส้นสาย จำนวน 42 ไฮโซเลท พบได้ใน 2 อันดับ คือ Nostocales และ Oscillatoriales และพบสกุล *Anabaena*, *Nostoc* และ *Calothrix* แพร่กระจายเป็นส่วนใหญ่ แต่เมื่อศึกษาการเจริญและการตรึงไนโตรเจนเพื่อนำมาทำเป็นปุ๋ยชีวภาพมีเพียง 4 สกุล ได้แก่ *Anabaena*, *Nostoc*, *Fischerella* และ *Calothrix* และเมื่อทำการศึกษาการเจริญ พบว่า ชนิดที่เหมาะสมควร

มี doubling time น้อยและการตรึงไนโตรเจนได้สูง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ *Anabaena* R1 มีลักษณะตรงตามที่ต้องการและมีการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด เท่ากับ 36.17 nmoles/min/mg ของโปรตีน รองลงมา คือ *Anabaena* R2, *Anabaena* R3, *Nostoc* R12, *Fischerella* R23 และ *Calothrix* R26 นอกจากนี้เมื่อนำมาทำการทดสอบความทนทานต่อสารปราบศัตรูพืช ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอาหาร $BG11_0$ ที่ผสมบิวทาคลอร์ ที่ระดับความเข้มข้น 0-5 ppm ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบิวทาร์คอร์เป็น 10 ppm จะเห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด มีการเจริญที่แตกต่างกัน ดังนี้ *Calothrix* R26 > *Nostoc* R12 > *Anabaena* R1> *Fischerella* R23 เมื่อทดสอบผลของยูเรีย พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญที่แตกต่างกัน กล่าวคือ เมื่อใส่ยูเรีย 0.05 กรัม/ลิตร ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญได้ดี แต่เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของปุ๋ยยูเรีย และที่ระดับความเข้มข้นของยูเรียเท่ากัน *Anabaena* R1 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด รองลงมา คือ *Nostoc* R12, *Fischerella* R23 และ *Calothrix* R26 ตามลำดับ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ *Anabaena* R1 มีลักษณะตรงตามที่ต้องการและมีความเหมาะสมที่จะนำมาทำเป็นปุ๋ยชีวภาพต่อไป

Title DIVERSITY OF CYANOBACTERIA IN ORGANIC AND NON-ORGANIC RICE PADDY FIELDS AND ITS APPLICATION FOR BIO-FERTILIZER

Author Surangrat Punsaeng

Advisor Dr. Songkran Chuakrut, Ph.D.

Co-Advisor Assistant Professor Dr. Anupan Kongbangkerd, Dr.rer.nat.
Assistant Professor Dr. Duenrut Chonudomkul, Ph.D.
Dr. Nittaya Chainateb

Academic Paper Ph.D. Dissertation in Biotechnology, Naresuan University, 2022

Keywords cyanobacteria, organic rice paddy fields, non-organic rice paddy fields, biofertilizer

ABSTRACT

The soil from organic rice paddy fields and non-organic rice paddy fields had been collected from three provinces in Lower-Northern region of Thailand: Phetchabun, Phichit and Uthai Thani. The soil samples were collected three sub-plots each and there were totally 18 sub-plots. The soil was dried and physical and chemical properties were analyzed. The result showed that organic rice paddy fields have neutral pH (7.0-7.3), whereas non-organic rice paddy fields have acidic pH (5.2-5.4) with clay type of soil except the samples from Phichit of which non-organic site and organic site contain silty clay loam and loam respectively. Soil from organic rice paddy fields has higher total density, organic matter, macro-nutrients and micro-nutrients than non-organic rice paddy fields. The study of diversity of cyanobacteria in organic rice fields and non-organic rice fields was conducted by collecting soil samples at pre-planting stage and tillering stage. The samples were diluted and cultured in BG11 and $BG11_0$. The results showed that the number of cyanobacteria cultured in BG11 is higher than those in $BG11_0$ and the number of cyanobacteria from tillering stage soil was higher than that soil collected from pre-planting stage. The genus of cyanobacteria in organic site rice fields revealed more insignificantly diverse

than non-organic rice fields. Characterization into genus level indicated that three orders, eight families and twelve genera of cyanobacteria with twelve isolates single cell and 42 isolates string type were found in two orders: Nostocales and Oscillatoriales. *Anabaena*, *Nostoc* and *Calothrix* are mostly dispersed. However, the study on growth and nitrogen fixation indicated four genera: *Anabaena*, *Nostoc*, *Fischerella* and *Calothrix* of which are available for bio-fertilizer production. The study on growth indicated that *Anabaena* R1 was the most appropriate genus with less doubling time and had the most ability for nitrogen fixation of which 36.13 nmoles/min/mg of proteins was detected, followed by *Anabaena* R2, *Anabaena* R3, *Nostoc* R12, *Fischerella* R23 and *Calothrix* R26, respectively. Moreover, the resistance to pesticides of cyanobacteria was also studied and there was no significant difference in terms of growth when cyanobacteria were cultured in $BG11_0$ medium added with 0-5 ppm butachlor. However, the growth of *Calothrix* R26 was higher than *Nostoc* R12, *Anabaena* R1 and *Fischerella* R23, respectively when cultured on the $BG11_0$ medium added with 10 ppm butachlor. The effect of the urea on growth of cyanobacteria was also tested and the results showed that the medium adding 0.05 g/l urea could induce the highest growth of *Calothrix* R26 followed by *Anabaena* R1, *Nostoc* R12 and *Fischerella* R23, respectively. However, an increase of urea concentration proved to reduce growth of cyanobacteria except *Anabaena* which was found that the medium adding 0.2 g/l urea could stimulate highest growth. Furthermore, the activity of nitrogenase enzyme tended to decrease with an increasing of urea concentration. At the same concentration of urea, *Anabaena* R1 has the most ability to fix nitrogen followed by *Nostoc* R12, *Fischerella* R23 and *Calothrix* R26, respectively. In conclusion, *Anabaena* R1 had the most usable properties to use as bio-fertilizer production.

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ดร.สงกรานต์ เชื้อครุฑ ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุตส่าห์สละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จีรพร เพกเกาะ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุพันธ์ กงบังเกิด ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล และ ดร.นิตยา ไชยเนตร กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร.บวร คุณากรนุรักษ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ หัวหน้ากลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน สำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) สำหรับทุนในการศึกษาและการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณอาจารย์อภิชาต งามรุ่งโรจน์ สำหรับภาพวาดไซยาโนแบคทีเรีย

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพดินนาต่อไปในอนาคตได้

สุรางค์รัตน์ พันแสง

สุรางค์รัตน์ พันแสง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

ประกาศคุณูปการ ..... ช

สารบัญ ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาของปัญหา 1

จุดมุ่งหมายของการศึกษา 2

ขอบเขตของงานวิจัย 3

ข้อตกลงเบื้องต้น 3

บทที่ 2 4

1. การปลูกข้าวของประเทศไทย 4

2. เกษตรอินทรีย์ 4

1.1 หลักการเกษตรอินทรีย์สากล หลักการเกษตรอินทรีย์ของ IFOAM มี 4 ประการ คือ 5

1.2 มาตรฐานเกษตรอินทรีย์ 5

2. ต้นทุนและผลตอบแทนจากการปลูกข้าว 7

4. อนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรีย 12

4.1 การจัดหมวดหมู่ 12
4.2 ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ 13
4.3 วิธีประเมินค่าการตรึงก๊าซไนโตรเจน 18
5. ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจน 19
5.1 อุณหภูมิ 19
5.2 เกลือ 20
5.3 รังสี 21
5.4 โลหะหนัก 21
5.5 ความเป็นกรด-ด่าง 22
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 46
1. การเก็บตัวอย่างดิน 46
2. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของดิน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2547) 51
2.1 การศึกษาลักษณะเนื้อดิน (soil texture) ใช้วิธี Hydrometer method 51
2.2 การศึกษาความหนาแน่นรวมของดิน (soil bulk density) ใช้วิธี Core method 52
3. การศึกษาลักษณะทางเคมีของดิน 52
3.1 ความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) โดยใช้เครื่องมือวัดปฏิกิริยาดิน (pH meter) ใช้อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:1 52
3.2 อินทรียวัตถุในดิน (Organic matter; OM) 53
3.3 ธาตุอาหารหลักในดิน (N-P-K) 54
3.4 ธาตุอาหารรองในดิน 57
4. การศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในดิน 58

5. การจัดจำแนกสกุลและชนิดไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ 61
6. การศึกษาอัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ 61
6.1 ศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 61
7. การจำแนกชนิดไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene 63
8. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน 65
8.1 แหล่งไนโตรเจน 65
8.2 สารปราบศัตรูพืช 66
9. การทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างของดิน 66
9.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว 66
9.2 การผลิตชีวมวล 66
9.3 การเตรียมตัวอย่างดิน 67
9.4 การทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างดิน 67
9.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน 67
บทที่ 4 68
1. การศึกษาลักษณะของดินในแปลงนาเกษตรอินทรีย์และแปลงนาที่ใช้สารเคมี 68
2. การศึกษาไซยาโนแบคทีเรียในดินนา 71
3. การศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าว 73
4. การศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ 103
5. การศึกษาความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย 106
6. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน.... 109
7. การทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างของดิน 114
บรรณานุกรม 121

ประวัติผู้วิจัย 132

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 สัญลักษณ์มาตรฐานเกษตรอินทรีย์ 6

ตาราง 2 โครงสร้างต้นทุนการปลูกข้าวอินทรีย์ และการปลูกข้าวที่ใช้สารเคมี (หน่วย : บาท/ไร่) 8

ตาราง 3 ผลตอบแทนการปลูกข้าวอินทรีย์ และการปลูกข้าวที่ใช้สารเคมี 9

ตาราง 4 ไซยาโนแบคทีเรียในแต่ละสกุลที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 15

ตาราง 5 ไซยาโนแบคทีเรียที่พบในดินนา 16

ตาราง 6 สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินนาข้าวในแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมี 70

ตาราง 7 เปรียบเทียบจำนวนไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมดในดินนาข้าวแปลงเกษตรอินทรีย์และดินนาข้าวที่ใช้สารเคมีที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร BG11 และ $BG11_0$ ก่อนฤดูเพาะปลูกข้าวและระยะออกรวงของ 3 จังหวัด 72

ตาราง 8 ไซยาโนแบคทีเรียที่พบในดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมีในระยะก่อนฤดูเพาะปลูกและระยะข้าวออกรวง 75

ตาราง 9 จำนวนไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แยกจากดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และปลูกแบบใช้สารเคมี 76

ตาราง 10 เปรียบเทียบความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาข้าวที่ใช้และไม่ใช้สารเคมีกับงานวิจัยอื่น 77

ตาราง 11 เปรียบเทียบความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาข้าวกับงานวิจัยอื่น ๆ 78

ตาราง 12 เปรียบเทียบความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาข้าวกับงานวิจัยอื่น ๆ (ต่อ) 79

ตาราง 13 ไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากดินนาข้าว.....81

ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้.....83

ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ).....84

ตาราง 15 ค่า doubing time ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ 105

ตาราง 16 ความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย..... 108

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินนาเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงดินนาที่ใช้สารเคมี (F) (เพชรบูรณ์ : BOA, BOB, BOC, BFA, BFB, BFC; พิจิตร : POA, POB, POC, PFA, PFB, PFC; อุทัยธานี : UOA, UOB, UOC, UFA, UFB, UFC).....46

ภาพ 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินนาเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงดินนาที่ใช้สารเคมี (F) ในตำบลโคกปรอำเภอวิเชียรบุรี จังหวัดเพชรบูรณ์.....47

ภาพ 3 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินนาเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงดินนาที่ใช้สารเคมี (F) ในตำบลหัวดงอำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร.....48

ภาพ 4 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินนาเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงดินนาที่ใช้สารเคมี (F) ในตำบลสะแกกรัง อำเภอเมือง จังหวัดอุทัยธานี.....49

ภาพ 5 แผนผังตำแหน่งที่เก็บดินตัวอย่างแบบสุ่มในแปลงย่อย.....50

ภาพ 6 ระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวและช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างดินในระยะก่อนฤดูเพาะปลูก (A) และระยะต้นข้าวออกรวง (B) การเก็บตัวอย่างดินเพื่อศึกษาลักษณะของดินเก็บดินระยะ A การเก็บตัวอย่างดินเพื่อศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียเก็บในระยะ A และ B.....60

ภาพ 7 การเปรียบเทียบจำนวนไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร BG11 และ $BG11_0$ในดินนาก่อนฤดูเพาะปลูกและระยะข้าวแตกกอในพื้นที่แตกต่างกัน ($x10^4$CFU/g).....73

ภาพ 8 การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเหลว $BG11_0$ ที่ผสม butachor ในความเข้มข้นที่ต่างกัน..... 111

ภาพ 9 ผลของ butachor ที่มีต่อความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย..... 112

ภาพ 10 ผลของปุ๋ยยูเรียที่มีต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย..... 113

ภาพ 11 ผลของปุ๋ยยูเรียที่มีต่อความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย..... 113

ภาพ 12 เปรียบเทียบกรรมวิธีทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างของดินด้วย..... 115

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากที่สุดชนิดหนึ่งในปี พ.ศ. 2562 มีการผลิตข้าวทั่วโลกปริมาณ 501 เมกะตัน และการบริโภคเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 179 กรัมต่อคนต่อวัน สูงกว่าปี 2543 ถึง 19.3% แม้ว่าทวีปเอเชียจะเป็นแหล่งสำคัญในการปลูกข้าว แต่ก็พบได้ในทวีปอื่น ๆ เช่น ละตินอเมริกา ยุโรป บางส่วนของแอฟริกาและสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ทศวรรษที่ 1960 อัตราการเติบโตของข้าวในเอเชียใต้มีการเติบโตอย่างก้าวกระโดด (Pingali and Heisey, 1996) และมีหลักฐานชี้ชัดว่าการปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินและอินทรียวัตถุลดลง (Yadav et al., 1998) ปัญหาวัชพืชทวีความรุนแรง รวมทั้งการดื้อยากำจัดวัชพืชและปัญหาแมลงศัตรูพืช (Malik et al., 1998)

คุณภาพดินเป็นหนึ่งในตัวแปรหลักในระบบการเกษตรและการผลิตอย่างยั่งยืน คุณภาพดินประกอบด้วย ส่วนประกอบทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ การทำการเกษตรแบบเข้มข้น กระบวนการผลิต การใช้สารเคมี และการใช้ทรัพยากรดินที่ไม่ยั่งยืน ส่งผลให้ส่วนประกอบทางชีวภาพของดินมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด ความหลากหลายของประชากรที่มีชีวิตและการทำงานของจุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการทำการเกษตรแบบยั่งยืน สิ่งเหล่านี้สามารถทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของความมั่นคงของสังคมสิ่งมีชีวิต และสามารถใช้อธิบายพลวัตทางนิเวศวิทยาของชุมชนและผลกระทบที่มีต่อชุมชนนั้น ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ คือ การขาดข้อมูลโดยละเอียดเกี่ยวกับชนิดของจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมของดิน และแนวทางการจัดการในพื้นที่เกษตรกรรมในระยะยาว การปรับปรุงดินด้วยอินทรียวัตถุช่วยส่งเสริมพัฒนาการของพืชและปรับปรุงคุณภาพดิน รวมทั้งมีผลในการยับยั้งโรคต่าง ๆ (Cotxurrera et al., 2002) การประเมินทั้งในระดับจุลภาคและการทดลองภาคสนามแสดงให้เห็นว่าอินทรีย์วัตถุไม่เพียงแต่ทำหน้าที่ปรับปรุงโครงสร้างของดิน แต่ยังมีผลอย่างมากต่อจุลินทรีย์ในดิน (Crecchio et al., 2001)

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่โดดเด่นในนาข้าว ช่วยรักษาและปรับปรุงผลผลิตของนาข้าว (Roger et al., 1993) เชื้อเหล่านี้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงและความแห้งแล้งได้ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงที่น่าทึ่งในการเจริญ การตรึงก๊าซไนโตรเจน (Goyal, 1997) นอกจากนี้เชื้อเหล่านี้ยังได้รับ

การยอมรับว่าเป็นตัวการที่สำคัญในการรักษาเสถียรภาพของผิวดิน (Bailey et al., 1973) จากการผลิตโพลีแซคคาไรด์จากภายนอกเซลล์ ความต้องการในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเกิดจากความเชื่อก่อนหน้านี้ว่า ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้จะไม่แพร่หลายในนาข้าว มีเพียง 5% จาก 911 ตัวอย่าง หรือ 33% จาก 2,213 ตัวอย่าง (Okuda and Yamaghchi, 1975) และ 71% ของดินในประเทศญี่ปุ่นที่มีไซยาโนแบคทีเรียเกิดขึ้น (Watanabe and Yamamoto, 1971) สิ่งเหล่านี้นำไปสู่การพัฒนาไซยาโนแบคทีเรียเป็นปุ๋ยชีวภาพ โดยเฉพาะในนาข้าวที่มีน้ำขัง เนื่องจากสภาพนาข้าวเอื้อต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

การศึกษาการผลิตปุ๋ยชีวภาพ การปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ มุ่งเน้นไปที่การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในดินหรือเพิ่มผลผลิตพืช อย่างไรก็ตามรายงานมีจำกัดมากเกี่ยวกับการกระจายและความชุกของไซยาโนแบคทีเรีย รวมทั้งการศึกษาอนุกรมธานของไซยาโนแบคทีเรียในแปลงปลูกพืชต่าง ๆ (Pereira et al., 2000) นอกเหนือจากข้อเท็จจริงที่ว่าไซยาโนแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในวัฏจักรไนโตรเจนและคาร์บอนในดิน ในพื้นที่เพาะปลูกจะพบสาหร่ายได้ที่ระดับความลึก 20 ซม. เนื่องจากการพลิกกลับของดินระหว่างการไถพรวน ชนิดของพืชปลูกมีอิทธิพลต่อความชุกของสาหร่าย จำนวนประชากรของไซยาโนแบคทีเรียพบมากในพื้นที่ทางการเกษตร โดยเฉพาะพื้นที่เพาะปลูกข้าว (Somporn et al., 2003) สายพันธุ์ที่พบในพื้นที่เพาะปลูกข้าว ได้แก่ *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Westiellopsis*, *Hapalosiphon*, *Aulosira*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Lyngbya* และ *Aphanocapsa* (Nayak and Prasanna, 2007)

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าวอินทรีย์และดินนาข้าวที่ใช้สารเคมี และคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีการเจริญความสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ดี และสามารถทนต่อสารเคมีทางการเกษตร เพื่อนำไปพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพใช้ในนาข้าวต่อไป

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าวอินทรีย์และดินนาข้าวที่ใช้สารเคมี
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญและการตรึงก๊าซไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้

3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในการปรับปรุงโครงสร้างดินในระดับห้องปฏิบัติการ

4. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพ

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมีในเขตภาคเหนือตอนล่าง 3 จังหวัด คือ เพชรบูรณ์ พิจิตร และอุทัยธานี และศึกษาลักษณะทางกายภาพของดิน ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน ความหนาแน่นรวมของดิน ลักษณะทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง อินทรียวัตถุในดิน ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง รวมถึงการเก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียในดินแปลงนาก่อนฤดูเพาะปลูกและระยะข้าวออกรวง อีกทั้งยังศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน โดยใช้เทคนิค Acetylene reduction assay พร้อมทั้งเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนสูงสุด 5 สปีชีส์ และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย และสารปราบวัชพืช (บิวทาคอร์)

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. แปลงนาอินทรีย์ คือ แปลงนาที่ได้รับมาตรฐาน IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements)

2. แปลงนาเคมี คือ แปลงนาที่ทำการเกษตรโดยใช้สารเคมีมาอย่างน้อย 10 ปี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. การปลูกข้าวของประเทศไทย

ในปัจจุบันมีการแบ่งการปลูกข้าวไว้ 4 วิธี คือ การปลูกข้าวนาดำ การปลูกข้าวนาหว่าน การปลูกข้าวไร่และการปลูกข้าวนาขั้นบันได แต่ละวิธีจะขึ้นกับลักษณะของพื้นที่การปลูกข้าวในปัจจุบันมีการใช้แรงงานคนน้อยลง เนื่องจากแรงงานในภาคเกษตรลดลงไม่เพียงพอต่อความต้องการและค่าจ้างสูง ดังนั้นเกษตรกรจึงหันมาใช้เครื่องจักรกลการเกษตรในรูปแบบต่าง ๆ ทดแทนแรงงานคน5

1.1 การปลูกข้าวนาดำ หมายถึง การปลูกข้าวในสภาพพื้นที่ลุ่ม โดยใช้ต้นกล้าปักดำลงไปในแปลงนา แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะต้นกล้า และระยะปักดำ

1.2 การปลูกข้าวนาหว่าน หมายถึง การปลูกข้าวในสภาพลุ่มน้ำขัง โดยใช้เมล็ดข้าวที่แช่น้ำแล้วหว่านในแปลงนา มีอยู่ 2 แบบ คือ การหว่านข้าวนาน้ำตมและการหว่านข้าวนาแห้งขึ้นกับลักษณะของพื้นที่

1.3 การปลูกข้าวไร่ หมายถึง การปลูกข้าวในสภาพที่ไม่มีน้ำขัง และใช้น้ำฝนเท่านั้น พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่สูง เชิงเขา หรือบนดอย ซึ่งจะใช้วิธีการหยอดเป็นหลุม หรือการโรยเป็นแถว

1.4 การปลูกข้าวแบบนาขั้นบันได หมายถึง การปลูกข้าวบนดอยหรือบริเวณพื้นที่สูง ทำการปรับพื้นที่ตามไหล่เขาให้เป็นขั้นบันได คันนาต้องกว้างสามารถขังน้ำได้

2. เกษตรอินทรีย์

หน่วยงานที่เรียกว่า “สหพันธ์เกษตรอินทรีย์นานาชาติ (International Federation of Organic Agriculture Movements) หรือ IFOAM” ได้ให้ความหมายของเกษตรอินทรีย์ไว้ว่า

“เป็นระบบเกษตรที่ผลิตอาหารและเส้นใยด้วยความยั่งยืนทางสิ่งแวดล้อม สังคม และเศรษฐกิจ โดยเน้นที่หลักการปรับปรุงบำรุงดิน การเคารพต่อศักยภาพทางธรรมชาติของพืช สัตว์ และนิเวศการเกษตร เกษตรอินทรีย์จึงลดการใช้ปัจจัยจากภายนอกและหลีกเลี่ยงการใช้สารสังเคราะห์ เช่น ปุ๋ย สารกำจัดศัตรูพืช และเวชภัณฑ์สำหรับสัตว์ แต่ในขณะเดียวกันก็พยายามประยุกต์ใช้

ธรรมชาติในการเพิ่มผลผลิต และพัฒนาความต้านทานต่อโรคของพืชและสัตว์เลี้ยง หลักการเกษตรอินทรีย์นี้เป็นหลักการสากลที่สอดคล้องกับเงื่อนไขทางด้านสภาพภูมิอากาศ เศรษฐกิจ สังคม และวัฒนธรรมท้องถิ่นด้วย”

1.1 หลักการเกษตรอินทรีย์สากล หลักการเกษตรอินทรีย์ของ IFOAM มี 4 ประการ คือ

1.1.1 หลักของสุขภาพ (Health) เกษตรอินทรีย์ทำให้ดินมีความอุดมสมบรูณ์ พืชงอกงาม มีสุขภาพดี สัตว์ที่กินพืชปราศจากสารพิษ สุขภาพสมบูรณ์ ส่งผลให้ผู้บริโภคมีสุขภาพที่ดี

1.1.2 หลักของระบบนิเวศ (Ecology) การทำฟาร์มเกษตรอินทรีย์ต้องจัดการให้ดิน พืช สัตว์ ให้สามารถเกื้อกูลกัน โดยการหมุนเวียนใช้ประโยชน์ของอินทรีย์สารในฟาร์มให้มากที่สุด

1.1.3 หลักของความเป็นธรรม (Fairness) การทำเกษตรอินทรีย์ต้องคำนึงถึงความสัมพันธ์ของเกษตรกร ผู้ประกอบการแปรรูป ผู้จัดจำหน่าย และผู้บริโภค

1.1.4 หลักของการมีสำนึกที่ดี (Care) ผู้เกี่ยวข้องต้องมีสำนึกที่ดีในการผลิตไม่เสี่ยงต่อการทำลายระบบนิเวศ และคุณภาพชีวิตของสิ่งมีชีวิต เข้าใจในระบบนิเวศเกษตรธรรมชาติของห่วงโซ่อาหารไม่ใช้สารเคมีใดฮอร์โมนตลอดจนพืชหรือสัตว์ที่มีตัดต่อพันธุกรรม (GMO_s)

1.2 มาตรฐานเกษตรอินทรีย์

องค์กรที่รับรองหน่วยตรวจสอบรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ (Accredited Certification Bodies: AB) จะเป็นผู้ที่กำหนดมาตรฐานขึ้น โดยอาจจะเป็นองค์กรรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ (Certification Body: CB) ด้วยตนเองหรือให้ผู้อื่นตรวจสอบรับรองตามมาตรฐานที่ตนเองกำหนดก็ได้แต่องค์กรรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์อื่น ๆ ต้องได้รับการรับรองจากหน่วยตรวจสอบรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์เสียก่อนว่าองค์กรรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์นั้นสามารถตรวจสอบตามมาตรฐานที่หน่วยตรวจสอบรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์กำหนดได้

มาตรฐานเกษตรอินทรีย์ ยังแบ่งได้เป็น แบบบังคับ และสมัครใจ

มาตรฐานเกษตรอินทรีย์ที่ต้องปฏิบัติ (บังคับ) เป็นมาตรฐานหรือกฎระเบียบของรัฐ/ประเทศ ซึ่งต้องปฏิบัติเมื่อต้องการนำสินค้าอินทรีย์เข้าไปจำหน่ายในประเทศนั้นๆ

มาตรฐานเกษตรอินทรีย์เอกชน เป็นมาตรฐานที่ไม่บังคับ (สมัครใจขอรับรอง) มักเกิดขึ้นก่อนมาตรฐาน/กฎระเบียบของรัฐ และเป็นที่รู้จักและไว้วางใจของผู้บริโภคในประเทศนั้นๆ

มาตรฐานพื้นฐานสำหรับองค์กรรับรอง (CBs – Certification Bodies) เช่น IFOAM Accredited มาตรฐาน Codex

ตาราง 1 สัญลักษณ์มาตรฐานเกษตรอินทรีย์

มาตรฐานเกษตรอินทรีย์ที่ต้องปฏิบัติ (บังคับ)	มาตรฐานเกษตรอินทรีย์เอกชน (ไม่บังคับ)	มาตรฐานพื้นฐานสำหรับองค์กรรับรอง
EEC 834/2007 = สหภาพยุโรป	Soil Association = อังกฤษ	IFOAM Accredited
JAS = ญี่ปุ่น	Bio Suisse = สวิตเซอร์แลนด์	BIO = เยอรมนี
NOP = สหรัฐอเมริกา	Naturland = เยอรมนี	

มีองค์กรรับรองเอกชนประมาณ 30 องค์กร ในหลายประเทศ ที่ได้รับการรับรองจาก IFOAM (ACBs – Accredited Certification Bodies) ในประเทศไทย สำนักงานมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ (มกท.) เป็นหน่วยงานที่ได้รับการรับรอง

สำหรับประเทศไทยมีมาตรฐาน มกษ. ซึ่งมี AB คือ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) และ CB คือ กรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ข้าว-กรมการข้าว ปศุสัตว์-กรมปศุสัตว์ สัตว์น้ำ-กรมประมง ผักผลไม้-กรมวิชาการเกษตร ฯลฯ โดยในปัจจุบันใช้ตราสัญลักษณ์ Organic Thailand การนำเข้าสินค้าหรือสินค้าที่ผลิตในประเทศไทยไม่ได้บังคับว่าจะต้องได้รับมาตรฐานดังกล่าว

2. ต้นทุนและผลตอบแทนจากการปลูกข้าว

ต้นทุน หมายถึง ต้นทุนทั้งสิ้นที่ใช้ในการปลูกข้าวของเกษตรกร ทั้งค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นจริงที่ได้จ่ายเป็นตัวเงิน หรือเรียกว่าต้นทุนทางตรง (Explicit Cost) รวมทั้งค่าใช้จ่ายที่ไม่ได้จ่ายออกไปจริง (Implicit Cost) ค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตสินค้าและบริการที่หน่วยผลิตได้จ่ายไปในการผลิตสินค้าและบริการทั้งหมดประกอบด้วยต้นทุนด้านต่าง ๆ ดังนี้

ต้นทุนทางตรง (Direct Cost) หมายถึง ต้นทุนที่ต้องจ่ายออกไปในรูปแบบของเงินในการซื้อหาปัจจัยการผลิตหรืออาจเรียกว่า ต้นทุนแจ้งชัด (Explicit Cost) หรือต้นทุนทางบัญชี (Accounting Cost) เช่น ค่าจ้างแรงงาน ค่าซ่อมแซมเครื่องจักร ค่าวัตถุดิบ ค่าน้ำมันเชื้อเพลิง เป็นต้น ต้นทุนทางตรงนี้ยังแยกได้อีกเป็น 2 ประเภท คือ

1. ต้นทุนคงที่ (Fixed Cost) หมายถึง ต้นทุนที่จ่ายคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามปริมาณการผลิต หรือผลิตมากน้อยเท่าไหร่ก็ต้องเสียค่าใช้จ่ายเท่าเดิม เช่น ค่าที่ดิน ค่าก่อสร้าง ค่าเครื่องจักร เป็นต้น

2. ต้นทุนแปรผัน (Variable Cost) หมายถึงต้นทุนที่เปลี่ยนแปลงไปตามปริมาณการผลิต ต้นทุนประเภทนี้จะสูงขึ้น ถ้าปริมาณการผลิตเพิ่มขึ้น และจะลดลงถ้าผลิตน้อยลง หรือเป็นศูนย์ถ้าไม่ผลิตเลย เช่น ค่าจ้างคนงาน ค่าวัตถุดิบ เป็นต้น

ผลตอบแทน หมายถึง ผลตอบแทนที่ได้รับจากการปลูกข้าวของเกษตรกร

ตาราง 2 โครงสร้างต้นทุนการปลูกข้าวอินทรีย์ และการปลูกข้าวที่ใช้สารเคมี (หน่วย : บาท/ไร่)

ต้นทุน	ข้าวอินทรีย์	ข้าวที่ใช้สารเคมี
ค่าเช่า	776.4	802.51
ค่าพันธุ์ข้าว	510.7	587.14
ค่าดึงน้ำ	280.0	339.32
ค่าเตรียมดิน	398.0	346.3
ค่าปุ๋ย	498.8	784.54
ค่าสารกำจัดศัตรูพืช	263.6	546.95
ค่าเกี่ยวตัด	462.6	445.1
ค่าขนส่ง	62.5	152.6
รวม	**3,252.6**	**4,004.47**

ที่มา : จากการคำนวณ

หมายเหตุ : ทุกรายการ รวมค่าแรงงาน และค่าเสียโอกาสแล้ว

ตาราง 3 ผลตอบแทนการปลูกข้าวอินทรีย์ และการปลูกข้าวที่ใช้สารเคมี

ผลตอบแทน	ข้าวอินทรีย์	ข้าวที่ใช้สารเคมี
ราคาข้าว(บาท/ตัน)	20,000	13,800
ผลผลิตเฉลี่ย(กก./ไร่)	500	450
รายได้เฉลี่ย(บาท/ไร่)	3515.73	2837.07
ต้นทุนเฉลี่ย(บาท/ไร่)	3252.56	4004.47
กำไรเฉลี่ย(บาท/ไร่)	263.17	-975.94
ค่าเสียโอกาส(บาท/ไร่)	64.97	53.67

ที่มา : จากการคำนวณ

อรกร (2012) รายงานว่า การปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์ให้ผลตอบแทนสูงกว่าเกษตรเคมีในเกือบทุกพื้นที่ และการประมวลผลโดยวิธีการทางสถิติ ยังพบอีกว่าราคาของผลผลิตและรายได้เฉลี่ยที่สูงกว่ารวมถึงต้นทุนเฉลี่ยที่ต่ำกว่า ทำให้ผลตอบแทนจากการปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์สูงกว่าเกษตรเคมีอย่างมีนัยสำคัญ

จุฑาทิพย์และคณะ (2551) เปรียบเทียบต้นทุนและผลตอบแทนจากการปลูกข้าวอินทรีย์และข้าวที่ใช้สารเคมีของเกษตรกรในอำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี พบว่าการผลิตข้าวอินทรีย์มีต้นทุนทั้งหมดเฉลี่ยต่อไร่เท่ากับ 3,718.10 บาท รายได้ทั้งหมดเฉลี่ยต่อไร่เท่ากับ 8,350.20 บาท การผลิตข้าวที่ใช้สารเคมีมีต้นทุนทั้งหมดเฉลี่ยต่อไร่เท่ากับ 4,534.08 บาท รายได้ทั้งหมดเฉลี่ยต่อไร่เท่ากับ 9,710.52 บาท ดังนั้นจึงพบว่าผู้ผลิตข้าวที่ใช้สารเคมีให้ผลผลิตต่อไร่สูงกว่าข้าวอินทรีย์ แต่มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าเกษตรกรผู้ผลิตข้าวใช้สารเคมี

อัทธ์ (2554) เปรียบเทียบศักยภาพการผลิตและการค้าข้าวไทยและเวียดนามในตลาดอาเซียน พบว่า ในประเทศอาเซียนเวียดนามมีผลผลิตต่อไร่สูงเป็นอันดับหนึ่ง ในขณะที่ไทยเป็นอันดับที่เจ็ด ต้นทุนการผลิตของจังหวัดเกิ่นเทอของเวียดนามมีต้นทุนการผลิตอยู่ที่ 4,978 บาทต่อไร่ ส่วนจังหวัดอยุธยาอยู่ที่ 5,800 บาทต่อไร่

3. ลักษณะทางชีววิทยาของไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) จัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta มีรูปร่างได้ 2 แบบ คือ เป็นเซลล์เดียวและมีลักษณะเป็นเส้นสาย และเป็นกลุ่มสาหร่ายที่มีจำนวนชนิดมากที่สุด คือ มีถึง 7,500 สปีชีส์ หรืออาจมากกว่านี้ (Chapman and Chapman, 1975) ในสภาพธรรมชาติไซยาโนแบคทีเรียสามารถอาศัยอยู่ได้อย่างอิสระเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรืออยู่รวมกันเป็นโคโลนี หรืออยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ (Singleton and Sainsbury, 1987) แต่ต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น คือ สามารถได้รับพลังงานผ่านระบบสังเคราะห์แสง และบางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เนื่องจากมีเอนไซม์ไนโทรจีเนส โดยทั่วไปแต่ละเซลล์ของ ไซยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วยผนังเซลล์ที่หนา แต่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ คือ ระบบ quorum sensing ซึ่งไม่พบการสร้าง acyl-homolactone ผนังเซลล์หุ้มด้วย gelatinous sheath และมีสีที่ต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับชนิดของรงควัตถุ เช่น chlorophyll a, carotenoid และ phycobilins เป็นต้น (หนึ่ง เตียอำรุง, 2554) ไซยาโนแบคทีเรียไม่มีคลอโรพลาสต์ที่ชัดเจน มีเพียงแต่ไทลาคอยด์ ซึ่งอยู่เดี่ยว ๆ ไม่มีเยื่อหุ้ม และไม่มีการจัดเรียงตัวกันเป็นชั้นบาง ๆ พบเป็นอิสระทั่ว ๆ ไปในเซลล์ Sze (1986) กล่าวไว้ว่า ไฟโคบิลลิโปรตีนในไซยาโนแบคทีเรีย มีอยู่ 4 ชนิด คือ ไฟโคอิริทริน (phycoerythrin) ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) และ ไฟโคอิริโทรไซยานิน(phycoerythrocyanin) โดยไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานิน พบในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิด และไฟโคไซยานินทำให้เซลล์มีสีน้ำเงินแกมเขียว หน้าที่ของไฟโคบิลลิโซม คือ รับแสงที่ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน และส่งผ่านไปเพื่อใช้ในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Grazer,1987) จัดเป็นข้อแตกต่างระหว่างพืชชั้นสูงและไซยาโนแบคทีเรีย รวมถึงไทลาคอยด์ซึ่งขดไปมาภายในเซลล์ ทำหน้าที่คล้ายกับคลอโรพลาสต์ในพืชที่มีสีเขียวซึ่งทำหน้าที่เป็นคลื่นลูกโซ่อิเลคตรอนเพื่อสร้างพลังงาน (Singleton and Sainsbury, 1987)

Desikachary (1959) กล่าวว่า ไซยาโนแบคทีเรียมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ผนังชั้นในบางประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส ผนังชั้นนอกหนา ประกอบด้วยสารพวกเจลลาติน แต่ Prescott (1978) ไซยาโนแบคทีเรียมีผนังเซลล์ถึง 3 ชั้น ชั้นในเป็นชั้นที่บาง ประกอบด้วยเซลลูโลส ชั้นกลางเป็นสารพวกเพคติน ส่วนชั้นนอกสุดเป็นสารเมือกเจลลาติน ไซโตพลาสซึมแบ่งออกเป็น 2 ส่วน บริเวณส่วนใน ไม่มีรงควัตถุจึงไม่มีสี เรียกว่า เซนโทรพลาสซึม (centroplasm) ส่วนบริเวณรอบนอกเป็นบริเวณที่มีรงควัตถุสะสมอยู่ เรียกว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm) บริเวณโครโมพลาสซึมจะมีโครงสร้างที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายทั่วไป เรียกว่า ไซยาโนไฟซินแกรนูล (cyanophycin granule)

ไซยาโนแบคทีเรียไม่มีนิวเคลียสชัดเจนเหมือนสาหร่ายอื่น แต่มีสารที่ทำหน้าที่คล้ายนิวเคลียสอยู่ภายในเซนโทรพลาสซึมและไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส(nuclear membrane) สารที่ทำหน้าที่คล้ายนิวเคลียส คือ Deoxyribonucleic acid (DNA) ซึ่งอาจจะรวมตัวกันเป็นร่างแหหลวม ๆ หรือเป็นท่อนสั้น ๆ หรืออาจจับตัวกันแน่น มีรูปร่างต่าง ๆ (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2549) ระบบสืบพันธุ์เป็นแบบไม่อาศัยเพศ อาศัยโครงสร้างที่เรียกว่าเซลล์อะไคนีต (akinete cell) มีลักษณะคล้ายสปอร์ที่มีผนังเซลล์หนากว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell) และสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังมีเซลล์อีกประเภทหนึ่ง คือ เซลล์เฮเทอโรซีสต์ (heterocyst cell) เป็นเซลล์ที่เกิดจากกระบวนการ differentiation ของเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์หนาเพื่อป้องกันออกซิเจนจากสิ่งแวดล้อม

ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง เช่น ในนาข้าวที่มีน้ำขัง ไซนาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในดินส่วนใหญ่เป็นพวกเซลล์เดียว หรือเป็นเส้นสาย filament ขนาดเล็กเท่านั้น ปริมาณที่พบอยู่ในช่วงประมาณ 10^3-10^6 cfu ต่อดินแห้ง 1 กรัม แต่ในเขตร้อนชื้นมักพบในปริมาณที่มากกว่าบทบาทของไซยาโนแบคทีเรีย โดยทั่วไปในดินได้แก่ การเพิ่มอินทรียวัตถุให้กับดิน

เฮเทอโรซีสท์ เป็นเซลล์พิเศษที่พบในไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น ใน Order Nostocales และ Order Stigonematales เท่านั้น เกิดได้โดยเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในเส้นสายมีขนาดใหญ่มากกว่าเซลล์ธรรมดา หลังจากนั้นผนังเซลล์จะสร้างไฟปรัส (fibrous) เป็นชั้น ๆ ขึ้นมา เฮเทอโรซีสต์จะมีลักษณะใสมากกว่าอะคีนีทเนื่องจากอะคีนีทมีการสะสมอาหารเอาไว้ส่งผลให้เซลล์ทึบแสง เซลล์เฮเทอโรซีสต์เมื่อแรกจะมีลักษณะเหลี่ยมเหมือนเซลล์อื่นๆ ต่อมาจะค่อยๆ กลมขึ้น หลังจากนั้น ไซโตพลาสซึมจะไหลผ่านรูเล็กๆ ที่ผนังเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียงทำให้สีซีดลง เพราะขาดรงควัตถุในการสังเคราะห์แสงเหลือเฉพาะแคโรทีน

บริเวณด้านข้างของเฮเทอโรซีสต์ที่ติดกับเซลล์อื่นจะมีการสะสมสารที่เป็นองค์ประกอบ ของผนังเซลล์มาพอกอยู่มากกว่าบริเวณอื่นๆ มองเห็นเป็นตุ่มเล็กๆ ทั้ง 2 ด้าน เรียกว่า polar nodule และบริเวณตำแหน่งรอยต่อของเฮเทอโรซีสต์กับเซลล์ข้างเคียงแตกหักออกจากกัน เฮเทอโรซีสต์จึงทำหน้าที่คือขยายพันธุ์ และถ้าหลุดออกจากเส้นสายก็จะสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมมากกว่าเซลล์ธรรมดา เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะงอกเป็นเส้นสายใหม่ได้

เฮเทอโรซีสต์ของไซยาโนแบคทีเรียมี 2 แบบ คือ 1) Intercalary heterocyst เกิดอยู่ระหว่างเซลล์ปกติ และ 2) Terminal heterocyst เกิดอยู่ที่ปลายของเส้นสาย

4. อนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรีย

4.1 การจัดหมวดหมู่

นักพฤกษศาสตร์ได้จัดไซยาโนแบคทีเรียอยู่ใน Division Cyanophyta, Class Myxophyceae ตามการจัดจำแนกของ International Code of Botanical Nomenclature แต่หลังจากที่จัดไซยาโนแบคทีเรียเป็นโพรคาริโอทแล้ว ก็ได้จัดจำแนกใหม่โดยใช้หลักของ International Code of Nomenclature of Bacteria ซึ่งนักแบคทีเรียวิทยาได้จำแนกไซยาโนแบคทีเรีย ดังนี้

Kingdom : Prokaryotae

Division : Gram-negative bacteria

Class : Photobacteria

Subclass : Oxyphotobacteria

Order : Cyanobacteriales

Desikachary (1959) แบ่งเป็น 5 ออร์เดอร์ และ Anagnostidis and Komarek (1988), Komarek and Anagnostidis (1989), Anagnostidis and Komarek (1990), Komarek and Anagnostidis (1999) และ Komarek et al. (2003) ยุวดี พีรพรพิศาล (2549) และ Whitton (2011) แบ่งเป็น 4 ออร์เดอร์ ดังนี้

Order 1 Chroococcales เป็นพวกเซลล์เดียว โดยเซลล์อาจจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นโคโลนี สืบพันธุ์โดยวิธีแบ่งเซลล์ มี 11 แฟมิลี

Order 2 Oscillatoriales มีลักษณะเป็นเส้นสาย อาจจะเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนงหรือแตกแขนงแบบไม่แท้จริง บางชนิดมีเมือกหุ้ม เซลล์มีรูปร่างแบบทรงกระบอก ไม่มีการสร้างเฮเทอโรซีสต์หรืออะคินีท สืบพันธุ์โดยการใช้วิธีขาดเป็นท่อน ๆ อาจจะสร้างฮอร์โมโกเนียม ประกอบไปด้วย 6 แฟมิลี

Order 3 Nostocales มีลักษณะเป็นเส้นสาย ไม่แตกแขนง มีชีทหุ้มหนาหรือบางแล้วแต่ชนิด เซลล์มีรูปร่างกลม หรือเหลี่ยมเล็กน้อยแล้วป่องตรงกลาง บางชนิดเป็นแบบทรงกระบอก มีเฮเทอโรซีสต์ ซึ่งอาจจะเป็นเทอร์มินัลเฮเทอโรซีสต์ หรืออินเตอร์คาลารีเฮเทอโรซีสต์ มีการสร้างอะคินีท ประกอบไปด้วย 4 แฟมิลี

Order 4 Stigonematales มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนงได้หลายแบบ มีทั้งแตกแขนงจริงและไม่แท้จริง และแต่ละแบบจะมีการแตกแขนงได้หลายทิศทาง เซลล์ที่มีลักษณะเป็นเส้นสายนั้นประกอบด้วยเซลล์แถวเดียว 2 แถว หรือมากกว่า ชีทที่หุ้มมักมีสีเหลืองหรือน้ำตาล มีการสร้างเฮเทอโรซีสต์ สืบพันธุ์โดยการสร้างฮอร์โมโกเนียม ไม่มีการสร้างอะคินีท ประกอบด้วย 8 แฟมิลี

4.2 ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้

ไซยาโนแบคทีเรียมีทั้งพวกที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวและพวกที่มีลักษณะเป็นเส้นสายทั้งสร้างเฮเทอโรซีสต์และไม่มีการสร้างเฮเทอโรซีสต์ Fogg et al. (1973) กล่าวไว้ว่า เฮเทอโรซีสต์เป็นตัวสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่สามารถเปลี่ยน ไดไนโตรเจน (dinitrogen) ให้เป็นแอมโมเนีย และจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโปรตีน พวกที่มีการสร้างเฮเทอโรซีสต์จะสามารถตรึงไนโตรเจนได้ทั้งสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แต่พวกที่ไม่มีการสร้างเฮเทอโรซีสต์จะตรึงไนโตรเจนได้เฉพาะในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น

ไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่มีเฮเทอโรซีสต์จะสร้างเฮเทอโรซีสต์ และสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ molybdenum iron protein (Mo-Fe Protein) และ Iron protein (Fe-Protein) โดยโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถถูกทำลายได้ด้วยออกซิเจน ถ้าสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ไนเตรทหรือแอมโมเนียจะยับยั้งการเกิดเฮเทอโรซีสต์ การตรึงไนโตรเจน เกิดขึ้นได้ดังสมการ

$$N_2 + 6H+ + 6e- + 12ATP \xrightarrow{\text{nitrogena}} 2NH_3 + 12ADP + 12Pi$$

$$NH_3 + H2O \xrightarrow{\text{nitrogena}} NH_4^+ + OH-$$

ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไนโตรจีเนสต้องการพลังงานจาก ATP เพื่อเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และสามารถเปลี่ยนอะเซทีลีนได้ดังสมการ

$$\text{(Acetylene)}C_2H_2 + 2H+ + 2e- \xrightarrow{\text{nitrogena}} C_2H_4 \text{ (Ethylene)}$$

จากปฏิกิริยาดังกล่าวจึงสามารถใช้หาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนทางอ้อมได้โดยการศึกษาการเปลี่ยนก๊าซอะเซทีลีนเป็นก๊าซเอทีลีนและวัดปริมาณก๊าซเอทีลีนที่เกิดขึ้นด้วย

gas chromatography

ยุวดี พีรพรพิศาล (2549) กล่าวไว้ว่า ไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเฮเทอโรซีสต์เลยก็สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ถ้าเป็นพวกเซลล์เดียว ได้แก่ Gloeocapsa ที่เป็นโคโลนี ได้แก่ Aphanothece พวกที่เป็นเส้นสาย ได้แก่ Nostoc, Anabaena, Microcoleus, Tolypothrix, Cylindrospermum, Anabaenopsis, Calothrix, Mastigocladus, และ Cylindrospermopsis

Motsara et al. (1995) ได้ทำการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียในนาข้าว พบจำนวน 27 สกุล และแต่ละสกุลสามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยเฉพาะสกุล Anabaena, Nostoc เป็นสกุลที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ทุกสายพันธุ์

Motsara et al., (1995) ได้ทำการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียในประเทศอินเดีย พบว่า มีไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 27 สกุล แต่ละสกุลมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ และสกุล *Anabaena* และ *Nostoc* เป็นสกุลที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ทุกสายพันธุ์ รายละเอียดในตาราง 2

Teaumroong et al., (2002) ศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน ภายใต้ระบบนิเวศต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่า มีไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 853 สกุล และสกุล *Anabaena* จำนวน 44 สายพันธุ์ และ *Nostoc* จำนวน 45 สายพันธุ์ รายละเอียดในตาราง 2

ตาราง 4 ไซยาโนแบคทีเรียในแต่ละสกุลที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

Motsara et al., (1995)	Teaumroong et al., (2002)
Gloeocapsa	*Anabaena*
Lyngbya	*Nostoc*
Oscillatoria	*Scytonema*
Phormidium	*Stigonema*
Anabaenopsis	*Calothrix*
Cylindrospermum	*Tolypothrix*
Anabaena	*Hapalosiphon*
Wollea	*Fischerella*
Nostoc	*Nodularia*
Nodularia	*Anabaenopsis*
Chlorogloea	*Cylindrospermum*
Aulosira	
Plectonema	
Scytonematopsis	
Scytonema	
Tolypothrix	
Calothrix	
Ruvularia	
Glocotrichia	
Nostochopsis	
Mastigocladopsis	
Mastigocladus	
Stigonenema	
Fischetell	
Hapalosiphon	
Hlestiella	

ตาราง 5 ไซยาโนแบคทีเรียที่พบในดินนา

ประเทศไทย (สมถวิล วัลลิสุต; 2531)	ประเทศอินเดีย (Choudhary and Bimal; 2010)
Anabaena	*Anabaena*
Cylindrospermum	*Anabaenopsis*
Nostoc	*Aulosira*
Scytonema	*Cylindrospermum*
Tolypothrix	*Nostoc*
Calothrix	*Aphanizomenon*
Gloeotrichia	*Nodularia*
Rivularia	
Mastigocladus	
Fischerella	
Hapalosiphon	
Stigonema	

สมถวิล วัลลิสุต (2531) พบว่าไซยาโนแบคทีเรียของไทยที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ พบในตัวอย่างดินนาประเทศไทยมีอยู่ 12 สกุล จัดอยู่ใน 2 Order 5 Family แต่ (Choudhary and Bimal; 2010) ตรวจพบเพียง 7 สกุล รายละเอียดดังตาราง 3 สกุลของไซยาโนแบคทีเรีย เฉพาะที่มีเฮเทอโรซีสต์ ที่พบในดินนาประเทศไทย มีรายละเอียดดังนี้

สกุล *Anabaena* ทรัยโคมมีความกว้างใกล้เคียงกันตลอดสาย บางชนิดอยู่เดี่ยว ๆ บางชนิดอยู่เป็นกลุ่มเฮเทอโรซีสท์ส่วนใหญ่จะอยู่ตรงกลางสายเซลล์ อะคีนิตสร้างเดี่ยว ๆ หรือเป็นสายยาวอยู่ติดกับเฮเทอโรซีสต์ หรืออยู่ระหว่างเฮเทอโรซีสต์ พบในน้ำเป็นส่วนใหญ่

สกุล *Cylindrospermum* ทัลลัสเหนียวเป็นเมือก ส่วนใหญ่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน ทรัยโคมมีความกว้างสม่ำเสมอ ไม่มีชีท แต่จะอยู่ในเมือกที่บางมาก และมองไม่ค่อยเห็น เซลล์มีรูปร่าง

ทรงกระบอก มีรอยแยกระหว่างเซลล์ เฮเทอโรซีสท์จะอยู่ส่วนปลาย อาจจะอยู่ด้านเดียวหรือทั้งสองด้าน และอะคีนีตอยู่ติดกับเฮเทอโรซีสต์ สร้างเดี่ยว ๆ พบได้ทั้งบนดินที่ชื้นและในน้ำ

สกุล *Nostoc* ทัลลัสเป็นเมือก มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ ระยะแรกมีรูปร่างกลมถึงยาว ระยะหลังกลมเรียงกันคล้ายเหรียญ ลักษณะเป็นสาย สายเซลล์บิดงอไปมา อาจมีสีเหลืองหรือน้ำตาล เซลล์มีรูปร่างกลม ถังเบียร์หรือทรงกระบอก เฮเทอโรซีสต์จะสร้างบริเวณกลางหรือตอนปลายของสายเซลล์ พบในดินชื้นมากกว่าในน้ำ

สกุล *Scytonema* สายเซลล์มีความกว้างเท่ากันตลอดทั้งสาย ชีทอาจบางหรือหนา มีสีหรือไม่มีสี และด้านข้างขนานไปกับสายเซลล์ เซลล์รูปร่างทรงกระบอก สายเซลล์ประกอบด้วยแขนงเทียม ทรัยโคมตรง เฮเทอโรซีสต์สร้างบริเวณตอนกลางสายเซลล์

สกุล *Tolypotrix* สายเซลล์มีชีทหุ้มบาง ทรัยโคมเรียวตรงปลายเล็กน้อย มีเพียงทรัยโคมเดียวในแต่ละชีท แตกแขนงเทียม เฮเทอโรซีสต์สร้างบริเวณปลายสายเซลล์ มีการเจริญเติบโตบริเวณปลาย ส่วนปลายของตรัยโคมประกอบด้วยเซลล์สั้น ๆ

สกุล *Calothrix* สายเซลล์จะอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่มเล็ก ๆ แต่ส่วนใหญ่ไม่ชอบอยู่เป็นกลุ่ม สายเซลล์ส่วนใหญ่ตรง ไม่มีกิ่งแขนงหรือมีกิ่งแขนงเทียม ไม่ค่อยพบชีท เฮเทอโรซีสต์อยู่บริเวณฐาน พบบ้างตอนกลางสายเซลล์ พบเกาะติดกับก้อนหิน ไม้ผุ หรืออยู่รวมกับสาหร่ายตัวอื่น

สกุล *Gloeotrichia* ทัลลัสกลมหรือครึ่งวงกลม แข็ง เมื่ออายุมากจะพองตัวและเป็นรู สายเซลล์วางตัวเป็นรัศมีวงกลม โดยเอาเฮเทอโรซีสต์ของแต่ละสายพันธุ์มาชนกัน สร้างอะคีนีตเดี่ยว ๆ หรือ 2-3 อันที่มีขนาดใหญ่ เป็นรูปทรงกระบอกอยู่ติดกับเฮเทอโรซีสต์ที่ฐานของสายเซลล์

สกุล *Rivularia* ทรัยโคมไม่แตกกิ่ง มีเมือกหุ้มหนา มีลักษณะเรียว ไม่มีอะคีนีตอยู่ที่ฐานของสายเซลล์ สายเซลล์จะเรียงขนานกัน ส่วนปลายของสายเซลล์แยกออกคล้ายรัศมี เฮเทอโรซีสต์สร้างบริเวณฐานหรือตอนกลางของสายเซลล์ มีการแตกกิ่งแขนงเทียม ไม่มีอะคีนีต

สกุล *Gloeotrichia* และสกุล *Rivularia* ต่างกันที่ *Rivularia* ไม่พบอะคีนีต แต่ทั้ง 2 สกุลอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ในเมือกที่มีลักษณะกลมเหมือนลูกบอล และตรัยโคมมีลักษณะเรียวปลายเหมือนกัน ชีทที่หุ้ม *Rivularia* มีลักษณะบางกว่าสกุล *Gloeotrichia* ทั้ง 2 สกุลเจริญได้บนก้อนหินที่มีความชื้น ใบไม้ หรือพืชน้ำอื่น ๆ

สกุล *Hapalosiphon* สายเซลล์หลักประกอบด้วยเซลล์ 1 หรือ 2 แถว มีชีทห่อหุ้มบาง แตกกิ่งแขนงด้านเดียวของสายเซลล์ มีการสร้างกิ่งแขนงเทียมบ้าง เซลล์มีรูปร่างเป็นทรงกระบอกสั้น ๆ เฮเทอโรซีสต์สร้างบริเวณตอนกลางสายเซลล์ เจริญได้ดีในน้ำ

สกุล *Fischerella* สายเซลล์หลักประกอบด้วยเซลล์หลายแถว ไม่ค่อยพบสายเซลล์ที่ประกอบด้วยเซลล์แถวเดียว แตกกิ่งแขนงตั้งตรงพบเพียงด้านเดียวเท่านั้น กิ่งแขนงยาวและสายเซลล์แคบกว่าสายเซลล์หลัก เซลล์รูปร่างกลมขนาดใหญ่

สกุล *Stigonema* สายเซลล์ประกอบด้วยเซลล์มากกว่า 1 แถว กิ่งแขนงมีลักษณะคล้ายกับสายเซลล์หลัก เป็นรูปตัววี สายเซลล์แตกกิ่งก้านอย่างอิสระ เซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม ชีทอาจมีสีน้ำตาล ค่อนสีเหลืองหรือไม่มีสี เฮเทอโรซีสต์สร้างบริเวณตอนกลางและด้านข้างของสายเซลล์

4.3 วิธีประเมินค่าการตรึงก๊าซไนโตรเจน

การวัดปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้เป็นวิธีที่บ่งชี้ระดับประสิทธิภาพ การตรึงไนโตรเจนในเชิงปริมาณ วิธีการประเมินการตรึงไนโตรเจน ได้แก่

4.3.1 Kjeldahl method เป็นวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) โดยวิธีทางเคมี เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมาก เนื่องจากเป็นวิธีการวิเคราะห์หาสารประกอบไนโตรเจนในทางตรง ที่ให้ผลดีพอสมควร ถึงแม้ว่าไม่สะดวกและเสียเวลามาก

4.3.2 Gasometric measurement โดยใช้การวัดปริมาณก๊าซไนโตรเจนที่หายไปจากบรรยากาศของภาชนะทดลอง วิธีนี้มีข้อจำกัดตรงความยุ่งยาก สิ้นเปลืองเวลามาก

4.3.3 วิธีไอโซโธป 15N เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ประเมินค่าการตรึงไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาศัยหลักการที่เกี่ยวข้องการระดับ 15^N เนื่องจากในสภาพธรรมชาติไนโตรเจนปรากฏอยู่ในสภาพ 2 ไอโซโทป (isotope) ได้แก่ 14^N และ 15^N ไนโตรเจน ทั้งสองไอโซโทปนี้อยู่ในอากาศในสัดส่วนที่คงที่ คือ จะมี 15^N อยู่ในอัตรา 0.3663 อะตอมต่อร้อยอะตอมไนโตรเจน (โดยจะมีค่าผันแปรอยู่ระหว่าง 0.36628-0.36632 อะตอมต่อร้อยละอะตอมไนโตรเจน) การวัดอัตราของ 15^N ซึ่งมีอยู่ในอัตราที่ต่ำมากนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีความไวและแม่นยำ เป็นกรณีพิเศษในการวัดกัมมันตภาพรังสี ซึ่งได้แก่ isotope ratio mass spectrometer (สามารถวัดได้อย่างแม่นยำ ถึง 0.1 ส่วนใน 1,000 ส่วนหรือประมาณร้อยละ 0.00004 อะตอม 15^N)

4.3.4 วิธี Acetylene reduction assay (ARA) เป็นการวัดการตรึงก๊าซไนโตรเจนในทางอ้อม โดยทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน อาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งมีการส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยมี N_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอน N_2 จึงถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็น NH_3 และเมื่อใส่ก๊าซอะเซทีลีน (C_2H_2) เข้าไปเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่ง C_2H_2 จะถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็น C_2H_4 ซึ่งการวิเคราะห์ก๊าซ C_2H_2 และ C_2H_4 สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง Gas Chromatography ปริมาณ C_2H_4 ที่เกิดขึ้นนำมาประเมินการทำงานของไนโตรจีเนสหรือการตรึงไนโตรเจนได้

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจน

5.1 อุณหภูมิ

ไซยาโนแบคทีเรียกลุ่ม diazotrophs มีความสำคัญในการตรึงไนโตรเจนและการเจริญมากกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น การศึกษาประชากรธรรมชาติชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ มากกว่า 20 ºC มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิด cyanobacterial blooms (Kashyap et al.,1991) Davey (1989) รายงานว่า *Nostoc commune* ทนทานต่ออุณหภูมิของความแห้งแล้งได้สูง และมีชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิประมาณ -60 ถึง 25 ºC สภาพขั้วโลกเหนือ และ -30ºC ถึงมากกว่า 40 ºC สภาพทั่วไป

Compaore and Stal (2010) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิและออกซิเจนกับกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียสองสายพันธุ์ *Anabaena variabilis* Kutz. ATCC29413 และ *Nostoc* sp. PCC7120 ภายใต้สภาวะ 12:12 (L:D) ผันแปรอุณหภูมิ (27, 36, 39 และ 42 ºC) และความเข้มข้นของออกซิเจน (20,10, 5 และ 0%) การตอบสนองของแสงด้วยรูปแบบของ rectangular hyperbola model พารามิเตอร์ Nm,Nd และ α พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์มีกิจกรรมไนโตรจีเนสสูงที่อุณหภูมิ 39-42 ºC และปราศจากก๊าซออกซิเจน 0%

Sand-Jensen and Sand-Jesperson (2012) เก็บ *Nostoc commune* จากหินปูนทางเท้า ที่มีลักษณะเปียกและแห้งที่มีอุณหภูมิ 20 ºC ในประเทศสวีเดน เพื่อทดสอบการสังเคราะห์แสงและการหายใจ โดยการผันแปรอุณหภูมิ (-269 ถึง 105 ºC), pH (2-10) และ NaCl (0.02-50 g NaCl Kg^{-1}) พบว่า ตัวอย่างในพื้นที่แห้งและพื้นที่เปียกสามารถทนได้ที่อุณหภูมิ -269 ถึง 70 ºC, pH 3-10 และ 0-20 g NaCl Kg^{-1}

Mongra (2014) พบว่า *Mastigocladus lamiosus* มีความสามารถในการตรึงคาร์บอนและไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศ และสามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าวที่มีอุณหภูมิสูงกว่าหรือ

ราว 45 ºC ในฤดูฝนไซยาโนแบคทีเรียทนร้อนที่แยกได้จากบ่อน้ำร้อนในฤดูใบไม้ผลิไม่สามารถเจริญได้ แต่สามารถประสบความสำเร็จได้เมื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดย *M. lamiosus* มีการเจริญสูงสุดที่ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ 4.2 µg chl-a/ml ที่เลี้ยงในอาหาร Allen and Arnon's medium (pH 7.2) ปราศจากแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ 45ºC แสงฟลูออเรสเซนต์ 12 W/m^2 นำมาเพิ่มผลผลิตในห้องปฏิบัติการ การเจริญที่ดีสุดความถี่สูงสุดของเฮเทอโรซีสต์ 6% อุณหภูมิ 45 ºC ระยะเวลา 15 วัน อัตราการเจริญลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 25 และ 35 ºC

5.2 เกลือ

พื้นที่ทั้งหมดบนโลกมีพื้นที่มีความเค็ม 7% และ 20% เป็นพื้นที่ทางการเกษตรซึ่งส่งผลกระทบต่อการผลิตพืชประจำปี กลไกทางสรีรวิทยา โมเลกุลของความทนทานในปฏิกิริยาออสโมติกและไอออนนิกของความเค็มได้รับการศึกษาจากนักวิจัยหลายคน พบว่าความเข้มข้นของเกลือสูง ๆ จะมีผลกระทบต่อค่าความต่างศักย์ของน้ำภายในเซลล์เป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียน้ำซึ่งจะนำไปสู่ osmotic stress นอกจากนี้ความเข้มข้นของไอออนสูงภายในเซลล์ (Na^+ และ Cl^-) มีผลต่อสภาวะความสมดุลของไอออน นำมาซึ่งสภาพ ionic stress (Roberts, 2005; Bartel and Souer,2004)

ไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป มีความทนทานต่อความเครียดของเกลือเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชั้นสูง และมากกว่าสัตว์น้ำบางชนิดที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด เช่น *A.doliolum* สามารถทนความเข้มข้นของเกลือ150 mM (Srivastava et al.,2005) แตกต่างจากพืชชั้นสูงที่สามารถทนความเข้มข้นของเกลือได้สุงสุดเพียง 50 mM (Serrano and Gaxiola, 1994)

Okmen et al. (2007) ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากทุ่งนาใน Corum-Turkıye เลี้ยงในอาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนเพื่อแยกไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ใช้เทคนิค Acetylene reduction ในการตรวจสอบผลกระทบของความแตกต่างของสารเคมีที่มีผลต่อกิจกรรมไนโตรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งระบุในระดับจีนัส *Nostoc* มีกิจกรรมไนโตรจีเนสที่สูงที่สุด (0.09 ethylene µl/mg.h) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 50 mM และมีกิจกรรมไนโตรจีเนสที่สูงที่สุด (0.08 ethylene µl/mg.h) ที่ความเข้มข้นของซูโครส 60 mM

Mahmoud et al. (1992) ได้ศึกษาการอยู่รอดของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน 5 สกุล ภายใต้สภาวะของเกลือและความแห้งแล้ง ทำการทดสอบในสภาพดินเหนียวและดินทรายภายใต้การผันแปรของความชื้น (100, 25 และ 12.5%) และความเข้มข้นของเกลือ (0, 0.5 และ 1 % ของ NaCl) พบว่ากิจกรรมไนโตรจีเนสและความถี่ของเฮเทอโรซีสต์ลดลงเมื่อความชื้นลดลงและ

ความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า *Nostoc microscopicum* และ *Rivulara natans* เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะความแห้งแล้งได้เป็นระยะเวลาที่ยาวนาน

5.3 รังสี

สเปกตรัมที่มองเห็นเป็นเพียงรังสีที่อยู่ภายใต้เงื่อนไขของธรรมชาติ เรียกว่า UV ในชั้นโอโซน สิ่งมีชีวิตจะได้รับระดับรังสีของ UV-B (280-320 nm) ซึ่งเป็นสิ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งกับไซยาโนแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เมื่อต้องสัมผัสเพื่อความอยู่รอด การขยายพันธุ์ และเพื่อที่จะหลบเลี่ยงการทำลายของ UV-B ไซยาโนแบคทีเรียจะย้ายที่อยู่ไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นของ UV-B ที่ต่ำ เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานโดยการอาศัยในพื้นดินและในน้ำ ระหว่างการสังเคราะห์แสงและการสร้างเม็ดสี นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียยังหลีกเลี่ยงความเสียหายที่เกิดจากการทำลายของ UV-B ด้วยการสังเคราะห์ scytonemin และ mycosporin

UV-B สร้างความเสียหายโดยตรงกับโปรตีน, เอนไซม์ และ DNA และทำความเสียหายทางอ้อมกับสารชีวโมเลกุล ทราบได้จากเปอร์เซ็นต์การสังเคราะห์แสง, การเจริญและอัตราการอยู่รอดลดลง ดังนั้นจะเห็นว่าการเจริญ, อัตราการอยู่รอด, รงควัตถุ, การสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตออกซิเจน, ไฟโคบิลิโปรตีน, และ 14CO2 อ่อนไหวต่อ UV-B (Donker and Hader, 1997) โดยเฉพาะรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงจะถูกทำลายลงอย่างง่ายดาย (Aratoz and Hader, 1997) จนในขณะนี้กลไกในระดับโมเลกุลของการตอบสนองทางสรีรวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียที่หลากหลายยังไม่ได้รับการระบุอย่างเต็มที่ และองค์ความรู้ที่เกี่ยวกับผลกระทบของรังสี UV ในระดับโปรตีนมีจำกัด จากรายงานการศึกษา UV-B ที่มีต่อโปรตีนของ *Synechocystis* PCC 6803 พบว่า *Synechocystis* แสดงออกถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเมื่อสัมผัสกับ UV-B เป็นเวลา 8, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง (Gao et al., 2009)

5.4 โลหะหนัก

ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปแบบเป็น oxygenic photosynthesis และมีความต้องการใช้โลหะมากกว่าสิ่งมีชีวิตพวก nonphotosynthetic (Casteilli, 2009) และทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนคอมเพล็กซ์ เช่น เหล็ก, กลุ่มเหล็กซัลเฟอร์, ไซโตโครม และธาตุเหล็กประกอบฮีม (heme-iron), แมงกานีสสำหรับแยกสารประกอบน้ำ คอปเปอร์สำหรับพลาสโตไซยานิน (Cavet et al., 2003) สิ่งมีชีวิตจะตอบสนองต่อความเข้มข้นของโลหะไอออนและการเผาผลาญสารอาหารภายในเซลล์ ซึ่งเป็นช่วงแคบ ๆ ระหว่างการขาดและความเป็นพิษของโลหะและการควบคุมปฏิกิริยา

homeostatic ในปฏิกิริยารีดอกซ์โลหะไอออนก่อให้เกิดรูปแบบของ hydroxyl radicals ผ่าน Haber-Weiss and Fenton reaction (Bhargava er al., 2008) อนุมูลเหล่านี้จะมีความผูกพันกันสูงกับ S, N, O ที่ทำงานกันเป็นกลุ่มในสารชีวโมเลกุลเป็นสาเหตุให้เกิดการทำลายและความเสียหาย ไซยาโนแบคทีเรียก็จะต้องเผชิญความเข้มข้นที่สูงของโลหะจากการปนเปื้อนจากดินและน้ำ แคดเมียมเป็นตัวอย่างของความเป็นพิษของโลหะ การศึกษามลพิษทางอุตสาหกรรมเป็นสาเหตุที่มีผลกระทบต่อไซยาโนแบคทีเรีย การศึกษาชีวเคมีใน *A. doliolum* โดย Bhargava et al. (2008) แสดงให้เห็นว่าแคดเมียมที่มากเกินจะไปกระตุ้นเอนไซม์และที่ไม่ใช่เอนไซม์ของสารปฏิชีวนะภายในเซลล์ ทองแดงมีประสิทธิภาพเป็นสารสำหรับฆ่าสาหร่าย และการปนเปื้อนของทองแดงมีความสำคัญกับประชากรของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย (Surosz and Palinska, 2004)

Okmen et al. (2007) ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากทุ่งนาใน Corum-Turkıye เลี้ยงในอาหาร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนเพื่อแยกไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ใช้เทคนิค Acetylene reduction ในการตรวจสอบผลกระทบของความเข้มข้นของโลหะที่มีผลต่อกิจกรรมไนโตรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่า *Anabaena* มีกิจกรรมไนโตรจีเนสที่สูงที่สุด (0.006 ethylene µl/mg.h) ที่ความเข้มข้นของเหล็ก 20 ppm *Nodularia* 0.1 ethylene µl/mg.h ที่ความเข้มข้นของแมงกานีส 20 ppm และ *Nostoc* 0.96 ethylene µl/mg.h ความเข้มข้นของสังกะสี 5 ppm

Shukla et al. (2009) ได้ศึกษาการตอบสนองของ *Anabaena doliolum* กับความเข้มข้นที่แตกต่างของนิเกิล ตั้งแต่ 0.1 ถึง 100 µM ในช่วงระยะเวลา 4 วัน การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในแง่ความหนาแน่นของเซลล์ (O.D.) ความถี่ของเฮเทอโรซีสต์ คลอโรฟิลล์ เอแคโรทีนอยด์ และซี-ไฟโคไซยานินที่ความเข้มข้นของนิเกิล 10 µM 96 ชั่วโมง โปรตีนและ thiol โปรตีนไม่ได้รับการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดดังกล่าว

5.5 ความเป็นกรด-ด่าง

ไซยาโนแบคทีเรียชอบ pH ที่เป็นด่างถึงด่างเล็กน้อยสำหรับการเจริญที่ดีที่สุด การเปลี่ยน pH สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมภายในเซลล์ที่หลากหลาย ได้มีการศึกษาโปรตีนเกี่ยวกับการตอบสนองต่อ pH ของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* PCC6803 จะแสดงออกถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาต่อค่าความเป็นกรด (Huang et al., 2002) มีรายงานว่า *Synechocystis* มียีนเป็นร้อยที่ up-regulated 1.5 เท่าเมื่อ pH 7.5 ถึง 10.2 (Summerfield and Sherman,

2008) และ Ohta et al., (2005) รายงานถึงความแตกต่างของจำนวนยีนที่แสดงออกใน *Synechocystis* เมื่อสัมผัสกรดในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษา cytoplasmic และ periplasmic protein แสดงออกถึงความแตกต่างเมื่อ pH ภายนอก 9.0, 7.5, 6.0 และ 5.5 เมื่อเปรียบเทียบส่วนของ cytoplasmic และส่วนของ periplasmic ได้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของ protein expression และไม่น่าแปลกใจเพราะ periplasm ได้สัมผัสพร้อมทั้งแบกรับความผันผวนของสิ่งแวดล้อมมากขึ้น

Song et al. (1998) พบว่า อุณหภูมิและ pH มีผลต่อการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรีย สกุล *Microcystin viridis* เจริญเติบโตได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส pH 7 และ 9.2 ความเข้มแสง 15 μE/วินาที/ตารางเมตร

5.6 แสง

ไซยาโนแบคทีเรียจำนวนมากสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ตั้งแต่ไซยาโนแบคทีเรียใช้ออกซิเจนสำหรับการสังเคราะห์แสงเพื่อการเจริญเติบโต ผลปรากฏว่าออกซิเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เป็นปัญหาสำหรับการดำเนินกิจกรรมไนโตรจีเนส ไนโตรจีเนสจะหยุดการทำงานอย่างรวดเร็วโดยออกซิเจน และไซยาโนแบคทีเรียมี 2 กระบวนการในการป้องกันกิจกรรมไนโตรจีเนสจากออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการหนึ่งคือการแยกกิจกรรมไนโตรจีเนสออกจากการสังเคราะห์แสงโดยอาศัยเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษ เรียกว่า เฮเทอโรซีสต์ (heterocysts) เฮเทอโรซีสต์ไม่มีหน้าที่ใน photosystem II แต่มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน และเป็นพื้นที่สำหรับไนโตรจีเนส ความแตกต่างนี้เกิดขึ้นในกลุ่ม IV และ V รายงานโดย Rippka et al.,(1979) วิธีการแยกการตรึงไนโตรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงแบบชั่วคราวอธิบายไว้ในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว และในชนิดที่สร้างสายเซลล์ ไม่มีเฮเทอโรซีสต์ ยกเว้น Trichodesmium การตรึงไนโตรเจนจะเกิดในช่วงกลางวันและกลางคืน (day-night cycle) ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในเวลากลางคืน

Boussiba (1995) พบว่า *Anabaena azollae* มีความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ที่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เมื่อความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในเซลล์ 7.5 μg/ml *A.azollae* จะกิจกรรมไนโตรจีเนสสูงสุด

Pinckney and Paert (1997) พบว่า กระบวนการตรึงไนโตรเจนการสังเคราะห์แสง และปัจจัยของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการอยู่รวมกันเป็นกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งแสงจะมีผลต่อ

PhotosystemII และกระบวนการ Photosystem II ถูกยับยั้งด้วย DCMU และการสังเคราะห์แสงทำให้มีการสร้างออกซิเจนที่ไปทำลายเอนไซม์ไนโตรจีเนส

5.7 ออกซิเจน

ออกซิเจนในชั้นบรรยากาศที่มีผลต่อการยับยั้งการตรึงไนโตรเจนสามารถเห็นได้จากสิ่งมีชีวิตที่เป็น free-living เช่นเดียวกับ symbiotic พบว่า การตรึงไนโตรเจนในกลุ่ม obligate anaerobic และ facultative bacteria จะเกิดขึ้นในกรณีที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำจากจำนวนผลการวิจัยที่มีนัยสำคัญเห็นได้ว่าเอนไซม์ในการตรึงไนโตรเจนมีความไวสูงมากต่อออกซิเจนหลักฐานประการแรกที่ชัดเจนเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการ reductive และมีแอมโมเนียที่เป็นผลผลิตหลักของการตรึงไนโตรเจน ได้มีการทดลองเกี่ยวกับออกซิเจนยับยั้งกิจกรรมไนโตรจีเนสใน *Azotobacter* sp. Burk (1930) แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 10 ถึง 20 เท่า เมื่อความดันของออกซิเจน (pO_2) ลดลงจาก 0.21 ถึง 0.01 atm (21.27 ถึง 1.01 kPa) เมื่อนำกิจกรรมไนโตรจีเนสมาพิจารณาถึงความสัมพันธ์กับความดันของออกซิเจน จะเห็นว่ารูปที่ได้เป็น bell-shaped curve

Wyatt and Silvey (1969) ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่า *Gloeothece* sp. มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และกิจกรรมไนโตรจีเนสจะไม่ตอบสนองเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนสูงพร้อมทั้งการเจริญช้าลง (generation time, ระหว่าง 40 และ 100 ชั่วโมง) ที่ความเข้มข้นของแสงสูง (500 ถึง 100 lx)

Oscillatoria limosa เจริญได้ในช่วงกลางวัน-กลางคืน กิจกรรมไนโตรจีเนสส่วนใหญ่วัดได้ในช่วงเวลาที่มืด คือ การบ่งชี้ที่แยกแยะของกระบวนการสังเคราะห์แสง และการตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะแวดล้อม (Stal and Krumbein, 1985) การเปลี่ยนสภาวะการบ่มเลี้ยงในแง่ความสว่าง-ความมืด จะเกิดการหยุดการผลิตออกซิเจนและอัตราการหายใจจะเพิ่มขึ้น

เมื่อเพาะเลี้ยง *Anabaena flos-aquae* และ *Nostoc muscorum* ภายใต้สภาวะแสงและความเข้มข้นของออกซิเจน อัตราการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนที่ระดับ 0.1 atm (10.13 kPa) กิจกรรมทั้งหมดจะต่ำลงเมื่อมีออกซิเจนเกิดขึ้นประมาณ 18% ความเข้มข้นของออกซิเจนในอากาศเป็นสาเหตุให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมไนโตรจีเนส เมื่อออกซิเจนถูกปรับให้อยู่ในระดับบรรยากาศ กิจกรรมไนโตรจีเนสก็จะกลับมาทำงานเช่นเดิม ระดับออกซิเจนที่สูงไม่เพียงแต่ยับยั้งการตรึงไนโตรเจนแต่รวมถึงการหายใจและการสังเคราะห์แสงด้วย (Stewart and Pearson, 1970)

5.8 ไนโตรเจน

Rejmankova and Komarkova (2005) ทำการศึกษา Cyanobacterial mats (CBM) ของไซยาโนแบคทีเรีย, แบคทีเรีย และสาหร่ายของระบบนิเวศบึงแถบแคริเบียน โดยทำการทดลองและประเมินผลของ CBM ด้วยการรวมปัจจัย (factorial) ของอาหารที่ประกอบด้วยสารประกอบฟอสฟอรัส (P) ไนโตรเจน (N) และเกลือที่มีความเข้มข้นสูงและต่ำ อธิบายได้ว่าความเข้มข้นของ P มีผลกระทบเชิงบวกน้อยกว่าของ N และมีผลกระทบเชิงลบน้อยกว่าของเกลืออย่างมีนัยสำคัญ ความอุดมสมบูรณ์ของสาหร่ายสีเขียว และ *Chroococcales* มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ P และ N ถึง 27.6% และ 21.9% ตามลำดับ อัตราการตรึงไนโตรเจนเฉลี่ย 75 และ 175 nmol C_2H_4 cm^{-2} min^{-1} ในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำและมีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสสูง ตามลำดับ กลุ่มของ heterocytous cyanobacteria สกุล *Nostoc* อัตราการตรึงไนโตรเจนจะมีความสัมพันธ์เชิงลบกับความเข้มข้นของไนโตรเจน เมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำฟอสฟอรัสสูง ส่งเสริมอัตราการตรึงไนโตรเจน

Kenesi *et al*. (2009) ทำการศึกษา NH_4^+ และ NO_3^- ที่มีผลกระทบต่อการเจริญความต้องการฟอสฟอรัส องค์ประกอบของเซลล์ และการตรึงไนโตรเจน ของ *Cylindrospermopsis raciborskii* ภายใต้ข้อจำกัดของฟอสฟอรัส (200 µg l^{-1} PO_4-P) โดยใช้อาหารประกอบด้วย 4,000 µg l^{-1} NH_4-N 4,000 µg $l^{-1}$$NO_3$-N และปราศจากสารประกอบไนโตรเจน พบว่า การเจริญของ *C. raciborskii* ลดลง อัตราส่วน C:N ของเซลล์ และแคโรทีนอยด์ ต่อ คลอโรฟิลล์ เอ ลดลงเช่นกัน มวลชีวภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในแหล่งอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบกระบวนการสังเคราะห์ไนโตรเจน และการตรึงไนโตรเจน ซึ่งถูกยับยั้งบางส่วนโดย NO_3^- แต่ถูกยับยั้งได้สมบูรณ์โดย NH_4^+

5.9 สารกำจัดศัตรูพืช

สารกำจัดศัตรูพืชมีความสำคัญสำหรับเกษตรกรในการควบคุมวัชพืชที่ไม่พึงประสงค์ในการปลูกพืชเชิงเดี่ยวและสรีรวิทยาของพืช ในการกระทำการอย่างใดอย่างหนึ่งด้วยมือรวมถึงการใช้สารกำจัดศัตรูพืชอย่างเฉพาะเจาะจงและการกระทำโดยใช้เครื่องมือในการอธิบายกลไกทางสรีรวิทยา นอกจากการควบคุมศัตรูพืชแล้ว สารดังกล่าวยังทำลายความหลากหลายของสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างไม่เฉพาะเจาะจงรวมทั้งไซยาโนแบคทีเรียในพื้นที่ทางการเกษตร ผลข้างเคียงของการใช้สารกำจัดศัตรูพืชลงสู่ระบบนิเวศวิทยาแหล่งน้ำจืด โดยการพ่น การลอย การชะล้าง หรืออุบัติเหตุนำมาซึ่งสารพิษ มีรายงานและงานวิจัยหลากหลายที่อธิบายถึงผลกระทบของสารกำจัดศัตรูพืชที่มีต่อสาหร่าย ไซยาโนแบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ไซยาโนแบคทีเรียมีความทนทานต่อสารกำจัดศัตรูพืช

ที่แตกต่างกัน สารกำจัดศัตรูพืชมี 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ organic phosphate compounds, chlorinated hydrocarbons และ carbamates

การประยุกต์ใช้สารกำจัดศัตรูพืชเป็นที่รู้จักกันดีถึงผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในดิน (Kumari et al., 2009) การย่อยสลายของจุลินทรีย์ถือเป็นกลไกหลักในการกระจายสิ่งมีชีวิตในดิน แบคทีเรียย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชผลิตเอนไซม์ที่มีความหลากหลายซึ่งมีความจำเพาะต่อการย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชดังกล่าว เช่นสารสกัดเอนไซม์แบคทีเรียจะมีคุณลักษณะเกี่ยวกับอัตราการใช้และมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารกำจัดศัตรูพืช การศึกษาไซยาโนแบคทีเรียมีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องดังกล่าว เพราะมีรายงานว่าไซยาโนแบคทีเรียจะสะสมสารพิษและสารกำจัดศัตรูพืชเหล่านี้ได้ จากการตรวจสอบสิ่งที่เกี่ยวข้องของสารกำจัดศัตรูพืชที่แตกต่างกันได้แสดงให้เห็นถึงผลกระทบโดยตรงต่อกิจกรรมการสังเคราะห์แสง (PSII)

การศึกษาสารกำจัดศัตรูพืชที่มีอยู่หลากหลายนั้น ข้อมูลที่มีอยู่เป็นสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม chloroacetamide ที่มีชื่อว่า butachlor ซึ่งสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ห่วงโซ่กรดไขมันที่เป็นสายยาวมาก (Gotz and Boger, 2004) ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ก่อนเมล็ดงอกไว้ใช้สำหรับควบคุมหญ้าและวัชพืชใบกว้างบางชนิดรวมทั้งเมล็ดและการปลูกถ่ายเมล็ดข้าว จากการศึกษาโดย Agarose gel electrophoresis ใน butachlor โดย *Aulosira fertilissima* ดำเนินการในระยะ 3, 6, และ 15 วัน ตามลำดับ (Kumari et al.,2009) ผลแสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของโปรตีน NusB เพิ่มขึ้น 2.53 เท่า ในขณะที่โปรตีน เช่น fructose 1,6-bisphosphate aldolase classII (FBP aldolase), ATP synthase β-chain, C-phycocyanin α-subunit, GroES (1 0 kDa chaperonin), allophycocyanin β-chain, peroxiredoxin (Prx) และ phycocyanin α-chain ลดลง พบโปรตีนที่โดดเด่น 8 ลักษณะ มี 6 ลักษณะที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง, การหายใจ และระบบการป้องกันสารต้านอนุมูลอิสระ

Leganes et al. (2001) ได้ศึกษาผลกระทบของปุ๋ยฟอสฟอรัส, การจัดการฟาง, ยาฆ่าแมลง [trichlorfon (dimethyl2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate) และการปลูกถ่ายไซยาโนแบคทีเรีย สายพันธุ์พื้นเมืองกลุ่มที่มีเฮเทอโรซีสต์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ดูความอุดมสมบูรณ์ของไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่มีเฮเทอโรซีสต์ในดิน การตรึงไนโตรเจน และผลผลิตข้าวในแปลงนาในประเทศสเปน ผลปรากฏว่าไม่การเพิ่มขึ้นของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในแต่ละทรีทเมนต์อย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่าจะสังเกตเห็นว่าบางอย่างมีแนวโน้มลักษณะเพิ่มขึ้น เช่น การเพิ่มขึ้นของไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่มีเฮเทอโรซีสต์ในแปลงปลูกถ่ายและแปลงที่ไม่ใส่ปุ๋ย และการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมไนโตรจีเนสในแปลงที่มีการจัดการฟาง อย่างไรก็ตามผลกระทบเหล่านี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อผลผลิตข้าว

Kumar et al. (2009) ได้ศึกษาผลกระทบของยาฆ่าแมลงในกลุ่ม organochlorine (hexachloro-hexahydro-methano-benzodioxathiepine-oxide หรือที่เรียกว่า endosulfan ที่มีต่อเฮเทอโรซีสต์, การตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena fertilissima* ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังนี้ 3, 6 และ 12 μg ml^{-1} โดยทำการศึกษารงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (คลอโรฟิลล์ เอ, แคโรทีนอยด์) ไฟโคบิลิโปรตีน กระบวนการเมตาบอลิซึม (คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน, กรดอะมิโน, ฟีนอล) กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทรส และการสังเคราะห์กลูตามีน พบว่า Endosulfan มีผลกระทบต่อกิจกรรมของไซยาโนแบคทีเรีย ในช่วง 4 วันแรก ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ ลดลง 38% และ 20% ตามลำดับ ไฟโคบิลิโปรตีน (ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอีริทริน) ปรับตัวลดลง 60 % 64% และ 28% ตามลำดับ นอกจากนั้น Endosulfan ยังส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเซลล์นำมาซึ่งการลดลงของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ฟีนอล กรดอะมิโน พร้อมทั้งกระบวนการเอนไซม์รีดักเทรสและการสังเคราะห์ กลูตามีน ถึงแม้ว่า Endosulfan จะมีผลกระทบที่ร้ายแรงต่อไซยาโนแบคทีเรีย *A. fertilissima* แต่จะปรากฏผลกระทบเพียงหนึ่งรุ่นซึ่งหลังจากผ่านไปแล้ว 12 วัน ความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงดังกล่าวจะลดลง

Aftab et al.(2013) ได้ดำเนินการประเมินการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการไนโตรเจนเมตาบอลิซึมในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabena variabilis* ภายใต้ยาฆ่าแมลงและ สารกำจัดวัชพืช โดยทดลองเลี้ยง *A. variabilis* อาหาร BG-11 ปราศจากแหล่งไนโตรเจนภายใต้ห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาการดูดซึมไนไตรท์และไนเตรทและกิจกรรมรีดักเทส วิเคราะห์โดยวิธี Cawse and Snell and Snell พบว่า การดูดซึมเริ่มจากชั่วโมงแรกของการบ่มและการดูดซึมลดลงเรื่อย ๆ กระทั่งชั่วโมงที่ 24 นอกจากนี้ยังพบว่าการดูดซึมไนเตรทได้น้อยในอาหารที่ประกอบด้วย isoproturon ไนไตรท์ดูดซึมได้น้อยในอาหารที่ประกอบด้วย Cypermethrin

Okmen et al. (2013) กล่าวว่า รงควัตถุมีการนำมาใช้บ่อย ๆ ในทางการแพทย์ อาหาร ยา เครื่องสำอาง หมึก และสิ่งทอ ไซยาโนแบคทีเรียมีศักยภาพในการผลิตรงควัตถุ เพราะไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญไปพร้อมกับความต้องการสารอาหารที่ง่าย ซึ่งแตกต่างจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีจำนวนของรงวัตถุมาก ไซยาโนแบคทีเรียผลิตรงควัตถุบางชนิด เช่น คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ ไฟโคบิลิโปรตีน นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ สภาวะแวดล้อมมีผลกระทบต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียและการผลิตรงควัตถุ ด้วยเหตุนี้สารกำจัดวัชพืชจึงมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต เช่นไซยาโนแบคทีเรีย ในครั้งนี้ทำการศึกษาการผลิตรงควัตถุบางชนิดโดย *Anabaena* sp. GO10 โดยใช้ความแตกต่างของสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืชที่ใช้ในการศึกษา fenoxaprop-p-ethyl และ cyhalofop-butyl พบว่า ความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่แตกต่างกันจะมีการผลิตรงควัตถุที่ต่างกัน fenoxaprop-p-ethyl 6.25 mg/L กระตุ้นการสร้างคลอโรฟิลล์ เอ เบต้าแคโรทีน ไฟโคไซยานิน และอัลโลไฟโคไซยานิน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น

ของสารกำจัดวัชพืชขึ้นจะไปยับยั้งการสร้างรงควัตถุทั้งหมด รงควัตถุทั้งหมดของ *Anabaena* sp. GO10 จะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของ fenoxaprop-p-ethyl เท่ากับ 100 mg/L สารกำจัดวัชพืช cyhalofop-butyl กระตุ้นการสร้างรงควัตถุต่าง ๆ แต่จะเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อความเข้มข้น 25 mg/L รงควัตถุทั้งหมดของ *Anabaena* sp. GO10 จะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของ cyhalofop-butyl มีค่าเท่ากับ 400 mg/L

Okmen and Turkcan (2013) รายงานว่าการเพาะปลูกข้าวสมัยใหม่ทั่วโลกมีการนำสารเคมีทางการเกษตรมาใช้อย่างกว้างขวาง สารกำจัดวัชพืชอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันและอาจเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต Bentazon เป็นสารที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการควบคุมวัชพืช ในนาข้าวของประเทศตุรกี เป้าหมายของการศึกษาครั้งนี้ คือการตรวจสอบผลกระทบของ Bentazon ที่มีต่อรงควัตถุของไซยาโนแบคทีเรีย โดยใช้ไซยาโนแบคทีเรีย 2 ชนิด *Anabaena* sp. GO4 และ *Anabaena* sp. GO10 ตรวจสอบโดยวิธี spectrophotometrically พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ bentazon ที่ 100 mg/L *Anabaena* sp. GO4 และ *Anabaena* sp. GO10 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำสุด และพบว่า *Anabaena* sp. GO4 มีปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงสุด เมื่อความเข้มข้นของ bentazon 6.25 และ 12.5 mg/L เช่นเดียวกับปริมาณของไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานิน นอกจากนี้พบว่ารงควัตถุทั้งหมดใน *Anabaena* sp. GO10 ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของ Bentazon 25 mg/L รงควัตถุของ *Anabaena* ทั้งสองสายพันธุ์จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของ Bentazon 200 mg/L โดยทั่วไปแล้วจะเห็นว่า *Anabaena* sp. GO4 มีประสิทธิภาพดีที่สุด จึงเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ

Shen and Luo (2011) ศึกษาผลกระทบของ monosulfuron ที่มีต่อการเจริญ, กระบวนการสังเคราะห์แสง และกิจกรรมไนโตรจีเนส ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน 3 สายพันธุ์ *Anabaena azollae*, *A.flos-aquae* และ *A.azotica* โดยใช้ความเข้มข้นของ monosulfuron ตั้งแต่ 0.001-10 mg/l monosulfuron สลายตัวอย่างรวดเร็วและสะสมได้น้อยใน *A.azotica* เมื่อเปรียบเทียบกับ *A.azollae* และ *A.flos-aquae* ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีความไวต่อ monosulfuron ที่แตกต่างกัน ค่า IC50s 0.014 0.005 และ 0.029 NOEC 0.019, 0.22 และ 0.075 mg/l ของ *A.flos-aquae*, *A.azollae* และ *A.azotica* ตามลำดับ โดยปกติอัตราของ monosulfuron ที่ ใช้ในนาข้าวอยู่ที่ 0.3-0.8 mg/l ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเป็นพิษต่อไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ การประยุกต์ใช้ monosulfuron ควรมีความเข้มข้นต่ำ (<0.1 mg/l) ซึ่ง *A.azotica* จะสามารถเจริญและทนได้เมื่อนำมาประยุกต์เป็นปุ๋ยชีวภาพ

Irisarri *et al*. (2001) ศึกษาความหลากหลาย ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชและไนโตรเจนรวมของไซยาโนแบคทีเรียในนาข้าวและในห้องปฏิบัติการประเทศอุรุกวัย ระยะเวลา 3 ปี พบว่า 8 สัปดาห์ หลังเพาะปลูกข้าวจำนวนไซยาโนแบคทีเรียสูงสุด

$1.6x10^4$ CFU m^{-2} ในกลุ่มควบคุม และประมาณ 90% เป็นไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มสร้างเฮเทอโรซีสต์ สกุล *Nostoc* และ *Anabaena* กิจกรรมไนโตรจีเนสสูงสุดหลังจากเพาะปลูก 12 สัปดาห์ในทุกทรีทเมนต์มีค่าประมาณ 20 μmol C_2H_4 m^{-2} h^{-1} การทดสอบความทนทานต่อสารประกอบไนโตรเจนและสารกำจัดวัชพืช 2 ชนิด ที่มีต่อไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์แอมโมเนียม 0.2 mM ยับยั้งกิจกรรมไนโตรจีเนสหลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ปริมาณของ quinclorac และ propanil มีผลกระทบต่อ กระบวนการสังเคราะห์แสง แต่กิจกรรมไนโตรจีเนสถูกยับยั้งโดย propanil เท่านั้น

Debnath *et al*. (2012) ได้ศึกษาผลกระทบของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช 4 ชนิด แยกเป็นสารฆ่าเชื้อรา Bagalol และ Mancozeb สารฆ่าแมลง Thiodan และ Phorate ที่มีต่อการเจริญและความแตกต่างของเอนไซม์ในไซยาโนแบคทีเรีย 4 ชนิด *Nostoc ellipsosporum*, *Scytonema simplex*, *Tolypothrix tenuis* และ *Westiellopsis prolifica* พบว่า Bagalol และ Thiodan มีความเป็นพิษมากที่สุด ทั้งสารฆ่าเชื้อราและยาฆ่าแมลงที่ความเข้มข้น EC50 สามารถยับยั้งการทำงานของไนโตรจีเนสและการสังเคราะห์กลูตามีน (GS) ในไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ Bagalol ยับยั้งกิจกรรมไนโตรจีเนสและ GS สูงสุด ใน *N.ellipsosporum* และ *S.simplex* ขณะที่ Thiodan และ Phorate มีผลกระทบสูงสุดใน *T.tenuis* และ *W.prolifica* ซึ่ง Mancozeb มีผลกระทบน้อยที่สุดในทุกกิจกรรม

Lakshmi and Annamalai (2007) ได้ศึกษาเปรียบเทียบไซยาโนแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ *Anabaena ambigua* Rao (A100) และ *Oscillatoria foreaui* Fremy (A1340) เพื่อตรวจสอบการตอบสนองต่อสารฆ่าแมลงในกลุ่ม organophosphorus Divap 100 ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน1 5 และ 10 ppm ที่มีผลต่อการเจริญและการขับสารออกนอกเซลล์ เช่น โปรตีน ไนโตรเจน แอมโมเนีย คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และฟีนอล ทำการทดลอง 28 วัน และสังเกตผลทุก ๆ 4 วัน พบว่า Divap 100 มีผลกระทบต่อสารที่ขับออกนอกเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม *A. ambigua* ได้รับผลกระทบของ Divap 100 ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 ppm นอกจากนี้ยังพบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวถูกปล่อยออกมาในปริมาณที่สูงขึ้นในช่วง exponential phase แม้แต่ในชุดควบคุม

Chen *et al*. (2009) ได้ศึกษาผลกระทบของสารกำจัดวัชพืช butachlor ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในดินนาข้าว กิจกรรมไนโตรจีเนสโดยวิธี acetylene reduction assay และการเปลี่ยนแปลงประชากรของสิ่งมีชีวิตในดิน โดยใช้ denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) หลังจากนั้นนำมาทดสอบทางสถิติเพื่อตรวจสอบจำนวนกลุ่มใน UPGMA dendrograms ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า อะเซทีลีนจะถูกยับยั้งหลังจากการใช้ butachlor ไปแล้ว 37 วัน ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างจาก UPGMA dendrograms สิ่งมีชีวิตกลุ่ม diazotrophic มี divergences ranged 33% ถึง

64% ในระยะต่าง ๆ ของการเจริญของข้าว สำหรับแบคทีเรียมี divergences ranged 28% ถึง 52% ความแตกต่างจะสูงสุดในระยะเพาะปลูก

6. การศึกษาความหลากหลายทางอณูวิทยา (molecular diversity)

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา เพื่อที่จะนำมาใช้ในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรียมีด้วยกันหลายวิธี ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและระดับของการจัดจำแนกความแตกต่างได้ในระดับจีนัส หรือสปีชีส์ โดยข้อมูลทางพันธุกรรมต่างๆ ที่นำมาใช้ ได้แก่

6.1 การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting)

6.1.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เป็นวิธีการวิเคราะห์ขนาดความยาวของ DNA ที่มีขนาดต่างๆ กัน ควบคู่กับหลักของความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งที่ตัดของ restriction enzyme ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว ทำการแยก DNA ที่มีขนาดต่าง ๆ ออกจากกันด้วย Agarose gel electrophoresis เมื่อทำ hybridization ด้วย DNA probe ที่เหมาะสม จะได้แถบ RFLPs ความแตกต่างของ individual นั้นเกิดได้จาก addition, deletion หรือ mutation ที่ตำแหน่งของ restriction site คุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือ การเป็น codominant marker ซึ่งทำให้สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้

6.1.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้หลักการของการใช้ short nucleotide sequence ประมาณ 10 mer เป็น primer เพื่อใช้ในการเพิ่มขยาย genomic DNA ในตำแหน่งที่ primer นั้นสามารถไปจับได้ โดยอาศัยหลักการของ PCR ชิ้นส่วนที่ได้รับการเพิ่มขยายปริมาณแล้วนั้น จะถูกนำไปแยกขนาดโดยใช้ Agarose gel electrophoresis ซึ่งความแตกต่างในประชากรนั้นเกิดจาก addition, deletion หรือ mutation ในตำแหน่งที่นั้นๆ คุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องนี้ คือ ความง่าย และความประหยัดต้นทุนในการดำเนินการ เนื่องจากการสร้าง primer นั้นเป็นแบบสุ่มไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบส อีกทั้งใช้ปริมาณของ DNA เริ่มต้นน้อยมาก เนื่องจากอาศัยระบบ

ของ PCR โมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้มักจะเป็น dominant marker จึงไม่สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ อีกทั้งยังไม่ทราบตำแหน่งที่แน่นอนในจีโนมอีกด้วย

6.1.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่รวบรวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าไว้ด้วยกัน วิธีการ คือ ตัด genomic DNA ด้วย restriction enzyme 2 ชนิด จากนั้นนำ adapter ของ enzyme ทั้งสองนั้นมาเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของ DNA โดยใช้ ligase สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA นั้นใช้หลักการของ PCR โดยจะใช้ oligonucleotide primer ซึ่งมีลำดับเบสที่ตรงกันข้ามกับ adapter ซึ่งทำให้สามารถจับกับ adapter ได้กระชับ โดยเพิ่มเบสจำเพาะ (selective base) ในส่วนท้ายของ primer ผลผลิตของการทำ PCR นั้นจะนำไปแยกขนาดโดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งความแตกต่างในประชากรนั้นเกิดจาก addition, deletion หรือ mutation ในตำแหน่งของ restriction site หรือ ในตำแหน่งระหว่าง primer นั้นๆ คุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือ จำนวนของความแตกต่าง (polymorphism) ที่สามารถตรวจสอบได้สูง 10-20 polymorphism ต่อการทำแต่ละครั้ง อีกทั้งสามารถเป็นได้ทั้ง codominant and dominant marker ปัญหาที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือความยุ่งยากในการเก็บข้อมูลและจำนวนขั้นตอนที่ซับซ้อน อีกทั้งการไม่รู้ตำแหน่งที่แน่นอนในจีโนม

6.1.4 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนามาเพื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจ ซึ่งสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนไปของลำดับเบสได้แม้เพียงเบสเดียว โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีการเติมปลายทางด้านใดด้านหนึ่งด้วย GC-clamp การตรวจวัดด้วยวิธีนี้มักใช้ควบคู่ไปกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR)เทคนิค DGGE มีข้อดีที่ไม่ต้องทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ก่อน เพียงแต่อาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และตรวจสอบความแตกต่างดังกล่าวโดยการทำ gel electrophoresis

6.1.5 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องช่วงสั้นและยาว (short and long tandem repeat repetitive sequences; STRR and LTRR)

ดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีท่อนของดีเอ็นเอซ้ำ ๆ กันประมาณ 2-7 เบส ที่มีอยู่หลายชุด เรียกบริเวณนี้ว่า “STR” ย่อมาจาก Short Tandem-Repeat (STR) STR ซึ่งมีอยู่หลายที่ หลายตำแหน่ง (ตำแน่ง = locus) บนสายดีเอ็นเอ ถูกนำใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม และนำมาศึกษาลักษณะของจำนวนการซ้ำ ของท่อนดีเอ็นเอแต่ละชุด ในแต่ละตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวได้ และสามารถบ่งบอกถึงข้อมูลพันธุกรรมเฉพาะของแต่ละบุคคลได้เพราะสิ่งมีชีวิต มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน (ยกเว้นกรณีฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน)

6.2 อนุกรมวิธานโดยใช้อณูวิทยา (molecular taxonomy)

6.2.1 ยีน 16S rRNA (16S rDNA)

16S rRNA เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอซึ่งเป็นองค์ประกอบของ ไรโบโซมมีหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเป็นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยยีน 16S rRNA ได้ถูกเลือกใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก เนื่องจากเป็นยีนที่มีอยู่ในยูแบคทีเรีย (eubacteria) ทุกชนิดทำให้สามารถเปรียบเทียบยูแบคทีเรีย มีขนาดประมาณ 1500 bp บางช่วงของสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene เหมือนกันในยูแบคทีเรียทุกชนิด ในขณะเดียวกันก็มีบางช่วงของสายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ในช่วงที่เหมือนและช่วงที่แตกต่างกันของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอนั้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย ช่วงที่เหมือนกันนี้จะนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ (primer) เพื่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR amplification) การที่สายดีเอ็นเอช่วงนี้มีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด จึงสามารถนำมาใช้เป็นไพรเมอร์ที่ถือว่าเป็นสากล (universal primers) คือ ไพรเมอร์ 1 คู่นี้สามารถขยายหรือเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ได้จากแบคทีเรียทุกชนิด ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ทำการศึกษาได้

6.2.2 16S-23S internal transcribed spacer (16S-23S ITS)

ในโปคาริโอต ยีนที่เป็นรหัสของไรโบโซมของอาร์เอ็นเอ จะอยู่เรียงต่อกันเป็นโอเปอรอนซึ่งมีลำดับการเรียงตัวของยีนที่จำเพาะ คือ 16S, 23S และ 5S rRNA เรียกว่า rrn operon โดยปกติแล้วในจีโนมของแบคทีเรียจะพบหลายชุดด้วยกัน เช่นใน *E. coli* และ *Salmonella* มี 7 ชุด ใน *Bacillus subtilis* มี 10 ชุด ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน เรียกว่า internal transcribed spacer (ITS) 16S-23S ITS เป็นบริเวณที่อาจมียีนที่เป็นรหัสของ tRNA ซึ่งสามารถนำไปศึกษาทางไฟโลเจเนติกได้

6.2.3 ไฟโคไซยานินโอเปอรอน (phycocyanin intergenic sequence, PC-IGS)

เป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งที่เสริมการทำงานของคลอโรฟิลด์ในการสังเคราะห์แสงในไซยาโนแบคทีเรีย (accessory pigment) โดยไฟโคไซยานินมีโครงสร้างหลักเป็นโพลีเปปไทด์สองสายคือ หน่วยย่อยแอลฟา และเบตา ซึ่งควบคุมรหัสโดยยีน cpcA และ cpcB อยู่เรียงกันเป็น โอเปอรอน ส่วนของดีเอ็นเอระหว่างยีนทั้งสองนี้ ถูกนำมาใช้ในการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไซยาโนแบคทีเรีย

7. ดิน (soil)

7.1 ความหมายของดิน

ดิน คือ เทหวัตถุธรรมชาติ (natural body) ที่ปกคลุมผิวโลกอยู่บาง ๆ เกิดจากผลของการแปรสภาพหรือผุพังของหินและแร่ กับอินทรียวัตถุที่ผสมคลุกเคล้ากัน และเมื่อมีอากาศและน้ำในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยในการค้ำจุน การยังชีพ และการเจริญเติบโตของพืช (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา,2548)

7.2 องค์ประกอบของดิน (soil component)

ดินเป็นสารผสมที่มีความสลับซับซ้อนอย่างมาก ดินประกอบด้วยสสาร 3 สถานะ คือ ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ซึ่งองค์ประกอบทั้ง 3 สถานะมีปริมาณ สัดส่วนผันแปรแตกต่างกันไปตามสถานที่ เวลา การใช้ประโยชน์ที่ดิน และสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ดินบริเวณหนึ่ง ๆ มีองค์ประกอบดังนี้

7.2.1 อนุภาคแข็ง (solid particles) มีหน้าที่ประกอบกันเป็นโครงร่างของมวลดิน อนุภาคแข็งมี 2 ประเภท คือ

ก. อนุภาคอนินทรีย์ (inorganic particles) เป็นส่วนที่สลายตัวจากหินและแร่ปฐมภูมิ (primary minerals) หรือเป็นแร่ทุติยภูมิ (secondary minerals)

ข. อนุภาคอินทรีย์ (organic particles) เป็นส่วนที่สลายตัวจากเศษซากพืช ซากสัตว์ ที่สลายตัวสมบูรณ์แล้ว เรียกว่า ฮิวมัส (humus)

7.2.2 น้ำในดิน (soil water) น้ำในดินได้มาจากฝนหรือน้ำชลประทาน เมื่อดินได้รับน้ำจะแทรกซึมไล่ที่อากาศออกจากช่อง แล้วไปอยู่แทน พบในช่อง (pores) ระหว่างเม็ดดิน ช่องเหล่านี้มักจะต่อเนื่องถึงกันโดยตลอด และเป็นที่อยู่ของ ๆ ไหล เช่น น้ำและอากาศ น้ำในดินจะเป็นตัวละลาย (solutes) ชนิดต่าง ๆ และสารแขวนลอยปะปนอยู่เสมอ สารเหล่านี้มีตั้งแต่ขนาดใหญ่ไปจนถึงสารละลายจริง (true solution)

7.2.3 อากาศในดิน (soil air) ตราบใดที่มวลดินไม่อิ่มตัวด้วยน้ำ (unsaturated soil) จะปรากฏว่ามีช่องบรรจุอากาศอยู่ในดินเสมอ สัดส่วนของอากาศในดินจะเป็นปฏิภาคโดยกลับกับสัดส่วนของน้ำหรือระดับความชื้นดิน อากาศในดินมีองค์ประกอบคล้ายกับในบรรยากาศ คือประกอบด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นส่วนใหญ่ แต่ในดินมักมีสัดส่วนของแก๊สออกซิเจนต่ำกว่า และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่าในบรรยากาศ เนื่องจากกิจกรรมการหายใจของสิ่งมีชีวิตในดินและการย่อยสลายอินทรีย์สารของจุลินทรีย์ดิน (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา,2548)

7.2.4 สิ่งมีชีวิตในดิน (living organisms) ในช่องระหว่างอนุภาคแข็ง นอกจากมีน้ำอากาศแล้ว ยังมีสิ่งมีชีวิตในระดับต่าง ๆ เช่น จุลินทรีย์ดิน พวกเห็ด รา แบคทีเรีย และแอคทิโนมัยซีท สัตว์ที่อาศัยในดิน เช่น แมลงต่าง ๆ ไส้เดือน หนู ตุ่น พร้อมกันนั้นยังประกอบด้วยรากพืช

7.3 โครงสร้างของดิน (soil structure)

โครงสร้างดิน หมายถึง การจับตัวเป็นเม็ดของอนุภาคเดี่ยวโดยกลไกธรรมชาติ เม็ดดินที่ได้เรียกว่า หน่วยโครงสร้าง (structure unit) หรือ ped การจำแนกโครงสร้างดินโดยยึดหลักเกณฑ์เกี่ยวกับความแตกต่างในด้านรูปร่าง (shape) ขนาด (size) และคุณสมบัติเกี่ยวกับความคงทน (durability or stability) ของเม็ดดิน ดังต่อไปนี้

7.3.1 spheroidal structure ลักษณะเป็นรูปทรงกลมมนๆ มักพบในดินชั้น A ขนาดของเม็ดดินค่อนข้างเล็ก คือ 1-10 มม. มีทั้งลักษณะที่มีรูพรุนมาก เรียกว่า crumb และลักษณะที่ไม่ค่อยมีรูพรุน เรียกว่า granular โครงสร้างประเภทนี้เมื่อเรียงตัวเป็นหน้าตัดดินจะเกิดช่องขนาดใหญ่ขึ้นระหว่างเม็ดดิน ช่วยทำให้หน้าตัดดินมีการระบายน้ำและอากาศ รวมทั้งการกระจายของรากที่ดี

7.3.2 block-like structure ลักษณะเป็นรูปทรงหลายเหลี่ยมหลายมุม หลายหน้าหรือหลายด้าน คล้ายกล่อง มักพบในดินชั้น B ขนาดของเม็ดดินโตกว่าประเภททรงกลม คือ อยู่ในช่วง

5-50 มม. ถ้าโครงสร้างมีเหลี่ยมมุมที่ชัดเจน เรียกว่า angular blocky แต่ถ้ามีเหลี่ยมและมุมมีลักษณะมน เรียกว่า sub- angular blocky โครงสร้างประเภทนี้เมื่อเรียงตัวเป็นหน้าตัดดินจะมีสภาพให้น้ำและอากาศซึมได้ รวมทั้งการกระจายของรากอยู่ในเกณฑ์ปานกลาง

7.3.3 plate-like structure ลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ วางซ้อนกันเป็นชั้น ๆ โดยมากจะเรียงกันตามแกนนอน โครงสร้างประเภทนี้มักพบในดินที่มีการอัดตัว (compaction) โดยเครื่องจักรกลการเกษตร หรือดินในชั้น E หรือผิวดินนาโดยทั่วไปเมื่อแห้ง การเรียงตัวเช่นนี้จะขัดขวางการไหลซึมของน้ำ และการระบายอากาศ รวมทั้งการกระจายตัวของรากพืช

7.3.4 prism-like structure ลักษณะรูปร่างทรงกระบอกยาวๆ หรือทรงสูง ๆ พบในดินชั้น B ของดินบางชนิด โครงสร้างมักมีขนาดใหญ่ คือ มีความยาว 10-100 มม. ถ้าพื้นที่หน้าตัดปลายทั้งสองข้างของทรงกระบอกนี้มีลักษณะเป็นเหลี่ยมมุมชัดเจน เรียกว่า prismatic มีสภาพให้น้ำซึมได้ปานกลาง แต่ถ้ามีลักษณะโค้งมนเหลี่ยมมุมไม่ชัดเจน เรียกว่า columnar มีสภาพให้น้ำซึมได้ค่อนข้างต่ำ

7.3.5 structureless (non structure) ไม่มีลักษณะของโครงสร้าง เนื่องจากไม่มีลักษณะของการสร้างตัว อาจมีลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้

ก. ลักษณะเป็นอนุภาคเดี่ยว (single grain) ได้แก่ ดินทราย (sandy soil) เพราะในสภาพธรรมชาติแล้ว จับตัวกันน้อยมาก เนื่องจากขาดปัจจัยส่งเสริมการเชื่อมยึดด้วยสารเชื่อม (cementing agent) ดินเหล่านี้มักมีลักษณะร่วนซุย และมีสมบัติด้านสภาพซึมน้ำและอากาศดี

ข. ลักษณะเป็นก้อนทึบ (massive) ได้แก่ ดินเนื้อละเอียดจำพวกดินเหนียวที่จับกันเป็นก้อนหรือเป็นตมขณะเปียก เช่น ดินนาที่ผ่านการทำเทือกหรือย่ำกวน (puddle) มาใหม่ๆ ดินเหล่านี้มีปัจจัยส่งเสริมให้อนุภาคดินเชื่อมยึดติดกัน แต่ไม่มีปัจจัยก่อให้เกิดการแตกแยกของเม็ดดิน ทำให้อนุภาคยึดติดกันเป็นพืด

7.4 การเกิดโครงสร้างดิน (formation of soil structure)

การเกิดโครงสร้างดิน ประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ

7.4.1 การเกาะกลุ่มของอนุภาคเดี่ยวเป็นกลุ่มก้อนอย่างหลวม ๆ (loose aggregates) เช่น

ก. กรณีดินมีความชื้นสูง เนื้อดินมี clay อยู่มาก และสารละลายดินประกอบด้วยแคตไอออนที่มีวาเลนซีสูง (multivalent cation) เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+}

ข. การเปียกและแห้งของดิน เนื่องจากดินจะขยายปริมาตรเมื่อได้รับน้ำ และหดปริมาตรเมื่อสูญเสียน้ำ ขณะที่ดินขยายปริมาตร อนุภาคเดี่ยว ๆ ถูกผลักให้แยกตัวออกจากกัน และขณะที่ดินหดปริมาตรอนุภาคดินจะถูกดึงเข้าหากัน เมื่อกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นสลับกันเป็นเวลานาน ๆ อนุภาคดินจะเกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ

ค. พฤติกรรมของรากพืช การชอนไชของรากพืชลงในพื้นดินจะผลักดันอนุภาคดินโดยรอบออกไปด้านข้าง และการดูดน้ำของรากจะทำให้มวลดินรอบ ๆ หดและขยายปริมาตรออกจากมวลดินรอบนอก กลายเป็นกลุ่มก้อนดินที่มีลักษณะเป็นเม็ดรอบรากพืช พร้อมกันนี้รากที่มีชีวิตยังขับสารเหนียวที่มีสมบัติเหมือนกาวออกมาเชื่อมอนุภาคดินด้วย

ง. พฤติกรรมของจุลินทรีย์ดิน ราที่งอกและแผ่กระจุกใยรา (mycelium) กระจายไปในมวลดิน ส่งผลให้อนุภาคดินเกาะกลุ่มเป็นเม็ดได้คล้ายรากพืช จุลินทรีย์ดินพวกแบคทีเรียและราสามารถย่อยสลายรากพืชเพื่อใช้เป็นพลังงานและเกิดผลพลอยได้เป็นสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นสารเชื่อม (cementing agent) (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา,2548)

7.4.2 การเชื่อมยึดอนุภาคดินที่เกาะกลุ่มกันหลวม ๆ เป็นเม็ดดินที่ถาวร (cementation) เป็นการกระทำโดยสารเชื่อม ซึ่งมีหลายประเภท ดังนี้

ก. สารอินทรีย์และฮิวมัส ที่ได้จากการสลายตัวของวัตถุโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน สามารถยึดเกาะโดยพันธะเคมี (chemical bond) กับอนุภาคผิวดิน โดยเฉพาะอนุภาคดินเหนียว พบว่า ดินที่มีอินทรียวัตถุมากมักจะมีโครงสร้างดีและเม็ดดินค่อนข้างคงทนต่อการสลาย

ข. ออกไซด์ของเหล็กและอลูมินัม ในดินมีสารประกอบดังกล่าวอยู่มาก เช่น ดินที่มีสีแดง มักจะมีโครงสร้างและเม็ดดินที่มีความคงทนต่อการสลาย ออกไซด์บางชนิดมีประจุเป็นบวก จึงสามารถเกาะยึดกับอนุภาคดินที่มีประจุลบได้ด้วยแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตย์ ออกไซด์บางชนิดที่ไม่มีประจุ สามารถตกตะกอนเปลี่ยนสภาพจากละลายน้ำได้ (soluble) เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble) ตรงจุดสัมผัสของอนุภาค ทำให้อนุภาคถูกเชื่อมติดกัน แล้วแห้งเป็นสารไม่ละลายน้ำก็ได้

ค. อนุภาคดินเหนียวโดยตัวมันเองแสดงตนเป็นสารเชื่อมได้ เพราะอนุภาคดินเหนียวมีขนาดเล็ก จึงมีผิวสัมผัสมาก สามารถเกาะติดอนุภาคดินเหนียวด้วยกันได้ดีโดยผ่านการเชื่อมยึดของสะพานแคตไอออน (cation bridge)

ดังนั้น จะเห็นว่าดินที่มีอินทรียวัตถุ ออกไซด์ของเหล็ก อลูมินัม และดินเหนียวมากจะเป็นดินที่มีโครงสร้างและเม็ดดินที่มีความคงทนต่อการแยกสลาย โดยกิจกรรมทางการเกษตร เช่น การไถพรวน และการกระทบกระเทือนโดยน้ำฝน หรือน้ำชลประทาน

7.5 การปรับปรุงโครงสร้างดิน (soil conditioners)

โครงสร้างดินมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการใช้ดินเมื่อผลิตพืชทางการเกษตร เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมดิน การยกร่อง การให้น้ำ การให้ปุ๋ย ล้วนแต่ได้รับอิทธิพลจากโครงสร้างของดินทั้งสิ้นเพราะหากโครงสร้างของดินไม่ดีแล้ว จะทำให้เกิดการอัดตัวแน่นของหน้าดิน การระบายน้ำและอากาศเลว รากพืชจะได้รับการกระทบกระเทือน การซึมน้ำผ่านผิวดินช้าส่งผลให้เกิดการไหล่บ่าของน้ำบนหน้าดิน การปรับปรุงโครงสร้างของดินสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

7.5.1 การเลือกเตรียมดินในขณะความชื้นพอเหมาะ คือ แห้งหมาด ๆ มิฉะนั้นอาจทำให้เกิดชั้นดินดานขึ้นได้ภายใต้ชั้นไถพรวน ซึ่งเป็นอันตรายอย่างยิ่งต่อคุณสมบัติของดิน โดยเฉพาะดินที่มีเนื้อละเอียดมาก

7.5.2 การเติมปูน ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมักและปุ๋ยพืชสดลงในดิน สิ่งเหล่านี้ล้วนแต่มีผลทำให้โครงสร้างของดินดีขึ้น โดยไปช่วยเร่งให้พืชที่ปลูกบนดินมีการเจริญเติบโตดีขึ้น เมื่อพืชปลูกเจริญดีย่อมเป็นการปกคลุมผิวดินหนาแน่นขึ้น ช่วยป้องกันการทำลายโครงสร้างของดิน เนื่องจากน้ำได้เป็นอย่างดี

7.5.3 การปลูกพืชปรับปรุงดิน พืชตระกูลหญ้าหรือพืชที่มีระบบรากฝอยมากมายจะช่วยให้ดินมีการสร้างตัวที่ดีและแข็งแรงทนทาน เพราะรากพืชจะชอนไชเข้าไปในดินทุกทิศทางส่งผลให้มวลของดินแยกจากกันและเกิดเป็นเม็ดดินเล็ก ๆ มากมาย จะมีการจับกันของเม็ดดินหรืออนุภาคดินค่อนข้างแข็งแรง เพราะอนุภาคดินที่อยู่ระหว่างรากจะโดนแรงอัดจากการชอนไชของรากให้แน่น และรากยังเป็นตัวเชื่อมยึดที่ดีอีกด้วย

7.5.4 การใช้วัสดุคลุมดินต่าง ๆ เช่น พวกใบไม้ ขี้เลื่อย กากถั่ว ฯลฯ จะช่วยป้องกันเม็ดดินจากการตกกระทบของฝน ลดการทำลายโครงสร้างของดิน และช่วยให้ดินมีโอกาสสร้างตัวได้ดีขึ้น

7.5.5 การใส่สารปรับปรุงดิน มัตติกา (2549) กล่าวว่า สารสังเคราะห์อินทรีย์บางชนิดที่นิยมใส่ลงในดินเพื่อให้ทำหน้าที่ยึดอนุภาคดินเข้าด้วยกัน สารสังเคราะห์นี้เรียกว่า soil conditioners ส่วนมากเป็นพวก organic polymer ที่มีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบลูกโซ่(chain)ยาว ๆ และมี active group เป็นพวก $-NH_2$ หรือ -OH ซึ่งจะยึดเกาะกับอนุภาคดินได้ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี ปัจจุบันที่รู้จักกันทั่วไป ได้แก่

(1) Polyacrylamide (PAM) เป็นสารอินทรีย์สังเคราะห์ในรูปพอลิเมอร์ที่มีโซ่ยาว (long chain polymers) มีน้ำหนักโมเลกุลมากและมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วยมอนอเมอร์ (monomers) มากกว่า 150,000 มอนอเมอร์

(2) Ammonium Laureth Sulfate หรือจะเรียกในอีกชื่อว่า ammonium lauryl ether sulfate คือ สารปรับปรุงสมบัติทางกายภาพของดินที่มีปัญหาต่อการแทรกซึมน้ำ

(3) Polyvinyl Alcohol-nonionic polymer (PVA)

(4) Polyvinyl Acetate

(5) Hydrolyzed Polyacrylonitrile (HPAN)

(6) Polyacrylic acid

(7) Vinyl acetate maleic acid copolymer (VAMA)

(8) Polyacrylamide (PAM)

(9) Methyltrichlorosilane (MCS)

ดังนั้นจะเห็นว่า สารเหล่านี้แม้จะให้ผลดีมากในการปรับปรุงโครงสร้างดิน แต่การนำมาใช้ยังไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร เนื่องจากราคาแพงเกินไป ผลดีที่จะได้รับจากการใส่สารเหล่านี้ จึงไม่คุ้มกับต้นทุนที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงดินทางการเกษตร (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548 และ สุพรรษา, 2550)

7.5.6 การเพิ่มอินทรียวัตถุลงในดิน เป็นการจัดการโครงสร้างดินที่มีความนิยมกันมากที่สุด ที่ใช้ในการปรับปรุงโครงสร้างดินในประเทศไทยในสถานการณ์ปัจจุบัน เพราะเป็นสิ่งที่หาได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และไม่มีอันตรายต่อต้นพืชแต่ประการใด การเติมอินทรียวัตถุให้มาก ๆ จะทำให้ดินร่วนซุย เพราะอินทรียวัตถุเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวเชื่อม (cementing agent) อนุภาคดินให้ยึดเกาะกันได้อย่างดียิ่ง มีความคงทนของเม็ดดินเมื่อเปียกน้ำสูง นอกจากนี้ยังพบว่าบทบาทของไซยาโนแบคทีเรียโดยทั่วไปในดิน ได้แก่ การเพิ่มอินทรียวัตถุให้กับดิน แม้ว่าจะเป็นปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับพืชชั้นสูง แต่ก็ช่วยส่งเสริมการเกิดโครงสร้างที่ดีขึ้นในบริเวณผิวดิน ทั้งนี้เพราะไซยาโนแบคทีเรียในดินมักมีความสามารถสร้างสารพอลิแซ็คคาไรด์ออกมานอกเซลล์ (extracellular polysaccharide) ได้มาก ช่วยส่งเสริมการเกิดเม็ดดินที่คงทนได้ดี (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา ,2548)

8. สารปรับปรุงโครงสร้างดินจากจุลินทรีย์ดิน (substances structure of soil microorganisms)

ปัจจัยส่งเสริมการเกิดโครงสร้างดินโดยธรรมชาตินั้น การผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ดินนั้นมีความสำคัญที่สุดต่อการสร้างเม็ดดิน โครงสร้างดิน และความเสถียรของดิน ซึ่งมีรายงานมาตั้งแต่ ปี 1955 ว่าไซยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ ปัจจุบันมีประมาณ 70 สายพันธุ์ที่ศึกษาว่าสามารถปล่อยสารพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ และทุกการศึกษาจะเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปล่อยออกนอกเซลล์แล้วละลายน้ำได้ (water soluble released polysaccharide) อยู่ในลำดับ Chroococcales Oscillatoriales Nostocales และ Stigonematales (นารินทร์, 2547)

8.1 คุณสมบัติของสารพอลิแซ็กคาไรด์

1) มีกลุ่มที่มีความว่องไวทางเคมี คือ คาร์บอกซิล อะมิโนกัวนิคิโนและโลหะคีเลต

2) มีโมเลกุลของสารที่ก่อให้เกิดพันธะไฮโดรเจนได้

3) มีอำนาจทางไฟฟ้าทั้งที่ไม่เป็นอิออนและเป็นอิออน

8.2 การเกาะยึดของสารพอลิแซ็กคาไรด์กับอนุภาคของดิน

1) โครงสร้างของสารพอลิแซ็กคาไรด์มีลักษณะเป็นเส้นตรงและยาว จึงเป็นสะพานเชื่อมให้ยึดสารพอลิแซ็กคาไรด์กับอนุภาคของดิน

2) มีสมบัติการยืดหยุ่น ส่งผลให้ตำแหน่งในการยึดเกาะกันด้วยแรงวัลเดอร์วาล (van der Waal's forces)

3) มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl groups, -OH) จำนวนมาก ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจน

4) มีหมู่ที่เป็นกรด เช่น คาร์บอกซิล (carboxyl group, -COOH) ส่งผลให้เกิดการเกาะยึดกับประจุผ่าน divalent และ trivalent หรือการดูดยึดประจุลบบนตำแหน่งประจุบวกของอนุภาคดินเหนียว

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.) (2548) รายงานว่า การใช้สาหร่ายที่สามารถหลั่งสารพอลิแซ็กคาไรด์สู่ภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide) เป็นตัวส่งเสริมความเสถียรของเม็ดดินและปรับปรุงโครงสร้างของดิน พบว่า *Chlamydomonas* เป็นสาหร่ายสีเขียวชนิดที่ผลิตพาล์เมลลอยด์ (palmelloid) เป็นตัวปรับปรุงโครงสร้างดินและ *Chlamydomonas maxicana* และ *Chlamydomonas sajao* สามารถผลิตสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากถึงร้อยละ 75 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในช่วงการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบประกอบด้วย กลูโคส กาแลคโตส ฟิวโนส และอาราบิโนส นอกจากนี้สาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ยังสามารถผลิตกรดยูโรนิค (uronic acid) ซึ่งส่งผลต่อความเสถียรของเม็ดดินโดยเป็นสะพานของประจุบวก (cation bridge) ยึดเหนี่ยวอนุภาคดินซึ่งมีประจุลบเข้าด้วยกัน

สุพรรษา (2550) ได้ศึกษาคุณสมบัติสารปรับโครงสร้างของดินจากสาหร่าย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Nostoc* sp. TISTR8290, *Nostoc muscorum* TISTR9054, *Nostoc muscorum* TISTR8871 และ *Nostoc* sp. TISTR 8873 พบว่า การเติมพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งของนอกเซลล์ช่วยฟื้นฟูโครงสร้างดินได้มากกว่าการเติมชีวมวลสด

Zulpa de Caire et al. (1997) ได้ทดสอบการเติมสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตสู่ภายนอกเซลล์และการเติมชีวมวลสดของ *Nostoc muscorum* ลงไปในดิน พบว่า การทดสอบทั้ง 2 อย่างสามารถสร้างเม็ดดินที่มีความเสถียรได้ แต่การเติมสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตสู่ภายนอกเซลล์สามารถสร้างเม็ดดินที่มีความเสถียรได้มากกว่าและเร็วกว่าการเติมชีวมวลสดลงไป

8.3 องค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาไรด์

สารพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกจากดิน พบว่าเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 10 ชนิด คือ กลูโคส (glucose)กาแลคโทส(galactose) แมนโนส (mannose) ไรโบส (ribose) ไซโลส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) ฟูโคส (fucose) แรมโนส (rhamnose) กรดกลูคิวโรนิค (glucuronic acid) และกรดกาแลคทิวโรนิค (galacturonic acid) นอกจากนี้ ไพบูลย์ (2528) อ้างอิงใน สุพรรษา (2550) ได้อธิบายองค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งแยกจากดินต่าง ๆ ดังตาราง 6

ตาราง 6 องค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งแยกออกมาจากดินต่าง ๆ

Factor	British soil	Scottish soil	Indiana soil
Equivalent weight	1,185	1,000	1,945
Nitrogen (%)	0.34	1.6	0.34
Methoxyl (%)	0	2.0	2.4
Reducing sugar (%)	80	-	-
Uronic anhydride (%)	15.8	20.1	9.1
Amino sugars (%)	0	0	Trace
Component sugar as % of total			
Glucose	20.8	36.0	21.2
Galactose	20.0	0	16.2
Mannose	21.9	0	18.5
Arabinose	11.7	29.8	10.4
Xylose	23.6	10.3	12.6
Ribose	1.5	4.5	Trace
Rhammose	0	11.0	14.2
Fucose	0	0.7	0
Unknown	0	7.0	6.6

ที่มา : ไพบูลย์ (2528) อ้างอิงใน สุพรรษา (2550)

องค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาไรด์ในดินมีบทบาทสำคัญต่อดินในทางเกษตรมากทั้งในแง่ของความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนบวก ความเสถียรของโครงสร้างของดิน การเป็นประโยชน์ได้ของไนโตรเจน การใช้คาร์บอนให้เป็นประโยชน์ของจุลินทรีย์ดินและการทำให้เกิดคีเลชันกับโลหะในดิน สารพอลิแซ็กคาไรด์นอกจากจะผลิตโดยแบคทีเรีย รา และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ แล้วยังมีสาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิดที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีผู้ศึกษาในเอกสารต่าง ๆ เช่น

นารินทร์ (2547) ได้ศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย “สาหร่ายเห็ดลาบ” (*Nostoc commune*) ที่เก็บจาก 3 แหล่ง คือ เก็บจากแหล่งธรรมชาติ เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น และเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าทั้ง 3 แหล่งพบน้ำตาล 11 ชนิด ได้แก่ ฟูโคส ไซโลส ไรโบส แมนโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กรดกาแลคทิวโรนิค กรดกลูนิวโรนิค อะราบิโนส และแรมโนสในปริมาณที่แตกต่างกัน

Bar-Or and Shilo (1987) ศึกษา *Phormidium* J-1 พบว่า สารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่น้ำตาลเป็นองค์ประกอบสังเคราะห์ sulfate heteropolysccharide ชื่อว่า emulcyan ซึ่งมีกรดไขมันและโปรตีนเป็นองค์ประกอบและพบว่า*Anabaenopsiscircularis*สามารถผลิตสารacidic polysaccharide ประกอบด้วย keto acid และน้ำตาล

Bishop et,al.,(1954) ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จาก Anabaena cylindrical ผลผลิตที่ได้ กลูโคส : ไซโลส : กรดกลูคิวโรนิค : กาแลคโตส : แรมโนส : อาราบิโนส ในอัตราส่วน 5 : 4 : 4 : 1 : 1 : 1

Moore and Tischer (1965) ศึกษาการหลั่งสารพอลิแซ็กคาไรด์สู่ภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide)ของ *Anabaena flos-aquae* strain A-37 สารพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วย กรดกลูคิวโรนิค : กลูโคส : ไซโลส : ไรโบส ในอัตราส่วน 1 : 88 : 39 : 3

Wang and Tischer (1973) ศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ของ *Anabaena flos-aquae* strain A-37 พบผลผลิตที่ได้ กลูโคส : ไซโลส : ไรโบส : กรดยูโรนิค ในอัตราส่วน 6 : 1 : 1 : 10 โดยสารพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวจะเป็นส่วนของ neutral polymer 62% และ acidic polymer 38%

9. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์

ความแตกต่างของสภาพแวดล้อม องค์ประกอบของสารอาหาร ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพ มีผลต่อการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ของไซยาโนแบคทีเรีย (Li *et al*., 2001) ได้แก่

9.1 แหล่งไนโตรเจน

สภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวกระตุ้นให้ *Cyanothece* stain 16Som2 หลั่ง RPS อย่างไรก็ตาม การผลิต RPS ใน *Anabaena* sp. ATCC33047 จะพบได้ภายใต้สภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจนเช่นเดียวกับใน *Spilulina* ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นในสภาวะขาดแหล่งไนโตรเจน การเพิ่มแหล่งไนโตรเจนในอาหารส่งผลให้การผลิต RPS ลดลงใน *Anabaena cylindrical* 10C, *Phormidium*, *Anabaena torulosa* และ *Anabaeba* sp. WSAF ส่วนใน *Aphanocapsa halophytia* MN-11 ผลิต RPS ได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 100 mg/l

9.2 แหล่งฟอสเฟต

การขาดแหล่งฟอสเฟตและการเพิ่มขึ้นของฟอสเฟตส่งผลให้ *Phormidium* ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ลดลง แต่การเพิ่มแหล่งฟอตเฟสในอาหารจะมีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ใน *A. torulosa*, *Anabaena* sp. WSAF และ *Spirulina* ปริมาณฟอสเฟตที่จำกัดส่งผลให้การสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตใน *Cyanothece* strain 16Som2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้ามการขาดฟอสเฟตส่งผลให้การผลิตพอลิแซ็กคาร์ไรด์ของ *Anabaena* WSAF และ *A. torulosa* ลดลง เช่นเดียวกับใน *A. cylindrica* การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดใน *A. halophytica* MN-11 เมื่อในอาหารมีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส 40 mg/l

9.3 เกลือ

การขาด NaCl เป็นสาเหตุให้การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Spirulina* ลดลงเพียงเล็กน้อย และการเพิ่มขึ้นของเกลือไม่มีผลต่อการผลิต RPS ใน *C. capsulata* และ *Caynothece* strain 16Som2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaCl ที่มีต่อการผลิต RPS ใน *A. halophytia* MN-11 และ *Cyanothece* sp. ATCC51142 คือ 3% และ 4.5% ตามลำดับ ความเข้มข้นของ NaCl สูงเป็นสาเหตุให้การผลิต RPS ลดลงได้ใน *Anabaena* sp. ATCC33047

9.4 ไอออนของโลหะ

ปัญหาการขาดแคลเซียมก่อให้เกิดการผลิต RPS เพิ่มขึ้นใน *C. capsulata* อย่างมีนัยสำคัญ การสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตใน *Cyanothece* stain 16Som2 ไม่ได้เพิ่มขึ้นจากการขาด Mg^{2+} แต่การขาดแคลเซียมทำให้เกิดผลกระทบกับปริมาณ RPS ที่ผลิตโดย *Cyanothece* strain 16Som2 และยังพบว่า การผลิต RPS ใน *Phormidium* sp. Strain J-1 เพิ่มขึ้นโดยการลดปริมาณ

แคลเซียมในอาหารลง การสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์พบว่า มีโลหะที่มีความเฉพาะเจาะจง ประสิทธิผลของไอออนบวกที่มีผลต่อการผลิต RPS ใน *Nostoc spongialforme* มีดังต่อไปนี้ Cu > Hg > Ni

9.5 ปัจจัยทางเคมี

การผลิต RPS ใน *A. cylindrica* และ *C. capsulata* ถูกกระตุ้นโดยการเพิ่มปริมาณของ glyoxylate ซึ่งเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งเพราะการเพิ่ม glyoxylate ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ในทางตรงกันข้าม การขาดสารอาหารบางอย่างสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ได้ แต่สามารถเพิ่มผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่แท้จริงได้ เพราะถูกขัดขวางด้วยการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเพิ่ม acetate, valerate, glucose หรือ citrate ในอาหารเป็นสาเหตุให้การผลิต RPS ใน *A. cylindrica* 10C ลดลง แต่ใน *Phormidium* sp. Strain J-1 การผลิต RPS เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของ EDTA ส่วนค่า pH สูง ๆ ก็ไม่มีผลกระทบต่อการผลิต RPS ของ *C. capsulata* การผลิต RPS ได้สูงสุดใน *Cyanothece* sp. ATCC51142 ที่ pH 7.0

9.6 ปัจจัยทางฟิสิกส์

การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ของ *Anabaena* sp. ATCC33047 จะเห็นได้ชัดเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น แตกต่างจาก *Spirulina* ที่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็นสาเหตุให้การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ลดลง การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ของ *Anabaena* sp. ATCC33047 จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อให้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง (light/dark cycles) แตกต่างจาก *Phormidium*, *A. torulosa* และ *Anabaena* sp. WSAF การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ลดลง

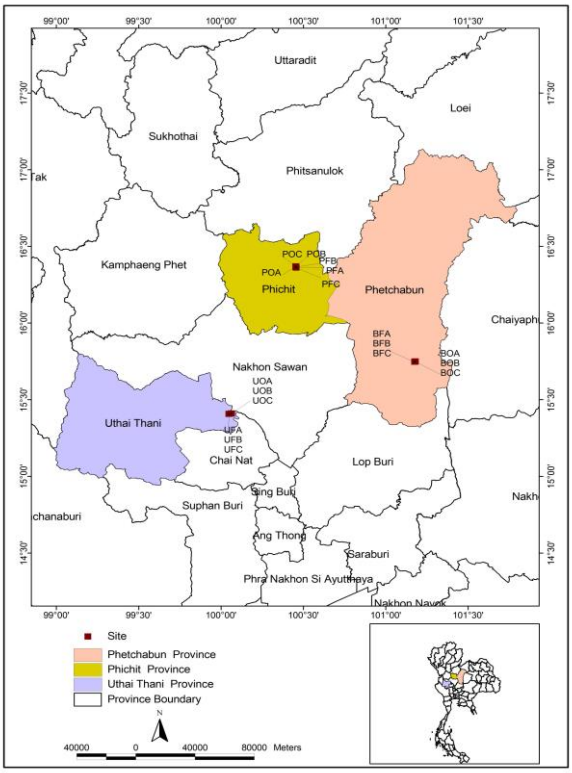
9.7 ระยะการเจริญ

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ของไซยาโน-แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะอยู่ในระยะการเจริญที่ไม่เหมือนกัน เช่น *Cyanothece* sp. BK68K, *Nostoc calcicola*, *Phormidium* J-1 และ *Anabaena* sp. ATCC33047 จะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ (RPS) ในระยะ stationary phase ซึ่งแตกต่างจาก *C. capsulate* และ *A. halophytia* จะเริ่มผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ ในระหว่างการเจริญเติบโตและเพิ่มขึ้นพร้อมๆ กับความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและสูงสุดในระยะ stationary phase

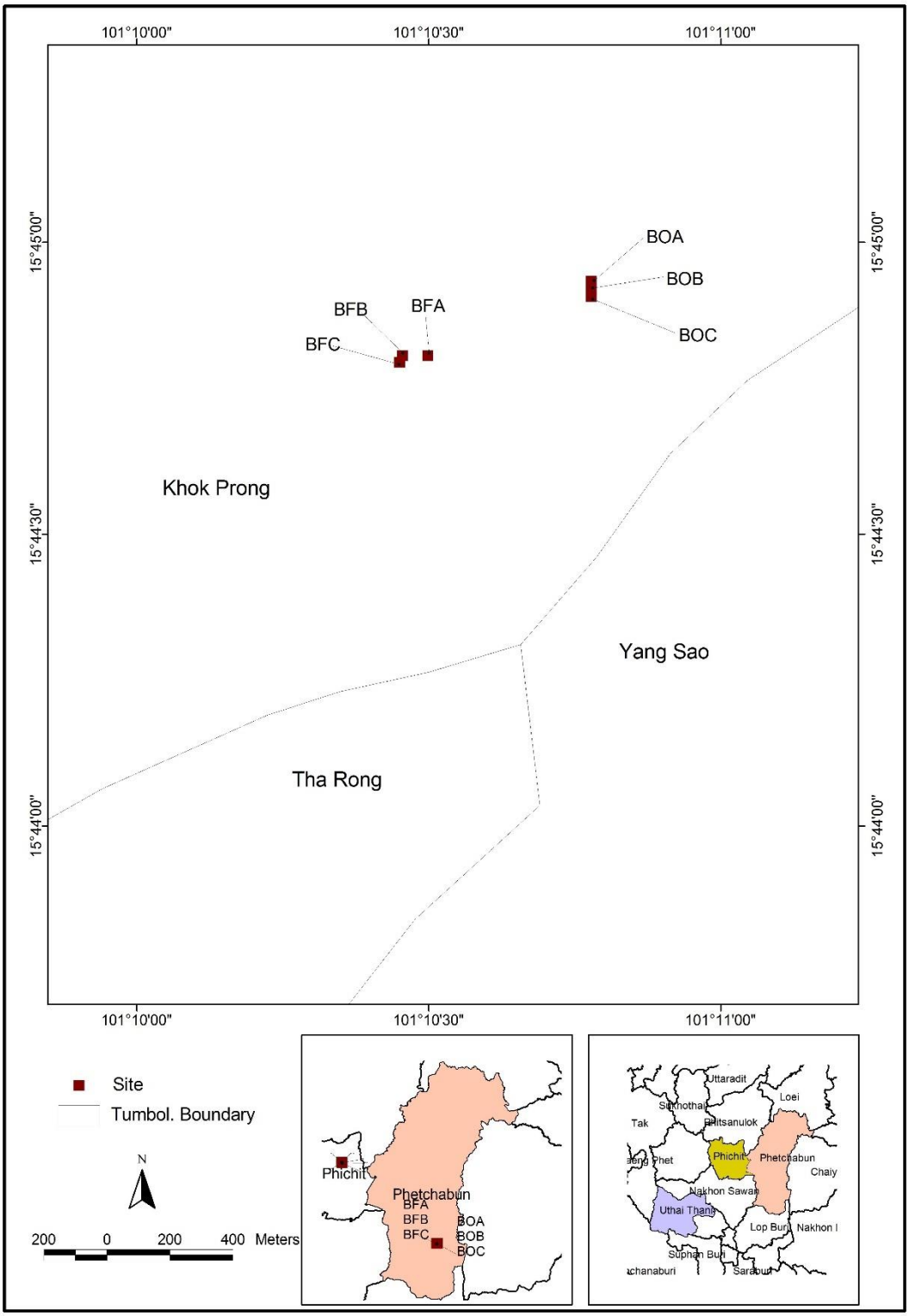
บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

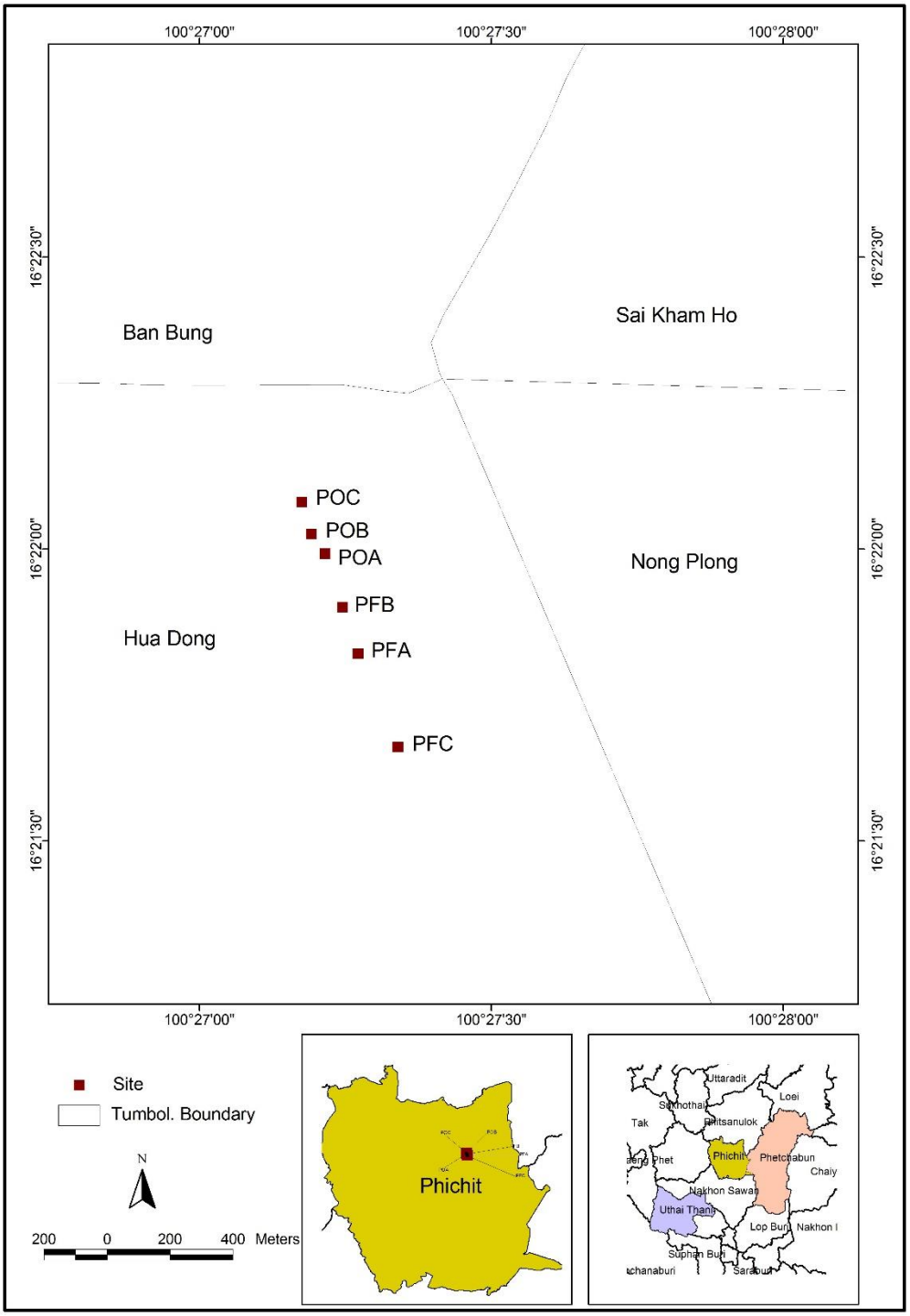
1.1 ศึกษาลักษณะของดินในแปลงดินนาเกษตรอินทรีย์ (O) ที่ได้รับมาตรฐาน IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements) หรือที่เรียกว่า สมาพันธ์เกษตรอินทรีย์นานาชาติ และแปลงดินนาที่ใช้สารเคมี (F) ในเขตภาคเหนือตอนล่าง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเพชรบูรณ์ (B) พิจิตร (P) และอุทัยธานี (U) โดยตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดินได้แสดงในภาพ 2, 3, 4 และ 5 ดินตัวอย่างที่นำมาศึกษาลักษณะทางกายภาพ เคมีและจุลชีววิทยาเป็นดินในแปลงนาก่อนฤดูเพาะปลูกข้าว



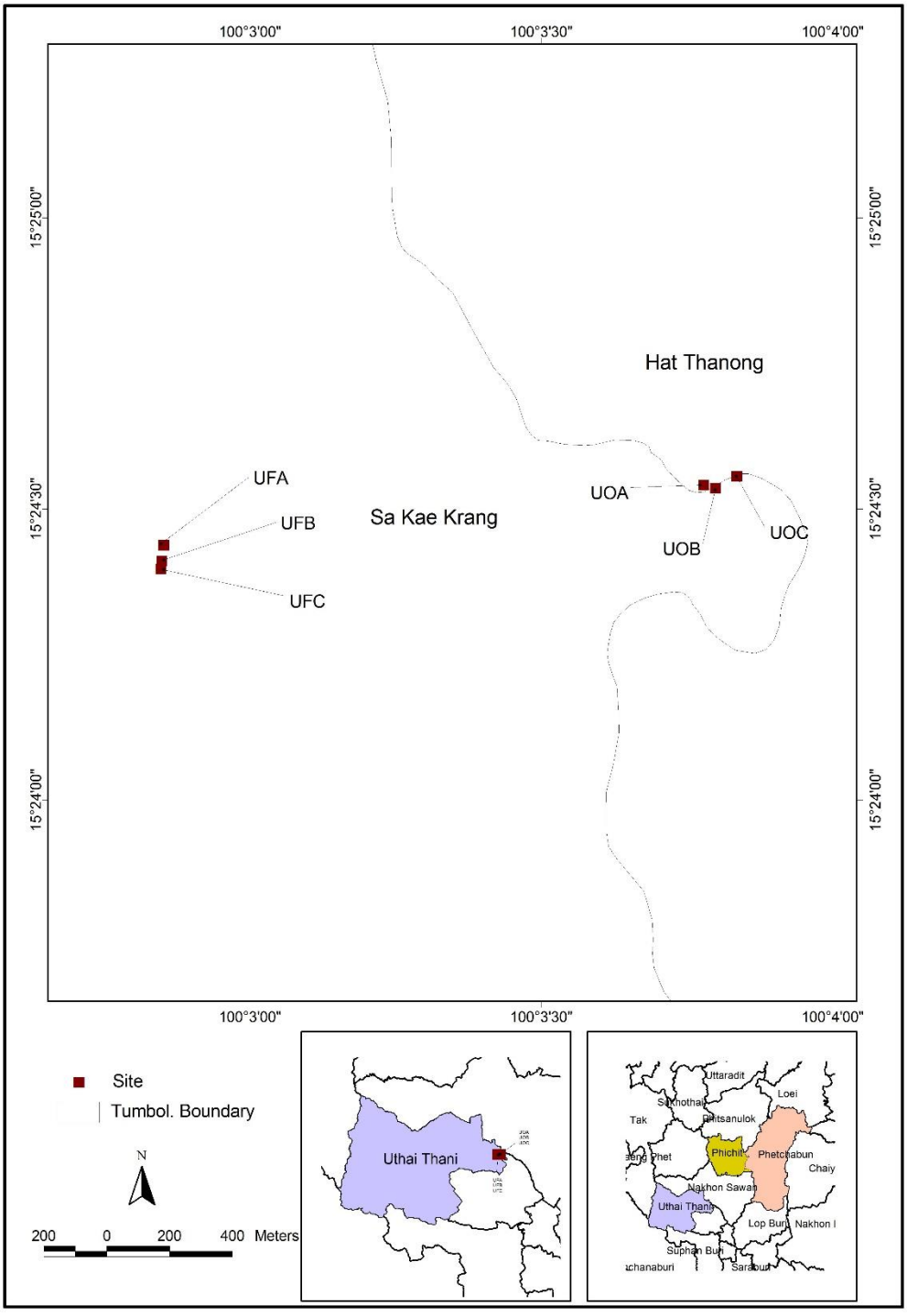
ภาพ 1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินนาเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงดินนาที่ใช้สารเคมี (F) (เพชรบูรณ์ : BOA, BOB, BOC, BFA, BFB, BFC; พิจิตร : POA, POB, POC, PFA, PFB, PFC; อุทัยธานี : UOA, UOB, UOC, UFA, UFB, UFC)



ภาพ 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินนาเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงดินนาที่ใช้สารเคมี (F) ในตำบลโคกปรอำเภอวิเชียรบุรี จังหวัดเพชรบูรณ์

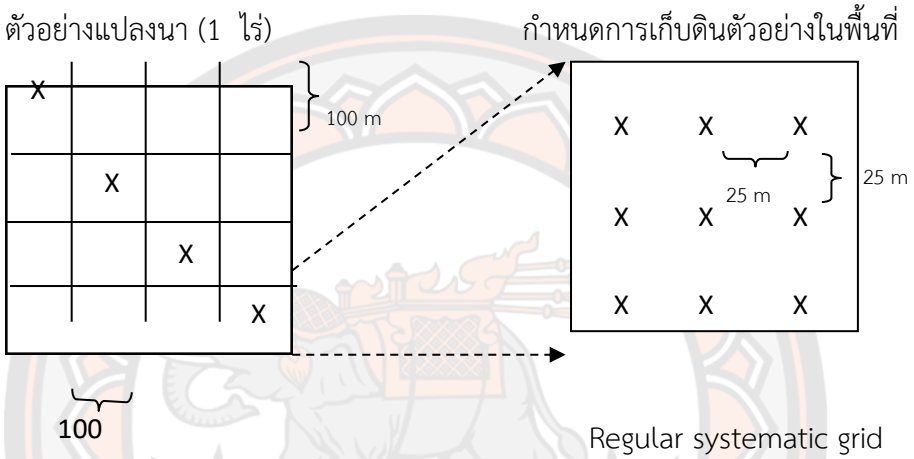


ภาพ 3 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินนาเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงดินนาที่ใช้สารเคมี (F) ในตำบลหัวดงอำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร



ภาพ 4 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินนาเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงดินนาที่ใช้สารเคมี (F) ในตำบลสะแกกรัง อำเภอเมือง จังหวัดอุทัยธานี

1.2 แบ่งแปลงนาที่ต้องการศึกษาออกเป็น 3 แปลงย่อย (A, B และ C) โดยให้แต่ละแปลงย่อยมีสภาพพื้นที่ และชนิดของดินคล้ายคลึงกัน แปลงนาย่อย 1 แปลง แบ่งพื้นที่เป็น 16 ส่วน ทำการเก็บตัวอย่างดิน 4 ส่วน แปลงนาแต่ละส่วนยังถูกแบ่งย่อยเป็น 9 จุด ทำให้ต้องเก็บตัวอย่างดินในแต่ละแปลงรวม 36 จุด โดยการเก็บตัวอย่างดินชั้นบน (surface soil) ให้ลึกประมาณ 15 เซนติเมตร ด้วยเครื่องมือเก็บตัวอย่าง Hand Auger (ศิริพรรณ, 2550) ดังภาพ 6



ภาพ 5 แผนผังตำแหน่งที่เก็บดินตัวอย่างแบบสุ่มในแปลงย่อย

1.3 นำดินที่เก็บจากจุดต่าง ๆ ในแปลงย่อย ทั้ง 36 จุดมารวมและคลุกเคล้าให้เข้ากัน เรียกตัวอย่างนี้ว่า composite sample

1.4 นำตัวอย่างดินมาแผ่บนกระดาษแล้วนำไปใส่ในตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert Model 600 ตั้งอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วันจนตัวอย่างดินแห้ง

1.5 จากนั้นนำดินที่แห้งแล้วไปบดด้วยโกร่งที่สะอาด และนำดินที่บดละเอียดในร่อนผ่านตะแกรงร่อน USA Standard Test Sieve ขนาด 2 มิลลิเมตร เก็บตัวอย่างดินที่ร่อนแล้วไว้ในตู้ดูดความชื้น ยี่ห้อ Boekel เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน (soil texture), ความหนาแน่นรวมของดิน (soil bulk density) ลักษณะทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH), อินทรียวัตถุในดิน (Organic matter: OM), ธาตุอาหารหลัก (N-P-K) และธาตุอาหารรอง (Ca, Mg)

2. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของดิน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2547)

2.1 การศึกษาลักษณะเนื้อดิน (soil texture) ใช้วิธี Hydrometer method

2.1.1 อบตัวอย่างดิน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างดินที่ชั่งแล้วใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้ตัวอย่างดินเย็น

2.1.2 ชั่งตัวอย่างดินในข้อ 2.1.1 ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร 2 ใบ ๆ ละ 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้ดินและน้ำเข้ากัน เติมสารละลาย 30% H_2O_2 ลงไปช้า ๆ ครั้งละ5-10 มิลลิลิตร ดินจะเกิดฟองก๊าซ เติมจนดินสีจางลงและไม่เกิดฟองก๊าซ ยกขึ้นตั้งบน hot plate ไล่ H_2O_2 ให้หมด นำตัวอย่างใน beaker ที่ 1 ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำไปชั่งน้ำหนักของดินที่ไล่อินทรียวัตถุออกหมด

2.1.3 นำบีกเกอร์ที่ 2 เติมสารละลาย calgon ลงไป 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ่ายตัวอย่างดินลงใน dispersion cup โดยใช้น้ำยาล้างจนไม่มีดินติดอยู่ที่บีกเกอร์ กวนด้วยเครื่องกวนประมาณ 5 นาที แล้วถ่ายลงใน Bouyoucos jar ค่อย ๆ หย่อน hydrometer ลงใน Bouyoucos jar เติมน้ำให้ถึงขีด 1,130 มิลลิลิตร

2.1.4 เติมสารละลาย 5% calgon 100 มิลลิลิตร ลงใน Bouyoucos jar อีกใบ เติมน้ำ 100-200 มิลลิลิตร ค่อย ๆ หย่อน Hydrometer ลงไป เติมน้ำจนถึงขีด 1,130 มิลลิลิตร ยก Hydrometer ออก

2.1.5 กวนสารแขวนลอยตัวอย่างใน Bouyoucos jar ประมาณ 20-25 ครั้ง เมื่อถึงเวลา 40 วินาที บันทึกค่าที่อ่านได้จาก Hydrometer ที่หย่อนลงไป วัดอุณหภูมิ บันทึกไว้

2.1.6 กวนสารละลาย calgon เมื่อถึงเวลา 20 วินาที หย่อน Hydrometer ลงในสารละลาย และอ่านค่าของสารละลาย calgon และเมื่อถึงเวลา 40 วินาที บันทึกค่าที่อ่านได้อีกครั้ง วัดอุณหภูมิของสารละลาย calgon บันทึกไว้

2.1.7 เมื่อเวลาครบ 2 ชั่วโมง ให้วัดค่าของสารแขวนลอยดิน อุณหภูมิ และวัดค่าของสารละลาย calgon และอุณหภูมิ จดบันทึกไว้

2.1.8 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของอนุภาคดิน และนำไปเข้า Diagram สามเหลี่ยมเพื่อหาประเภทของเนื้อดิน

$$\% \text{ (Silt+Clay)} = \frac{\text{Rs ที่ 40 วินาที x 100}}{\text{น้ำหนักดิน}}$$

$$\% \text{ Clay} = \frac{\text{Rs ที่ 2 ชั่วโมง x 100}}{\text{น้ำหนักดิน}}$$

$$\% \text{ Sand} = 100 - \% \text{ (Silt+Clay)}$$

$$\% \text{ Silt} = \% \text{ (Silt+Clay)} - \% \text{ Clay}$$

2.2 การศึกษาความหนาแน่นรวมของดิน (soil bulk density) ใช้วิธี Core method

2.2.1 เก็บ undisturbed soil core โดยใช้กระบอกโลหะเจาะลงไปในดินตามความลึกที่ต้องการ แล้วปาดหน้าดินทั้งสองด้านของกระบอกให้เรียบพอดีกับปากกระบอกด้วยมีดปาดดิน

2.2.2 ชั่งน้ำหนักของกระบอกที่มีดินบรรจุอยู่ (Wsw + Wa)

2.2.3 นำกระบอกโลหะที่มีดินบรรจุอยู่เข้าตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส กระทั่งน้ำหนักคงที่ (Ws + Wa)

2.2.4 ชั่งน้ำหนักของกระบอกโลหะเปล่า (Wa) พร้อมวัดเส้นผ่าศูนย์กลางและความยาวของกระบอก คำนวณหาปริมาตรภายในของกระบอก (Vs)

$$\text{ความหนาแน่นรวมของดิน} = \frac{(Ws + Wa) - Wa}{Vs}$$

3. การศึกษาลักษณะทางเคมีของดิน

3.1 ความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) โดยใช้เครื่องมือวัดปฏิกิริยาดิน (pH meter) ใช้อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:1

3.1.1 ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในบิกเกอร์

3.1.2 เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

3.1.3 นำสารละลายดินไปวัด pH ด้วยเครื่องวัด pH

3.2 อินทรียวัตถุในดิน (Organic matter; OM)

3.2.1 ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

3.2.2 ปิเปต สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมท 1 นอร์มอล 10 มิลลิลิตร

3.2.3 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 1-2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นหยดอินดิเคเตอร์ออร์โทฟีแนนโทรลีน จำนวน 5 หยด

3.2.4 ไทเทรตด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 นอร์มอล เพื่อหาปริมาณโพแทสเซียมไดโครเมทที่เหลือจากปฏิกิริยา กระทั่งสีของสารละลายดินเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง ถือว่าถึงจุดยุติ

3.2.5 บันทึกปริมาณโพแทสเซียมไดโครเมท และเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ คำนวณปริมาณอินทรีย์คาร์บอน และอินทรียวัตถุ

$$\%\ \text{Organic carbon} = \frac{(B-T)N}{B} \times \frac{100}{77} \times 3 \times \frac{100}{10^3} \times \frac{10}{W}$$

$$\%\ \text{Organic matter} = \%\ \text{Organic carbon} \times 1.724$$

หรือ $$\%\ \text{Organic matter} = \frac{(B-T)N}{B} \times \frac{100}{77} \times \frac{100}{58} \times \frac{3}{10^3} \times \frac{100}{W} \times 10$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดโครเมท (นอร์มอล)

B = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

T = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ไทเทรตกับตัวอย่างดิน (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักดิน (กรัม)

3.3 ธาตุอาหารหลักในดิน (N-P-K)

3.3.1 วิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในดิน (Total Nitrogen; N) ใช้วิธี Kjeldahl method

(1) ชั่งดิน 2 กรัม ใส่ลงใน micro-kjeldahl tube เติมสารเร่งสำเร็จรูปอัดเม็ด kjeltab 2 เม็ด และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยเตาย่อย จนได้สารละลายสีขาวขุ่น

(2) นำไปเข้าเครื่องกลั่น Kjeltec System กำหนดให้เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และ NaOH 40% 25 มิลลิลิตร ประมาณ 4 นาที

(3) เติมกรดบอริก 4% 25 มิลลิลิตร ลงในชวดรูปชมพู่ หยดอินดิเคเตอร์ประมาณ6-7 หยด สารละลายจะมีสีม่วงแดง นำไปรองรับการกลั่นจากข้อ (2) สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเขียว และรองรับจนได้สารละลายในขวดรูปชมพู่ ประมาณ 150 มิลลิลิตร

(4) ไทเทรตสารละลายที่ได้จากการกลั่นกับกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล จนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดง

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน = X นอร์มอล

ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่ใช้กับ blank = B มิลลิลิตร

จำนวนปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่ใช้ = Y – B มิลลิลิตร

ดิน A กรัม มีปริมาณไนโตรเจน = X(Y-B) มิลลิกรัมสมมูล

ดิน 100 กรัม มีปริมาณไนโตรเจน = $\frac{X(Y-B)x100x0.014}{A}$ g

= $\frac{1.4x(Y-B)}{A}$ เปอร์เซ็นต์

3.3.2 การวิเคราะห์ไนโตรเจนในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Ammonium-N และ Nitrate-N) โดยใช้วิธี Steam Distillation

(1) ชั่งดิน 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติม 2 นอร์มอล KCl 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 1 ชั่วโมง ทำการกรอง

(2) ปิเปตสารละลายที่สกัดได้ 20 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Distillation tube เติม 12% MgO 5 มิลลิลิตร

(3) ทำการกลั่นโดยเก็บ NH_3 ที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่ ที่บรรจุสารละลาย boricacid ผสมอินดิเคเตอร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร กลั่นจนได้สารละลายปริมาตร 30 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่กลั่นได้นี้ไว้หาปริมาณ NH_4^+-N

(4) เติม Devarda alloy 0.2 กรัม ลงใน Distillation tube ทำการกลั่นต่อไปโดยเก็บ NH_3 ที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่ ที่มีสารละลาย boric acid ผสมอินดิเคเตอร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร กลั่นจนได้สารละลายปริมาตร 30 มิลลิลิตร

(5) ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ทั้ง 2 ครั้งด้วย 0.05 นอร์มอล HCl สารละลายที่กลั่นได้ครั้งแรก คือ แอมโมเนียมไนโตรเจน (NH_4^+-N) ส่วนครั้งที่สองที่เติม Devarda alloy คือ ไนเตรทไนโตรเจน (NO_3^--N)

$$NH_4^+\text{-N หรือ } NO_3^-\text{-N} = \frac{N(A-B)xDx0.014x10^6}{CxE} \text{ mg kg}^{-1}$$

เมื่อ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน N นอร์มอล

ปริมาณของสารละลายที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับ HCl A มิลลิลิตร

ปริมาณของ blank ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับ HCl B มิลลิลิตร

ปริมาณของสารละลายที่ดูดจากสารละลายที่สกัดได้ C มิลลิลิตร

ปริมาณของสารละลายที่สกัดได้ D มิลลิลิตร

น้ำหนักของตัวอย่างดิน E กรัม

3.3.3 การวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Available Phosphorus; avail P) โดยวิธีสารละลายสกัด Bray II แล้ววัดปริมาณฟอสฟอรัสโดยเครื่อง Spectonic-20

(1) ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายสกัด BrayII 10 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 5

(2) ปิเปตสารละลายที่สกัดได้อัตราส่วน 1 ส่วนต่อ working solution 16 ส่วน ทิ้งไว้ครึ่งชั่วโมง นำไปอ่านค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

$$\text{ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (P)} = \frac{B \times df(\text{sample}) \times R}{A \times df(\text{standard})} \text{ mg kg}^{-1}$$

เมื่อ A = น้ำหนักของตัวอย่างดิน (กรัม)

B = สารละลายสกัด (มิลลิลิตร)

R = ค่าที่อ่านได้ เมื่อวัดค่าเทียบกับ standard set

df = อัตราส่วนการเจือจาง

ถ้าไม่มีการเจือจาง

$$\text{ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (P)} = \frac{B \times R}{A} \text{ mg kg}^{-1}$$

3.3.4 การวิเคราะห์โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Available Potassium; avail K) ใช้ 1 แอมโมเนียมอะซิเตทที่เป็นกลาง แล้ววัดปริมาณโพแทสเซียมด้วยเครื่อง Flame photometer

(1) ชั่งดิน 2.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตทความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที ด้วยเครื่องเขย่า กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 5

(2) ใช้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นตัวปรับเครื่องที่ความยาวคลื่น 383 นาโนเมตร

(3) นำสารละลายที่กรองได้ วัดปริมาณโพแทสเซียม (K) ด้วยเครื่อง Flame photometer ถ้าสารละลายมีความเข้มข้นมากต้องเจือจางด้วยสารละลายโพแทสเซียมมาตรฐาน

$$\text{โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (avai.K)} = \frac{DxdfxB}{A} \text{ mg kg}^{-1}$$

เมื่อ A = น้ำหนักของตัวอย่างดิน (กรัม)

B = ปริมาตรของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตทที่ใช้สกัด (มิลลิลิตร)

D = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมเมื่อเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน

df = อัตราส่วนการเจือจาง

3.4 ธาตุอาหารรองในดิน

3.4.1 การวิเคราะห์แคลเซียมที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Available Calcium; avail Ca) ใช้ 1 แอมโมเนียมอะซิเตทที่เป็นกลาง แล้ววัดปริมาณแคลเซียมด้วยเครื่อง Flame photometer

(1) ชั่งดิน 2.5 กรัมใส่ในขวดแก้วก้นแบน เติมสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตท 25 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที ด้วยเครื่องเขย่า กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5

(2) ใช้สารละลายมาตรฐานของแคลเซียมทำกราฟมาตรฐาน โดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 422 นาโนเมตร

(3) สารละลายที่กรองได้ นำไปวัดปริมาณแคลเซียม (Ca) โดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ถ้ามีความเข้มข้นมากต้องเจือจางด้วยสารละลาย $SrCl_2$

$$\text{แคลเซียมที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (avai.Ca)} = \frac{DxdfxB}{A} \text{ mg kg}^{-1}$$

เมื่อ A = น้ำหนักของตัวอย่างดิน (กรัม)

B = ปริมาตรของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตทที่ใช้สกัด (มิลลิลิตร

D = ความเข้มข้นของแคลเซียมเมื่อเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน

df = อัตราส่วนการเจือจาง

3.4.2 การวิเคราะห์แมกนีเซียมที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Available Magnesium; avail Mg) ใช้ 1 แอมโมเนียมอะซิเตทที่เป็นกลาง แล้ววัดปริมาณแมกนีเซียมด้วยเครื่อง Flame photometer

(1) ชั่งดิน 2.5 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตท 25 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที ด้วยเครื่องเขย่า กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5

(2) ใช้สารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียมทำกราฟมาตรฐาน โดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 285 นาโนเมตร

(3) สารละลายที่กรองได้ นำไปวัดปริมาณแมกนีเซียม (Mg) โดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ถ้ามีความเข้มข้นมากต้องเจือจางด้วยสารละลาย $SrCl_2$

$$\text{แมกนีเซียมที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (avai.Mg)} = \frac{DxdfxB}{A} \text{ mg kg}^{-1}$$

เมื่อ A = น้ำหนักของตัวอย่างดิน (กรัม)

B = ปริมาตรของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตทที่ใช้สกัด (มิลลิลิตร)

D = ความเข้มข้นของแมกนีเซียมเมื่อเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน

df = อัตราส่วนการเจือจาง

4. การศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในดิน

4.1 เก็บตัวอย่างดินด้านบน ขนาด 20x20x5 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้วิธีการสุ่มอย่างง่าย (random sampling) เหมือนข้อ 1.2 ในแปลงนาเกษตรอินทรีย์ และแปลงนาที่ใช้สารเคมี 2 ช่วงของการปลูกข้าว คือ ระยะก่อนฤดูเพาะปลูกและระยะข้าวออกรวง ดังภาพ 7

4.2 ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม มาเจือจางในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน จะได้ความเจือจาง 10^{-1} แล้วใช้ปิเปตดูดสารละลายดินที่เจือจาง 1 มิลลิลิตร ไปใส่ในหลอดน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ตามลำดับ จนกระทั่งได้ความเจือจาง 4 ระดับ คือ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} เท่า (Saadatnia and Riahi, 2009)

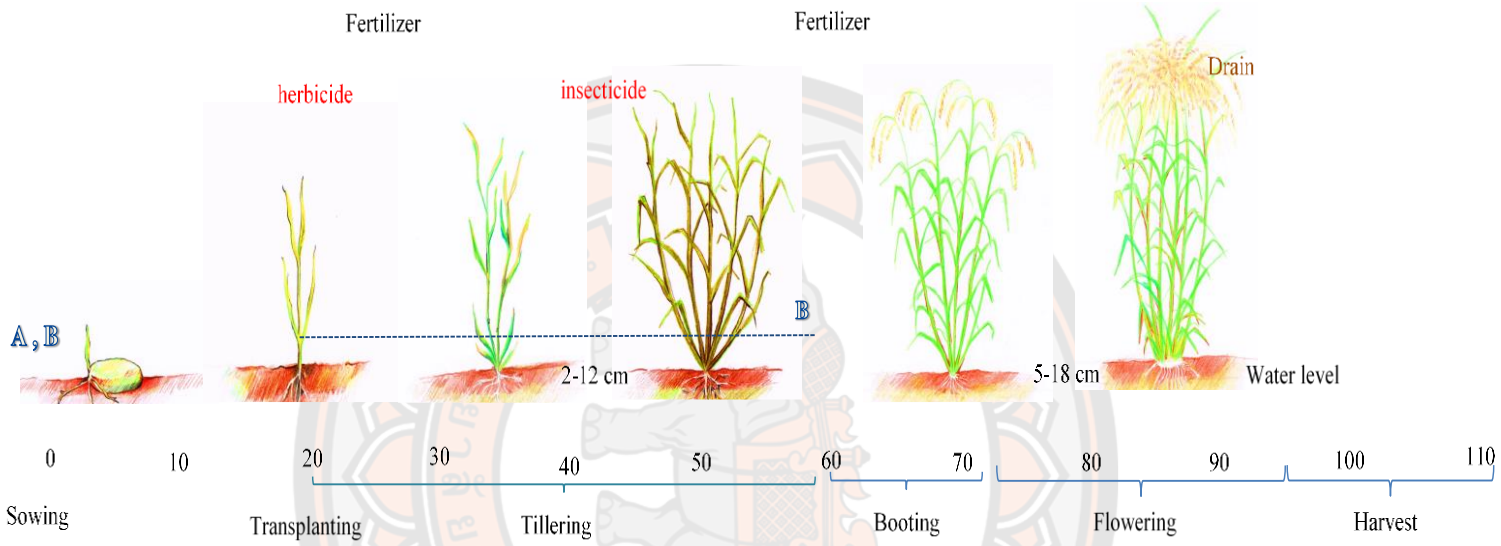
4.3 นำสารละลายดินที่ความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง BG11 ที่มีแหล่งไนโตรเจน (BG11) และอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน ($BG11_0$) ความเจือจางละ 3 เพลท จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ±2 ºC โดยมีแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มของแสง 3,000 ลักซ์ (Lux) เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ จนกระทั่งไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญเป็นโคโลนีขึ้นบนอาหารแข็ง นับจำนวนโคโลนีของไซยาโนแบคทีเรีย

4.4 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ขนาด ความมันวาว ลักษณะขอบ ความโค้งมน การยกตัวของโคโลนี เป็นต้น มาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Micropipette washing โดยนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40X จะพบว่ามีไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันปนอยู่ นำเซลล์ที่ต้องการมาล้างน้ำในหยดน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วบนกระจกสไลด์ 6-7 ครั้งแล้วจึงนำมาใส่ใน micro plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ $BG11_0$ บ่มเชื้อกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน

4.5 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ นำไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลวใน micro plate มาทดสอบดังนี้

4.5.1 ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะเชื้อมา cross-streak ลงบนอาหารแข็ง $BG11_0$ นำไปบ่มในสภาพที่มีแสง อุณหภูมิ 25 ±2 ºC จนกระทั่งเห็นไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ (axenic culture)

4.5.2 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว $BG11_0$ ที่มีส่วนผสมของอาหาร GYP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2 ºC ในที่มืด สังเกตลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใส แสดงว่าไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (axenic culture) แต่ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขาวขุ่นแสดงว่าไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ยังมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย แต่ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญมีลักษณะเหมือนกัน แสดงว่าเป็น unialgal culture ซึ่งต้องนำไปแยกเชื้อด้วยวิธี micropipette washing ใหม่อีกครั้ง



ภาพ 6 ระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวและช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างดินในระยะก่อนฤดูเพาะปลูก (A) และระยะต้นข้าวออกรวง (B) การเก็บตัวอย่างดินเพื่อศึกษาลักษณะของดินเก็บดินระยะ A การเก็บตัวอย่างดินเพื่อศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียเก็บในระยะ A และ B

5. การจัดจำแนกสกุลและชนิดไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้

การจำแนกไซยาโนแบคทีเรียในระดับสกุล (genus) อาศัยลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังนี้

รูปร่าง ขนาดและตำแหน่งของเฮเทอโรซีสท์ในสายเซลล์

รูปร่าง ขนาดและตำแหน่งของอะคีนีตในสายเซลล์

การสร้างชีท, เมือก

การแตกแขนง

อื่น ๆ

ลักษณะดังกล่าวส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และกล้องสเตอริโอ และจำแนกใช้วิธีการของ Desikachary (1959), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001) และยุวดี (2549)

6. การศึกษาอัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้

6.1 ศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

นำไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว $BG11_0$ ปริมาตรที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ 150 มิลลิลิตร เปิดให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 °C และให้อากาศในอัตรา 1 ลิตรต่อนาที วัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร โดยให้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น (OD_{900}) เท่ากับ 0.05 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน วัดการเจริญโดยวัดค่าความขุ่น หาน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย คำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) (Pirt, 1975) จากสูตร

$$\mu = \frac{1dx}{xdt} \text{ หรือ } \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{\Delta t}$$

โดย X_1 = มวลของสาหร่ายเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

X_2 = มวลของสาหร่ายที่เวลา (t) (กรัมต่อลิตร)

t = เวลา (วัน)

คำนวณระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (doubling time) (t_d) จากสูตร

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

6.2 ศึกษาความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้

นำเชื้อไซยาโนแบคทีเรียมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดบรรจุปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง 2 ชั้น ฉีดก๊าซอาร์กอนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซยาโนแบคทีเรียอยู่จำนวน 7 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เปลี่ยนก๊าซที่ใช้บ่มให้มีก๊าซอะเซทิลีน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เข็มฉีดยา (syringe) ดูดอากาศออก 0.75 มิลลิลิตร แล้วฉีดก๊าซอะเซทิลีนลงไปแทนที่ 0.75 มิลลิลิตร ก๊าซอะเซทิลีนที่หนักกว่าอากาศจะไปแทนที่อากาศก้นภาชนะ จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่า (orbital shaker) ที่มีความเร็ว 120 รอบ/นาที บ่มภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดก๊าซออกประมาณ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในหลอดเก็บก๊าซสูญญากาศ นำตัวอย่างก๊าซที่ได้ในแต่ละขวดไปวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซเอทิลีนโดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟฟี โดยก๊าซที่ต้องการวิเคราะห์เป็นก๊าซเอทิลีนที่เกิดจากการรีดิวซ์ก๊าซอะเซทิลีนซึ่งเกิดจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยสามารถคำนวณหาปริมาณก๊าซเอทิลีนที่ได้โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของก๊าซ เอทิลีนมาตรฐานจากสูตร

$$\text{อัตราการตรึงไนโตรเจนของตัวอย่าง} = \frac{10^3 \times B \times V}{2200 \times \text{Std.} \times A \times 22.4} \quad \mu\text{mole/hr/unit}$$

หน่วยเป็นไมโครโมลของเอทิลีน (C_2H_2) ต่อยูนิตต่อชั่วโมง เมื่อใช้ก๊าซเอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาตรที่แน่นอนเป็น 2200 มิลลิลิตร

B	=	พื้นที่ใต้กราฟของก๊าซเอทิลีนที่เกิดขึ้น
V	=	ปริมาตรของขวดที่ใช้เก็บตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร
Std.	=	พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของก๊าซอะเซทิลีนมาตรฐาน
A	=	เวลาที่ใช้ในการรีดิวซ์ก๊าซอะเซทิลีนเป็นชั่วโมง

7. การจำแนกชนิดไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene

ทำการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรีย ที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศได้ อย่างน้อย 10 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะ คือ เจริญได้เร็ว สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพในการตรึงก๊าซไนโตรเจนสูง นำมาจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene เปรียบเทียบฐานข้อมูล NCBI

7.1 การสกัดดีเอ็นเอ นำไซยาโนแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ ในฟลาสก์ที่มีปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 ºC บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์ ประมาณ 100 มิลลิกรัม เติมลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ (100 nM Tris-HCl pH 8.0, 100 nM EDTA pH 8.0, 1.5 M NaCl) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากัน ดูดสารแขวนลอย ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สำหรับทำ PCR

7.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (16S rDNA) ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) เพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยการทำ PCR โดยใช้ universal forward primer 27F และ reverse primer เป็น the cyanobacterium-specific primer 809R (Harding et al., 2011) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

Forward primer (27F) : 5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’

Reverse primer (809R) : 5’-GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA-3’

ส่วนผสมในหลอด PCR จำนวน 50 µl ประกอบด้วย

2xPCR buffer for KOD FX Neo	25 µl
2mM dNTPs	10 µl
0.3 µM Forward primer	1.5 µl
0.3 µM Reverse primer	1.5 µl
KOD FX Neo (1 unit)	1 µl

DNA template	2 µl
PCR grade water	9 µl
ปริมาตรรวม	50 µl

หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่อง Thermo cycle เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 30 รอบ โดยสภาวะที่ใช้ คือ

Initial-Denaturation	94ºC	3 นาที
Denaturation	94ºC	1 นาที
Annealing	58ºC	45 วินาที
Extension	74ºC	1.30 นาที
Final Extension	74ºC	5 นาที

หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างไปตรวจหาขนาดดีเอ็นเอที่คาดว่าจะปรากฏขึ้น ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

7.3 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

เตรียม 1% agarose ใน 1xTAE buffer โดยชั่ง agarose 0.5 กรัม ละลายใน TAE buffer 50 ml โดยนำเข้าไมโครเวฟ ประมาณ 1-2 นาที รอให้เจลเย็นลงประมาณ 55ºC เท agarose ที่หลอมแล้วลงในถาดที่เสียบ comb ลงไป รอจนเจลแข็งตัว ประมาณ 30 นาที ดึง comb ออก วางถาดที่มีเจลลงใน chamber ที่มี TAE buffer อยู่ ดูด PCR products ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ในปริมาณที่เท่ากัน แล้วดูดใส่ใน wells ที่มี standard DNA ladder ไว้เปรียบเทียบแยกขนาดของ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที นำแผ่น agarose gel ออกจาก gel tray แล้วนำมาแช่ในสารละลาย ethidium bromide 0.5 µg/ml ประมาณ 15-30 นาที จากนั้นนำแผ่น agarose gel ไปวางบนกล่องที่มีแสง UV จะเห็นแถบ DNA เรืองแสง UV บันทึกภาพที่ได้ขนาดของดีเอ็นเอที่ปรากฏประมาณ 1,200-1,500 bp ด้วยเครื่องถ่ายภาพ

7.4 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ 16S rDNA gene

นำ PCR products ที่เหลืออยู่ปริมาณ 45 ไมโครลิตร มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DNA and Gel Band Purification Kit หลังจากนั้นส่งดีเอ็นเอตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำ BLAST search ในฐานข้อมูลของ NCBI GenBank เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซยาโนแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ถ้าตัวอย่าง DNA ตัวอย่างใดมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 97% จะถือว่าเชื้อนั้นมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อไซยาโนแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มี % similarity สูงสุดหรือเป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกัน

8. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน

สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ ควรมีคุณสมบัติดังนี้ เจริญได้เร็ว สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพในการตรึงก๊าซไนโตรเจนสูง โดยทำการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียมา 4 สายพันธุ์ เพื่อทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน และสารปราบศัตรูพืช ซึ่งเป็น สิ่งที่เกษตรกรไทยนิยมใช้ในการเพาะปลูกข้าว

8.1 แหล่งไนโตรเจน

8.1.1 นำไซยาโนแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว $BG11_0$ ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 200 มิลลิลิตร โดยมีปริมาณ inoculum ในรูปของค่า OD_{560} ประมาณ 0.05 ในอาหารเหลวนี้มีปริมาณของแหล่งไนโตรเจนเป็นปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) โดยได้รับความกรุณาจากบริษัท เจียไต๋ จำกัด (ประเทศไทย) ในความเข้มข้น 0, 0.05, 0.2, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที บ่มเชื้อภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) 3 ซ้ำ

8.1.2 เก็บตัวอย่างเชื้อวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย ทุก ๆ 4 วัน เป็นเวลา 20 วัน โดยการวัดน้ำหนักแห้ง และวัดความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน ในวันที่ 20 ทำการทดลองเหมือนข้อ 6.

8.2 สารปราบศัตรูพืช

8.2.1 นำไซยาโนแบคทีเรีย มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว $BG11_0$ ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 200 มิลลิลิตร โดยกำหนดให้มี OD_{560} อยู่ในช่วง 0.05 แปรผันความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช butachor (N-butoxymethyl-2-chloro-2',6'-diethylacetanilide) ได้รับความกรุณาจาก P.Chemitech Co.,Ltd. ประเทศไทย ในสูตรอาหารเป็น 0, 5, 10 และ 20 ppm เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบ/นาที บ่มเชื้อภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) 3 ซ้ำ

8.2.2 เก็บตัวอย่างเชื้อวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย ทุก ๆ 4 วัน เป็นเวลา 20 วัน โดยวัดความหนาแน่นของเซลล์ (optimal density) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Spectronic 20) ความยาวคลื่นแสง 560 นาโนเมตร และวัดความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน ในวันที่ 20 ทำการทดลองเหมือนข้อ 6.2

9. การทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างของดิน

การเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียเพื่อปรับโครงสร้างของดิน โดยพิจารณาจากการเจริญเติบโต และความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ในสภาพที่มีการใส่ปุ๋ยยูเรียหรือการใส่สารกำจัดวัชพืช butachor โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลดีที่สุด ได้แก่ *Anabaena* R1

9.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว

นำเซลล์ *Anabaena* R1 10 กรัม (น้ำหนักสด) เพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ โดยเลี้ยงในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 200 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบ/นาที บ่มเชื้อภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

9.2 การผลิตชีวมวล

นำเซลล์สาหร่ายเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเลี้ยงในขวดในอัตราส่วนเซลล์ 12 กรัม (น้ำหนักสด) ต่ออาหารเพาะเลี้ยง 1,000 มิลลิลิตร (Zulpa et al., 1997) บ่มเชื้อภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส พร้อมพ่นอากาศด้วยอัตราการไหล 1,000 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บเซลล์ในระยะ exponential phase แยกตัวเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงโดยการนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่งที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีนาน 15 นาที

9.3 การเตรียมตัวอย่างดิน

ดินที่นำมาทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพของสารพอลิแซ็กคาไรด์ในการเป็นสารปรับโครงสร้างดินจากไซยาโนแบคทีเรีย เก็บมาจากพื้นดินที่ทำนาข้าวโดยใช้สารเคมีในระยะก่อนเพาะปลูกของ 3 จังหวัดของเขตภาคเหนือตอนล่าง คือ พิจิตร เพชรบูรณ์ และอุทัยธานี ตัวอย่างดินที่เก็บมานำไปกรองผ่านตะแกรงร่อนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 2 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อในดินตัวอย่างด้วยautoclave

9.4 การทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างดิน

นำตัวอย่างดินที่เตรียมไว้ทั้ง 3 พื้นที่ตัวอย่างละ 250 กรัมใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 13x13x4.5 เซนติเมตร จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ทำให้ชุ่มด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำเซลล์สดของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือกแต่ละสายพันธุ์ผสมน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว

(1) หยดลงบนผิวหน้าดินให้ทั่ว

(2) หยดลงบนผิวหน้าดินให้ทั่ว และทำการคลุก

(3) เจาะหลุมแล้วหยด

สำหรับตัวแปรควบคุมใช้ตัวอย่างดินที่ฆ่าเชื้อแล้วหยดด้วยน้ำกลั่นที่ไม่ใส่เชื้อจากนั้นนำกล่องไปตั้งไว้ใต้แสงสว่างที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือนควบคุมความชื้นโดยการปิดฝากล่องพลาสติก

9.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

9.5.1 การศึกษาลักษณะเนื้อดิน (soil texture) ใช้วิธี Hydrometer method

9.5.2 การศึกษาความหนาแน่นรวมของดิน (soil bulk density) ใช้วิธี Core method

9.5.3 อินทรียวัตถุในดิน (Organic matter; OM) โดยวิธี wet oxidation

การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน 9.5.1, 9.5.2 และ 9.5.3 ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2 และข้อ 393

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การศึกษาลักษณะของดินในแปลงนาเกษตรอินทรีย์และแปลงนาที่ใช้สารเคมี

เก็บตัวอย่างดินในแปลงนาที่ปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงนาที่ใช้สารเคมี (P) ในเขตภาคเหนือตอนล่าง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเพชรบูรณ์ (B) พิจิตร (P) และอุทัยธานี (U) (ภาพ 2, 3, 4 และ 5) ที่นำมาศึกษาเป็นดินในแปลงนาก่อนฤดูเพาะปลูกข้าว ดินที่เก็บในแต่ละจังหวัดมาจากแปลงนาข้าวที่เพาะปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ จำนวน 3 แปลง และแปลงนาข้าวที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีและยาฆ่าแมลง จำนวน 3 แปลง ดินในแต่ละแปลงจะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างทั่วถึงทั้งหมด 36 จุด และนำดินที่สุ่มเก็บมารวมผสมให้เข้ากันเป็น 1 ตัวอย่าง ดังนั้น จึงมีตัวอย่างดินสำหรับนำไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา จำนวน 18 ตัวอย่าง ลักษณะทางกายภาพของดินที่วิเคราะห์ ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน และความหนาแน่นรวมของดิน ลักษณะทางเคมีของดิน ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) อินทรียวัตถุในดิน ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง (ตาราง 7) ผลการวิเคราะห์ พบว่า ดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ มีค่า pH เป็นกลาง (7.0-7.3) ในขณะที่ดินจากแปลงนาที่ใช้สารเคมี มีค่า pH เป็นกรด (5.2-5.4) Thamizh และ Sivakumar (2011) รายงานว่าค่า pH ที่เหมาะสมในนาข้าว ควรอยู่ในช่วงตั้งแต่ 7.3 ถึง 8.4 โดย pH มีผลต่อความสามารถในการละลายของก๊าซ CO_2 และแร่ธาตุ และมีอิทธิพลทั้งทางตรงหรือทางอ้อมต่อการเจริญเติบโต และความหลากหลายของพืชรวมทั้งสาหร่าย (Jayagoudar et al., 2020) เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญได้ตามปกติในดินที่เป็นด่าง เปอร์เซ็นต์ความชุกของไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็น heterocystous สูงสุดที่ pH เท่ากับ 8.1 (Nayak and Prasanna, 2007)

เนื้อดินในแปลงนาเกษตรอินทรีย์และแปลงนาที่ใช้สารเคมีจะมีลักษณะคล้ายกัน แต่จะแตกต่างกันไปตามภูมิประเทศ ตาราง 4 ลักษณะเนื้อดินของพื้นที่ที่เป็นดินเหนียว (clay) ประกอบด้วย อนุภาคขนาดดินเหนียวตั้งแต่ร้อยละ 40 ขึ้นไป มีอนุภาคทรายร้อยละ 45 หรือน้อยกว่าและมีอนุภาคขนาดทรายแป้ง น้อยกว่าร้อยละ 40 ดินเหนียวเป็นดินที่มีเนื้อละเอียด ในสภาพดินแห้งจะแตกออกเป็นก้อนแข็งมาก เมื่อเปียกน้ำแล้วจะมีความยืดหยุ่น เป็นดินที่มีการระบายน้ำและอากาศไม่ดี แต่สามารถอุ้มน้ำดูดยึด และแลกเปลี่ยนธาตุอาหารพืชได้ดี เหมาะที่จะใช้ทำนาปลูกข้าวเพราะเก็บน้ำได้นาน ยกเว้นแปลงนาในจังหวัดพิจิตรแปลงที่ใช้สารเคมี มีลักษณะเป็นดินร่วน

เหนียวปนทรายแป้ง (silty clay loam) ประกอบด้วยอนุภาคขนาดดินเหนียวร้อยละ 27-40 และมีอนุภาคขนาดทรายร้อยละ 20 หรือน้อยกว่า ส่วนแปลงนาเกษตรอินทรีย์ มีลักษณะเป็นดินร่วน (loam) ประกอบด้วยอนุภาคขนาดดินเหนียวร้อยละ 7-27 อนุภาคขนาดทรายแป้งร้อยละ 28-50 และอนุภาคขนาดทรายร้อยละ 52 ดินร่วน เป็นดินที่เนื้อดินค่อนข้างละเอียด ในสภาพดินแห้งจะจับกันเป็นก้อนแข็งพอประมาณ ในสภาพดินชื้นจะยืดหยุ่นได้บ้าง เป็นดินที่มีการระบายน้ำได้ดีปานกลาง จัดเป็นเนื้อดินที่มีความเหมาะสมสำหรับการเพาะปลูก

ความหนาแน่นรวม อินทรียวัตถุ ธาตุอาหารหลัก เช่น ฟอสฟอรัสที่มีอยู่ และโพแทสเซียมที่มีอยู่ รวมถึงธาตุอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียมที่มีอยู่ และแมกนีเซียมที่มีอยู่ ดินนาข้าวอินทรีย์มีค่าสูงกว่าดินนาข้าวที่ใช้สารเคมี เนื่องจากมีระบบการจัดการความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ เช่น ไม่มีการเผาตอซัง ฟางข้าว และมีการปลูกพืชบำรุงดิน โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่ว (leguminosae) ปอเทือง (*Crotalaria juncea*) นอกจากนี้ยังมีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์อย่างสม่ำเสมอเป็นประจำ ปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก และปุ๋ยพืชสด ซึ่งการใช้อินทรียวัตุบางอย่างทดแทนปุ๋ยเคมีบางชนิดได้ เช่น ใช้แหนแดง หรือกากเมล็ดสะเดา แทนธาตุไนโตรเจน ใช้กระดุกป่น มูลไก่ มูลค้างคาวแทนธาตุฟอสฟอรัส หรือใช้ขี้เถ้า และหินปูนบางชนิด แทนธาตุโพแทสเซียม ธาตุแคลเซียม ใช้ปูนขาว โดโลไมท์ เปลือกหอยป่น และการปลูกข้าวอินทรีย์ จะปลูกเพียงปีละครั้ง

ตาราง 6 สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินนาข้าวในแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมี

Properties	Organic Rice Paddy Soils				Non-Organic Rice Paddy Soils			
	Phichit (PO)	Phetchabun (BO)	Uthaithani (UO)	Mean±SD	Phichit (PF)	Phetchabun (BF)	Uthaithani (UF)	Mean±SD
pH	7.1	7.3	7.0	7.13 ± 0.15^{s}	5.4	5.5	5.2	5.37 ± 0.15^{s}
Texture	L	C	C	*	SCL	C	C	*
Bulk density	1.08	1.05	1.41	1.18 ± 0.20^{ns}	1.48	1.71	1.32	1.50 ± 0.20^{ns}
Organic matter (%)	2.96	3.08	2.76	2.93 ± 0.16^{s}	1.04	0.91	1.40	1.17 ± 0.25^{s}
Available Phosphorus(mg kg^{-1})	83	99	75	85.67 ± 12.22^{s}	2	4	9	5.00 ± 3.60^{s}
Available Potassium (mg kg^{-1})	112	168	178	152.67 ± 35.57^{s}	18	33	66	39.00 ± 24.55^{s}
Available Calcium (mg kg^{-1})	6,876	6,562	6,946	$6,794.67\pm204.51^{s}$	428	313	1,940	893.67 ± 907.97^{s}
Available Magnesium (mg kg^{-1})	1,483	1,481	1,416	$1,460.00\pm38.12^{s}$	93	54	364	170.33 ± 168.85^{s}
Total N (%)	0.14	0.14	0.10	0.13 ± 0.02^{s}	0.04	0.08	0.08	0.07 ± 0.02^{s}
NH^{+}_{4} -N (mg kg^{-1})	nd	5.60	8.40	$4.67\pm4.28^{*}$	12.80	nd	19.60	$10.80\pm9.95^{*}$
NO^{-}_{3}-N (mg kg^{-1})	nd	2.80	nd	$0.93\pm1.61^{*}$	18.40	14.00	nd	$10.80\pm9.60^{*}$

หมายเหตุ SCL = silt clay loam nd = non detected (0.01 mg/l) data = mean from composite sampling of nine sample L = loam
s = significant (p= 0.05) * = non comparison C = clay ns = non-significant (p = 0.05)

2. การศึกษาไซยาโนแบคทีเรียในดินนา

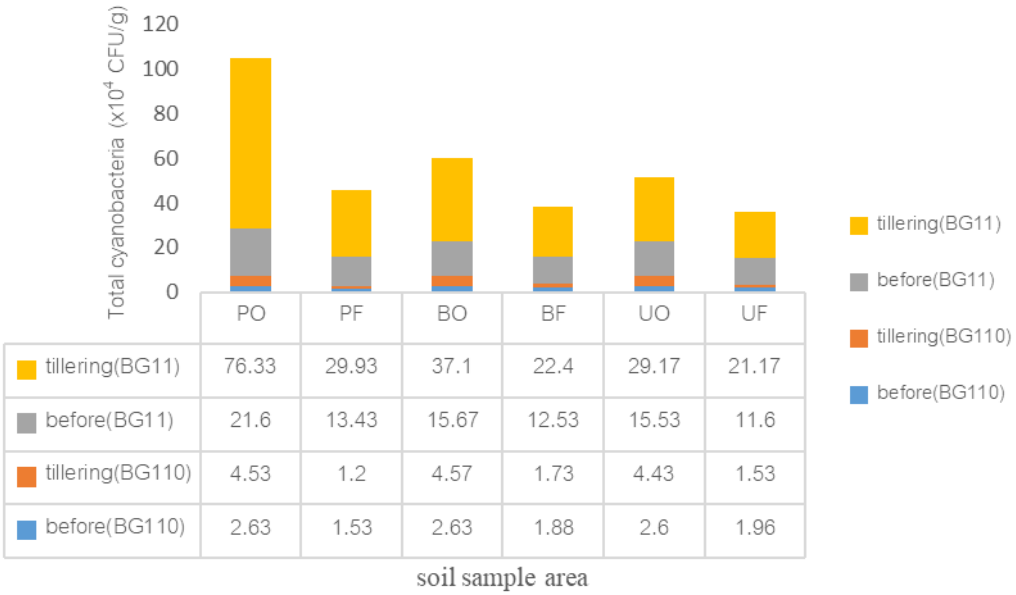
ในการศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบปริมาณของไซยาโนแบคทีเรียในดินนาของแปลงเพาะปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์ ซึ่งไม่มีการใช้ปุ๋ยเคมีหรือยาปราบศัตรูพืชใด ๆ และดินนาจากนาข้าวที่เพาะปลูกโดยใช้ปุ๋ยเคมีและใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช โดยนำตัวอย่างดินมาเจือจางแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 และ BG11 ที่ไม่มีไนโตรเจน ($BG11_0$) ด้วยเทคนิค serial dilution spread plate บ่มเชื้อในสภาพที่มีแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้ม 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมานับปริมาณของไซยาโนแบคทีเรีย (ตาราง 8) พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG11 มีปริมาณมากกว่า BG11 อาหาร $BG11_0$ โดยจำนวนของไซยาโนแบคทีเรียบนอาหาร BG11 ก่อนฤดูเพาะปลูกเฉลี่ยอยู่ที่ 24.50 $x10^4$ CFU/g ในแปลงที่ใช้สารเคมี และ 47.53 $x10^4$ CFU/g แปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ แต่อาหาร$BG11_0$ มีเฉลี่ยอยู่ที่ 1.79 $x10^4$ และ 2.62 $x10^4$ CFU/g ในแปลงที่ใช้สารเคมีและแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ตามลำดับ ระยะข้าวแตกกอ อาหาร BG11 เฉลี่ยอยู่ที่ 12.52 $x10^4$ CFU/g ในแปลงที่ใช้สาร และ 17.60 $x10^4$ CFU/g แปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ อาหาร $BG11_0$ มีเฉลี่ยอยู่ที่ 1.49 $x10^4$ CFU/g และ 4.51 $x10^4$ CFU/g ในแปลงที่ใช้สารเคมี และแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ตามลำดับ (ตาราง 5 และภาพ 8) ดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์มีจำนวนไซยาโนแบคทีเรียมากกว่าดินนาข้าวแปลงที่ใช้สารเคมีถึง 2 เท่า สอดคล้องกับรายงานของ Irisarri et al., (2001) ไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างเซลล์เฮเทอโรซีสต์ในแปลงนาที่ใช้สารเคมีมีจำนวนน้อยกว่าแปลงควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมีในฤดูการออกรวง มีจำนวนของไซยาโนแบคทีเรียมากกว่าช่วงก่อนฤดูเพาะปลูก เมื่อเพาะเลี้ยงบน BG11 และ $BG11_0$ (ตาราง 5 6 และภาพ 8) สอดคล้องกับรายงานของ Bharadwaj and Baruah (2017) การใส่ปุ๋ยและฤดูกาลส่งผลต่อจำนวนประชากรไซยาโนแบคทีเรีย Choudhary (2009) ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียสูงสุดในระหว่างรอบการเพาะปลูกสูงสุด 21 ชนิดในวันที่ 30 ของการเพาะปลูก ต่ำสุดในวันที่ 10 ของการเพาะปลูกข้าว 8 ชนิด แตกต่างจากรายงานของ Irisarri et al., (2001) ความอุดมสมบูรณ์ของไซยาโนแบคทีเรียในดินจะมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันเกือบตลอดทั้งปี มีค่าสูงสุดในระยะข้าวตั้งท้อง (booting stage) จากรายงานทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าความเข้มของแสงที่ส่องถึงผิวดินมีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย (Ichimura, 1954; Choudhary, 2009) ในช่วงแรกของการปลูกข้าวพบจำนวนของไซยาโนแบคทีเรียน้อย เนื่องมาจากผลของความเข้มของแสงสูง ในขณะที่ช่วงหลังของการปลูกข้าวพบจำนวนไซยาโนแบคทีเรียน้อยลง

เช่นกันอาจเกิดจากการสูญเสียสารอาหารและความเข้มของแสงที่ต่ำไม่สามารถส่องลงได้ถึงพื้นผิวดิน เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของทรงพุ่มข้าว Roger และ Reynaud (1979) อธิบายว่าไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการแสงน้อยและประชากรไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนมีความสัมพันธ์กับความเข้มแสงที่ลดลงและการจำกัดสารอาหาร

ตาราง 7 เปรียบเทียบจำนวนไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมดในดินนาข้าวแปลงเกษตรอินทรีย์และดินนาข้าวที่ใช้สารเคมีที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร BG11 และ $BG11_0$ ก่อนฤดูเพาะปลูกข้าวและระยะออกรวงของ 3 จังหวัด

Soil samples	Total cyanobacteria ($x10^4$ CFU/g)			
	Before crop season		Tillering	
	BG11	$BG11_0$	BG11	$BG11_0$
non-organic rice paddy soils				
PF	29.93±5.52^{bc}	1.53±0.11^{b}	13.43±0.81^{c}	1.20±0.10^{c}
BF	22.40±4.21^{c}	1.88±0.48^{b}	12.53±1.15^{cd}	1.73±0.15^{b}
UF	21.17±2.77^{c}	1.96±0.75^{b}	11.60±0.56^{d}	1.53±0.23^{bc}
Mean±SD	24.50±6.00	1.79±1.32	12.52±0.84	1.49±0.16
organic rice paddy soils				
PO	76.33±8.02^{a}	2.63±0.46^{a}	21.60±1.64^{a}	4.53±0.50^{a}
BO	37.10±3.72^{b}	2.63±0.35^{a}	15.67±0.50^{b}	4.57±0.21^{a}
UO	29.17±1.81^{bc}	2.60±0.26^{a}	15.53±0.64^{b}	4.43±0.25^{a}
Mean±SD	47.53±4.52	2.62±0.36	17.60±0.93	4.51±0.32

หมายเหตุ In a column means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT



	PO	PF	BO	BF	UO	UF
tillering(BG11)	76.33	29.93	37.1	22.4	29.17	21.17
before(BG11)	21.6	13.43	15.67	12.53	15.53	11.6
tillering(BG110)	4.53	1.2	4.57	1.73	4.43	1.53
before(BG110)	2.63	1.53	2.63	1.88	2.6	1.96

ภาพ 7 การเปรียบเทียบจำนวนไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร BG11 และ $BG11_0$ในดินนาก่อนฤดูเพาะปลูกและระยะข้าวแตกกอในพื้นที่แตกต่างกัน (x10^4CFU/g)

3. การศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าว

ในการจัดจำแนกสกุล (genus) ของไซยาโนแบคทีเรียอาศัยความแตกต่างของลักษณะรูปร่าง ขนาดและตำแหน่งของเฮเทอโรซีสท์หรืออะคีนีตในสายเซลล์ การสร้างซีท เมือก และการแตกแขนง Desikachary (1959) จำนวนไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าวก่อนฟดูเพาะปลูกและในระยะข้าวออกรวงมีทั้งหมด 59 ไอโซเลท ซึ่งสามารถจำแนกได้ 16 สกุล ส่วนไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าวแปลงที่ใช้สารเคมี มีจำนวน 45 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็น 15 สกุล (ตาราง 9) จากลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและต่อกันเป็นเส้นสาย สกุลของไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยวพบมากที่สุดในดินนาข้าวทั้งที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์หรือใช้สารเคมี คือ*Chroococcus* ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะต่อกันเป็นเส้นสายที่พบมากที่สุดในดินนาข้าวทั้งสองแปลงมี 3 สกุล คือ *Anabaena*, *Nostoc* และ *Calothrix* สกุล

จากลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและต่อกันเป็นเส้นสาย สกุลของไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยวพบมากที่สุดในดินนาข้าวทั้งที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์หรือใช้สารเคมี คือ *Chroococcus* ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะต่อกันเป็นเส้นสายที่พบมากที่สุดในดินนาข้าวทั้งสองแปลงมี 3 สกุล คือ *Anabaena Nostoc* และ *Calothrix* ของไซยาโน

แบคทีเรียที่พบในดินนาข้าวทั้งสองแปลงมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก แต่ในดินนาข้าวแปลงที่ใช้สารเคมีไม่พบไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Stigonema*

จากการศึกษาอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาข้าวที่ปลูกแบบอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมี พบไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 3 อันดับ (order) 8 แฟมิลี่ (Family) และ 12 สกุล (ตาราง 10) ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่พบ 2 อันดับ คือ Nostocales และ Oscillatoriales แต่ถ้าพิจารณาเฉพาะสายพันธุ์ที่มีการสร้างเฮเทอโรซีสท์ 2 อันดับแรก คือ Nostocales และ Stigonematales ซึ่งตรงกับรายงานของ Desikachary (1959) ไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่เป็นเส้นสายที่พบในดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมี มีอยู่ประมาณ 47 ชนิด โดยทั่วไป มักจะพบ *Anabaena*, *Nostoc* และ *Calothrix* แพร่กระจายเป็นส่วนใหญ่ในดินนาของประเทศไทย

ตาราง 8 ไซยาโนแบคทีเรียที่พบในดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมีในระยะก่อนฤดูเพาะปลูกและระยะข้าวออกรวง

Cyanobacteria	Number of isolates	
	Organic rice paddy soils	Non-organic rice paddy soils
Unicellular		
Aphanothece spp.	2	2
Chroococcus spp.	5	5
Gloeothece spp.	3	3
Myxosarcina spp.	2	2
Filamentous		
Anabaena spp.	11	7
Anabaenopsis spp.	2	1
Calothrix spp.	7	4
Cylindrospermum spp.	3	3
Fischerella spp.	3	3
Nodularia spp.	1	1
Nostoc spp.	11	8
Oscillatoria spp.	2	1
Phormidium spp.	1	2
Stigonema spp.	1	-
Spirulina spp.	2	1
Tolypothrix spp.	3	2
total	59	45

ตาราง 9 จำนวนไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แยกจากดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และปลูกแบบใช้สารเคมี

Order	Family	Genus	Desikachary (1959)	This study			
				Organic	Percent (%)	Non-organic	Percent (%)
Nostocales	Nostocaceae	*Anabaena*	25	11	44.0	7	28.00
		Anabaenopsis	3	2	66.67	1	33.33
		Cylindrospermum	12	3	25.0	3	25.0
		Nodularia	1	1	100.0	1	100.0
		Nostoc	23	11	47.83	8	34.78
	Scytoneataceae	*Tolypothrix*	18	3	16.67	2	11.11
	Rivulariaceae	*Calothrix*	28	7	25.0	4	14.28
Stigonematales	Fischerellaceae	*Fischerella*	3	3	100.0	3	100.0
	Stigonemataceae	*Stigonema*	12	1	8.33	-	0
Oscillatoriales	Pseudanabaenaceae	*Spirulina*	8	2	25.0	1	12.5
	Oscillatoriaceae	*Oscillatoria*	76	2	2.63	1	1.31
	Phormidiaceae	*Phormidium*	45	1	2.22	2	4.44
Total			254	47	-	33	-

ตาราง 10 เปรียบเทียบความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาข้าวที่ใช้และไม่ใช้สารเคมีกับงานวิจัยอื่น

Genus	Unfertilized		Fertilized	
	This study (2020)	Choudhary and Bimal (2010)	This study (2020)	Choudhary and Bimal (2010)
Anabaena	11	12	7	8
Anabaenopsis	2	3	1	2
Cylindrospermum	3	4	3	3
Nodularia	1	1	1	1
Nostoc	11	8	8	8
Tolypothrix	3	*	2	*
Calothrix	7	*	4	*
Fischerella	3	*	3	*
Stigonema	1	*	-	*
Spirulina	2	*	1	*
Oscillatoria	2	*	1	*
Phormidium	1	*	2	*
Aulosira	-	3	-	2
Aphanizomenon	-	1	-	1

หมายเหตุ * = non study

จากตาราง 11 แสดงความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาข้าวที่ใช้และไม่ใช้สารเคมีกับงานวิจัยของ Choudhary และ Bimal (2010) ที่ศึกษาไซยาโนแบคทีเรียแฟมิลี่ Nostocaceae ในระหว่างขั้นตอนการเพาะปลูกที่แตกต่างกัน ในนาข้าวที่ใช้สารเคมีและไม่ใช้สารเคมี ประเทศอินเดีย ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียพบมากที่สุดในวันที่ 60 ของฤดูเพาะปลูก ทั้งการศึกษาของ Choudhary และ Bimal (2010) และการศึกษาครั้งนี้พบไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Nostoc* และ *Anabaena* เป็นสกุลที่เด่นทั้งในนาข้าวที่ใช้สารเคมีและไม่ใช้สารเคมี

ตาราง 11 เปรียบเทียบความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาข้าวกับงานวิจัยอื่น ๆ

Genus	Song et al., (2005)	Nayak and Prasanna (2007)	Choudhary and Bimal (2010)	This study (2020)
Anabaena	-	/ *	/ *	/ *
Anabaenopsis	-	-	/	/
Cylindrospermum	-	/	/	/
Nodularia	-	-	/	/
Nostoc	/ *	/ *	/ *	/ *
Tolypothrix	-	-	-	/
Calothrix	-	/	-	/
Fischerella	-	-	-	/
Stigonema	-	-	-	/
Spirulina	/	-	-	/
Oscillatoria	-	/	-	/
Phormidium	/	/	-	/
Aulosira	-	/	/	-
Aphanizomenon	-	-	/	-

ตาราง 12 เปรียบเทียบความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาข้าวกับงานวิจัยอื่น ๆ (ต่อ)

Genus	Song et al., (2005)	Nayak and Prasanna (2007)	Choudhary and Bimal (2010)	This study (2020)
Scytonema	/	/	-	-
Westiellopsis	-	/	-	-
Hapalosiphon	-	/	-	-
Lyngbya	-	/	-	-
Leptolyngbya	/ *	-	-	-
Microcoleus	/	-	-	-
Chroococcidiopsis	/	-	-	-

หมายเหตุ * หมายถึง Dominant Species

จากตาราง 12 เปรียบเทียบความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาข้าวกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ศึกษาในประเทศไทย อินเดีย และจีน บว่าไซยาโนแบคทีเรียสกุล *ostoc* และ *Anabaena* เป็นสกุลที่พบมากที่สุด โดยไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าวประเทศอินเดีย พบไซยาโนแบคทีเรีย 166 ชนิด ไอโซเลท มีเฮเทอโรซีสต์ 130 ชนิด ไม่มีเฮเทอโรซีสต์ 36 ชนิดและพบไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซีสต์มากที่สุดที่ pH 8.1 (Nayak and Prasanna ;2007) และจำนวนไซยาโนแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล โดยสูงสุดในเดือนกันยายนที่ระดับความลึกของดิน 0-5 เซนติเมตร และ 10-15 เซนติเมตร (Song et al.,2005) นอกจากนี้ยังสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนภายใต้ระบบนิเวศต่าง ๆ ของประเทศไทย เช่น ดิน ภูเขา ป่าไม้ และพื้นที่เพาะปลูก พบไซยาโนแบคทีเรีย จำนวน 853 ชนิด ประกอบด้วย *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Scytonema* sp., *Stigonema* sp., *Calothrix* sp., *Tolypothrix* sp., *Hapalosiphon* sp., *Fischerella* sp., *Nodularia* sp., *Anabaenopsis* sp., *Cylindrospermum* sp. สกุลที่เด่นเป็น *Nostoc* และ *Anabaena* (Teaumroong et al., 2002) แต่จะสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียได้มากในบริเวณพื้นที่ทางการเกษตร โดยเฉพาะพื้นที่ปลูกข้าว (Chunleuchanon et al., 2003) ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในดินนาข้าวที่มีอินทรียวัตถุมาก (Choudhury and Kennedy, 2004) จากรายงานต่าง ๆ ดังกล่าว จะเห็นได้ว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อมมีผลต่อจำนวน ความหนาแน่นและความหลากชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย ไม่ว่าจะเป็น อุณหภูมิ ความชื้น และ pH

จากการศึกษาตัวอย่างดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมีในเขตภาคเหนือตอนล่าง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเพชรบูรณ์ พิจิตร และอุทัยธานี จำนวน 61 ตัวอย่าง พบว่า เมื่อนำมาแยกไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน สามารถจำแนกไซยาโนแบคทีเรียอยู่ใน 2 อันดับ คือ Nostocales และ Stigonematales ทั้ง 2 อันดับเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย มีการสร้างเซลล์เฮเทอโรซีสท์เพื่อใช้ในการตรึงไนโตรเจน เมื่อจำแนกระดับสกุลได้ 9 สกุล 42 ชนิด ดังตาราง 13 ไซยาโนแบคทีเรียที่จำแนกออกมามีลักษณะสัณฐานวิทยา

ตาราง 13 ไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากดินนาข้าว

Genus	Number of isolates
Anabaena	11
Anabaenopsis	3
Nostoc	11
Fischerella	3
Calothrix	7
Tolypothrix	3
Cylindrospermum	3
Nodularia	1

ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียเมื่อจำแนกในระดับสกุล

สกุล *Anabaena* มีลักษณะเป็นเส้นสาย ตรัยโคมอยู่เดี่ยว ๆ ไม่รวมเป็นกลุ่มก้อน ตรัยโคมลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีชีทหุ้มแต่ไม่หนา บางชนิดเซลล์มีลักษณะรูปถังเบียร์ (barrel shaped) ตรงกลางป่องหรือรูปทรงกลมคล้ายลูกปัด สร้างเฮเทอโรซีสต์ และอะคีนีตตรงตำแหน่งปลาย หรือภายในเส้นสาย

สกุล *Anabaenopsis* มีลักษณะเป็นเส้นสาย ขดม้วนงอเป็นวง เส้นสายมีขนาดสั้น มีเซลล์ประมาณ 8-20 เซลล์ เฮเทอโรซีสต์ มักพบอยู่ส่วนปลายของเส้นสาย และอะคีนีตไม่อยู่ติดกับเฮเทอโรซีสต์

สกุล *Nostoc* มีลักษณะเป็นเส้นสาย และบิดงอ มักอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก มีสารเมือกลักษณะเป็นวุ้นหนา มองดูเป็นก้อนต้องขยี้วุ้นหนาออกก่อนจึงจะเห็นเส้นสายจำนวนมาก เซลล์มีลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม เฮเทอโรซีสต์และอะคีนีตอยู่ติดกัน และอยู่ในเส้นสาย

สกุล *Fischerella* ตรัยโคมเป็นเส้นสายคล้ายลูกปัด มีชีทหุ้มหนา แตกแขนงแบบแท้จริง แตกออกทางด้านข้าง กิ่งก้านเป็นรูปทรงกระบอก เฮเทอโรซีสต์อยู่ในเส้นสาย

สกุล *Calothrix* เป็นเส้นสายที่มักอยู่เดี่ยว ๆ หรืออยู่รวมกัน 3-4 เส้น เซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่ เรียวเล็กทางปลาย ไม่แตกแขนง บางชนิดอาจมีการแตกแขนงเทียม เฮเทอโรซีสต์จะอยู่ปลายฐาน มีขนาดเล็ก อะคีนีตอยู่ติดกับเฮเทอโรซีสต์

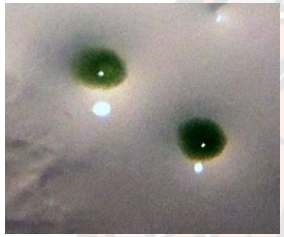
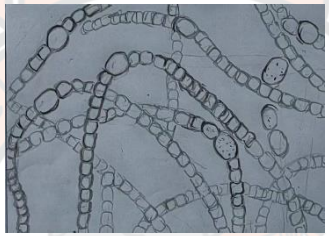
สกุล *Tolypothrix* เป็นเส้นสายที่มีการแตกแขนงเป็นแขนงเดี่ยว (false branch in single) เฮเอทโรซีสต์อยู่ภายในสายเซลล์

สกุล *Cylindrospermum* มีลักษณะเป็นเส้นสาย อาจอยู่เดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นกลุ่มฝังตัวอยู่ในสารเมือก เซลล์มีขนาดเท่ากันตลอดสาย เฮเทอโรซีสต์มักอยู่ปลายสุดด้านใดด้านหนึ่ง หรือทั้งสองด้าน อะคีนีตจะอยู่ติดกับเฮเทอโรซีสต์ มีขนาดค่อนข้างใหญ่ รูปทรงกระบอก

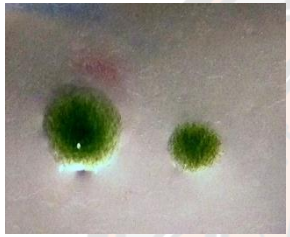
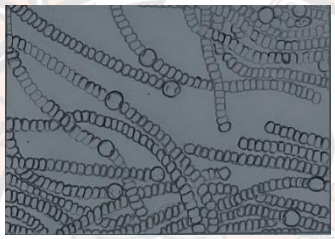
สกุล *Nodularia* มีลักษณะเป็นเส้นสายที่ไม่ยาว เซลล์แต่ละเซลล์เป็นเฮเทอโรซีสต์มักจะมีรูปร่างเหลี่ยมมน ส่วนกว้างมากกว่ายาว มีชีทบางๆ หุ้มอะคินีท

ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ แต่ละไอโซเลทแสดงในตารางที่ 14

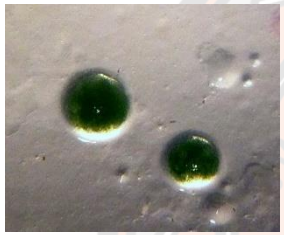
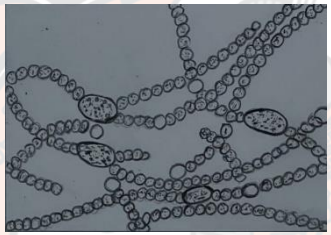
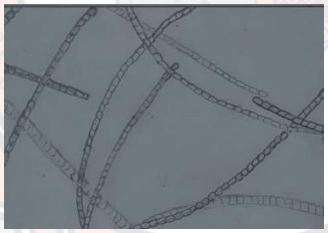
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้

Isolate	Colony	Filamentous	Characteristics
Anabaena R1			Colony: สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ Cell: รูปถังเบียร์ ความกว้างใกล้เคียงกับความยาว Heterocyst: รูปถังเบียร์หรือทรงกลมอยู่ตรงกลาง Akinete: รูปวงรีปลายมนจนถึงรูปทรงกระบอกอยู่ติดกับเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R2			Colony: กลุ่มของเซลล์ สีเขียวอ่อน รวมตัวกันเป็นโคโลนี มีลักษณะกลม โค้ง นูน Cell: รูปถังเบียร์ มีความยาวมากกว่าความกว้าง Heterocyst: รูปกลม พบบริเวณตรงกลางของสายเซลล์ Akinete: รูปทรงกลม ห่างจากเฮเทอโรซีสต์

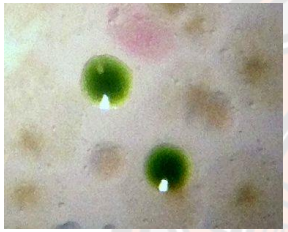
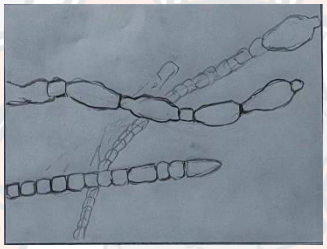
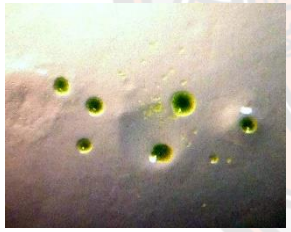
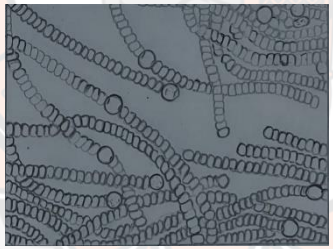
ตาราง 15 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

Isolate	Colony	Filamentous	Characteristics
Anabaena R3			Colony: กลุ่มของเซลล์ สีเขียวอ่อน รวมตัวกันเป็นโคโลนี มีลักษณะกลม โค้ง นูน Cell: รูปถังเบียร์ มีความยาวใกล้เคียงกับความกว้าง Heterocyst: รูปไข่ค่อนข้างกลม อยู่ตรงกลางของสายเซลล์ Akenete: รูปทรงกระบอกปลายมา ติดอยู่ทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์

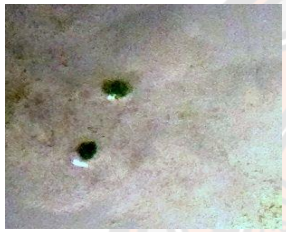
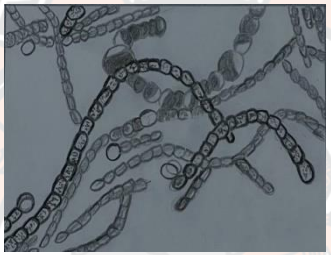
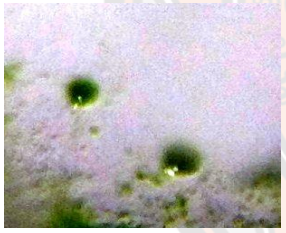
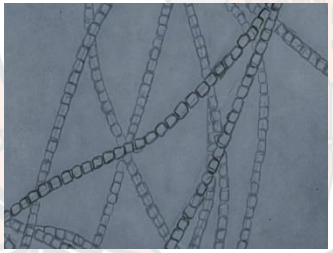
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

Isolate	Colony	Filamentous	Characteristics
Anabaena R4			Colony: กลุ่มของเส้นใย โคโลนี สีเขียว โคโลนี กลม โค้ง นูน Cell: รูปทรงกระบอก ความยาวมากกว่าความกว้าง ปลายมน Heterocyst: รูปวงรี ปลายมน หรือรูปทรงกระบอกปลายใน Akenete: รูปทรงกระบอกปลายแบน มีเพียง 1 ติดอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R5			Colony: สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell: รูปทรงกลมหรือวงรีปลายแหลม สีน้ำเงินแกมเขียวซีด ๆ Heterocyst: รูปทรงกลมคล้ายถูกบีบ บางครั้งมีการสร้างเฮเทอโรซีสต์ขึ้นมา 2 อันติดกัน Akenete: เป็นเซลล์เดี่ยวรูปวงรี อยู่ห่างจากเฮเทอโรซีสต์

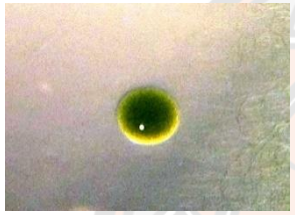
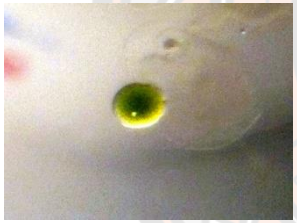
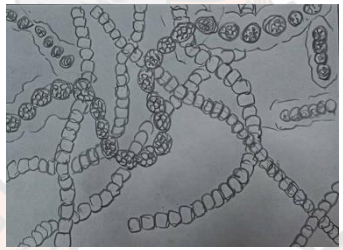
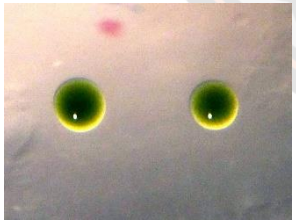
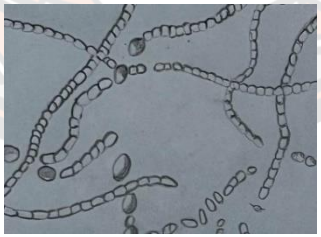
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

Isolate	Colony	Filamentous	Characteristics
Anabaena R6			Colony: สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell: รูปถังเบียร์ ความกว้างใกล้เคียงกับความยาว หรืออาจจะกว้างกว่าเล็กน้อย Heterocyst: รูปถังเบียร์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ Akinete: รูปทรงกระบอก ปลายมน ติดอยู่ทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R7			Colony: สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell: รูปถังเบียร์ ความกว้างใกล้เคียงกับความยาว Heterocyst: รูปถังเบียร์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ Akinete: รูปทรงกระบอก ปลายมน ติดอยู่ทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์

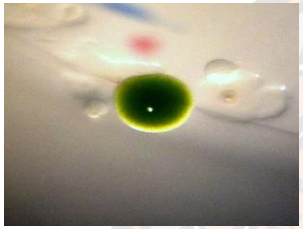
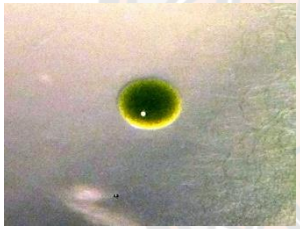
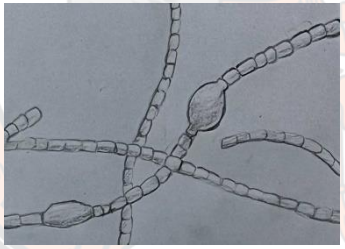
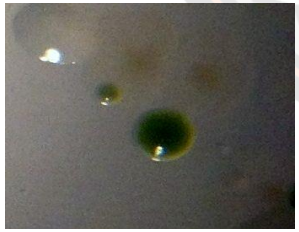
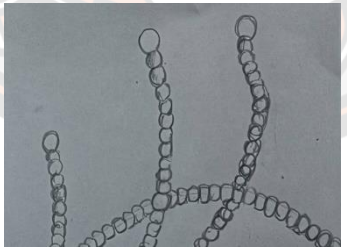
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

Isolate	Colony	Filamentous	Characteristics
Anabaena R8			Colony: สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell: รูปทรงกระบอก Heterocyst: รูปทรงกระบอกสั้น ๆ Akenete: รูปร่างโค้งงออยู่ติดทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R9			Colony: สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell: รูปถังเบียร์ ความกว้างใกล้เคียงกับความยาว หรืออาจจะกว้างกว่าเล็กน้อย Heterocyst: รูปถังเบียร์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ Akenete: รูปทรงกระบอก ปลายมน ติดอยู่ทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์

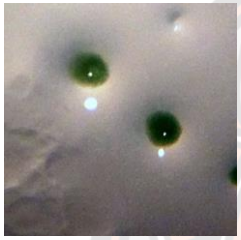
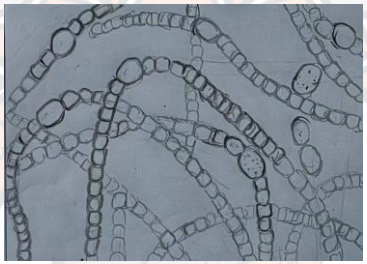
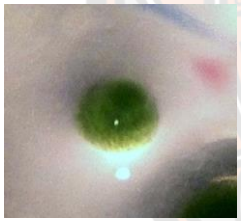
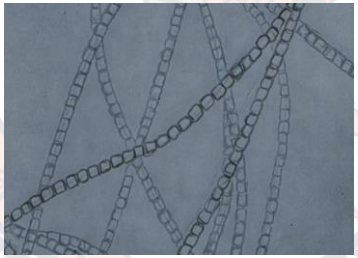
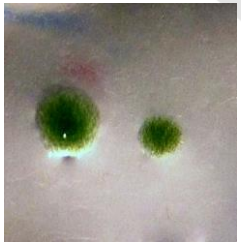
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

Isolate	Colony	Filamentous	Characteristics
Nostoc R13			Colony: สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ Cell: รูปถังเบียร์ วงรีเซลล์ปลายกลม มน Heterocyst: ทรงกระบอกสั้น ๆ พบตอนกลางของสายเซลล์ Akenete: รูปทรงกระบอก พบตอนกลางของสายเซลล์
Nostoc R14			Colony: สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ มีเมือก Cell: ทรัยโคมพันกันหลวม ๆ เห็นชีทชัดเจน Heterocyst: กลม หรือค่อนข้างยาว สร้างบริเวณตอนปลายของสายเซลล์ Akenete: รูปร่างกลม ผิวเรียบ สร้างกลางของสายเซลล์
Nostoc R15			Colony: สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ มีเมือก Cell: รูปถังเบียร์สั้น ๆ หรือทรงกระบอกยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง Heterocyst: รูปทรงกลมหรือวงรี ปลายมน สร้างกลางเซลล์ Akenete: รูปทรงกระบอก พบตอนกลางของสายเซลล์

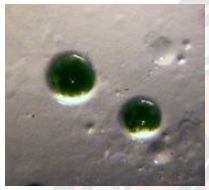
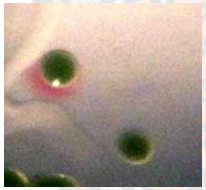
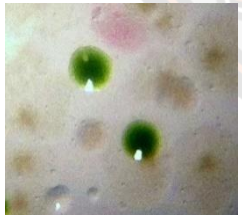
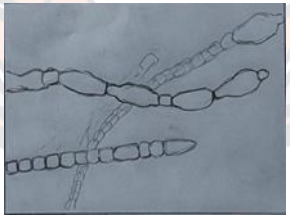
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้

Isolate	Colony	Filamentous	Characteristics
Nostoc R16			Colony: สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ มีเมือก Cell: รูปถังเบียร์สั้น ๆ หรือทรงกระบอกยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง Heterocyst: รูปทรงกลมหรือวงรี ปลายมน สร้างกลางเซลล์ Akenete: รูปทรงกระบอก พบตอนกลางของสายเซลล์
Nostoc R17			Colony: สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ มีเมือก Cell: รูปถังเบียร์สั้น ๆ ยาวน้อยกว่าสั้น Heterocyst: รูปทรงค่อนข้างกลม สร้างตอนกลางและปลายของสายเซลล์ Akenete: รูปไข่ พบตอนกลางของสายเซลล์
Nostoc R18			Colony: สีเขียว กลม โค้ง นูน มีเมือก ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell: รูปถังเบียร์สั้น ๆ ยาวน้อยกว่าสั้น Heterocyst: รูปทรงค่อนข้างกลม สร้างตอนกลางและปลายของสายเซลล์ Akenete: รูปไข่ พบตอนกลางของสายเซลล์

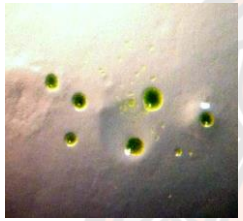
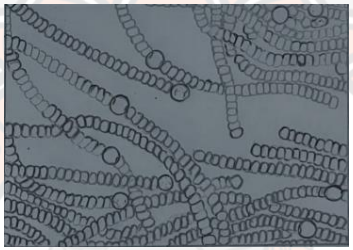
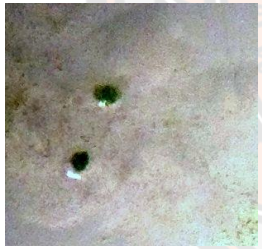
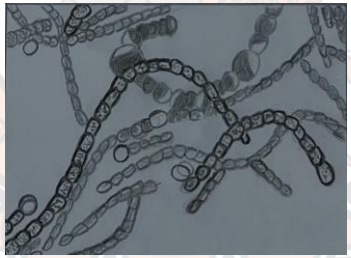
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้

isolate	colony	filamentous	characteristics
Anabaena R1			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ Cell : รูปถังเบียร์ ความกว้างใกล้เคียงกับความยาว Heterocyst : รูปถังเบียร์หรือทรงกลมอยู่ตรงกลาง Akenete : รูปวงรีปลายมนจนถึงรูปทรงกระบอกอยู่ติดกับเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R2			Colony : กลุ่มของเซลล์ สีเขียวอ่อน รวมตัวกันเป็นโคโลนี มีลักษณะกลม โค้ง นูน Cell : รูปถังเบียร์ มีความยาวมากกว่าความกว้าง Heterocyst : รูปกลม พบบริเวณตรงกลางของสายเซลล์ Akenete : รูปทรงกลม ห่างจากเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R3			Colony : กลุ่มของเซลล์ สีเขียวอ่อน รวมตัวกันเป็นโคโลนี มีลักษณะกลม โค้ง นูน Cell : รูปถังเบียร์ มีความยาวใกล้เคียงกับความกว้าง Heterocyst : รูปไข่ค่อนข้างกลม อยู่ตรงกลางของสายเซลล์ Akenete : รูปทรงกระบอกปลายมา ติดอยู่ทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์

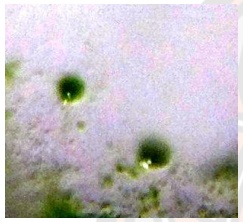
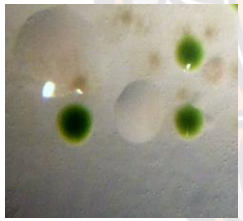
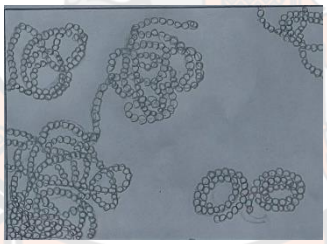
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Anabaena R4			Colony : กลุ่มของเส้นใย โคโลนี สีเขียว โคโลนี กลม โค้ง นูน Cell : รูปทรงกระบอก ความยาวมากกว่าความกว้าง ปลายมน Heterocyst : รูปวงรี ปลายมน หรือรูปทรงกระบอกปลายใน Akenete : รูปทรงกระบอกปลายแบน มีเพียง 1 ติดอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R5			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปทรงกลมหรือวงรีปลายแหลม สีน้ำเงินแกมเขียวซีด ๆ Heterocyst : รูปทรงกลมคล้ายถูกบีบ บางครั้งมีการสร้างเฮเทอโรซีสต์ขึ้นมา 2 อันติดกัน Akenete : เป็นเซลล์เดี่ยวรูปวงรี อยู่ห่างจากเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R6			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปถังเบียร์ ความกว้างใกล้เคียงกับความยาว หรืออาจจะกว้างกว่าเล็กน้อย Heterocyst : รูปถังเบียร์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ Akenete : รูปทรงกระบอก ปลายมน ติดอยู่ทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์

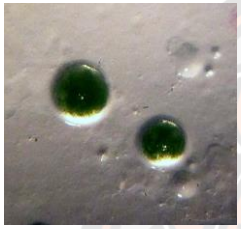
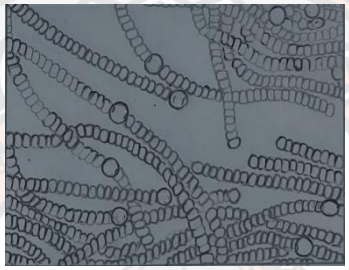
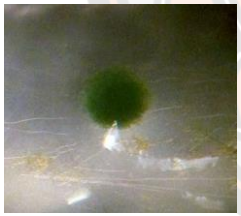
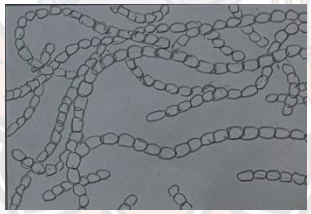
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Anabaena R7			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปถังเบียร์ ความกว้างใกล้เคียงกับความยาว Heterocyst : รูปถังเบียร์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ Akenete : รูปทรงกระบอก ปลายมน ติดอยู่ทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R8			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปทรงกระบอก Heterocyst : รูปทรงกระบอกสั้น ๆ Akenete : รูปร่างโค้งงออยู่ติดทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์

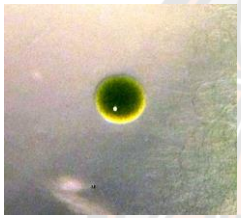
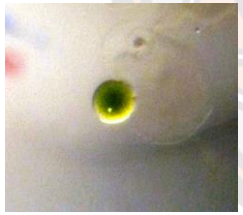
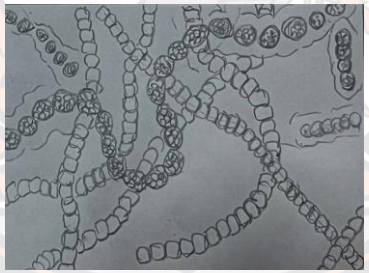
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Anabaena R9			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปถังเบียร์ ความกว้างใกล้เคียงกับความยาว หรืออาจจะกว้างกว่าเล็กน้อย Heterocyst : รูปถังเบียร์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ Akenete : รูปทรงกระบอก ปลายมน ติดอยู่ทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์
Anabaena R10			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปถังเบียร์ มีความยาวเท่ากับความกว้าง เซลล์คอด Heterocyst : พบตรงกลางของสายเซลล์ เป็นรูปทรงกลม Akenete : รูปวงรี ปลายแหลมอยู่ติดกันเป็นสายห่างจากเฮเทอโรซีสต์

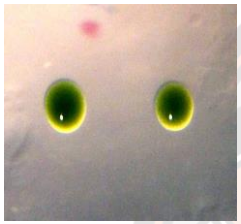
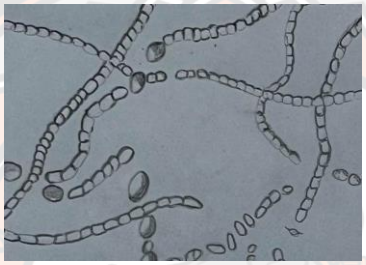
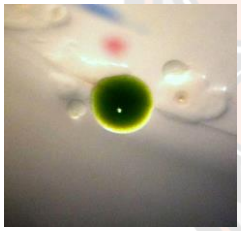
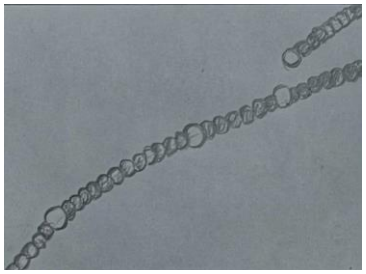
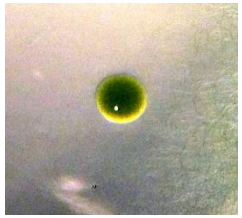
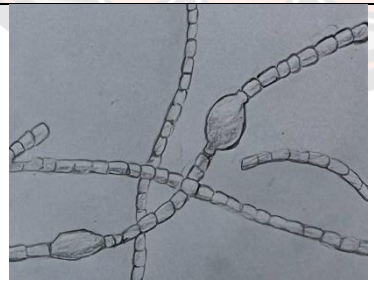
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Anabaena R11			Colony : กลุ่มของเส้นใย รวมตัวกันเป็นโคโลนี สีเขียวโคโลนี กลม โค้ง นูน Cell : รูปถังเบียร์ มีความยาวใกล้เคียงกับความกว้าง Heterocyst : รูปไข่ค่อนข้างกลม อยู่ตรงกลางของสายเซลล์ Akenete : รูปทรงกระบอกปลายมน ติดอยู่ทั้งสองข้างของเฮเทอโรซีสต์
Nostoc R12			Colony : กลุ่มของเส้นใย รวมตัวกันเป็นโคโลนี สีเขียว โคโลนี กลม โค้ง นูน มีเมือกมาก Cell : รูปถังเบียร์สั้น ๆ Heterocyst : ทรงกระบอกสั้น ๆ พบตอนกลางของสายเซลล์ Akenete : กลม พบตอนกลางของสายเซลล์

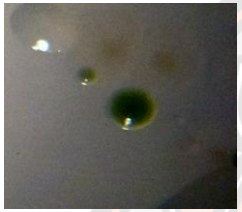
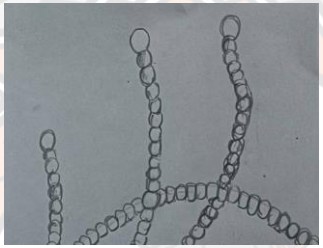
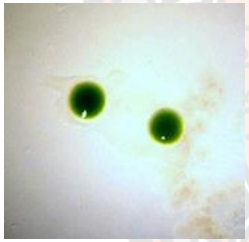
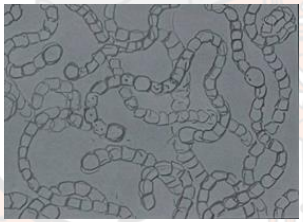
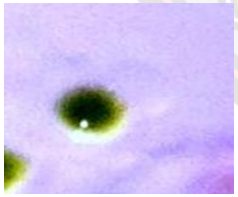
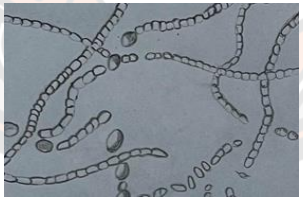
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Nostoc R13			Colony : สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ Cell : รูปถังเบียร์ วงรีเซลล์ปลายกลม มน Heterocyst : ทรงกระบอกสั้น ๆ พบตอนกลางของสายเซลล์ Akenete : รูปทรงกระบอก พบตอนกลางของสายเซลล์
Nostoc R14			Colony : สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ มีเมือก Cell : ทรัยโคมพันกันหลวม ๆ เห็นชีทชัดเจน Heterocyst : กลม หรือค่อนข้างยาว สร้างบริเวณตอนปลายของสายเซลล์ Akenete : รูปร่างกลม ผิวเรียบ สร้างกลางของสายเซลล์

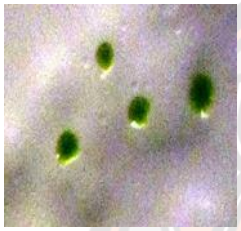
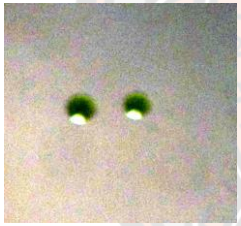
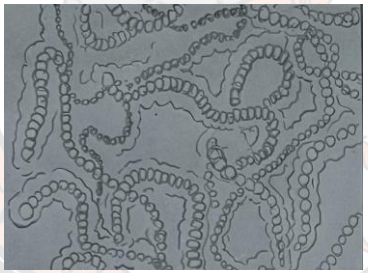
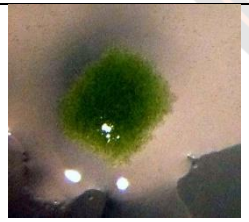
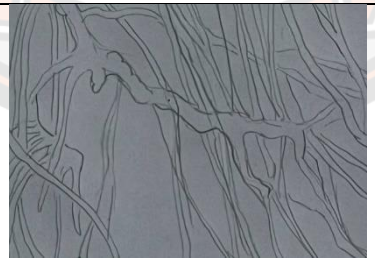
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Nostoc R15			Colony: สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ มีเมือก Cell : รูปถังเบียร์สั้น ๆ หรือทรงกระบอกยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง Heterocyst : รูปทรงกลมหรือวงรี ปลายมน สร้างกลางเซลล์ Akenete : รูปทรงกระบอก พบตอนกลางของสายเซลล์
Nostoc R16			Colony : สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ มีเมือก Cell : รูปถังเบียร์สั้น ๆ หรือทรงกระบอกยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง Heterocyst : รูปทรงกลมหรือวงรี ปลายมน สร้างกลางเซลล์ Akenete : รูปทรงกระบอก พบตอนกลางของสายเซลล์
Nostoc R17			Colony : สีเขียวอ่อน กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ มีเมือก Cell : รูปถังเบียร์สั้น ๆ ยาวน้อยกว่าสั้น Heterocyst : รูปทรงค่อนข้างกลม สร้างตอนกลางและปลายของสายเซลล์ Akenete : รูปไข่ พบตอนกลางของสายเซลล์

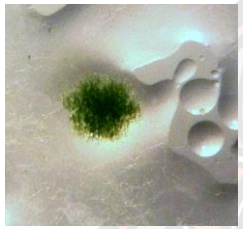
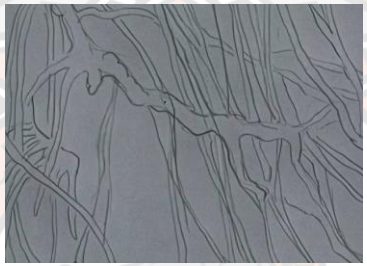
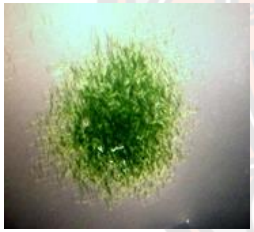
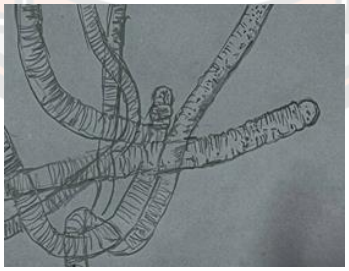
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Nostoc R18			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน มีเมือก ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปถังเบียร์สั้น ๆ ยาวน้อยกว่าสั้น Heterocyst : รูปทรงค่อนข้างกลม สร้างตอนกลางและปลายของสายเซลล์ Akinete : รูปไข่ พบตอนกลางของสายเซลล์
Nostoc R19			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน มีเมือก ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปทรงกระบอกยาว ๆ ปลายแบน Heterocyst : รูปทรงกระบอก พบตอนกลางของเซลล์ Akinete : ไม่พบ
Nostoc R20			Colony: สีเขียว กลม โค้ง นูน มีเมือก ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปถังเบียร์สั้น ๆ ยาวน้อยกว่าสั้น Heterocyst : รูปทรงค่อนข้างกลม สร้างตอนกลางและปลายของสายเซลล์ Akinete : รูปไข่ พบตอนกลางของสายเซลล์

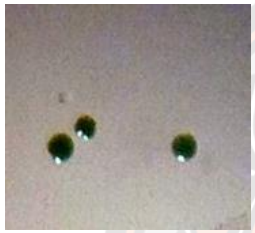
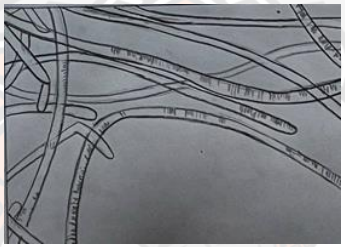
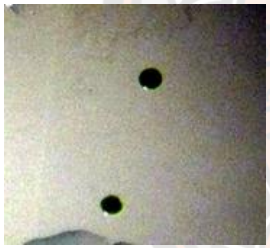
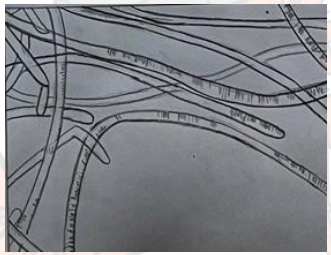
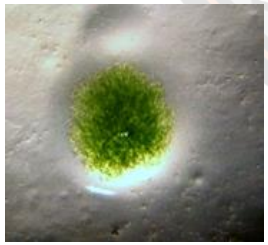
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Nostoc R21			Colony: สีเขียว ผิวหน้าเรียบ กลม โค้ง นูน ขอบเรียบ Cell : รูปร่างถังเบียร์สั้น ๆ หรือเป็นรูปวงกลม Heterocyst : พบตอนปลายของสายเซลล์ Akenete : รูปทรงรี
Nostoc R22			Colony : สีเขียว กลม โค้ง นูน มีเมือก ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ Cell : รูปถังเบียร์สั้น ๆ ยาวน้อยกว่าสั้น Heterocyst : รูปทรงค่อนข้างกลม สร้างตอนกลางและปลายของสายเซลล์ Akenete : รูปไข่ พบตอนกลางของสายเซลล์
Fischerella R23			Colony : กลุ่มเซลล์สีเขียว มีลักษณะของ เส้นใยรวมตัวกัน แผ่ราบบนอาหาร Cell : เป็นรูปทรงกลมทรัยโคมแขนงตรง Heterocyst : พบมากในกิ่งแขนงเป็นรูปทรงกระบอก Akenete : ไม่พบ

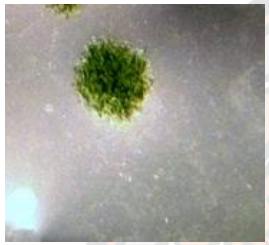
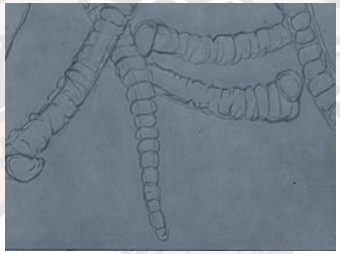
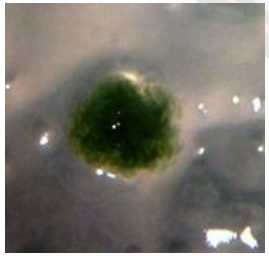
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Fischerella R24			Colony : กลุ่มเซลล์สีเขียว มีลักษณะของ เส้นใย รวมตัวกัน แผ่ราบบนอาหาร Cell : เป็นรูปทรงกลม มีชีทหุ้มบาง ๆ กิ่งแขนงตรง Heterocyst : รูปทรงกระบอก มีขนาดเล็กกว่าเซลล์ Akenete : ไม่พบ
Fischerella R25			Colony: กลุ่มเซลล์สีเขียวอ่อน มีลักษณะของเส้นใย รวมตัวกัน แผ่ราบบนอาหาร Cell: เซลล์ในสายเซลล์หลักรูปร่างทรงกลมหรือทรงกระบอก Heterocyst: รูปทรงกระบอก อยู่ตอนกลางของสายเซลล์หลักและกิ่งแขนง Akenete: ไม่พบ
Tolypothrix R26			Colony: กลุ่มเซลล์สีเขียวเข้ม ลักษณะโค้ง นูน ขอบไม่แน่นอน Cell: เซลล์มีรอยแยกระหว่างเซลล์เห็นได้ชัด Heterocyst: พบเพียง 1 ที่ฐาน Akenete: ไม่พบ

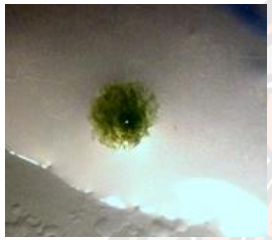
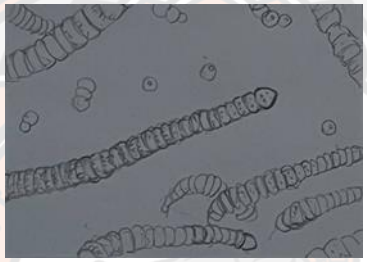
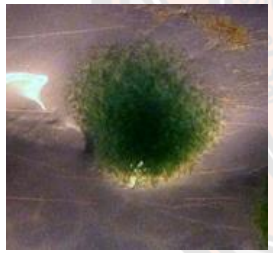
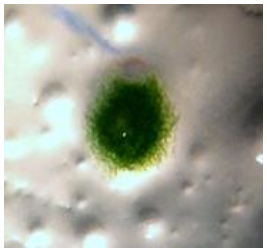
ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Tolypothrix R27			Colony: สีเขียว ขนาดเล็ก กลม โค้ง นูน Cell: รูปถังเบียร์ หรือทรงกระบอก มีชีทหนา Heterocyst: เป็นรูปวงรี พบเพียง 1 ที่ฐาน Akenete: ไม่พบ
Tolypothrix R28			Colony: สีเขียว ขนาดเล็ก กลม โค้ง นูน Cell: เซลล์มีลักษณะคล้ายจานวางเรียงซ้อนกัน Heterocyst: รูปวงกลมเหมือนถูกบีบ พบเพียง 1 ที่ฐาน Akenete: ไม่พบ
Calothrix R29			Colony: กลุ่มของเส้นใย รวมตัวกันเป็นโคโลนี สีเขียว โคโลนี กลม โค้ง นูน Cell: มีความยาวครึ่งหนึ่งของความกว้าง Heterocyst: พบเพียง 1 ที่ฐานรูปครึ่งวงกลม Akenete: ไม่พบ

ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Calothrix R30			Colony: กลุ่มของเส้นใย รวมตัวกันเป็นโคโลนี สีเขียว โคโลนีกลม โค้ง นูน Cell: สายเซลล์เป็นเส้นเดียว ทรัยโคมเรียวปลาย Heterocyst: รูปร่างกลมอยู่ที่ฐาน Akenete: พบเดี่ยวๆ อยู่ที่ฐานติดกับเฮเทอโรซีสต์
Calothrix R31			Colony: กลุ่มของเส้นใย รวมตัวกันเป็นโคโลนี สีเขียว โคโลนีราบบนอาหาร Cell: ทรัยโคมกว้าง 7-8 µ เห็นรอดคอดที่ผนังเซลล์ชัดเจน Heterocyst : พบ 1-3 เซลล์ ที่ฐานรูปทรงกลมหรือทรงกระบอก Akenete : ไม่พบ
Calothrix R32			Colony: กลุ่มของเส้นใย รวมตัวกันเป็นโคโลนี สีเขียว โคโลนีกลม โค้ง นูน Cell: รูปร่างสี่เหลี่ยมจตุรัสหรือถังเบียร์ Heterocyst: พบที่ฐานและกลางสายเซลล์ Akenete: มีเพียง 1 อยู่ติดกับเฮเทอโรซีสต์

ตาราง 14 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

isolate	colony	filamentous	characteristics
Calothrix R33			Colony: กลุ่มของเส้นใย รวมตัวกันเป็นโคโลนี สีเขียว โคโลนีกลม โค้ง นูน Cell: คอดเล็กน้อยที่ผนังเซลล์ เซลล์ปลายสุดโค้งมน Heterocyst: มีที่ฐานและตรงกลางสายเซลล์ Akenete : พบเดี่ยว ๆ ที่ฐาน รูปร่างทรงกระบอกปลายมนทั้งสองข้าง
Calothrix R34			Colony: กลุ่มของเส้นใย รวมตัวกันเป็นโคโลนี สีเขียว โคโลนีกลม โค้ง นูน Cell: ทรัยโคมมีลักษณะเรียวปลาย มีฐานกว้าง เซลล์ที่ฐานมีรูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยม เซลล์ปลายโค้งมน Heterocyst: รูปร่างวงรีค่อนข้างกลม พบเพียง 1 ที่ฐานเซลล์ Akenete : ไม่พบ
Calothrix R35			Colony: กลุ่มของเส้นใย รวมตัวกันเป็นโคโลนี สีเขียว โคโลนีกลม โค้ง นูน

4. การศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้

นำไซยาโนแบคทีเรียที่ผ่านการจัดจำแนก จำนวน 35 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว $BG11_0$ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 ºC และให้อากาศในอัตรา 1 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร (OD_{900}) สำหรับนำไปเขียนกราฟการเจริญและคำนวณเวลาที่เชื้อใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time) จากการคำนวณค่า doubling time ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 35 ชนิด พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 11.95-31.60 ชั่วโมง โดยไซยาโนแบคทีเรีย Nostoc R12 เป็นเชื้อที่เจริญเร็วที่สุด เนื่องจากมีค่า doubling time น้อยที่สุด เท่ากับ 11.95 ชั่วโมง หรือมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เท่ากับ 0.058 ต่อชั่วโมง ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญช้าที่สุด คือ *Fischerella* R25ซึ่งมีค่า doubling time และ specific growth rate เท่ากับ 31.60 ชั่วโมง และ 0.022 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ดังตาราง 12 จากค่า doubling time สามารถนำมาจัดแบ่ง ไซยาโนแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตเร็ว คือ มีค่า doubling time น้อยกว่า 20 ชั่วโมง ไซยาโนแบคทีเรียมีจัดอยู่ในกลุ่มนี้ มี 17 ไอโซเลท ได้แก่ *Anabaena* R1, *Anabaena* R3, *Anabaena* R4, *Anabaena* R6, *Anabaena* R7, *Anabaena* R8, *Anabaena* R9, *Anabaena* R11, *Nostoc* R12, *Nostoc* R13, *Nostoc* R18, *Nostoc* R22, *Nostoc* R23, *Nostoc* R24, *Tolypothrix* R27, *Calothrix* R29 และ *Calothrix* R31

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตเร็วปานกลาง คือ มีค่า doubling time อยู่ระหว่าง 20-24 ชั่วโมง ไซยาโนแบคทีเรียมีจัดอยู่ในกลุ่มนี้ มี 12 ไอโซเลท ได้แก่ *Anabaena* R5, *Anabaena* R10, *Nostoc* R14, *Nostoc* R15, *Nostoc* R16, *Nostoc* R20, *Nostoc* R21, *Tolypothrix* R26, *Calothrix* R32, *Calothrix* R33, *Calothrix* R34 และ *Calothrix* R35

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตช้า คือ มีค่า doubling time มากกว่า 24 ชั่วโมง ไซยาโนแบคทีเรียมีจัดอยู่ในกลุ่มนี้ มี 6 ไอโซเลท ได้แก่ *Anabaena* R2, *Nostoc* R17, *Nostoc* R19, *Fischerella* R25, *Tolypothrix* R28 และ *Calothrix* R30

นำผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ เปรียบเทียบกับการทดลองของ Antarikanonda and Amarit (1995), Sassanarakkit et al., (1999) ดังนี้

สกุล *Anabaena* มีรายงานการทดลองไว้ว่ามีค่า t_d เท่ากับ 14.88 และ 28 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการทดลองครั้งนี้ นำ *Anabaena* 11 ไอโซเลททำการทดลอง มี 2 ไอโซเลทที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่า ในรายงานของ Sassanarakkit et al., (1999) ซึ่งมีค่า t_d เท่ากับ 14.58 ชั่วโมง แต่เมื่อเทียบกับรายงานของ Antarikanonda & Amarit (1995) มีเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้น ที่เจริญเติบโตช้ากว่า ซึ่งมีค่า t_d เท่ากับ 28.74 ชั่วโมง

สกุล *Nostoc* มีรายงานการทดลองไว้ว่ามีค่า t_d เท่ากับ 12.24 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการทดลองครั้งนี้ นำ *Nostoc* 11 ไอโซเลททำการทดลอง มี 1 ไอโซเลทที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่า ในรายงานของ Sassanarakkit et al., (1999) ซึ่งมีค่า t_d เท่ากับ 11.95 ชั่วโมง แต่เมื่อเทียบกับรายงานของ Antarikanonda & Amarit (1995) มีเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น ที่เจริญเติบโตช้ากว่า ซึ่งมีค่า t_d เท่ากับ 26.10 และ 29.70 ชั่วโมง ตามลำดับ

ตาราง 16 ค่า doubing time ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้

Isolates	doubling time (h)		
	This study	Sassanarakkit et al., (2542)	Antarikanonda & Amarit (1995)
Anabaena R1	16.30		
Anabaena R2	28.74		
Anabaena R3	17.94		
Anabaena R4	17.20		
Anabaena R5	22.90	14.88	28
Anabaena R6	14.58		
Anabaena R7	14.80		
Anabaena R8	14.58		
Anabaena R9	19.86		
Anabaena R10	20.34		
Anabaena R11	17.94		
Nostoc R12	11.95		
Nostoc R13	14.60		
Nostoc R14	22.74		
Nostoc R15	22.74		
Nostoc R16	20.58		
Nostoc R17	29.70		
Nostoc R18	19.10		
Nostoc R19	26.10		
Nostoc R20	20.10		
Nostoc R21	21.78		
Nostoc R22	17.22		
Fischerella R23	17.90		
		-	-
Fischerella R25	31.60		
Tolypothrix R26	20.34		
		19.68	-

ตาราง 15 ค่า doubing time ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (ต่อ)

Isolates	doubling time (h)		
	This study	Sassanarakkit et al., (2542)	Antarikanonda & Amarit (1995)
Tolypothrix R27	19.38		
Tolypothrix R28	26.34		
Calothrix R29	17.94		
Calothrix R30	27.30		
Calothrix R31	18.90		
Calothrix R32	22.75	18.24	38
Calothrix R33	22.50		
Calothrix R34	22.02		
Calothrix R35	21.54		

5. การศึกษาความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย

ความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย 35 ไอโซเลท ได้ผลดังตาราง 12 มีค่าการตรึงก๊าซไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 0.22 - 36.17 nmoles min/mg protein โดย *Nostoc* R22 มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนต่ำสุด และ *Anabaena* R1 มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนสูงสุด ตาราง 13 แบ่งกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียตามความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีการตรึงไนโตรเจนได้สูง มีค่า Nitrogenous activity ตั้งแต่ 10 nmoles min/mg protein ขึ้นไป ซึ่งมีไซยาโนแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ 6 ชนิด *คือ Anabaena* R1, R2 R3, *Nostoc* R12, R23 และ *Fischerella* R23

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีการตรึงไนโตรเจนได้ปานกลาง มีค่า Nitrogenous activity ตั้งแต่ 5 - 10 nmoles min/mg protein ขึ้นไป ซึ่งมีไซยาโนแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ 9 ชนิด คือ *Anabaena* R4, R5, R6, R7, *Nostoc* R14, R15 และ *Calothrix* R29, R30, R31

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่มีการตรึงไนโตรเจนได้น้อย มีค่า Nitrogenous activity ต่ำกว่า 5 nmoles min/mg protein ขึ้นไป ซึ่งมีไซยาโนแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ 20 ชนิด คือ *Anabaena* R8, R9, R10, R11, *Nostoc* R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, *Fischerella* R24, R25, *Tolypothrix* R26, R27, R28 และ *Calothrix* R32, R33, R34, R35

นำผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้มาเปรียบเทียบกับการทดลองของ Sassanarakkit et al., (1999) พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด คือ *Anabaena* ตรึงไนโตรเจนได้ 36.17 nmoles/ min/mg protein รองลงมา คือ *Nostoc* ตรึงไนโตรเจนได้ 16.70 nmoles/ min/mg protein

กิจกรรมไนโตรจีเนสมีความสัมพันธ์กับการเจริญ (ตาราง 12 และ 13) กล่าวคือ เมื่อไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน จะนำไปสร้างโปรตีนที่ส่งเสริมการเจริญ (Thiel, 2004) แต่ในภาพรวมจะเห็นว่า *Nostoc* มีกิจกรรมไนโตรจีเนสต่ำ อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ดังกล่าวมีการสร้างชีทหนาห่อหุ้มเซลล์ จึงเป็นข้อจำกัดในการแลกเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจน (Hrckova et al., 2010) แต่บางไอโซเลทซึ่งมีอัตราการเจริญสูงแต่กลับมีกิจกรรมไนโตรจีเนสต่ำ อาจเป็นเพราะว่าเอนไซม์ไนโตรจีเนสสามารถถูกยับยั้งด้วยก๊าซออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ จากผลการทดลอง Hrouzek (2004) พบว่า Trichormus และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีกิจกรรมไนโตรจีเนสลดลงในสภาพที่มีแสง

ตาราง 17 ความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย

Scientific name	Nitrogenous activity (nmoles C_2H_4 mg^{-1} protein min^{-1})		
	This study	Sassanarakkit et al., (1999)	Tassayanonchai and Mala (2015)
Anabaena R1	36.17		
Anabaena R2	25.99		
Anabaena R3	18.11		
Anabaena R4	8.09		
Anabaena R5	7.20	36.17	0.21-0.46
Anabaena R6	5.32		
Anabaena R7	5.32		
Anabaena R8	3.93		
Anabaena R9	3.44		
Anabaena R10	3.31		
Anabaena R11	0.69		
Nostoc R12	16.70		
Nostoc R13	14.44		
Nostoc R14	6.69		
Nostoc R15	5.00		
Nostoc R16	4.30		
Nostoc R17	1.30	16.70	0.18-0.42
Nostoc R18	1.29		
Nostoc R19	1.18		
Nostoc R20	0.90		
Nostoc R21	0.40		
Nostoc R22	0.22		

ตาราง 16 ความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย (ต่อ)

Scientific name	Nitrogenous activity (nmoles C_2H_4 mg^{-1} protein min^{-1})		
	This study	Sassanarakkit et al., (1999)	Tassayanonchai and Mala (2015)
Fischerella R23	16.63		
Fischerella R24	3.82	non study	non study
Fischerella R25	0.59		
Tolypothrix R26	3.86		
Tolypothrix R27	0.65	3.82	non study
Tolypothrix R28	0.43		
Calothrix R29	9.55		
Calothrix R30	5.39		
Calothrix R31	5.16		
Calothrix R32	4.73	9.55	0.20-0.66
Calothrix R33	3.08		
Calothrix R34	2.59		
Calothrix R35	1.86		

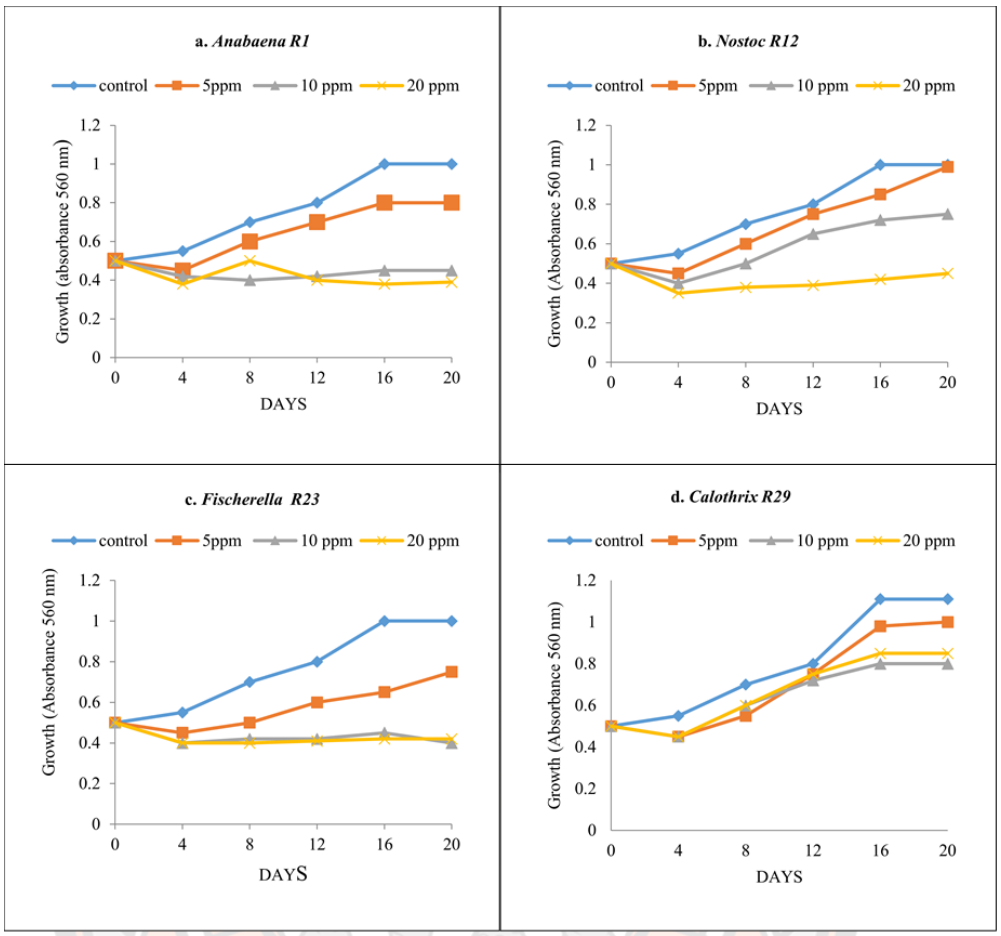
หมายเหตุ Tassayanonchai and Mala (2015)
Nitrogenous activity (nmoles C_2H_4 mg^{-1} dry wt h^{-1})

6. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน

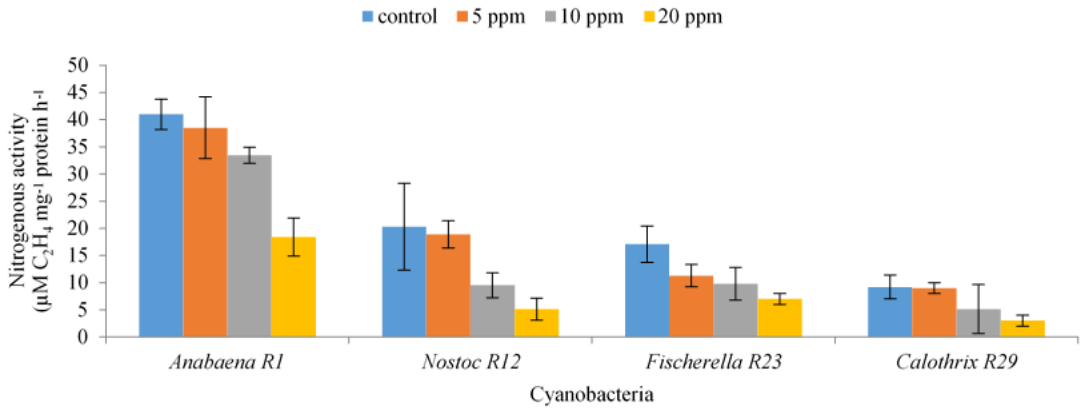
ได้ทำการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้ เจริญได้เร็ว สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมากและมีประสิทธิภาพในการตรึงก๊าซไนโตรเจนสูง โดยทำการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียมา 4 ไอโซเลท เพื่อทำการทดสอบความทนทานต่อสารปราบศัตรูพืช ซึ่งเป็นสิ่งที่เกษตรกรไทยนิยมใช้ในการเพาะปลูกข้าวในปัจจุบัน (ภาพ 9) ทำการวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือก ตามอัตราการเจริญและความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน ทุก ๆ 4 วัน เป็นเวลา 20 วัน พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอาหาร $BG11_0$ ที่ผสมบิวทาคลอร์ ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 20 ppm ที่ความเข้มข้นของบิวทาคลอร์

0 และ 5 ppm การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบิวทาร์คอร์เป็น 10 ppm ขึ้นไป จะเห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันดังนี้ *Calothrix* R26 > *Nostoc* R12 > *Anabaena* R1> *Fischerella* R23 จากการศึกษาพบว่าไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Calothrix* มีผนังเซลล์หนา เยื่อหุ้มสายเซลล์หนา และมักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเซลล์หนาแน่น ส่วน *Anabaena* มีวิวัฒนาการน้อยกว่า สายเซลล์ไม่แตกแขนง เซลล์มีผนังบาง สายเซลล์มีเยื่อหุ้มบาง จึงทนต่อความเข้มข้นของบิวทาร์คอร์ได้น้อย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าบิวทาคลอร์ 2-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ (Lee et al., 2007) และ *N.muscorum* กลายพันธุ์ได้เมื่อความเข้มข้นของบิวทาคลอร์เท่ากับ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Singh et al., 1979) ขณะที่ *Anabaena*, *Rhizobium* และ *Gloeocapsa* สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้เมื่อความเข้มข้นของบิวทาคลอร์เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Chen, 1986; Singh and Vaishampayan, 1978; Singh and Vaishampayan, 1978) รายงานว่าการทนทานต่อบิวทาคลอร์มีความสัมพันธ์กับวิวัฒนาการ คือ ความต้านทานต่อสารบิวทาคลอร์จะลดลงตามลำดับ ไรโซเบียม > ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว > ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย > พืชชั้นสูงและพืชใบเลี้ยงเดี่ยว แสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตในยุคดึกดำบรรพ์มีความต้านทานต่อบิวทาคลอร์มากกว่าและสูงกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Suseela (2001) รายงานว่าการใช้บิวทาคลอร์ช่วยเพิ่มมวลชีวภาพของสาหร่าย *A. sphaerica* และเร่งปริมาณการตรึงไนโตรเจนโดยการใช้บิวทาคลอร์ 2.9 กก./ไร่ กระตุ้นจำนวนประชากรแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ 31.6% และเพิ่มความสามารถในการตรึงไนโตรเจน 10%

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารกำจัดวัชพืช ยาฆ่าเชื้อรา และยาฆ่าแมลง ใช้สำหรับอารักขาพืชในนาข้าว ไม่เพียงแต่ส่งผลเสียต่อประชากรไซยาโนแบคทีเรีย แต่ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างไฟโคไซยานิน ไฟโคอีรีทริน และอัลโลไฟโคไซยานิน ใน *N. sphaeroides* (Xia, 2005) ในบรรดาสารกำจัดศัตรูพืช พบว่า บิวทาคลอร์มีความเป็นพิษสูงและเป็นสารก่อกลายพันธุ์ *N. muscorum* (Vaishampayan, 1985) บิวทาคลอร์ยับยั้งการเจริญ การสังเคราะห์ด้วยแสง และการตรึงไนโตรเจนของ *A. doliolum* และ *Nostoc* (Chen et al., 2007; Pandey and Rai, 2002) ปริมาณบิวทาคลอร์ที่แนะนำสำหรับนาข้าว ช่วงตั้งแต่ 10 µM ถึง 150 µM (Chen et al.,2007; Alla et al., 2008)

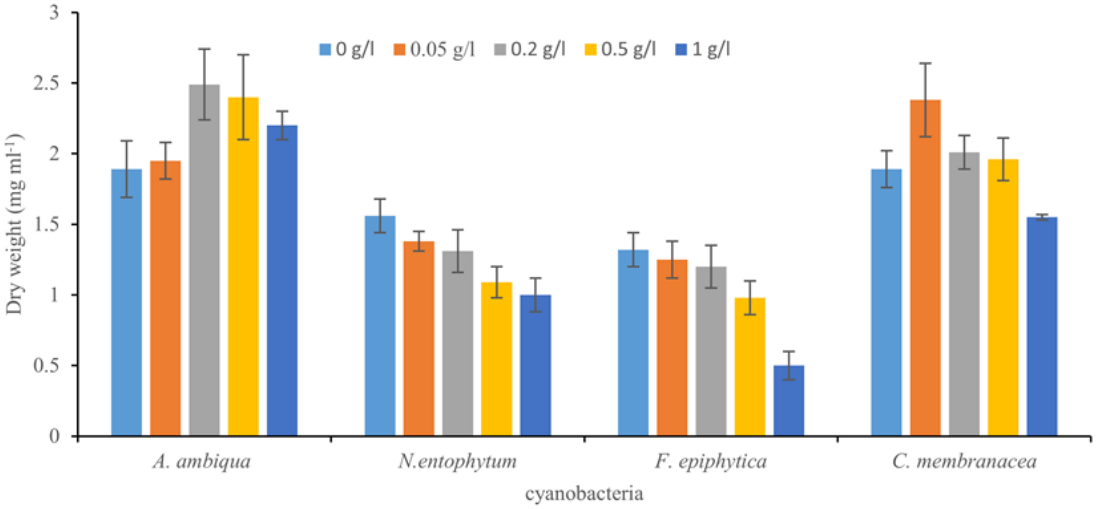


ภาพ 8 การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเหลว $BG11_0$ ที่ผสม butachor ในความเข้มข้นที่ต่างกัน

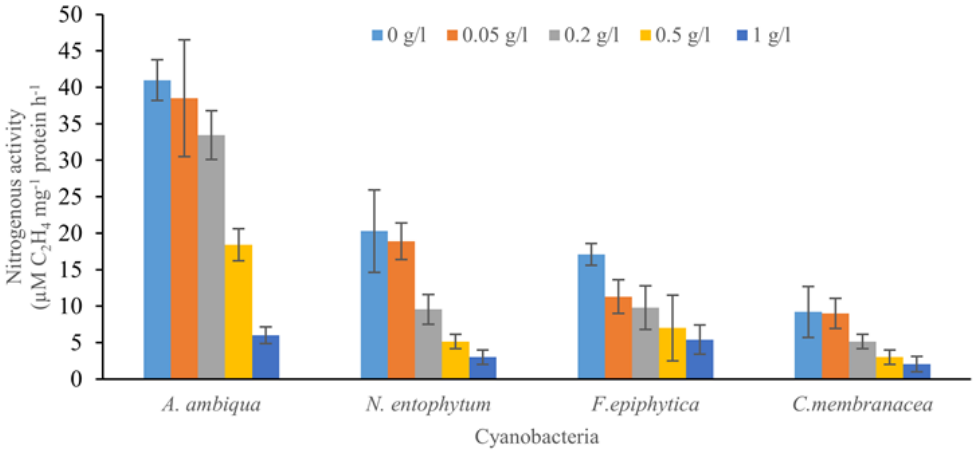


ภาพ 9 ผลของ butachor ที่มีต่อความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

บิวทาคลอร์นอกเหนือจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียแล้ว ยังมีผลไปลดประสิทธิภาพการตรึงก๊าซไนโตรเจนอีกด้วย เมื่อความเข้มข้นของบิวทาคลอร์เพิ่มมากขึ้น จะทำให้ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดลดลง (ภาพ 10) ประสิทธิภาพที่การตรึงก๊าซไนโตรเจนจะลดลงมากกว่า 50% เมื่อเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียได้รับสารบิวทาคลอร์ที่ความเข้มข้น 20 ppm ปรากฏว่า *Anabaena* R1 ทนต่อสารบิวทาคลอร์ได้มากกว่า *Nostoc* R12, *Fischerella R23* และ *Calothrix* R26 เป็นชนิดที่ทนได้น้อยที่สุด การตรึงไนโตรเจนและการเจริญของ *Gloeocapsa* เมื่อเติมบิวทาคลอร์ มีความเกี่ยวข้องกับพลาสมิกยีน (Singh et al., 1986) เป็นกลไกการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืช เช่น 2,4-D และ MCPA เช่นเดียวกับ โทลูอีน ไซลีน แนพทาลีน และกรด 2,4,5-ไตรคลอโรฟีนอกอะซิติก แต่มีรายงานว่าในการทดลองความเป็นพิษของยาปราบศัตรูพืชต่อสาหร่ายในห้องปฏิบัติการ ยาปราบศัตรูพืชจะแสดงความเป็นพิษต่อสาหร่ายสูงกว่าในนาข้าว เนื่องจากในนาข้าวมีจุลินทรีย์อื่น ๆ ช่วยย่อยสารพิษ และสารพิษบางชนิดมีความคงทน (persistence) ต่ำ จะเป็นพิษในช่วงสั้น ๆ ดังนั้นหลังจากสารพิษสลายตัว สาหร่ายก็สามารถปรับตัวและเจริญต่อไปได้



ภาพ 10 ผลของปุ๋ยยูเรียที่มีต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย



ภาพ 11 ผลของปุ๋ยยูเรียที่มีต่อความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

เมื่อทดสอบผลของยูเรียมีต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญที่แตกต่างกัน คือ เมื่อใส่ยูเรีย 0.05 กรัม/ลิตร ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญได้ดี *Calothrix* R26, *Anabaena* R1, *Nostoc* R12 และ *Fischerella* R23 ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มเข้มข้นของยูเรียกลับพบว่าการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียลดลง ยกเว้นใน *Anabaena* R1 มีการเจริญสูงสุดเมื่อใส่ยูเรีย 0.2 กรัม/ลิตร ไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของ NO_3^- ,

NH_4^+ และอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น ยูเรีย ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้แต่ต้องระวังในเรื่องของความเป็นพิษถ้าใช้ในอัตราที่มีความเข้มข้นสูง อัตราการดูดซึมแอมโมเนียมมักจะสูงกว่าไนเตรต เนื่องจากไม่จำเป็นต้องมีการลดเอนไซม์สำหรับการดูดซึมแอมโมเนียม (Ruckert and Giani; 2004) นอกจากนี้ค่าพลังงานที่ลดลงเนื่องจากการเผาผลาญเฟอร์โรดอกซิน 8 ชนิดโดยไซยาโนแบคทีเรียเพื่อเปลี่ยนไนเตรตเป็นแอมโมเนียม (Lara et al., 1987) เมื่อไนเตรตถูกดูดซึม สะสมในเซลล์หรือถูกรีดิวซ์เป็นสารประกอบ เช่น แอมโมเนียมและกรดอะมิโนอิสระ ก่อนที่มันจะกลายเป็นโปรตีนและคลอโรฟิลล์และเริ่มแบ่งเซลล์ ดังนั้นการเติบโตของประชากรแพลงก์ตอนพืชอาจช้าลงด้วยการใช้ไนเตรตมากกว่าแอมโมเนียมและแพลงก์ตอนพืชสะสมไนโตรเจนภายในเซลล์ในรูปของสารประกอบต่างๆ เช่น ไนเตรต แอมโมเนียม กรดอะมิโน โปรตีน อาร์เอ็นเอ และสารสี (Ruckert and Giani; 2004)

กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของปุ๋ยยูเรีย ที่ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากัน *Anabaena* R1 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด รองลงมา คือ *Nostoc* R12, *Fischerella* R23 และ *Calothrix* R26 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Rejmankova and Komarkova (2005) กลุ่มของ heterocytous cyanobacteria สกุล *Nostoc* อัตราการตรึงไนโตรเจนจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำ ฟอสฟอรัสสูง ส่งเสริมอัตราการตรึงไนโตรเจน Irisarri et. al., (2001) ในช่วงเริ่มต้นของฤดูเพาะปลูก ประชากรไซยาโนแบคทีเรียตามธรรมชาติอาจเหลือน้อยและต้องใช้เวลาหลายสัปดาห์ก่อนที่มันจะมีส่วนสำคัญในการตรึงไนโตรเจน แอมโมเนียมยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

7. การทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างของดิน

หลังจากทำการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้ เจริญได้เร็ว สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพในการตรึงก๊าซไนโตรเจนสูง และเลือกมา 4 ไอโซเลทเพื่อทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน พบว่า *Anabaena* R1 มีลักษณะตรงตามที่ต้องการและมีความเหมาะสมที่จะนำมาทำเป็นปุ๋ยชีวภาพ หลังจากนั้นนำเชื้อดังกล่าวมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างของดิน โดยนำเซลล์สดของ *Anabaena* R1 มาผสมน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว

(1) หยดลงบนผิวหน้าดินให้ทั่ว
(2) หยดลงบนผิวหน้าดินให้ทั่ว และทำการคลุก
(3) เจาะหลุมแล้วหยด

จากนั้นนำกล่องไปตั้งไว้ใต้แสงสว่างที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือนควบคุมความชื้นโดยการปิดฝากล่องพลาสติก

ภาพ 12 เปรียบเทียบกรรมวิธีทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างของดินด้วย *Anabaena* R1 A = หยดลงบนผิวหน้าดินให้ทั่ว B = หยดลงบนผิวหน้าดินให้ทั่วและทำการคลุก C = เจาะหลุมแล้วหยด

การเปรียบเทียบกรรมวิธีทดสอบประสิทธิภาพการปรับโครงสร้างของดินด้วย *Anabaena* R1 พบว่า การหยดลงบนผิวหน้าดินให้ทั่ว ให้ประสิทธิภาพดีกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ

อินทรียวัตถุในดิน

ปริมาณอินทรียวัตถุเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น พบว่า กรรมวิธีอื่นดินจะแห้งและเกิดการแตกระแหงที่ผิวหน้าดิน แต่กล่องที่หยดลงบนผิวหน้าดินให้ทั่ว จะไม่มีการแตกระแหงที่ผิวหน้าดิน เพราะสาหร่ายช่วยรักษาความชื้นให้ดิน

การศึกษาลักษณะเนื้อดิน

การเติมชีวมวลสดของสาหร่ายลงไปในดินทั้ง 3 กรรมวิธีให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุซึ่งจะส่งเสริมกิจกรรมของจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตในดิน ซึ่งพฤติกรรมการย่อยสลายพวกอินทรียวัตถุเกิดเป็นสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นสารเชื่อม (cementing agent) และได้ฮิวมัส (humus) ซึ่งเป็นสมบัติของสารเชื่อม ซึ่งทั้งสารอินทรีย์และฮิวมัสมีประสิทธิภาพสูงในการเกาะยึดหรือรวมตัวกับอนุภาคต่าง ๆ ในดิน โดยพันธะเคมี (chemical bond) (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)

นอกจากนี้สารพอลิแซ็กคาไรด์ที่แต่สายพันธุ์ผลิตขึ้นมีความหนืดเหนียวมาก ความเหนียวนี้ทำให้ดินเกาะยึดกันกลายเป็นเม็ดดินเพิ่มขึ้น แต่จากการทดลองนี้จะเห็นว่าลักษณะเนื้อดินไม่มีความแตกต่างไปจากเดิม ที่เป็นเช่นนี้อาจมาจากเวลาที่ใช้ในการทดลองน้อยเกินไป เพราะว่าการปรับปรุงโครงสร้างดินให้ดีขึ้นนั้นกระทำได้ยากและต้องใช้เวลานาน

ความหนาแน่นรวมของดิน

ความหนาแน่นรวมของดินมีค่าลดลงเมื่อเติมชีวมวลสดของสาหร่ายลงไปในดินทั้ง 3 กรรมวิธี ที่เป็นเช่นนี้เป็นผลเนื่องมาจากการสร้างเม็ดดินที่มีความเสถียรต่อแรงกระทำของน้ำที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งการเกาะยึดกันของอนุภาคดินทำให้ความหนาแน่นรวมของดินมีค่าลดลง ซึ่งความหนาแน่นรวมของดินเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะการเชื่อมยึดและการจัดเรียงของอนุภาคดินและของเม็ดดิน (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)

สุพรรษา (2550) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นสารปรับโครงสร้างของดินระหว่างชีวมวลสดและสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์สาหร่าย พบว่า การเติมสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ *Nostoc* ช่วยฟื้นฟูโครงสร้างดินได้มากกว่าการเติมชีวมวลสด พิจารณาได้จาก การเพิ่มของกิจกรรมจุลินทรีย์ (microbial activities) ความพรุนของดิน (total porosity) เม็ดดินที่มีความเสถียรต่อแรงกระทำของน้ำ (water stable aggregate) และการลดลงของความหนาแน่นรวมของ

ดิน (bulk density) สาหร่ายที่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตสารปรับปรุงโครงสร้างดิน ได้แก่ *Anabaenopsis*, *Microcoleus*, *Scytonema*, *Aurosila*, *Anabaena*, *Nostoc* และ *Tolypothrix* (Bar-Or, 1987) การเติมสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Nostoc muscorum* ลงไปในดิน สามารถสร้างเม็ดดินที่มีความเสถียร และสามารถเพิ่ม soluble C , กิจกรรมจุลินทรีย์ , เม็ดดินมีขนาดใหญ่ขึ้น (Zulpa et. al., 1997) องค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Anabaena cylindrica* คือ glucose, xylose, glucuronic acid, galactose, rhamnose และ arabinose (Bishop et. al., 1954)

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ลักษณะของดินในแปลงนาเกษตรอินทรีย์และแปลงนาที่ใช้สารเคมีเก็บตัวอย่างดินในแปลงนาที่ปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์ (O) และแปลงนาที่ใช้สารเคมี (P) ในเขตภาคเหนือตอนล่าง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเพชรบูรณ์ (B) พิจิตร (P) และอุทัยธานี (U) ดินที่ใช้ศึกษาเป็นดินในแปลงนาก่อนฤดูเพาะปลูกข้าว และเก็บจากแปลงนาข้าวที่เพาะปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ จำนวน 3 แปลง และแปลงนาข้าวที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีและยาฆ่าแมลง จำนวน 3 แปลง นำไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา จำนวน 18 ตัวอย่าง ลักษณะทางกายภาพของดินที่วิเคราะห์ได้แก่ ลักษณะเนื้อดิน และความหนาแน่นรวมของดิน ลักษณะทางเคมีของดิน ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) อินทรียวัตถุในดิน ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ผลการวิเคราะห์ พบว่า ดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ มีค่า pH เป็นกลาง (7.0-7.3) ในขณะที่ดินจากแปลงนาที่ใช้สารเคมี มีค่า pH เป็นกรด (5.2-5.4) เนื้อดินในแปลงนาเกษตรอินทรีย์และแปลงนาที่ใช้สารเคมีจะมีลักษณะคล้ายกัน แต่จะแตกต่างกันไปตามภูมิประเทศ ความหนาแน่นรวม อินทรียวัตถุ ธาตุอาหารหลัก เช่น ฟอสฟอรัสที่มีอยู่ และโพแทสเซียมที่มีอยู่ รวมถึงธาตุอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียมที่มีอยู่ และแมกนีเซียมที่มีอยู่ ดินนาข้าวอินทรีย์มีค่าสูงกว่าดินนาข้าวที่ใช้สารเคมี

ปริมาณของไซยาโนแบคทีเรียในดินนาของแปลงเพาะปลูกข้าวแบบเกษตรอินทรีย์และดินนาจากนาข้าวที่เพาะปลูกโดยใช้ปุ๋ยเคมีและใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG11 มีปริมาณมากกว่าอาหาร $BG11_0$ โดยจำนวนของไซยาโนแบคทีเรียบนอาหาร BG11 ก่อนฤดูเพาะปลูกเฉลี่ยอยู่ที่ 24.50 $x10^4$ CFU/g ในแปลงที่ใช้สารเคมี และ 47.53 $x10^4$ CFU/g แปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ แต่อาหาร $BG11_0$ มีเฉลี่ยอยู่ที่ 1.79 $x10^4$ และ 2.62 $x10^4$ CFU/g ในแปลงที่ใช้สารเคมี และแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ตามลำดับ ระยะข้าวแตกกอ อาหาร BG11 เฉลี่ยอยู่ที่ 12.52 $x10^4$ CFU/g ในแปลงที่ใช้สารเคมี และ 17.60 $x10^4$ CFU/g แปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ อาหาร $BG11_0$ มีเฉลี่ยอยู่ที่ 1.49 $x10^4$ CFU/g และ 4.51 $x10^4$ CFU/g ในแปลงที่ใช้สารเคมี และแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ตามลำดับ

ในการจัดจำแนกสกุล (genus) ของไซยาโนแบคทีเรียอาศัยความแตกต่างของลักษณะรูปร่าง ขนาดและตำแหน่งของเฮเทอโรซีสท์หรืออะคีนีตในสายเซลล์ การสร้างชีท เมือก และการแตกแขนง พบว่า จำนวนไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าวก่อนฤดูเพาะปลูกและในระยะข้าวออกรวงมีทั้งหมด 59 ไอโซเลท ซึ่งสามารถจำแนกได้ 16 สกุล ส่วนไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าวแปลงที่ใช้สารเคมี มีจำนวน 45 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็น 15 สกุล มีทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและต่อกันเป็นเส้นสาย สกุลของไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยวพบมากที่สุด คือ *Chroococcus* ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะต่อกันเป็นเส้นสายที่พบมากที่สุด คือ *Anabaena*, *Nostoc* และ *Calothrix*

นำไซยาโนแบคทีเรียที่ผ่านการจัดจำแนกจำนวน 35 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการเจริญ โดยการวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร และคำนวณเวลาที่เชื้อใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time) พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 35 ชนิด มีค่า doubling time อยู่ในช่วง 11.95-31.60 ชั่วโมง โดยไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* R12 เป็นเชื้อที่เจริญเร็วที่สุด doubling time เท่ากับ 11.95 ชั่วโมง *Fischerella* R25 เจริญช้าที่สุด เมื่อพิจารณาความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย อยู่ระหว่าง 0.22 - 36.17 nmoles min/mg protein โดย *Nostoc* R22 มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนต่ำสุด และ *Anabaena* R1 มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนสูงสุด หลังจากนั้นได้ทำการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ โดยนำมาทดสอบความทนทานต่อสารปราบศัตรูพืช พบว่าเมื่อความเข้มข้นของบิวทาร์คอร์เป็น 10 ppm ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน ซึ่ง *Calothrix* R26 ทนได้ดีที่สุด และเมื่อดูความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 20 ppm *Anabaena* R1 ทนต่อสารบิวทาคลอร์ได้มากกว่าชนิดอื่น ๆ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าบิวทาคลอร์มีผลไปยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียและมีผลไปลดประสิทธิภาพการตรึงก๊าซไนโตรเจนอีกด้วย เมื่อทดสอบผลของยูเรียมีต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่า เมื่อเพิ่มเข้มข้นของยูเรียการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียกลับลดลง ยกเว้นใน *Anabaena* R1 มีการเจริญสูงสุดเมื่อใส่ยูเรีย 0.2 กรัม/ลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของปุ๋ยยูเรีย ที่ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากัน *Anabaena* R1 มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด ดังนั้นการทดลองครั้งนี้ *Anabaena* R1 มีลักษณะตรงตามที่ต้องการและมีความเหมาะสมที่จะนำมาทำเป็นปุ๋ยชีวภาพต่อไป

ข้อเสนอแนะ

งานทดลองครั้งนี้ เป็นเพียงจุดเริ่มต้นในการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียในดินนาข้าวแปลงที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์และแปลงที่ใช้สารเคมี จากการตรวจสอบเอกสารพบว่าได้มีการศึกษาในแปลงนาของหลาย ๆ ประเทศ โดยเฉพาะของประเทศอินเดีย แต่การทดลองที่เป็นแปลงเกษตรอินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล ยังมีอยู่น้อย ในอนาคตประเทศไทยน่าจะมีฐานข้อมูลของไซยาโนแบคทีเรียที่พบในประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางในการจำแนกและการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. (2548). **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น** (พิมพ์ครั้งที่ 10). สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จุฑาทิพย์ สองเมือง, สุทธิ ชัยพฤกษ์ และสัญจิตา อรชุนเลิศไมตรี.(2551). **การเปรียบเทียบต้นทุนและผลตอบแทนจากการปลูกข้าวอินทรีย์และข้าวที่ใช้สารเคมีของเกษตรกร ในอำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี , ปทุมธานี.

ธงชัย มาลา. (2550). **ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ:เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์** (พิมพ์ครั้งที่ 2).สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

นารินทร์ จันทร์สว่าง. (2547). **การศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย “สาหร่ายเห็ดลาบ”(*Nostoc commune*,Cyanophya)**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

มาริษา ภิรมย์แทน. (2547). **การคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ**. วิทยานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มัตติกา พนมธรนิจกุล.(2547). **การจัดการดินและน้ำเพื่อระบบการเกษตรที่ยั่งยืน** (พิมพ์ครั้งที่ 3). หน่วยพิมพ์ฯ งานบริหารและธุรการ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ยุวดี พีรพรพิศาล. (2549). **สาหร่ายวิทยา** (พิมพ์ครั้งที่ 2). ห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.). (2548). **เทคโนโลยีสาหร่ายกับอนาคตการเกษตรของประเทศไทย**(พิมพ์ครั้งที่ 1). กองประชาสัมพันธ์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.), ปทุมธานี.

สุพรรษา ขันธโสภา. (2550). **การศึกษาคุณสมบัติสารปรับโครงสร้างของดินจากสาหร่าย**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., วิทยาลัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานปลัดกระทรวงพานิชย์. (2554). **Thailand Organic Mapping**. สำนักงานปลัดกระทรวงพานิชย์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (ม.ป.ป.). **สถิติการส่งออกข้าว(export) ข้าว(รวม): ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน.** สืบค้นเมื่อ 16 เมษายน 2557, จาก http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php

หนึ่ง เตียอำรุง. (2554). **แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อานัฐ ตันโช, รศ.ดร. (ม.ป.ป.).**เกษตรธรรมชาติประยุกต์**. สืบค้นเมื่อ 17 เมษายน 2557, จาก http://www. *ibc.rid.go.th/web/culturesys.htm*

อัทธ์ พิศาลวานิช. (2554). การเปรียบเทียบศักยภาพการผลิตและการค้าข้าวไทยและเวียดนามในตลาดอาเซียน. **วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย**, 31(2), 158-170.

อรกร เก็จพิรุฬห์. (2012). การสร้างแรงจูงใจในการปลูกข้าวอินทรีย์ด้วยการวิจัย. **Journal of Community Development Research,** 5(1), 113-124.

Aftab, U.A., Ahmad, I.Z., and Chaturvedi, R. (2013). Enzymes alteration in nitrogen metabolism in cyanobacteria under pesticide and herbicide stresses. **International Journal of Medical and Applied Sciences**, 2(4), 36-42.

Ahmed M. H., Venkataraman G. S. (1973). Tolerance of *Aulosira fertilissima* to pesticides. **Curr Sci**: 42-108.

Aratoz, R. and Hader, D.P. (1997). Ultraviolet radiation induces both degradation and synthesis of phycobolosomes in Nostoc sp.: A spectroscopic and biochemical approach. **FEMS Microbiol. Ecol**., 23(4), 301-313.

Bailey, D., Mazurak, A. P. and Rosowaki, J. R. (1973). Aggregation of soil particles by algae. **Journal of Phycology**, 9: 99-101.

Bar-Or, Y. and Shilo, M. (1987). Characterization of macromolecular flocculants produced by *Phormidium* sp. Strain J-1 and by *Anabaenopsis circularis* PCC6720. **Appl Environ. Microbiol**, 53, 226-2230.

Bartels, D. and Souer, E. (2004). Molecular responses of higher plants to dehydration. **Plant Responses to Abiotic Stress**, Vol.4.

Bhargava, P. et al. (2008). Excess copper induces anoxygenic photosynthesis in *Anabaena doliolum*: A homology based proteomic assessment of its survival strategy. **Photosynth. Res.**, 96(1), 61-74.

Bishop, C.T., Adams, G.A., and Hughes, E.O. (1954). A polysaccharide from the blue-green algae *Anabaena cylindrical*. **Canadian Journal of Chemistry**, 32, 999-1004.

Boussiba, S. (1995). ***Anabaena azollae* as a Nitrogen Biofertilizer**. Microalgal biotechnology labolatory, Jacob Blaustein Institute for Desert Research Ben Gurion University, Sede Boker, Israel.

Burk, D.(1930). The influence of oxygen gas upon the organic catalysis of nitrogen fixation by *Azotobacter*. **J. Phys. Chem**., 34, 1195-1209.

Casteilli, O.et al. (2009). Proteomic analyses of the response of cyanobacteria to different stress condition. **FEBS Lett.**, 583(1), 1753-1758.

Cavet, J.S., Borrelly, G.P. and Robinson, N.J. (2003). Zn, Cu and Co in cyanobacteria : Selective control of metal availability. **FEMS Microbiol**. **Rev**.,27(2-3), 165-181.

Chapman, V.J. and Chapman D.J. (1975). **The algae**. The Macmillan Press, Ltd., London

Choudhary, K. K. et al. (2007). Nitrogen fixing cyanobacteria and their potential application.- In: Gupta, R.K. and Pandey, V.D. (eds), Advances in applied phycology. Daya Publishing House, 142-154.

Choudhary, K. K. et al. (2009). Ecological and biotechnological relevance of soil cyanobacteria. –In: Gupta, R. K. et al., Soil microflora. Daya publishing House, 324-339.

Choudhary, K. K. and Bimal R. (2010). Distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria (*Nostocaceae*) during rice cultivation in fertilized and unfertilized paddy fields. **Nordic Journal of Botany**. 28 . 100-103.

Chen, W.C., Yen, J.H., Chang, C.H., and Wang, Y.S. (2009). Effect of herbicide butachlor on soil microorganisms and on nitrogen-fixing abilities in paddy soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72, 120-127.

Chunleuchanon, S, Sooksawang, A., Teaumroong, N and Boonkerd, N. (2003). Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystem of Thailand : population dynamics as affected by environmental factors**. World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 19, 167-173.

Compaore, J. and Stal , LJ. (2010). Effect of Temperature on the sensitive of nitrogenase to oxygen in two heterocystous cyanobacteria. **J. Phycol**, 46, 1172-1179.

Cotxurrera, L., Trillas-Gay, M. L., Steinberg, C. and Alabouvette, C. (2002). Use of sewage sluge compost and Trichoderma asperellum isolates to suppress Fusarium wilt of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, 34: 467-476.

Crecchio, C., Curci, M., Mininni, R., Ricciuti, P. and Ruggiero, P. (2001). Short-term effects of municipal solid waste compost amendments on soil carbon and nitrogen content, some enzyme activities and genetic diversity. **Biology and Fertility of Soils**, 34: 311-318.

David R. Boone, Richard W. Castenholz. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd*. Volume one.

Davey MC. (1989). The effect of freezing and desiccation on photosynthesis and survival of terrestrial Antarctic algae and cyanobacteria. **Polar Biol**, 10, 29-36.

Debnath, M., Mandal, N.C., and Ray, S. (2012). Effect of fungicides and insecticides on growth and enzyme activity of four cyanobacteria. **Indian J Microbiol**, 52, 275-280.

Desikachary, T. V. (1959). **Cyanophyta**. Indian Council of Agriculture Research, New Delhi.

Desikachary, T.V. (1985). **Cyanobacteria**. University Botany laboratory, Madras.

Donker, V.A. and Hader, D.P. (1997). Ultraviolet radiation effects on pigmentation in the cyanobacterium**. Acta Protozool**, 36: 49.

Gao, Y. et al. (2009). Identification of the proteomic changes in *Synechocystis* sp. PCC6803 following prolonged UV-B irradiation. **J.Exp. Bot.,**60(4), 1141-1154.

Gotz, T. and Boger, P. (2004). The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides. **Z. Naturforsch**, 59(7-8), 549-553.

Granhall, U. (1975). Nitrogen fixing by blue-green algae in temperature soils. – In: Stewart, W.D.P. (ed.), Nitrogen-fixing by free-living microorganisms. Cambridge Univ. Press, pp. 189-198.

Goyal, S. K. (1997). Algae and soil environment. **Phykos**, 36: 1-12.

Grazer, A. N. (1987). Phycobilisomes : assembly and attachment, *In* P. Fay and C. V. Baclen (eds). **The Cyanobacteria**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Harding, T., Jungblut, A.D., Lovejoy, C. and Vincent W.F. (2011). Microbes in High Arctic Snow and Implications for the Cold Biosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, 77(10), 3234-3243.

Huang, F. et al.,(2002). Proteomics of *Synechocystis* sp. Strain PCC6803: Identification of plasma membrane proteins. **Mol. Cell Proteomics**. 1(12):956-966.

Ichimura, S. (1954). Ecological studies on the phytoplankton in paddy fields. I. Seasonal fluctuations in the standing crop and productivity of plankton. **Jpn J. Bot**. 14: 269-279.

Irisarri,P., Gonnet, S., and Monza, J. (2001). Cyanobacteria in Uruguayan rice fields : diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. **Journal of Biotechnology**, 91, 95-103.

Karl, D.M. (2002). Nutrient dynamic in the deep blue sea. **Trends Microbiol.**,10 , 410-418.

Kashyap, A., Pandey, K. & Gupta, R. (1991). Nitrogenase activity of the Antarctic cyanobacterium *Nostoc commune* of temperature. **Folia Microbiol**, 36 , 557-560.

Kenesi,G., Shafik, H. M., Kovacs, A. W.,Herodek, S., and Presing, M. (2009). Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N_2 fixation of *Cylindrospermopsis raciborskii* in phosphorus limited chemostat cultures. **Hydrobiologia**, 623, 191-202.

Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1999). Cyanoprokaryota : Chroococcales, 1. Teil, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.

Komarek, J., Kling, H. and Komarkova, J. (2003). Filamentous Cyanobacteria. In Wehr., J.D. and Sheath, R.F. (eds.), Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification. Academic Press. California. 59-116.

Kumar S., Habib K. and Fatma T. (2008). Endosulfan induced biochemical changes in nitrogen-fixing cyanobacteria. **Science of the Total Environment**, 403: 130-138.

Kumar, Nirmal, J.I., Kumar, R.N., Anubhuti, B., and Kaur, A.M. (2009). Photosynthetic, biochemical and enzymatic investigation of Anabaena fertilissima in response to an insecticide-hexachloro-hexahydro-methano-benzodioxathiepine-oxide. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, 5(3), 4-12.

Kumari, N., Narayan, O. P., and Rai, L.C. (2009). Understanding butachlor toxicity in *Aulosira fertilissima* using physiology, biochemical and proteomic approaches. **Chemosphere,** 77(11), 1501- 1507.

Lakshmi, P.T.V., and Annamalai, A. (2007). Biochemical studies on the response of organo-phosphorus insecticide and release of extra cellular products by cyanobacteria. **Research Journal of Fisheries and Hydrobiology**, 2(1), 13-17.

Leganes, F. et al. (2001). Effect of phosphate fertilization, straw incorporation, insecticide application and inoculation with cyanobacteria on rice productivity. **Invest. Agr.;Prod. Prot. Veg.**,16(2), 273-282.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, 193, 265-275.

Malik, R. K., Gill, G. and Hobbs, P.R. (1998). Herbicide resistance: a major issue for sustaining wheat productivity in rice wheat cropping system in the IndoGangetic plains. Rice-Wheat Consortium Paper Series, 3, 32.

Mazel, D., Houmard, J., Castets, A.M. & Taodeau de Marsac, N. (1990). Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. **Journal of Bacteriology**, 172, 2755-2761

Mishra, U. et al. (2005). Influence of blue green algae and Azolla inoculation on specific soil enzymes under paddy cultivation. **Asian Jr. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci**. 7: 9-12.

Missouri Agricultural Experiment Station SB1001. (2012). Recommended Chemical Soil Test Procedures for the North Central Region.

Moreland D.E. (1980). Mechanism of action of herbicides. **Ann Rev Plant Physiol**: 97-638.

Motsara, M., Bhattacharyya, P. and Srivastava, S. (1995). Biofertilizer Technology, Marketing and Usage. Fertilizer Development and Consultation Organization, New Delhi, India.

Mongra, A.C. (2014). Effect of temperature on growth of Mastigocladus laminosus. **IJIRSET**,3(1), 8383-8390.

Moore, B.G., and Tischer, R.G. (1965). Biosynthesis of extracellular polysaccharide by the blue-green algae *Anabaena flos-aquae*. **Canadian Journal of Microbiology**, 11(6), 877-885.

Motsara, M., Bhattacharyya, P. and Srivastava, S. (1995). **Biofertilizer Technology, Marketing and Usage**. Fertilizer Development and Consultation Organization, New Delhi, India.

Nayak S. and Prasanna R. (2007). Soil pH and its role in cyanobacterial abundance and diversity in rice soils. **Applied ecology and environmental research**, 5(2): 103-113.

Neung et al., (2002). Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand : I. Morphology, physiology and genetic diversity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 18, 673-682.

Ohta, H. et al. (2005). Identification of genes expressed in response to acid stress in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 using DNA microarrays. **Photosynth. Res**., 84(1-3), 225-230.

Okmen, G.,Donmez, G. and Donmez, S. (2007). Influence of osmotic and metal stresses on nitrogenase activity of cyanobacteria isolated from paddy fields. **African Journal of Biotechnology**, 6(15), 1828-1832.

Okmen,G., Turcan,O., and Erdal, P. (2013). Effect of herbicides on chlorophyll-a, β-carotein, phycocyanin and allophycocyanin content of *Anabaena* sp. **Journal of Applied Biological Science**, 7(2), 20-27.

Okmen,G., and Turcan, O. (2013). Influence of bentazon on pigment contents of *Anabaena* species. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, 11(3&4), 813-816.

Okuda, A. and Yamaghchi, M. (1975). Algae and atmospheric nitrogen fixation in paddy soils. II. Relation between the growth of blue green algae and physical or chemical properties of soil and effect of soil treatments and inoculation on the nitrogen fixation. **Memer Research Institute of Food Science.** Kyoto Univ., 4:1-11.

Organic Agriculture Certification Thailand (ACT). 2011. *Organic Agriculture standards, version 2011*. Thailand.

Pengfu Li, Stephen, E. Harding and Zhili Liu (2001). Cyanobacteria Exopolysaccharides:Their Nature and potential and Potential Biotechnological Applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 18,375-404.

Pereira, I., Reyesy, G. and Kramm, V. (2000). Cyanophyceae, Euglenophyceae, Chlorophyceae, Zygnematophyceae Charophyceae en arrozales de Chile. **Gayana Botanica**, 57: 29-53.

Pinckney, J.L. and Paert, H.W. (1997). Anoxygenic photosynthesis and nitrogen fixation by a microbial mat community in a Bahamian Hypersaline Lagoon. **Appl. Environ. Microbiol**., 93(2), 420-426.

Prescott, G.W. (1978). **How to Know the Freshwater Algae**. Wm. C. Brown Company Publisher Dubuque, lowa.

Prosperi C., Boluda L., Luna C., Fernandez-Valiente E. (1992). Environmental factors affecting in vitro nitrogenase activity of cyanobacteria isolated from rice-fields. **J. Appl. Phycol**, 4: 197-204.

Rai, A.N. (1990). In Handbook of Symbiotic Cyanobacteria, ed Rai, A.N. Boca Raton, Florida : CRC Press. ISBN 0-84933275-3.

Rai, U. N. et al. (2000). Amelioration of fly-ash by selected nitrogen fixing blue green algae. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**. 64 : 294-301.

Rejmankova, E., and Komarkova, J. (2005). Response of cyanobacterial mats to nutrient and salinity changes. **Aquatic Botany**, 83, 87-107.

Rippka, R.,Deruelles, J.,Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y. (1978). Generic assignments, stain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol**, 111, 1-61.

Robert, M.F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. **Saline System**,1 , 5.

Roger, P. A. and Reynaud, P. A. (1979). Ecology of blue green algae in paddy fields. **Int Rice Res. Inst**., Los Banos, Philippines, pp. 289-309.

Roger, P. A., Zimmerman, W. J. and Lumpkin, T. A. (1993). Microbiological management of wetland rice fields. In. Soil microbiological ecology-application in agricultural and ecological management, (ed) Baline Metting, F. Jr, Marcel Dekker, New York, Basel Hong Kong, pp: 417-455.

Saadatnia, H. and Riahi H. (2009) Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. **Plant Soil Environ**., 55(5), 207-212.

Sand-Jensen, K. and Sand Jespersen, T. (2012). Tolerance of the widespread cyanobacterium *Nostoc commune* to extreme temperature variation (-269 to 105° C), pH and salt stress. **Oecologia**,169, 331-339.

Serrano, R. and Gaxiola, R. (1994). Microbial models and salt stress tolerance in plant. **Crit. Rev. Plant Sci**, 13, 121.

Shen, J., and Luo, W. (2011). Effect of Monosulfuron on growth, photosynthesis, and nitrogenase activity of three nitrogen-fixing cyanobacteria. **Arch Environ Contam Toxicol**, 60, 34-43.

Shukla, M.K., Tripathi, R.D., Sharma, N., Dwivedi, S., Mishra, S., Singh, R., et al. (2009). Responses of cyanobacterium *Anabaena doliolum* during nickel stress. **Journal of Environmental Biology**, 30(5), 871-876.

Singh, R.N. (1961). **Role of Blue Green Algae in Nitrogen Economy of Indian Agriculture**. New Delhi, India : Indian Council for Agricultural Research. p.175.

Singleton, P. and Sainsbury. (1987). **Dictionary of Microbiology and Molecular Biology**. John Wiley & Sons, New York.

Song, L.R.,Sano, T., Li, R.H., Watanabe, M.M., Liu, X.D. and Kaya, K. (1998). **Variation of microcystin content by environmental conditions**. *In* Asian Network on Microbial Researches Gadjah Mada University (GMU). The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan. 59-63.

Srivastava, A.K., Bhargava, P., and Rai, L.C. (2005). Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defence systems *Anabaena doliolum*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 21, 1291.

Stal, L. J., and Krumbein, W.E. (1985).Nitrogenase activity in the non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Grown under alternating light-dark cycles. **Arch. Microbiol**., 143, 67-71

Stewart, W. D. P., and Pearson, H. W. (1970). Effect of aerobic and anaerobic conditions on growth and metabolism of blue-green algae. **Proc. R. Soc. London Ser**., 175, 293-311.

Summerfield, T.C. and Sherman, L.A. (2008). Global transcriptional response of the alkali-tolerant cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 to a pH 10 environment. **Appl. Microbiol**.,74(17), 5276-5284.

Surosz, W. and Palinska, K.A. (2004). Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**., 48(1),40-48.

Sze, P. (1986). **A Biology of the Algae**. Wm. C. Brown Publishers, Oxford, England.

Thamizh Selvi K. and Sivakumar K. (2011). Cyanobacterial diversity and related physic-chemical parameters in paddy fields of cuddalore district, Tamilnadu. International **Journal of Research in Environmental Science and Technology**, 1(2): 7-15

Tilman, D. et al. (2001). Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. **Annu.Rev. Ecol. Syst**. 13: 349-373.

Vaishampayan, A. et al. (2001). Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **Bot. Rev**. 6: 453-516.

Venkataraman, G.S. (1981). Blue-green Algae for Rice Production. **FAO Soil Bull. 46**. Food and Agricultural Organization of the United Nation, Rome.

Wang, W.S. and Tischer, R.G. (1973). Study of the extracellular polysaccharides produced by a blue-green algae *Anabaena flos-aquae* A-37. **Archives of Microbiology**,91,77-81.

Watanabe, A. and Yamamoto, Y. (1971). Algal nitrogen fixation in the tropics. Plant and Soil, (Spl. Vol.): 403-413.

Wyatt, J. T., and Silvey, J. K. G. (1969). Nitrogen fixation by *Gloeocapsa*. **Science**, 165, 908-909.

Yadav, S. et al. (2001). Cyanobacterial secondary metabolites. **International Journal of Pharma and Bio Science**, 2 , 144-167.

Zulpa de Caire, G., Storni de Cano, M., Zaccaro de Mule, M.C., Palma, R.M. and Colombo, K. (1997). Exopolysaccharide of Nostoc muscorum (Cyanobacteria) in the aggregation of soil particle. **J. Appl. Phycol.,** 9, 249-253.