



รายงานการวิจัย

การใช้ไซยาโนแบคทีเรียตามหลักปรัชญาของเศรษฐกิจพอเพียง

Used of Cyanobacteria base on Sufficiency

Economy Philosophy

สุรางค์รัตน์ พันแสง และคณะ

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2564

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้ไซยาโนแบคทีเรียตามหลักปรัชญาของเศรษฐกิจพอเพียง

Used of Cyanobacteria base on Sufficiency

Economy Philosophy

สุรางค์รัตน์ พันแสง

สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

พวงผกา แก้วกรม

สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สมเพียร พักทอง

นักวิทยาศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

แสงจันทร์ สอนสว่าง

นักวิชาการศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ทุนอุดหนุนโดยมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประเภทโครงการทุนอุดหนุนงานวิจัยที่บูรณาการตามศาสตร์พระราชา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

ชื่องานวิจัย	การใช้ไฮยาโนแบคทีเรียตามหลักปรัชญาของเศรษฐกิจพอเพียง
ชื่อผู้วิจัย	สุรางค์รัตน์ พันแสง
ผู้ร่วมวิจัย	พวงผกา แก้วกรม แสงจันทร์ สอนสว่าง สมเพียร พักทอง
สาขาวิชา	ชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ปีเสรีจวิจย 2564

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของแหนแดงและไฮยาโนแบคทีเรีย โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเก็บตัวอย่างแหนแดง (*Azolla*) จากวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ และมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ (AZ01 และ AZ02) ลักษณะโครงสร้างเบื้องต้นจำแนกได้ว่าแหนแดงทั้ง 2 สายพันธุ์จัดอยู่ใน section *Azolla* แหนแดงใน section นี้ ใบที่กำลังเจริญจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 เซนติเมตร เจริญเติบโตในแนวนอน เมื่อนำใบแหนแดงในระยะที่สมบูรณ์เต็มที่มาตัดตามขวางและศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ โพรงใบจะมีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่ ภายในโพรงใบบริเวณช่องแคบจะพบ *Anabaena azollae* ยึดอยู่กับภายในโพรงใบ มีลักษณะเซลล์ 2 แบบ คือ vegetative cell และ heterocyst cell ลักษณะเป็นเส้นใยสีน้ำตาล รูปร่างของเซลล์เป็นทรงกระบอก เฮเทอโรซิสต์เซลล์มีรูปร่างทรงกลม สามารถพบได้ทั้งภายในและส่วนปลายของเส้นใย อะซีนีต เป็นรูปทรงกระบอก สำหรับการศึกษากการเจริญเติบโตของแหนแดง พบว่า ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 มีผลต่อการเจริญของแหนแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แหนแดงให้ผลผลิตมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 0.5 กรัม/กระถาง ในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคิดเป็นผลผลิตของน้ำหนักแห้ง 0.95 กรัม/ตารางเมตร อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ 0.12 ต่อวัน การวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมดของแหนแดงจะมีค่าอยู่ในช่วง 2.92-3.73% จากผลการวิเคราะห์พบว่า สายพันธุ์ AZ02 มีค่าไนโตรเจนทั้งหมดสูงที่สุด จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าแหนแดงสายพันธุ์ AZ02 เป็นสายพันธุ์ที่ดี ใช้เป็นปุ๋ยในนาข้าวสามารถเพิ่มผลผลิตได้

คำสำคัญ : แหนแดง, ไฮยาโนแบคทีเรีย

Title	Used of Cyanobacteria base on Sufficiency Economy Philosophy
Researcher	Surangrat Punsang
Co-Researcher	Puangpaka Kaewkrom Sangjan Sonsawang Sompian Fagtong
Major	Biology
	Phetchabun Rajaphat University Year of research completed 2021

Abstract

This study aimed to classify *Azolla* species and cyanobacteria by observing their morphology through stereo microscope and SEM analysis. Two isolated of *Azolla* (AZ01 and AZ02) were collected from Wat Dao Ruang, Na Pa, Mueang Phetchabun District, Phetchabun and Phetchabun Rajabhat University. The morphological study which was based on diameter of vegetative and epidermal trichomes found that the two isolated was classified in *Azolla*. Section *Azolla* in this section, diameter of leaves was ranged from 1-3 cm and grow horizontally. Remove *Azolla* leaves in complete stage was studies under microscope by cross-section technique. The leaf cavity is oval shape. Within the leaf cavity was found *Anabaena azollae*. There are two types of cells: vegetative cell and heterocyst cell. *A. azollae* was characterized by filamentous brown to olive in color culture, its vegetative cell are cylindrical shape. Heterocyst were found to be internal and terminal in the filament, its shape is spherical. Akinetes were found with cylindrical shape. The growth of *Azolla*, showed that the concentration of K_2HPO_4 affected the growth of *Azolla* had significantly different at the statistical level of 95%. At K_2HPO_4 0.5 g/pot at week 3 of cultivation, *Azolla* was reported as the highest growth with dry weight at 0.95 g/m^2 and the relative growth rate at 0.12 d^{-1} . The total nitrogen content of *Azolla* was range from 2.92 - 3.73%. The results showed that strain AZ02 had the highest total nitrogen concentration. From this experiment concluded that *Azolla* species AZ02 was a good type. Which can be used as bio-fertilizer in paddy fields to increase rice yields.

Keywords : *Azolla* spp., Cyanobacteria

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยคำแนะนำต่าง ๆ จากคณาจารย์ในมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และความร่วมมือช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่ายที่สละเวลาให้คำแนะนำ คำปรึกษา รวมถึงข้อเสนอแนะต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าอาวาสวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ และผู้บริหารมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ สำหรับตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดสอบ งานบริหารการวิจัย คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในการขอใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์และห้องปฏิบัติการ รวมทั้งขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้มา ณ ที่นี้ด้วย

สุรางค์รัตน์ พันแสงและคณะ

28 กุมภาพันธ์ 2565

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ระยะเวลาในการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
1.7 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 แขนง.....	6
2.2 อนุกรมวิธาน.....	6
2.3 การเติบโต และการเพิ่มจำนวนของแขนง.....	7
2.4 การเพาะเลี้ยงแขนงและขยายพันธุ์แขนง.....	8
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแขนง.....	10
2.6 ประโยชน์ของแขนง.....	11
2.7 การนำแขนงไปใช้ประโยชน์.....	11
2.8 ความหลากหลายทางชีวภาพ.....	13
2.9 ไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน.....	14
2.10 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย..... 19
3.1	สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ด.....19
3.2	การจำแนกเห็ดโดยใช้ลักษณะทางสรีรวิทยา.....22
3.3	การแยกเชื้อไฮฟาโนแบคทีเรีย.....23
3.4	การจัดจำแนกสกุลไฮฟาโนแบคทีเรียที่แยกได้.....23
3.5	การวิเคราะห์ในไตรเจนทั้งหมด.....24
บทที่ 4	ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....25
4.1	ลักษณะทางโครงสร้างของเห็ด.....25
4.2	ลักษณะการอยู่ร่วมกันของเห็ดและไฮฟาโนแบคทีเรีย.....28
4.3	การจัดจำแนกสกุลไฮฟาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากเห็ด.....30
4.4	การศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ด.....33
4.5	การวิเคราะห์ในไตรเจนทั้งหมด.....35
บทที่ 5	สรุปและข้อเสนอแนะ.....37
5.1	สรุป.....37
5.2	ข้อเสนอแนะ.....39
บรรณานุกรม.....	40
ภาคผนวก.....	44
ประวัตินักวิจัย.....	52

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางเคมีของແໜແດງ โดยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometer และปริมาณลิแกนด์ ที่ทำการเพาะเลี้ยงในกระชัง ขนาด 32 ตารางเมตร.....	9
2.2 องค์ประกอบและแร่ธาตุต่าง ๆ ของตัวอย่างແໜແດງ.....	9
2.3 ผลของการใส่ปุ๋ยตามวิธีการต่าง ๆ ต่อผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของ กัลวล้อมในแปลงเกษตรอำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี.....	12
2.4 ผลของการใส่ปุ๋ยตามกรรมวิธีต่าง ๆ ต่อผลผลิต ต้นทุน รายได้ และอัตราส่วน ผลประโยชน์ต่อต้นทุน (BCR) ของเกษตรกรผู้ปลูกกัลวล้อม อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี ปี 2560.....	13
3.1 สายพันธุ์ແໜແດງที่คัดเลือกมาใช้ในการศึกษา.....	21
3.2 การเตรียม stock ของอาหารเหลว N-free medium.....	21
4.1 ขนาดของແໜແດງ (เซนติเมตร).....	25
4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>A. azollae</i>	31
4.3 น้ำหนักแห้งของແໜແດງที่เลี้ยงในอาหารโฮกแลนด์ (Hoagland 's solution) ที่ระดับความเข้มข้นของฟอสเฟตต่าง ๆ กัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	34
4.4 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของແໜແດງแต่ละสายพันธุ์.....	36

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	5
4.1 ลักษณะทางสรีรวิทยาของโครงสร้าง vegetative ภายใต้กล้องถ่ายภาพ.....	26
4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาของโครงสร้าง vegetative ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo.....	26
4.3 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของขนใบ (epidermal trichomes).....	27
4.4 ไฮยาโนแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับแหนแดง	29
4.5 รูปจากกล้องจุลทรรศน์ของไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>A. azollae</i>	30
4.6 อัตราการเติบโตสัมพันธ์ของแหนแดงที่ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ต่างกัน.....	35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นธัญญาหารหลักของชาวโลก จัดเป็นพืชสายพันธุ์เดียวกับหญ้า สามารถปลูกขึ้นได้ง่ายมีความทนทานต่อทุกสภาพภูมิประเทศในโลก และข้าวเป็นพืชอาหารประจำชาติที่มีตำนานประวัติศาสตร์มายาวนาน ปัจจุบันการปลูกข้าวในประเทศไทยคงมีเพียงข้าวเมล็ดป้อมที่พบมากในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนข้าวเมล็ดยาว พบมากในภาคกลางและภาคใต้ ที่มีความอุดมสมบูรณ์มากที่สุด ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด 62.599 ล้านไร่ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2564) เนื้อที่เพาะปลูกคาดว่าจะเพิ่มขึ้นจากปีที่แล้ว เนื่องจากราคาข้าวเปลือกที่เกษตรกรขายได้อยู่ในเกณฑ์ดี แต่กลับพบว่าเนื้อที่เก็บเกี่ยวลดลงจากปีที่แล้วเนื่องจากประสบอุทกภัยในช่วงเดือนกันยายน 2564 ทำให้แหล่งผลิตในภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง บางพื้นที่เสียหาย จากรายงานสถานการณ์ภัยพิบัติด้านการเกษตร ข้อมูล ณ วันที่ 18 ต.ค. 2564 ของศูนย์ติดตามและแก้ไขปัญหาภัยพิบัติด้านการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถานการณ์อุทกภัย ตั้งแต่วันที่ 1 ก.ย. – 18 ต.ค. 2564 พื้นที่ข้าวที่ได้รับผลกระทบ 3.684 ล้านไร่ จำนวน 48 จังหวัด แบ่งเป็นพื้นที่ได้รับผลกระทบภาคเหนือ 1.463 ล้านไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 1.828 ล้านไร่ ภาคกลาง 0.393 ล้านไร่ ในขณะที่ข้าวทำรายได้ให้ประเทศอย่างมหาศาลนี้เกษตรกรที่ปลูกข้าวก็มีฐานะยากจนลงเรื่อย ๆ สาเหตุที่สำคัญคือแรงงานและปัจจัยการผลิตโดยเฉพาะปุ๋ยเคมีที่มีราคาแพงขึ้น ดินเริ่มเสื่อมเห็นได้จากผลผลิตต่อไร่ของประเทศไทย ผลิตข้าวได้เพียง 454.4 กิโลกรัมต่อไร่ แตกต่างจากประเทศเพื่อนบ้านที่มีผลผลิตต่อไร่สูงถึง 803.2 กิโลกรัมต่อไร่ นั่นเป็นเครื่องบ่งชี้ได้ว่าดินนาของประเทศไทยกำลังสูญเสียความอุดมสมบูรณ์ลง และมีศักยภาพในการผลิตข้าวต่ำลง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงพยายามรวบรวมทรัพยากรที่มีอยู่ในท้องถิ่นมาคิดหาวิธีการแก้ไข พัฒนามลิตภณท์ และปรับปรุงคุณภาพของดินนาให้ดีขึ้น

แหนแดง (*Azolla*) เป็นเฟิร์นน้ำชนิดหนึ่งที่สามารถเจริญเติบโตลอยอยู่ใต้ผิวน้ำในเขตร้อนและเขตอบอุ่น โดยจะดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยกันกับไซยาโนแบคทีเรียซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ช่วยเพิ่มไนโตรเจนให้กับดินและพืช และยังปลดปล่อยสารจำพวกฮอริโมนที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชทำให้ผลผลิตสูงขึ้น ปลดปล่อยออกซิเจนในขณะสังเคราะห์แสงทำให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อื่น ๆ เจริญเติบโตได้ดีด้วย นอกจากนี้เรายังสามารถพบไซยาโนแบคทีเรีย

ตามพื้นที่ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นพื้นที่ทางการเกษตร ภูเขา แม่น้ำ หรือแม้แต่พื้นที่ที่มีสภาพสุดขีด (extreme) เช่น ขั้วโลก บ่อน้ำพุร้อน ก็ยังสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียได้ Somporn et al., (2003) ได้ทำการศึกษาจำนวนประชากรของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงก๊าซไนโตรเจน พบว่า จำนวนประชากรของ ไซยาโนแบคทีเรียพบมากในพื้นที่ทางการเกษตร โดยเฉพาะพื้นที่เพาะปลูกข้าว สายพันธุ์ที่พบ ได้แก่ *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Westiellopsis*, *Hapalosiphon*, *Aulosira*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria*, *Phormidium* Lyngbya และ *Aphanocapsa* (Nayak and Prasanna, 2007)

ดังนั้น งานวิจัยนี้มีจึงมุ่งเน้นที่จะทำการรวบรวมข้อมูลด้านความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียที่พบได้ในแหล่งแคว จังหวัดเพชรบูรณ์ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปถ่ายทอดให้กับชุมชนเป็นการกระตุ้นให้ชุมชนมองเห็นแนวทางของการนำเอาความหลากหลายทางชีวภาพของทรัพยากรธรรมชาติในท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ในชุมชนได้ และร่วมกันพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพดินนาให้ดีขึ้น โดยเน้นหลักความพอเพียงของชุมชนและส่งเสริมให้ชุมชนพึ่งตนเองได้ อันจะเป็นการบูรณาการองค์ความรู้สู่การนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา และการเจริญเติบโตของแหล่งแคว
- 2) ศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรีย สกุล *Anabaena* sp. ในจังหวัดเพชรบูรณ์
- 3) ส่งเสริมการใช้แหล่งแควร่วมกับชุมชนเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตข้าว

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1) ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิจัย คือ แหล่งแคว (*Azolla* spp.) จาก 2 บริเวณ ได้แก่ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ต.สะเดียง อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ และวัดดาวเรือง ต.นาป่า อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์
- 2) ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แก่ โครงสร้างของแหล่งแคว และลักษณะการอยู่ร่วมกันของแหล่งแควและไซยาโนแบคทีเรีย
- 3) ศึกษาการเจริญเติบโตของแหล่งแคว ได้แก่ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง เวลาที่ใช้ในการขยายตัวเป็นสองเท่า และผลผลิตไนโตรเจน
- 4) ศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรีย สกุล *Anabaena* sp.
- 5) ส่งเสริมการใช้แหล่งแควร่วมกับชุมชนเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตข้าว

1.4 ระยะเวลาในการวิจัย

ระยะเวลาในการวิจัยไม่เกิน 9 เดือน

ตั้งแต่วันที่ 16 ธันวาคม พ.ศ.2563 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม พ.ศ. 2564

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ข้อมูลเบื้องต้นทางสรีรวิทยา และการเจริญเติบโตของแหนแดง
- 2) ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย สกุล *Anabaena* sp. ที่สามารถพบได้ในแหนแดง
- 3) เป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกรในการเพิ่มผลผลิตข้าว และปรับปรุงคุณภาพดิน

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

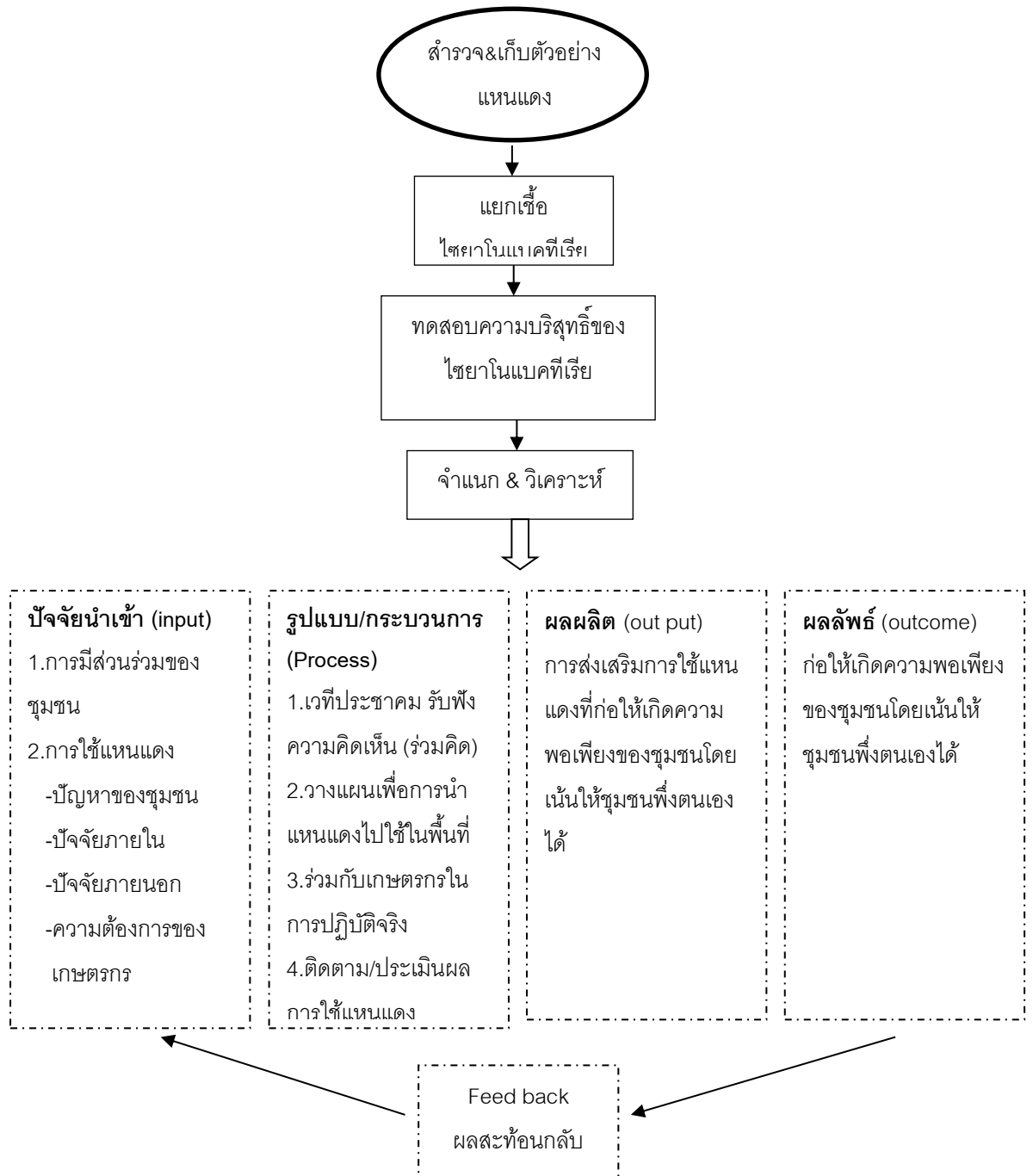
แหนแดง (Mosquito fern, Water fern) เป็นพืชน้ำเล็ก ๆ ตระกูลเฟิร์นลอยน้ำ พบเจริญเติบโตอยู่บนผิวน้ำในที่ที่มีน้ำขังในเขตร้อนและอบอุ่นทั่วไป มีไนโตรเจนสูง พร้อมทั้ง โปรตีนไม่น้อยกว่า 30%

สรีรวิทยา (physiology) เป็นสาขาวิชาที่ศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของระบบต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตทั้งในด้านกลศาสตร์ ด้านกายภาพ และด้านชีวเคมี

การเจริญเติบโต (growth) เป็นการเพิ่มขนาดและน้ำหนักของพืช เป็นผลโดยตรงจากการแบ่งเซลล์ (Cell Division) และการขยายขนาดของเซลล์ (Cell Enlargement)

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae หรือ cyanobacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว จัดอยู่ในไฟลัม Cyanophyta ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ และบางชนิดยังมีคุณสมบัติตรึงไนโตรเจนในอากาศได้

1.7 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



รูปที่ 1.1 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แหนแดง

แหนแดง (*Azolla*) เป็นพืชน้ำขนาดเล็ก ตระกูลเฟิร์นชนิดลอยน้ำได้ เจริญเติบโตลอยอยู่บนผิวน้ำในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ประเทศไทยพบได้ทั่วไปตามคลอง หรือแหล่งน้ำขังตามธรรมชาติ แหนแดงประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ คือ ลำต้น (rhizome) ราก (root) และใบ (lobe) มีกิ่งแยกจากลำต้น ใบของแหนแดงเกิดตามกิ่งเรียงสลับกันไป ใบแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ใบบนและใบล่าง มีขนาดใกล้เคียงกัน ใบบนมีคลอโรฟิลล์เป็นองค์ประกอบมากกว่าใบล่าง กาบใบบนด้านหลังมีโพรงใบและมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae) อาศัยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) (นพพร ศิริพานิช, 2564)

2.2 อนุกรมวิธาน

Division : Pteridophyta

Class : Filicopsida

Order : Salinales

Family : Azollaceae

Genus : Anabeaeba

แหนแดง แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

2.2.1 กลุ่ม *Euazolla* เป็นกลุ่มแหนแดงที่มีขนปกคลุมบนใบ สปอร์เพศเมียมีทุ่นลอย 3 อัน ส่วนสปอร์เพศผู้มีหนามแหลมปกคลุม และปลายสปอร์มีตะขอล้ายหัวลูกศร มีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่

Azolla microphylla Kaulfuss พบในแถบประเทศในทวีปอเมริกา

Azolla filiculoides Lamark พบในแถบประเทศในทวีปอเมริกาใต้ อเมริกาเหนือ และอลาสก้า

Azolla rubra R.Brown พบในแถบประเทศในทวีปออสเตรเลีย และเอเชียในแถบประเทศญี่ปุ่น และเกาหลี

Azolla mexicana Presl พบในแถบประเทศทางตอนเหนือของทวีปอเมริกาใต้ และทางทิศตะวันตกของทวีปอเมริกาเหนือ

Azolla cololiniana Willdenow พบในแถบประเทศทางตะวันออกของอเมริกาเหนือ และแถบทะเลคาริบเบียน

2.2.2 กลุ่ม *Rhizospenna* เป็นกลุ่มแหนแดงที่มีขนปกคลุมทั้งบนใบ และตามลำต้น มีทั้งหมด 2 ชนิด ที่พบในแถบประเทศเอเชีย และออสเตรเลีย ได้แก่

Azolla pinnata var. *pinnata*

Azolla pinnata var. *imbricata*

ในประเทศไทย พบแหนแดง 2 สายพันธุ์ คือ *A. pinnata* และ *A. Microphylla* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตรนำเข้ามาเพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์จนได้แหนแดงที่มีขนาดใหญ่ มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถตรึงไนโตรเจนได้มากกว่าสายพันธุ์ท้องถิ่น

2.3 การเติบโต และการเพิ่มจำนวนของแหนแดง

2.3.1 แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) การสืบพันธุ์แบบนี้เกิดขึ้นน้อยกว่าแบบไม่อาศัยเพศ โดยแหนแดงจะสร้างอับสปอร์ 2 ชนิด คือ microsporocarp บรรจุสปอร์เพศผู้จำนวนมาก อีกชนิด คือ megasporocarp บรรจุสปอร์เพศเมียเพียง 1 สปอร์ และเมื่ออับสปอร์แก่ อับสปอร์จะร่วงลงสู่ น้ำ และพักตัวในระยะหนึ่ง เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม อับสปอร์ทั้งสองจึงทำการผสมกัน เกิดเป็นต้นอ่อน พร้อมกับลอยขึ้นสู่ผิวน้ำ และเติบโตต่อไป

2.3.2 แบบไม่อาศัยเพศ (a sexual reproduction) การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แหนแดงจะแบ่งตัวออกจากต้นแม่ แล้วเจริญเป็นต้นเล็ก ๆ ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็น 2 เท่า ในเวลาเพียง 2.5 – 5.5 วัน พร้อมเติบโต และสะสมไนโตรเจนได้ถึง 15 กิโลกรัม/ไร่ ภายในเวลา 30 วัน

2.4 การเพาะเลี้ยงแหนแดงและขยายพันธุ์แหนแดง

วิธีการและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์แหนแดงสำหรับเป็นอาหารสัตว์

(1) เตรียมภาชนะที่เป็นภาชนะปิดหรือสภาพแวดล้อมปิด เช่น กะละมังพลาสติก ถัง อ่าง บ

บ่อซีเมนต์ ภาชนะที่ไม่มีสารพิษ หรือแม้แต่บ่อปูนซีเมนต์ที่จัดเตรียมไว้ โดยหากเป็นบ่อปูนใหม่หรือบ่อซีเมนต์ใหม่ ควรจะแช่น้ำไว้นาน 2-3 สัปดาห์เพื่อให้กรดปูนเจือจางหรือหมดไปก่อน หรืออาจนำขุยมะพร้าว เปลือกมะพร้าวสับหรือถ่านหุงต้มมาใส่เพื่อช่วยดูดซับกรดปูน เมื่อเห็นว่ากรดปูนลดลงแล้วโดยสังเกตจากคราบเคมีที่ลอยอยู่บนผิวน้ำ จึงปล่อยน้ำนั้นทิ้งเพื่อเติมน้ำใหม่

- (2) เติมน้ำลงในภาชนะ กระทั่งระดับน้ำสูง 20 -30 เซนติเมตรจากพื้นภาชนะ ซึ่งระดับน้ำนี้ ไม่สำคัญมากนัก แต่จะมีผลกับระดับออกซิเจนในน้ำ แหนแดงเป็นพืชที่ต้องการออกซิเจน
- (3) ใส่ดินประมาณ 5 เซนติเมตรจากระดับพื้นภาชนะ
- (4) ใส่ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก หรือน้ำหมักชีวภาพลงในน้ำในปริมาณครึ่งกิโลกรัมต่อน้ำ 30 ลิตร หรือหากเป็นน้ำหมักชีวภาพในปริมาณ 1 ลิตรต่อน้ำ 30 ลิตร
- (5) ทิ้งไว้ให้น้ำตกตะกอน
- (6) นำแหนแดงที่ได้ปล่อยลงไปให้น้ำให้มีปริมาณครึ่งหนึ่งของภาชนะหรือบ่อซีเมนต์ เพื่อให้แหนแดงขยายตัวรวดเร็ว
- (7) นำไปไว้ในพื้นที่ที่มีแดดรำไรหรือความเข้มของแสง 60-65 %

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของแหนแดง โดยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometer และปริมาณลิกนิน ที่ทำการเพาะเลี้ยงในกระชัง ขนาด 32 ตารางเมตร

	Total-N (%)	Carbon (%)	C/N ratio	Lignin (%)	Total-P (%)	Total-K (%)	Total-Ca (%)	Total-Mg (%)
<i>Azolla</i>	4.58	45.6	9.95	24.2	0.64	5.08	2.59	0.39

ที่มา : นพพร ศิริพานิช, 2564

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบและแร่ธาตุต่าง ๆ ของตัวอย่างແໜແດງ
(ประยูร และบรรหาญ, 2545)

องค์ประกอบ	อัตราร้อยละ
น้ำหนักแห้ง	5-7
โปรตีน	13-30
ไขมัน	3.1
เซลลูโลส	8.5-11.7
ไนโตรเจน (N)	3-5
คาร์บอน (C)	41-45
ฟอสฟอรัส (P)	0.2-1.6
โปแตสเซียม (K)	0.3-0.6
แคลเซียม (Ca)	0.5-1.7
แมกนีเซียม (Mg)	0.2-0.7
กำมะถัน (S)	0.2-0.7
ซิลิกา (Si)	0.2-3.5
โซเดียม (Na)	0.2-1.3
คลอรีน (Cl)	0.6-0.8
อลูมิเนียม (Al)	0.04-0.6
เหล็ก (Fe)	0.04-0.6

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของແໜແດງ

- (1) น้ำ ความลึกที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-15 เซนติเมตร หากมีความลึกมาก ธรรมชาติจะเหือดจาง แໜແດງจะได้รับธาตุอาหารน้อยไม่เจริญเติบโต น้ำมีความลึกน้อยอุณหภูมิจะสูง แໜແດງไม่เจริญเติบโต
- (2) อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่ควบคุมการเจริญเติบโตของແໜແດງ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับແໜແດງทุกชนิดควรอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส จึงพบว่าในเขตร้อนແໜແດງบางชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้

- (3) แสงแดด แห้งแดดเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในที่ที่มีแสงประมาณ 50-75 เปอร์เซ็นต์ ของแสงแดด จึงควรมีการพร่างแสงแดดให้เหมาะสม หรือเลือกพื้นที่เพาะปลูกแห้งแดดที่มีร่มรำไร
- (4) ความชื้นสัมพัทธ์ แห้งแดดเป็นพืชที่ชอบความชื้นสูง 85-90 เปอร์เซ็นต์
- (5) ความเป็นกรด ด่าง ควรอยู่ในช่วง 4.5-6.5
- (6) ลม แห้งแดดไม่ชอบลมแรง เพราะทำให้ถูกพัดพาเกิดการกระจายตัว และสูญเสียความชื้นได้ง่าย หรือหากถูกพัดพาไปอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของแปลง ส่งผลให้ไม่สามารถขยายตัวได้
- (7) ธาตุอาหาร แห้งแดดต้องการทั้งธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง นอกจากนี้ไนยาโนแบคทีเรียที่อยู่ร่วมด้วยยังต้องการ Molybdenum, Cobalt และ Sodium เพื่อใช้ในการตรึงไนโตรเจน ธาตุที่สำคัญในการเจริญเติบโตของแห้งแดดมากที่สุด คือ ฟอสฟอรัส เพราะมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต การตรึงไนโตรเจน และปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ใบแห้งแดด
- (8) ศัตรูพืช ควรมีการควบคุมพืชในบ่อเพาะเลี้ยงแห้งแดดเป็นระยะ เพื่อควบคุมโรค แมลง และสัตว์ที่กินแห้งแดดเป็นอาหาร เช่น หนอนด้วง หนอนผีเสื้อกลางคืน หนอนไรน้ำ ปลา เป็ด หอย เป็นต้น

2.6 ประโยชน์ของแห้งแดด

1. สามารถทดแทน หรือลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนลงได้
2. เพิ่มอินทรีย์วัตถุให้แกดิน ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์มากขึ้น ปรับปรุงโครงสร้างดินในระยะยาว
3. ใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์สำหรับพืชผักและผลไม้ เพิ่มทางเลือกสำหรับการผลิตพืชอินทรีย์
4. ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการให้ปุ๋ยเคมี ลดการดูดตรึงฟอสเฟตของดิน
5. ใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับเลี้ยงสัตว์ เช่น ปลา เป็ด เป็นต้น
6. มีต้นทุนการผลิตต่ำ แห้งแดดเติบโตและขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว
7. ลดปริมาณวัชพืชในนาข้าว แห้งแดดที่ขยายคลุมผิวน้ำจะทำให้แสงแดดส่องไม่ผ่าน จึงช่วยลดการเจริญเติบโตของวัชพืชรำพวงสาหร่ายลงได้

2.7 การนำແໜແດງໄປໃຊ້ປະໂຫຼິດ

จากคุณสมบัติของແໜແດງທີ່ມີปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างสูง สลายตัวง่ายและปลดปล่อยธาตุอาหารออกมาได้เร็ว จึงมีการนำແໜແດງเหล่านี้มาใช้ในการปลูกผักชนิดต่างๆ เช่น ศีรลักษณ์ และคณะ (2561) แนะนำให้ใช้ແໜແດງ 30 กรัมต่อดิน 1 กิโลกรัม ในการปลูกผักกาดเขียว กวางตุ้ง สำหรับการปลูกผักรับประทานใบ เช่น คะน้า ผักกาดเขียว กวางตุ้ง หรือผักสลัด สามารถใช้ແໜແດງ 1 กิโลกรัม สำหรับการปลูกผักในพื้นที่ประมาณ 2 ตารางเมตร แม้ว่า การปลดปล่อยธาตุอาหารจากແໜແດງจะเกิดขึ้นได้เร็ว แต่ยังช้ากว่าปุ๋ยยูเรีย ดังนั้นการใส่ແໜແດງเพื่อเป็นแหล่งธาตุอาหารให้กับพืชควรใส่ให้มีปริมาณที่เพียงพอตั้งแต่ก่อนเริ่มปลูก เพื่อให้ปลดปล่อยธาตุอาหารออกมาได้เพียงพอและตรงกับความต้องการของพืชนั้นๆ ไม่ควรทำการแบ่งใส่ระหว่างการปลูก (ภาชีตา และคณะ: 2563)

นพพรและคณะ (2562) พบว่าการให้ปุ๋ยกล้วยหอมที่ปลูกในจังหวัดปทุมธานี โดยใช้ปุ๋ยเคมีตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรโดยลดไนโตรเจนร้อยละ 20 และใส่ແໜແດງทดแทนไนโตรเจนที่ลดลง ให้ค่าน้ำหนักเครือ จำนวนหวี น้ำหนักหวี และจำนวนผลต่อหวีที่สูงกว่ากรรมวิธีเกษตรกร และการใส่ปุ๋ยเคมีและคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร (ตารางที่ 2.3) การใส่ปุ๋ยเคมีตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร และใส่ແໜແດງ 2 กิโลกรัม มีผลผลิตรายได้ กำไรสุทธิและค่าอัตราส่วนผลประโยชน์ต่อต้นทุนสูงสุด (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.3 ผลของการใส่ปุ๋ยตามวิธีการต่าง ๆ ต่อผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของ

กล้วยหอมในแปลงเกษตรอำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี

วิธีการใส่ปุ๋ย	น้ำหนักเครือ (กก.)	จำนวนหวี (หวี/เครือ)	น้ำหนักหวี (กก.)	จำนวนผล (ผล/หวี)
เกษตรกร	13.5c	6.1	1.9b	13.5b
GAP	16.0b	6.4	2.2b	15.1b
GAP+ແໜແດງ 2 กก./ต้น	17.7a	6.2	2.5a	15.7b
GAP(ลด N20%)+ແໜແດງ เท่ากับ N ที่ลด 20%	18.0a	6.4	2.7a	16.4a
GAP(ลด N40%)+ແໜແດງ เท่ากับ N ที่ลด 40%	17.5a	6.4	2.5a	16.2ab
CV (%)	5.75	2.99	5.47	1.70

* ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 2.4 ผลของการใส่ปุ๋ยตามกรรมวิธีต่าง ๆ ต่อผลผลิต ต้นทุน รายได้ และอัตราส่วนผลประโยชน์ต่อต้นทุน (BCR) ของเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยหอม อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี ปี 2560

วิธีการใส่ปุ๋ย	ผลผลิต (กก./ไร่)	ต้นทุน (บาท/ไร่)	รายได้ (บาท/ไร่)	BCR
กรรมวิธีเกษตรกร	7,821	71,126	78,209	1.10
กรรมวิธีที่ 2 คำแนะนำ	8,526	66,289	85,265	1.29
กรรมวิธีที่ 3 คำแนะนำ+ແໜແດງ 2 กก.	8,952	67,489	89,518	1.33
กรรมวิธีที่ 4 ลด N 20%+ແໜແດງเท่ากับ N ที่ลด 20%	8,985	67,680	89,845	1.33
กรรมวิธีที่ 5 ลด N 40%+ແໜແດງเท่ากับ N ที่ลด 40%	8,888	67,469	88,878	1.32

2.8 ความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity หรือ Biological Diversity)

ความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity หรือ Biological Diversity) หมายถึง ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ มาจากคำ 2 คำ คือ Biological หมายถึง ชีวภาพ และ diversity หมายถึง ความหลากหลาย ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายชนิดของทรัพยากรธรรมชาติ อาทิเช่น แหนแดง ที่เป็นพืชน้ำที่พบอย่างแพร่หลายทั่วไป อย่างไรก็ตามนักชีววิทยาได้เห็นพ้องต้องกันว่า โลกกำลังสูญเสียสัตว์และพืชในป่าเขตร้อน อย่างน้อย 27,000 ชนิดต่อปี นอกจากในป่าเขตร้อนแล้ว ความหลากหลายทางชีวภาพ ในระบบนิเวศอื่นๆ กำลังลดลงเช่นกัน อาทิเช่น ในแนวปะการัง พื้นที่ชุ่ม บนเกาะ และบนภูเขา แม้ว่าจำนวนชนิดพันธุ์ที่สูญหายไปในระบบนิเวศนี้รวมกันแล้วยังเทียบไม่ได้ กับจำนวนชนิดพันธุ์ที่สูญหายไปในป่าเขตร้อนก็ตาม แม้ว่าการสูญพันธุ์เป็นวัฏจักรของธรรมชาติ แต่การสูญพันธุ์ด้วยอัตราเร่งอย่างนี้เป็นที่ เป็นอยู่ในปัจจุบันเป็นปรากฏการณ์ นอกเหนือธรรมชาติ ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่า โลกกำลังเผชิญหน้ากับความหายนะที่กำลังคืบคลานสู่ทุกชีวิตบนพื้นพิภพนี้ สำหรับมวลมนุษยชาติการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพมีความหมายมากกว่าการ ดำรงรักษาชนิดพันธุ์หนึ่งชนิดใดไว้

มากกว่า การดำรงรักษาระบบนิเวศประเภทหนึ่งประเภทใด เพราะนอกเหนือไปจากนั้น มนุษย์ต้องการดำรงรักษาแหล่งอาหาร แหล่งยารักษาโรค แหล่งวัสดุใช้สอย ฯลฯ เพื่อความอยู่รอดของตนเองและอนาคตของชนรุ่นหลัง ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายชนิดของทรัพยากรธรรมชาติ การนำมาใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่า รวมไปถึงการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติเหล่านั้นเป็นหน้าที่หลักที่สำคัญของนักวิชาการทางชีวภาพอย่างหนึ่ง

ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างแพร่หลายในประเทศไทย และสามารถพบได้ในจังหวัดเพชรบูรณ์ คือ แหนแดง (*Azolla*, Water fern, Water velvet) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Azolla* spp. พบว่าแหนแดงในโลกนี้มีความหลากหลายชนิด แต่ที่พบแพร่หลาย ได้แก่ *Azolla caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. microphylla*, *A. mexicana*, *A. nilotica*, *A. pinnata* และ *A. rubra* ส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกา ออฟริกา และเอเชีย โดยผลจากการสำรวจพบว่าแหนแดงชนิดที่พบแพร่หลายในประเทศไทย คือ *A. pinnata* โดยทั่วไปแหนแดงจะอาศัยอยู่ในน้ำนิ่งและนาข้าวทั่วไป

2.9 ไชยาโนแบคทีเรีย หรือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae หรือ cyanobacteria)

ไชยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) จัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta เป็นแบคทีเรียที่มีโครงสร้างผนังเซลล์แบบแกรมลบ มีรูปร่างได้ 2 แบบ คือ เป็นเซลล์เดี่ยวและมีลักษณะเป็นเส้นสาย และเป็นกลุ่มสาหร่ายที่มีจำนวนชนิดมากที่สุด คือ มีถึง 7,500 สปีชีส์ หรืออาจมากกว่านี้ (Chapman and Chapman, 1975) ในสภาพธรรมชาติไชยาโนแบคทีเรียสามารถอาศัยอยู่ได้อย่างอิสระเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรืออยู่รวมกันเป็นโคโลนี หรืออยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ (Singleton and Sainsbury, 1987) แต่ต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น คือ สามารถได้รับพลังงานผ่านระบบสังเคราะห์แสง และบางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เนื่องจากมีเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยทั่วไปแต่ละเซลล์ของ ไชยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วยผนังเซลล์ที่หนา แต่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ คือ ระบบ quorum sensing ซึ่งไม่พบการสร้าง acyl-homolactone ผนังเซลล์หุ้มด้วย gelatinous sheath และมีสีที่ต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับชนิดของรงควัตถุ เช่น chlorophyll a, carotenoid และ phycobilins เป็นต้น (หนึ่ง, 2554) ไชยาโนแบคทีเรียไม่มีคลอโรพลาสต์ที่ชัดเจน มีเพียงแต่ไทลาคอยด์ ซึ่งอยู่เดี่ยวๆ ไม่มีเยื่อหุ้ม และไม่มีการจัดเรียงตัวกันเป็นชั้นบางๆ พบเป็นอิสระทั่วๆ ไปในเซลล์ Sze (1986) กล่าวว่าไวโคไคบิลลิโปรตีนในไชยาโนแบคทีเรีย มีอยู่ 4 ชนิด คือ ไฟโคอิริทริน (phycoerythrin) ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) และไฟโคอิริโทรไซยานิน

(phycoerythrocyanin) โดยไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานิน พบในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิด และไฟโคไซยานินทำให้เซลล์มีสีน้ำเงินแกมเขียว หน้าที่ของไฟโคบิลิโซม คือ รับแสงที่ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน และส่งผ่านไปเพื่อใช้ในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Grazer, 1987) จัดเป็นข้อแตกต่างระหว่างพืชชั้นสูงและไซยาโนแบคทีเรียรวมถึงไทลาคอยด์ซึ่งขดไปมาภายในเซลล์ ทำหน้าที่คล้ายกับคลอโรพลาสต์ในพืชที่มีสีเขียว ซึ่งทำหน้าที่เป็นคลิ่นลูกโซ่อิเล็กตรอนเพื่อสร้างพลังงาน (Singleton and Sainsbury, 1987)

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) และยูวดี (2549) แบ่งเป็น 4 ออร์เดอร์ ดังนี้

Order 1 Chroococcales เป็นพวกเซลล์เดี่ยว โดยเซลล์อาจจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นโคโลนี สืบพันธุ์โดยวิธีแบ่งเซลล์ มี 11 แฟมิลี

Order 2 Oscillatoriales มีลักษณะเป็นเส้นสาย อาจจะเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนงหรือแตกแขนงแบบไม่แท้จริง บางชนิดมีเมือกหุ้ม เซลล์มีรูปร่างแบบทรงกระบอก ไม่มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์หรืออะคินีท สืบพันธุ์โดยใช้วิธีขาดเป็นท่อน ๆ อาจจะสร้างฮอริโมโกเนียมประกอบไปด้วย 6 แฟมิลี

Order 3 Nostocales มีลักษณะเป็นเส้นสาย ไม่แตกแขนง มีชีทหุ้มหนาหรือบางแล้วแต่ชนิด เซลล์มีรูปร่างกลม หรือเหลี่ยมเล็กน้อยแล้วป่องตรงกลาง บางชนิดเป็นแบบทรงกระบอก มีเฮเทอโรซิสต์ ซึ่งอาจจะเป็นเทอร์มินัลเฮเทอโรซิสต์ หรืออินเตอร์คาลารีเฮเทอโรซิสต์ มีการสร้างอะคินีท ประกอบไปด้วย 4 แฟมิลี

Order 4 Stigonematales มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนงได้หลายแบบ มีทั้งแตกแขนงจริงและไม่แท้จริง และแต่ละแบบจะมีการแตกแขนงได้หลายทิศทาง เซลล์ที่มีลักษณะเป็นเส้นสายนั้นประกอบด้วยเซลล์แถวเดียว 2 แถว หรือมากกว่า ซีทที่หุ้มมักมีสีเหลืองหรือน้ำตาล มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ สืบพันธุ์โดยการสร้างฮอริโมโกเนียม ไม่มีการสร้างอะคินิท ประกอบด้วย 8 แฟมิลี

2.10 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พัชนี วิมูลชาติและคณะ (2021) ศึกษาอัตราส่วนของการใช้มูลโคและมูลสุกรที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและปริมาณธาตุอาหารในแหนแดง พบว่า การใส่มูลโคร่วมกับมูลสุกรในทุกอัตราส่วนทำให้แหนแดงมีน้ำหนักสดรวมมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1,890.07-1,824.60 กรัมต่อตารางเมตร แม้ว่าการให้ปุ๋ยมูลสัตว์ทุกชนิดทำให้น้ำหนักแห้งสุทธิรวมมีค่ามากกว่าการไม่ให้ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างการให้ปุ๋ยมูลสัตว์ที่แตกต่างกัน โดยทำให้แหนแดงมีน้ำหนักแห้งสุทธิรวมอยู่ในช่วง 21.49-22.20 กรัม

โชคชัย วนภู (2553) จำแนกสายพันธุ์แหนแดง 3 สายพันธุ์ (AZ01, AZ02 และ AZ03) โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์หีตเอ็นเอ พบว่าแหนแดงทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ใน section *Azolla* โดย AZ01 คือ สายพันธุ์ *A. microphylla*, AZ02 คือ สายพันธุ์ *A. cristata* และ AZ03 คือ สายพันธุ์ *A. filiculoides*

พัชนี วิมูลชาติ และคณะ (2564) ศึกษาอัตราส่วนของการใช้มูลโคและมูลสุกรที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และปริมาณธาตุอาหารในแหนแดง พบว่า การใส่มูลโคร่วมกับมูลสุกรในทุกอัตราส่วนทำให้แหนแดงมีน้ำหนักสดรวมมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1,890.07-1,824.60 กรัมต่อตารางเมตร การให้ปุ๋ยมูลสุกรเพียงอย่างเดียวทำให้แหนแดงมีการสะสมของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมดมากที่สุด คือ 3.97 และ 0.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การให้ปุ๋ยมูลโคเพียงอย่างเดียวหรือปุ๋ยมูลโคร่วมกับมูลสุกรอัตราส่วน 50:50 โดยน้ำหนัก ทำให้น้ำหนักแห้งมีการสะสมของปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดมากที่สุด คือ 4.58 และ 4.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Kannan และคณะ (2014) ศึกษาการอาศัยอยู่ร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียกับแหนแดง *Azolla pinnata*, *Azolla caroliniana* และ *Azolla filiculoides* โดยวิธีดั้งเดิมและวิธีโมเลกุล พบว่า *Westiellopsis* และ *Anabeana variabilis* อาศัยอยู่ร่วมกับ *Azolla filiculoides*

Newton and Herman (1979) ได้พัฒนาขั้นตอนเพื่อแยกไซยาโนแบคทีเรียจากแหนแดง วิธีการหลักที่จะจากไซยาโนแบคทีเรียออกจากแหนแดง คือ การย่อยสลายแหนแดงและเลี้ยงใน

อาหารที่ปราศจากไนโตรเจน ในสภาวะมีแสง และเลือกเซลล์ที่เจริญขึ้นมา พบว่า ไชยานิแบคทีเรียที่แยกได้มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Anabaena* sp.

Pereira A.L. and Carrapico F. (2016) ศึกษาโพรทอซัวของ *A. filiculoides* Lamarck (family Azollaceae) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สามารถตรวจพบปลอกหุ้มลักษณะพิเศษรูปทรงกระบอกที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ heterocyst ของ *A. azollae* และลักษณะของปลอกหุ้มพิเศษนี้ไม่พบในไนสิยานิแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับปรอง และไนสิยานิแบคทีเรียที่อยู่อย่างอิสระ

Azzz A. M. Abd El-AAI (2013) ศึกษาลักษณะของ *Anabaena azollae* ที่แยกได้จาก *Azolla pinnata* พบว่า *A. azollae* มีลักษณะเป็นเส้นสายสีน้ำตาล เซลล์ปกติเป็นรูปทรงกระบอก กว้าง 8-9 μm ยาว 5-6 μm เฮเทอโรซิสต์พบได้ในระหว่างเซลล์ปกติและเกิดที่ปลายของเส้นสายรูปทรงกลม กว้าง 9-9.5 μm ยาว 9-9.5 μm อะคีนีต รูปทรงกระบอก กว้าง 9-10 μm ยาว 6-8 μm ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ *A. azollae* เพิ่มขึ้นจาก 0.1786-4.7992 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4\text{ g soil/hr.}$ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ และพบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* หรือ *Alternaria alternate* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการใช้ไซยาโนแบคทีเรียตามหลักปรัชญาของเศรษฐกิจพอเพียง

สถานที่ศึกษาภาคสนาม เก็บตัวอย่างแหนแดง (*Azolla*) จากคลองวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ และมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์

สถานที่ศึกษาในห้องปฏิบัติการ อาจารย์สิรินธร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแหนแดง

คัดเลือกแหนแดงที่มีลักษณะแตกต่างกันจากแหล่งน้ำในพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ (ตารางที่ 3.1) นำแหนแดงที่ได้มาล้างน้ำเบา ๆ ในน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม สำหรับการนำมาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา นำแหนแดงมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในประตางที่มีความสูง 20 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ที่มีอาหารเหลว N-free medium (ตารางที่ 3.2) ควบคุมสภาพแวดล้อม

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ประกอบด้วย

ชุดการทดลองที่ 1 : AZ01

T1 = ชุดควบคุม (control)

T2 = K_2HPO_4 อัตรา 0.5 กรัม/กระถาง

T3 = K_2HPO_4 อัตรา 1.0 กรัม/กระถาง

T4 = K_2HPO_4 อัตรา 1.5 กรัม/กระถาง

T5 = K_2HPO_4 อัตรา 2.0 กรัม/กระถาง

ชุดการทดลองที่ 2 : AZ02

T6 = ชุดควบคุม (control)

T7 = K_2HPO_4 อัตรา 0.5 กรัม/กระถาง

T8 = K_2HPO_4 อัตรา 1.0 กรัม/กระถาง

T9 = K_2HPO_4 อัตรา 1.5 กรัม/กระถาง

T10 = K_2HPO_4 อัตรา 2.0 กรัม/กระถาง

ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมปกติ โดยใช้ແຜ່ນແດງເລີ່ມຕົ້ນ 3 ກຣັມ/ກະຄາງ ແລະໃສ່ປຸຍຟອສເຟຕທຸກ ໆ 7 ວັນ ວັດການເຈຣີຍູເຕີບໂຕທຸກ 7 ວັນ ໃນໄລຍະເວລາ 10.00 ນ. ໂດຍໃຊ້ ກະໜົດກັບແຜ່ນແດງໃນແຕ່ລະໜ່ວຍທົດລອງຂຶ້ນຈາກກະຄາງ ພັກໄວ້ເປັນເວລາ 15 ນາທີ ນໍ້າແຜ່ນແດງ ໄປສົ່ງນໍ້ານັກສດ ບັນທຶກຂໍ້ມູນ ທໍາການບັນທຶກນໍ້ານັກສດ ນໍ້ານັກແຫ້ງຂອງແຜ່ນແດງ ໂດຍການຫາ doubling time

$$\text{doubling time} = \ln 2 / \text{RGR}$$

$$\text{RGR (Relative growth rate)} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t - t_1)$$

$$W_1 = \text{ນໍ້ານັກເລີ່ມຕົ້ນ}$$

$$W_2 = \text{ນໍ້ານັກສຸດທ້າຍ}$$

$$t = \text{ຈໍານວນວັນທີ່ໃຊ້ໃນການເລີ່ງ (Mitchell, 1974)}$$

ຕາຣາງທີ່ 3.1 ສາຍພັນຊຸດແຜ່ນແດງທີ່ຄັດເລືອກມາໃຊ້ໃນການສຶກສາ

ສາຍພັນຊຸດ	ແຫຼ່ງທີ່ເກີດ
Azolla1 (AZ01)	ມະຫາວິທະຍາໄລຊາຣັກພະຊຽນຸຣຸນ ອຳເກອເມືອງ ຈັງຫວັດພະຊຽນຸຣຸນ
Azolla2 (AZ02)	ຄຣອງວັດດາວເຣືອງ ຕຳບຣນາປ່າ ອຳເກອເມືອງ ຈັງຫວັດພະຊຽນຸຣຸນ

ຕາຣາງທີ່ 3.2 ການເຕີຣີຍມ stock ຂອງອາຫານເລວ N-free medium

Stock solution	ສາຣເຕມີ	ຄວາມເຂັ້ມຂົ້ນ (ກຣັມລິຕຣ)
1	CaCl ₂	55.50
2	MgSO ₄ . 7H ₂ O	49.50
3	KCl	37.50
4	KH ₂ PO ₄	13.60
5	FeEDTA.Na	30.00
6	Micro nutrient	
	H ₃ BO ₃	2.86
	MnCl.4H ₂ O	1.81
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.22
	CoCl .6H ₂ O	0.10
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.08
	MnO ₃	0.02

3.2 การจำแนกแหนดงโดยใช้ลักษณะทางสรีรวิทยา

3.2.1 การศึกษาลักษณะโครงสร้างของ vegetative โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำตัวอย่างใบของแหนดงที่คัดเลือกได้มาแช่ใน glutaraldehyde 2.0% ใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 ที่ไว้ค้างคืนเพื่อทำการตรึงตัวอย่างให้คงอยู่ในสภาพเดิม นำมาล้างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 10-15 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน osmium tetroxide 1% เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำมาทำการดึงน้ำออกอย่างช้า ๆ ด้วยการล้างด้วยเอทานอล 30, 50, 70, 90, 95 และ 100% เป็นเวลา 10-15 นาที ชุดละ 2 ครั้ง ตัวอย่างที่ได้จะนำไปทำแห้งโดยการใช้เครื่อง critical point dryer จากนั้นนำตัวอย่างไปหุ้มด้วยทองด้วยเครื่อง ion sputter นำตัวอย่างที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 85, 100, 120, 200 และ 800 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่เหมือนหรือแตกต่างกันของแหนดงสายพันธุ์ต่าง ๆ

3.2.2. การศึกษาลักษณะการอยู่ร่วมกันของแหนดงและไซยาโนแบคทีเรีย (*Azolla-Anabaena symbiosis*)

การศึกษาไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena azollae* ในโพรงใบแหนดง ขั้นแรกนำใบแหนดงมาผ่าตามยาวและตามขวางไปแช่ใน glutaraldehyde 2.5% ใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 หลังจากนั้นนำไปแช่ใน OsO_4 นำตัวอย่างมาดึงน้ำออกอย่างช้า ๆ ด้วยการล้างด้วยเอทานอล 30, 50, 70, 90, 95 และ 100% ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้ฝังลงไปพาราฟฟินตัดตัวอย่างด้วยเครื่อง microtome ย้อมตัวอย่างที่ได้ด้วย toluidine blue 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า ต่อจากนั้นย้อมด้วย basic fuchsin เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำเปล่าอีกครั้ง ส่องดูลักษณะการอยู่ร่วมกันของแหนดงและไซยาโนแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

3.3 การแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย

(1) ชั่งตัวอย่างแหนดง 1 กรัม มาเจือจางในน้ำกลั่น 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)

(2) นำสารละลายแหนดงที่ความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} ไป spread ลงบนอาหารแข็ง N-free medium จำนวน 3 เพลท จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25

$\pm 2^{\circ}\text{C}$ โดยมีแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มของแสง 3,000 ลักซ์(Lux) เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ กระทั่ง ไชยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญเป็นโคโลนีขึ้นบนอาหารแข็ง

(3) เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน มาแยกเพื่อให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Micropipette washing โดยนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4 การจัดจำแนกสกุลไชยาโนแบคทีเรียที่แยกได้

การจำแนกไชยาโนแบคทีเรียในระดับสกุล อาศัยลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ และกล้องสเตรียอ ไมโครสโคป ตามวิธีการจำแนกของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001), Anagnostidis and Komarek (1988), Komarek and Anagnostidis (1989), Anagnostidis and Komarek (1990), Komarek and Anagnostidis (1999) และ Komarek et al. (2003) และยวดี (2549) ลักษณะที่ศึกษา ได้แก่

- รูปร่าง และขนาดของ vegetative cell
- จำนวนและตำแหน่งของเฮเทอโรซิสท์ในสายเซลล์
- จำนวนและตำแหน่งของอะคีนีต์ในสายเซลล์
- การสร้างสปอร์ เมื่อ
- การแตกแขนง

3.5 การวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด

นำตัวอย่างแห้งแดงไปอบที่ 70°C เป็นเวลา 24 ชม. บดตัวอย่างให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ลงในหลอด Kjeldahl และใช้หลอดเปล่า 1 หลอดเป็น sample blank เติม mixed catalyst (ผสม $\text{K}_2\text{SO}_4 : \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ อัตราส่วน 100:10) ลงไปประมาณ 5 กรัม เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้นลงไป 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ส่วนผสมทั้งหมดคลุกเคล้ากัน นำไปย่อยใน digestion block ในตู้ดูดควันที่อุณหภูมิ 400°C ประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีของสารละลายที่ย่อยใสหรือสีขาวขุ่น ทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายกรดบอริก 50 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพูขนาด 125 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น ก่อนเริ่มกลั่นเติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 35% NaOH ลงไป 25 มิลลิลิตร ใช้กรดบอริกจับแก๊สแอมโมเนียที่เกิดขึ้น สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว ได้สารละลายที่กลั่นแล้ว นำกรดบอริกที่ได้ไปไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 M HCl กระทั่งสีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีชมพูเทียบกับ blank

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนการทดลอง ได้แก่

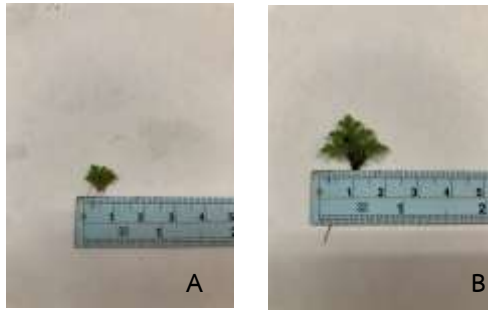
ตอนที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของแหนแดง

4.1 ลักษณะทางโครงสร้างของแหนแดง

แหนแดงทุกสายพันธุ์คัดเลือกมาจากจากคลองวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ และมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ในการจำแนกสายพันธุ์แหนแดงนี้ จะทำการเลี้ยงแหนแดงในสารละลายอาหาร N-free medium ภายใต้สภาพโรงเรือน ในการศึกษาขั้นแรกทำเมื่อแหนแดงอายุได้ 14 วัน โดยจะนำมาศึกษาลักษณะโครงสร้างทาง vegetative ภายใต้กล้องถ่ายภาพ ดังรูปที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 โดยสายพันธุ์ AZ01 และ AZ02 ต้นแหนแดงจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร และ 2.2 เซนติเมตรความยาว 0.6 และ 1.5 เซนติเมตร ตามลำดับ และกล้องจุลทรรศน์ stereo รูปที่ 4.2 ซึ่งการสังเกตลักษณะโครงสร้างเบื้องต้นจำแนกได้ว่าแหนแดงทั้ง 2 สายพันธุ์จัดอยู่ใน section *Azolla* (ประกอบด้วยสายพันธุ์ *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* และ *A. ruba*) ตาม tentative identification key (Lumpkin and Plucknett, 1982) แหนแดงใน section นี้ ใบที่กำลังเจริญจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 เซนติเมตร เจริญเติบโตในแนวนอน

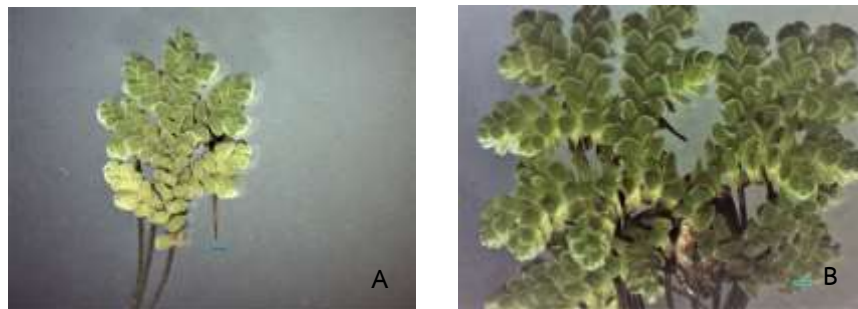
ตารางที่ 4.1 ขนาดของแหนแดง (เซนติเมตร)

ตัวอย่าง	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.)	ยาว (ซม.)
AZ01	1.0	0.6
AZ02	2.2	1.5



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสรีรวิทยาของโครงสร้าง vegetative ภายใต้กล้องถ่ายภาพ

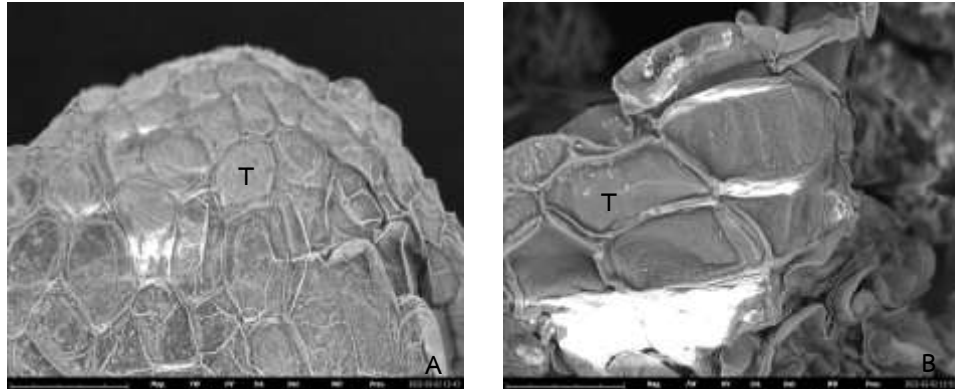
A) AZ01 B) AZ02



รูปที่ 4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาของโครงสร้าง vegetative ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo

A) AZ01 B) AZ02 (กำลังขยาย 0.66)

ปี 1976 Martin ได้แนะนำว่าลักษณะบางอย่างเช่น ชนิดของขนใบ (trichome หรือ epidermal leaf hair) เป็นลักษณะที่สำคัญที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์เห็ด จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาลักษณะขนใบซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง vegetative โดยสังเกตความแตกต่างของขนใบในแต่ละสายพันธุ์ด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของขนใบ (epidermal trichomes)

A) รูปขนใบของ AZ01 B) รูปขนใบของ AZ02

T คือ ปลายหรือยอดของขนใบ (apical trichome cell) กำลังขยาย 2650x

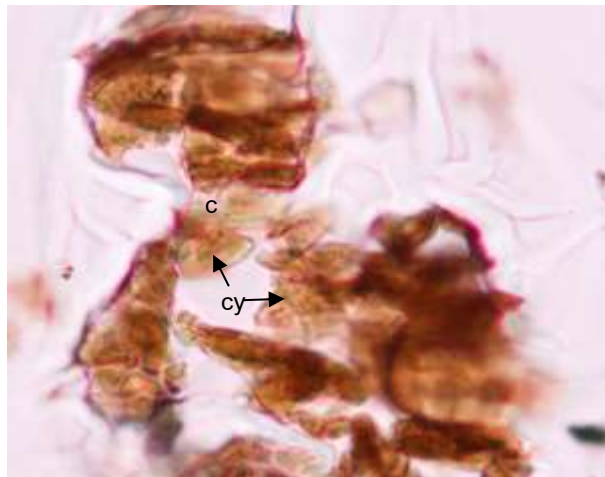
โดยลักษณะขนใบของสายพันธุ์ AZ01 จะมีรูปร่างค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30-40 ไมโครเมตร สายพันธุ์ AZ02 มีรูปร่างเป็นวงรี กว้างประมาณ 20 ไมโครเมตร ยาว 50 ไมโครเมตร โดยพบว่าทั้งสองสายพันธุ์ขนใบ มีลักษณะเรียงตัวกันเป็นแถวในแนวตั้ง พบขนใบ 1 เซลล์หรือมากกว่า

จากการจำแนกของ Lumpkin and Plucknett (1982) เซลล์ขนใบเป็นส่วนหนึ่งที่ใช้สำหรับจำแนกสายพันธุ์ของเห็บแดง โครงสร้างของเซลล์ขนใบประกอบด้วย 2 เซลล์ คือ ก้านเซลล์ (pedicel cell) และส่วนปลายหรือยอดของขนใบ (apical trichome cell) แต่เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของ vegetative บางส่วนในแต่ละสายพันธุ์ยังมีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงควรมีการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็บแดง (sporocarp)

จากการศึกษาของ Dunham and Fowler (1987) นอกจากไตรโคมของใบและกายวิภาคศาสตร์ของรากแล้วคุณลักษณะของ vegetative ก็ไม่มีประโยชน์ ควรมีการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง glochidial septation โครงสร้างของสปอร์ และโครงสร้างอื่น ๆ ร่วมด้วย สำหรับใช้ในการจัดจำแนกอนุกรมวิธานของเห็บแดงร่วมด้วย การเปลี่ยนแปลงทางอนุกรมวิธานรวมถึงการสร้างสายพันธุ์ใหม่อย่างน้อย 2 ชนิด ปฏิเสธ *A. caroliniana* และการแยก *A. filiculoides* ออกเป็น 2 สายพันธุ์ย่อย

4.2 ลักษณะการอยู่ร่วมกันของแหนแดงและไซยาโนแบคทีเรีย (Azolla-Anabaena endosymbiont)

ในการศึกษา *Anabaena azollae* ไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ในโพรงใบของแหนแดง ทำโดยการนำใบแหนแดงมาตัดตามขวางและนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ในระยะเวลาที่สมบูรณ์เต็มที่ โพรงใบจะมีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่ ภายในโพรงใบบริเวณช่องแคบที่อยู่รอบเส้นรอบวงจะพบ *A.azollae* ยึดอยู่กับภายในโพรงใบ ดังรูปที่ 4.4 จากการศึกษพบลักษณะเซลล์ 2 แบบ คือ vegetative cell และ heterocyst cell ทั้ง 2 สายพันธุ์ AZ01 และ AZ02 สายของไซยาโนแบคทีเรียส่วนมากจะพบ vegetative cell โดยลักษณะของเซลล์นี้จะพบเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกัน โดยลักษณะนี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย ส่วน heterocyst cell จะมีลักษณะและรูปร่างแตกต่างจาก vegetative cell เพราะเซลล์ดังกล่าวมีขนาดใหญ่ ผนังเซลล์หนา รูปร่างค่อนข้างกลม



รูปที่ 4.4 ไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับแหนแดง กำลังขยาย 100 เท่า

c = โพรงใบแหนแดง

cy= ไซยาโนแบคทีเรีย

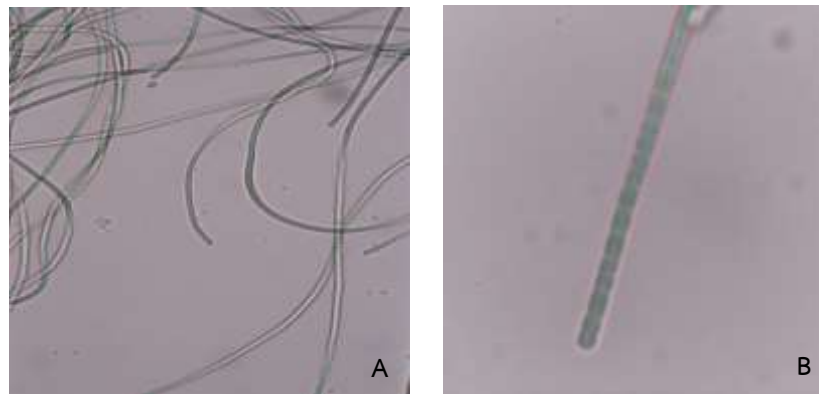
ในปี 1987 Dunham และ Fowler เสนอการจำแนกสายพันธุ์แหนแดงโดยสังเกตจากลักษณะของ vegetative cell และ reproductive cell ด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตัดตามขวาง ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า บางส่วนของขนใบ ลักษณะ

บางอย่างของโครงสร้าง vegetative cell สามารถนำมาใช้ในการจำแนกแหนดงได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

โชคชัย วนภู (2553) จำแนกสายพันธุ์แหนดง 3 สายพันธุ์ (AZ01, AZ02 และ AZ03) โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ พบว่าแหนดงทั้ง 3 สายพันธุ์ อยู่ใน section *Azolla* โดย AZ01 คือ สายพันธุ์ *A. microphylla*, AZ02 คือ สายพันธุ์ *A. cristata* และ AZ03 คือ สายพันธุ์ *A. filiculoides*

4.3 การจัดจำแนกสกุลไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหนดง

จากตารางที่ 4.2 พบว่า *Anabaena azollae* ที่แยกได้จากแหนดง มีลักษณะเป็น เส้นใยสีน้ำตาล รูปร่างของเซลล์เป็นทรงกระบอก มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 8 ถึง 9 ไมโครเมตร และความยาว 5 ถึง 6 ไมโครเมตร เซลล์ heterocyst มีรูปร่างทรงกลม สามารถพบได้ภายใน และส่วนปลายของเส้นใย เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ถึง 9.5 ไมโครเมตร ความกว้างและยาว 9 ถึง 9.5 ไมโครเมตร อะคีนิต เป็นรูปทรงกระบอก มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 9 ถึง 10 ไมโครเมตร และความยาว 6 ถึง 8 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.5 รูปจากกล้องจุลทรรศน์ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. azollae*

(A = กำลังขยาย 10X, B = กำลังขยาย 40X)

ตารางที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. azollae*

color	shape	Vegetative cell			heterocyst			Site of heterocyst	Akinetes		
		shape	Width (µm)	Length (µm)	shape	Width (µm)	Length (µm)		shape	Width (µm)	Length (µm)
Brown	Filamentous	Cylindrical	8-9	5-6	Spherical	9-9.5	9.-9.5	Inter. & Terminal	Cylindrical	9-10	6-8

Newton and Herman (1979) ได้พัฒนาขั้นตอนเพื่อแยกไซยาโนแบคทีเรียจากเหินแดง วิธีการหลักที่จะจากไซยาโนแบคทีเรียออกจากเหินแดง คือ การย่อยสลายเหินแดงและเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน ในสภาวะมีแสง และเลือกเซลล์ที่เจริญขึ้นมา พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Anabaena* sp.

Pereira A.L. and Carrapico F. (2016) ศึกษาโพรงใบของ *A. filiculoides* Lamarck (family Azollaceae) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สามารถตรวจพบปลอกหุ้มลักษณะพิเศษรูปทรงกระบอกที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ heterocyst ของ *A. azollae* และลักษณะของปลอกหุ้มพิเศษนี้ไม่พบในไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับปรัง และไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่อย่างอิสระ

Azza A. M. Abd El-AAI (2013) ศึกษาไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับ *Azolla pinnata* ทำการเพาะเลี้ยงอย่างอิสระ พบ *Anabaena azollae* ที่แยกได้จากเหินแดง มีลักษณะเป็นเส้นใยสีน้ำตาลถึงสีมะกอก รูปร่างของเซลล์เป็นทรงกระบอก เซลล์ heterocyst พบทั้งภายในและส่วนปลายของเส้นใย มีรูปร่างทรงกลม อะคีนิต เป็นรูปทรงกระบอก กิจกรรมไนโตรจีเนส ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 0.1786 ถึง 4.7992 μ mole C_2H_2 g soil/hr

ตอนที่ 2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเหินแดง

4.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเหินแดง

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 พบว่า ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 มีผลต่อการเจริญของเหินแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เหินแดงสามารถเจริญได้ใน K_2HPO_4 ที่ระดับความเข้มข้นไม่สูง โดยพบว่าเหินแดงให้ผลผลิตมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 0.5 กรัม ในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคิดเป็นผลผลิตของน้ำหนักแห้ง 0.95 กรัม/ตารางเมตร รองลงมา ได้แก่ ชุดการทดลองที่ไม่เติม K_2HPO_4 และที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 1 กรัม ตามลำดับ จากการศึกษาของ Tokhun et al., (2011) พบว่า เหินแดงเจริญเติบโตเต็มที่ในระยะเวลา 13-15 วันของการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.6 พบว่า ในสัปดาห์ที่สองของการเพาะเลี้ยงเหินแดงมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (RGR) สูงสุด คือ ที่ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 0.5 กรัม โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ 0.12 ต่อวัน รองลงมา ได้แก่ ที่ชุดการทดลองที่ไม่เติม K_2HPO_4 และที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 1 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 กรัม เหินแดงมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่ำ Sadeghi et al. (2013) รายงานว่า ธาตุฟอสฟอรัสในรูปฟอสเฟต (PO_4^{2-}) ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่จำกัดการเจริญเติบโตของเหินแดงเป็นอย่างมาก เนื่องจากฟอสฟอรัสมีบทบาทสำคัญต่อการเร่งการเจริญเติบโตของเหินแดง โดย

หากมีปริมาณฟอสฟอรัสเพียงพอในน้ำที่ใช้เลี้ยงแหนแดง อาจไม่จำเป็นต้องให้ไนโตรเจนทั้งในรูปแอมโมเนียม (NH_4^+) หรือไนเตรต (NO_3^-) ซึ่งยังคงทำให้แหนแดงมีการเจริญเติบโตได้ดีอย่างต่อเนื่อง

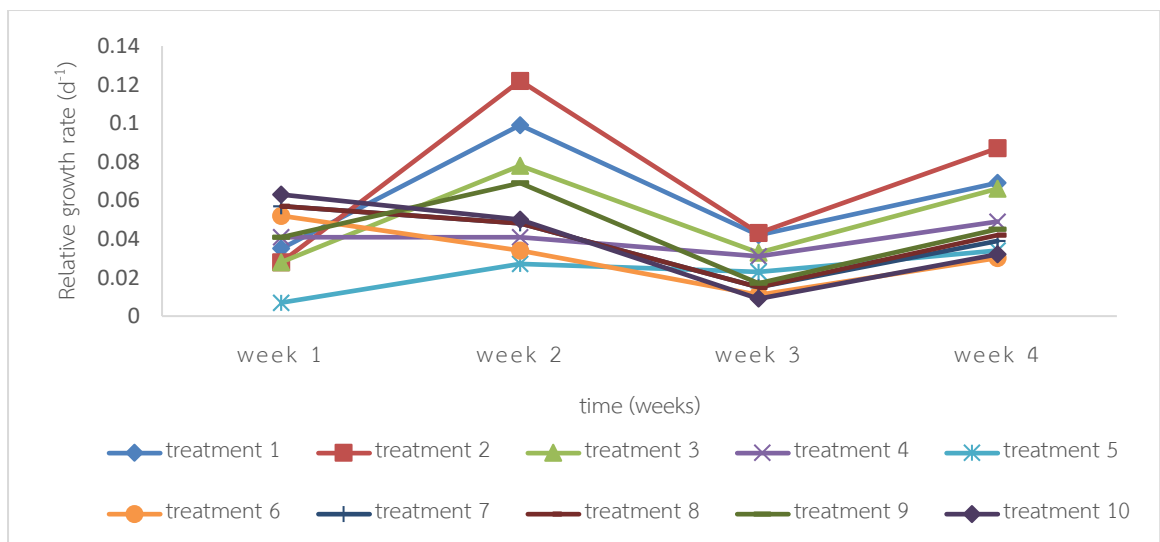
เมื่อแหนแดงได้รับธาตุอาหารหลักทั้งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม รวมถึงธาตุอาหารอื่นๆ จากปุ๋ยคอกทั้ง 2 ชนิด ย่อมทำให้แหนแดงมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการส่งเสริมซึ่งกันและกันของธาตุอาหารที่หลากหลายดังเช่นการศึกษาของ Biswas et al. (2005) ที่รายงานว่า จุลธาตุอย่างเหล็กและโมลิบดีนัมที่มีอยู่ในมูลโคช่วยเพิ่มความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้กับทั้งแหนแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ทำให้แหนแดงมีการสะสมของไนโตรเจนเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักแห้งของแหนแดงที่เลี้ยงในอาหารโฮกแลนด์ (Hoagland 's solution) ที่ระดับความเข้มข้นของฟอสเฟตต่าง ๆ กัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

Treatment	Dry Weight (g)			
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
1	0.23±0.01 ^{cd}	0.46±0.01 ^b	0.83±0.02 ^b	0.99±0.03 ^b
2	0.22±0.00 ^d	0.52±0.01 ^a	0.95±0.00 ^a	1.37±0.03 ^a
3	0.22±0.01 ^e	0.38±0.02 ^e	0.61±0.01 ^c	0.88±0.00 ^c
4	0.24±0.03 ^c	0.32±0.00 ^g	0.50±0.01 ^d	0.68±0.01 ^d
5	0.19±0.00 ^e	0.23±0.00 ^h	0.32±0.02 ^g	0.39±0.01 ^h
6	0.26±0.01 ^b	0.33±0.01 ^f	0.39±0.03 ^f	0.49±0.02 ^g
7	0.27±0.02 ^b	0.38±0.02 ^{de}	0.47±0.00 ^e	0.62±0.02 ^e
8	0.27±0.01 ^b	0.38±0.03 ^e	0.47±0.01 ^e	0.66±0.01 ^d
9	0.24±0.01 ^c	0.39±0.00 ^d	0.50±0.02 ^d	0.62±0.00 ^e
10	0.28±0.02 ^a	0.40±0.03 ^c	0.46±0.03 ^e	0.55±0.02 ^f
F-test	**	**	**	**

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



รูปที่ 4.6 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ของແຜ່ນແດງທີ່ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ต่างกัน

4.5 การวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด

ผลจากตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมดของແຜ່ນແດງจะมีค่าอยู่ในช่วง 2.92-3.73% จากผลการวิเคราะห์พบว่า สายพันธุ์ AZ02 มีค่าไนโตรเจนทั้งหมดสูงที่สุด ตามด้วยสายพันธุ์ AZ01 ซึ่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหลักที่ช่วยเพิ่มผลผลิตในนาข้าว ปริมาณไนโตรเจนในແຜ່ນແດງโดยปกติจะมีค่าประมาณ 0.25% ขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ สภาพภูมิอากาศ และเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยง (โชคชัย วรรณ, 2553) แຜ່ນແດງที่ได้รับธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมจะมีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 2.548 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าทุกชุดการทดลอง (ภาณุพงศ์ น้อยผุดและคณะ, 2562)

เนื่องจากແຜ່ນແດງดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยกันกับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศโดยการทำงานของเอนไซม์ที่มีธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ ไนโตรเจนที่ถูกตรึงจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนในรูปที่ແຜ່ນແດງสามารถใช้ได้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของແຜ່ນແດງแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	% ไนโตรเจนทั้งหมด
AZ01	2.92
AZ02	3.73

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

ลักษณะทางโครงสร้างของแหนแดง

แหนแดงทุกสายพันธุ์คัดเลือกมาจากจากคลองวัดดาวเรือง ตำบลนาป่า อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ และมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ศึกษา ลักษณะโครงสร้างทาง vegetative ภายใต้กล้องถ่ายภาพ และกล้องจุลทรรศน์ stereo ซึ่งการสังเกตลักษณะโครงสร้างเบื้องต้นจำแนกได้ว่าแหนแดงทั้ง 2 สายพันธุ์จัดอยู่ใน section *Azolla* ประกอบด้วยสายพันธุ์ *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* และ *A. rubra*) แหนแดงใน section นี้ ใบที่กำลังเจริญจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 เซนติเมตร เจริญเติบโตในแนวนอน

ลักษณะการอยู่ร่วมกันของแหนแดงและไซยาโนแบคทีเรีย

เมื่อใบแหนแดงมาตัดตามขวางและศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในระยะที่สมบูรณ์เต็มที่ โพรงใบจะมีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่ ภายในโพรงใบบริเวณช่องแคบที่อยู่รอบเส้นรอบวงจะพบ *A. azollae* ยึดอยู่กับภายในโพรงใบ ลักษณะเซลล์ 2 แบบ คือ vegetative cell และ heterocyst cell ทั้ง 2 สายพันธุ์ AZ01 และ AZ02 สายของไซยาโนแบคทีเรียส่วนมากจะพบ vegetative cell โดยลักษณะของเซลล์นี้จะพบเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกัน โดยลักษณะนี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย ส่วน heterocyst cell จะมีลักษณะและรูปร่างแตกต่างจาก vegetative cell เพราะเซลล์ดังกล่าวมีขนาดใหญ่ ผนังเซลล์หนา รูปร่างค่อนข้างกลม

การจัดจำแนกสกุลไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหนแดง

Anabaena azollae ที่แยกได้จากแหนแดง มีลักษณะเป็นเส้นใยสีน้ำตาล รูปร่างของเซลล์เป็นทรงกระบอก มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 8 ถึง 9 ไมโครเมตรและความยาว 5 ถึง 6 ไมโครเมตร เซลล์ heterocyst มีรูปร่างทรงกลม สามารถพบได้ภายในและส่วนปลายของเส้นใย เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ถึง 9.5 ไมโครเมตร ความกว้างและความยาว 9 ถึง 9.5 ไมโครเมตร อะซีนิตเป็นรูปทรงกระบอก มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 9 ถึง 10 ไมโครเมตร และความยาว 6 ถึง 8 ไมโครเมตร

การศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ดนางฟ้า

ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 มีผลต่อการเจริญของเห็ดนางฟ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เห็ดนางฟ้าสามารถเจริญได้ใน K_2HPO_4 ที่ระดับความเข้มข้นไม่สูง โดยพบว่าเห็ดนางฟ้าให้ผลผลิตมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 0.5 กรัม ในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคิดเป็นผลผลิตของน้ำหนักรวม 0.95 กรัม/ตารางเมตร รองลงมา ได้แก่ ชุดการทดลองที่ไม่เติม K_2HPO_4 และที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 1 กรัม ตามลำดับ

ในสัปดาห์ที่สองของการเพาะเลี้ยงเห็ดนางฟ้ามีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (RGR) สูงสุดคือ ที่ระดับความเข้มข้นของ K_2HPO_4 0.5 กรัม โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ 0.12 ต่อวัน รองลงมา ได้แก่ ที่ชุดการทดลองที่ไม่เติม K_2HPO_4 และที่ระดับความเข้มข้น K_2HPO_4 1 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 กรัม เห็ดนางฟ้ามีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่ำ

การวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด

การวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมดของเห็ดนางฟ้าจะมีค่าอยู่ในช่วง 2.92-3.73% จากผลการวิเคราะห์พบว่า สายพันธุ์ AZ02 มีค่าไนโตรเจนทั้งหมดสูงที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

การทดลองต่อไปควรมีการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็ดนางฟ้า (sporocarp) และการศึกษาทางชีวโมเลกุล เพื่อการจัดจำแนกชนิดของเห็ดนางฟ้าและไฮฟาโนแบคทีเรียที่แน่นย่ำมากขึ้น

บรรณานุกรม

- โชคชัย วนภู. (2553). การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไซยาโนแบคทีเรียกับเห็ดนางฟ้าเพื่อใช้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในนาข้าวอินทรีย์. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- นพพร ศิริพานิช. (2564). เห็ดนางฟ้า. การจัดการความรู้ เทคโนโลยีการใช้ปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชในเขตภาคกลางและภาคตะวันตก. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมวิชาการเกษตร.
- ประยูร สวัสดิ์ และบรรพต แดงจ๋า. (2545). เห็ดนางฟ้า และการใช้ประโยชน์. ใน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร (บ.ก.), เอกสารวิชาการปุ๋ยชีวภาพ. กรุงเทพฯ . 163-212.
- พัชนี วิมลชาติ, พุทธิ ชุตินานุกูล และอรประภา เทพศิลป์. (2564). ผลของมูลโคและมูลสุกรต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของเห็ดนางฟ้า (*Azolla microphylla*). เกษตร 49 (6): 1364-1374. /doi:10.14456/kaj.2021.121.
- ภาณุพงศ์ น้อยสุด, จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ และยุพันธ์ พิมพ์โคตร. (2562). ผลของหลักและโมลิบดีนัมต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไนโตรเจนของเห็ดนางฟ้า. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 29 : 896-901.
- ภาษิตา ทุนศิริ, ศิริรัตน์ แจ่มกรณ์, กานดา ปุ่มสิน, ฉันทนา เคนศรี, พันทิศา กระจาย. (2563). "เห็ดนางฟ้า"....แหล่งไนโตรเจนในแปลงผัก. วารสารสิ่งแวดล้อม 24 (4): 1-8.
- ยุวดี พิธีพรพิศาล. (2549). สาหร่ายวิทยา (พิมพ์ครั้งที่ 2). ห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ศิริลักษณ์ แก้วสุริยิต, ประไพ ทองระอา, กานดา ฉัตรไชยศิริ,และภาสันต์ ศารทูลทัต. (2561). ผลของเห็ดนางฟ้าต่อการเจริญเติบโตของกวางตุ้ง. ใน: The 17th National Horticultural Congress 2018: 332-337.
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. ผลผลิตข้าว. [online]. 2565. แหล่งที่เข้าถึง : <http://www.thairiceexporters.or.th/production.htm>. [21 กุมภาพันธ์ 2565].
- หนึ่ง เตียอำรุง. (2554). แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- Anagnostidis, K. and Komarek, J. (1988). Modern Approach to the Classification System of Cyanobacteria 3. Oscillatoriales. Arch. Hydrobiol. Suppl., 50/53, 327-472.

- Anagnostidis, K. and Komarek, J. (1990). Modern Approach to the Classification System of Cyanobacteria 5. Stigonematales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 59, 1-73.
- Azzz A. M. Abd El-AAI (2013). Characterization of *Anabaena azollae* isolated from *Azolla pinnata*. *Egypt. J. Agric. Res.* 91 (3): 801- 808.
- Biswas M., Parveen S., Shimozawa H. and Nakagoshi N. (2005). Effects of *Azolla* species on weed emergence in a rice paddy ecosystem. *Weed Biology Management.* 5: 176-183.
- Chapman, V.J. and Chapman D.J. (1975). *The algae*. The Macmillan Press, Ltd., London
- Dunham D.G. and Fowler K. (1987). Taxonomy and species recognition in *Azolla* Lam. In: *Azolla* utilization. International Rice Research Institute, Philippines. 7-16.
- Grazer, A. N. (1987). Phycobilisomes : assembly and attachment, In P. Fay and C. V. Baclen (eds). *The Cyanobacteria*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Komarek, J. and Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the Classification System of Cyanobacteria 4. Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 56, 247-345.
- 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.
- Lumpkin T.A. and Plucknett. D.W. (1982). *Azolla* as a Green Manure: Use and Management in Crop Production. Boulder: West View Press.
- Martin A.R.H. (1976). Some structure in *Azolla* megaspores and an anomalous form. *Review of Paleobotany and Palynology.* 12: 141.
- Mitchell, D.S. (1974). The development of excessive populations of aquatic plant. In: *Aquatic Vegetation and Its Use and Control*. UNESCO, Paris. pp.37-38.
- Nayak, S., Prasanna, R. (2007). Soil pH and its role in cyanobacterial abundance and diversity in rice soil. *Applied ecology and environmental research*, 5(2), 103-113.
- Newton J.W. and Herman A.I. (1979). Isolation of Cyanobacteria from the Aquatic Fern, *Azolla*. *Arch. Microbiol.* 120: 161-165.

- Pereira A.L. and Carrapico F. (2016). An extra sheath around the heterocysts of *Anabaena azollae* from the aquatic macrophyte *Azolla filiculoides* Lamarck. Botany Letters. <http://dx.doi.org/10.1080/23818107.2016.1234975>.
- Raja, W.R., Rathaur, P., John, S.A. and Ramteke, P. W. (2012). Azolla: An aquatic pteridophyte with great potential. *International Journal of Research in Biological Sciences*. 2(2):68-72.
- 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.
- Sadeghi R., Zarkami R., Sabetrafter K., and Damme P.V. (2013). A review of some ecological factors affecting the growth of *Azolla* spp. *Caspian Journal of Environment Science*. 11(1): 65-67.
- Singleton, P. and Sainsbury. (1987). *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Somporn Chunleuchanon, Apichat Sooksawang, Neung Teaumroong and Nantakorn Boonkerd. (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.
- Sze, P. (1986). *A Biology of the Algae*. Wm. C. Brown Publishers, Oxford, England.
- Tokhum N., Boonthai Iwai C. and Ta-oun M. (2001). Wastewater Treatment from Piggery farm by Using *Azolla microphylla*. In *Proceedings of the 12th Graduate Research Conference Khon Koen University*. 779-783.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาพกิจกรรม



รูปที่ ผนวก ก-1 ออกเก็บตัวอย่าง ณ คลองวัดดาวเรือง ต.นาป่า อ. เมือง จ.เพชรบูรณ์



รูปที่ ผนวก ก-2 ตัวอย่างพืช (*Azolla* spp.)



รูปที่ ผนวก ก-3 การส่งเสริมการใช้แผนแดงที่ก่อให้เกิดความพอเพียงของชุมชน



รูปที่ ผนวก ก-4 การส่งเสริมการใช้แผนแดงที่ก่อให้เกิดความพอเพียงของชุมชน

ภาคผนวก ข

แบบรับรองการนำไปใช้ประโยชน์

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวสุรางค์รัตน์ พันแสง
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms Surangrat Punsang
 2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-6704-00213-29-9
 3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
 4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ 67000
โทรศัพท์ 056-717100 ต่อ 2715 โทรสาร 056-717123
e-mail: surangrat_aejung@hotmail.com
 5. ประวัติการศึกษา วท.บ.(ชีววิทยา), วท.ม. (วิทยาศาสตร์การเกษตร)
 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ชีววิทยา เกษตรศาสตร์
 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
- การเผยแพร่

[1] พวงผกา แก้วกรม สุรีย์พร ธรรมิกพงษ์ **สุรางค์รัตน์ พันแสง** และสุภา น้อยจาก. 2550. ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชตระกูลปาล์มและความต้องการอนุรักษ์ของชุมชนในอำเภอเขา คือ จังหวัดเพชรบูรณ์ (Biological diversity of Palm Family and the necessary to conservation by local community in Khao Kho District, Phetchabun Province). *วารสารวิจัยเพื่อท้องถิ่นมหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ* 1: 35-50.

[2] **สุรางค์รัตน์ พันแสง**, สุรีย์พร ธรรมิกพงษ์, พวงผกา แก้วกรม และนันทวรรณ ทองคด. 2552. การบำบัดน้ำเสียจากฟาร์มสุกรด้วยพืชน้ำ. *วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์* 1: 55-64.

[3] **สุรางค์รัตน์ พันแสง** และพวงผกา แก้วกรม. (2019). ฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกในส่วนต่างๆ ของต้นกำลังช้างเผือกและผลต่อลิโมนิไซด์ และโมโนไซด์ในหนู. *วารสารนเรศวรพะเยา* 12(1): 10-12.

[4] **สุรางค์รัตน์ พันแสง** และพวงผกา แก้วกรม. (2019). พืชสมุนไพรท้องถิ่นและการใช้ประโยชน์ในชุมชนไทหล่ม อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์. *แก่นเกษตร* 47 (6): 1119-1126.

[5] **สุรางค์รัตน์ พันแสง** และพวงผกา แก้วกรม. (2019). การประเมินคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย ของสมุนไพรบางชนิดในจังหวัดเพชรบูรณ์. *ว. วิทย์. มช.* 47(4): 691-698.

2. ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวพวงผกา แก้วกรม
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms Puangpaka Kaewkrom
 2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-6701-01603-53-2
 3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
 4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ 67000
โทรศัพท์ 056-717100 ต่อ 2709 โทรสาร - e-mail: kpuangpaka@hotmail.com
 5. ประวัติการศึกษา วท.บ.(เกษตรศาสตร์) วท.ม. (สัตววิทยา) วท.ด. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ ชีววิทยานิเวศวิทยา เกษตรศาสตร์
 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอก
- [1] พวงผกา แก้วกรม สุรีย์พร ธรรมิกพงษ์ สุรางค์รัตน์ พันแสง และสุภา น้อยจาก. 2550. ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชตระกูลปาล์มและความต้องการอนุรักษ์ของชุมชนในอำเภอเขาค้อจังหวัดเพชรบูรณ์ (Biological diversity of Palm Family and the necessary to conservation by local community in Khao Kho District, Phetchabun Province). *วารสารวิจัยเพื่อท้องถิ่นมหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ* 1: 35-50.
- [2] Puangpaka Kaewkrom, Sureeporn Thummikkaphong and Tussarin Somnoutad. 2007. Population Ecology of Some Important Palm Species in Phetchabun Province. *Kasetsart Journal* 41(3): 407-413.
- [3] พวงผกา แก้วกรม, กฤษมา มีศิริ และพรทิตัน ปิติสม. 2550. เปรียบเทียบผลการใช้สารเคมีและไม่ใช้สารเคมีที่มีต่อคุณสมบัติของดินและประโยชน์ทางสังคมในระบบนิเวศเกษตรกรรม. *วารสารวิจัยเพื่อท้องถิ่นมหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ* 1 (3) : 15-24.
- [4] สุรางค์รัตน์ พันแสง, สุรีย์พร ธรรมิกพงษ์, พวงผกา แก้วกรม และนันทวรรณ ทองคด. 2552. การบำบัดน้ำเสียจากฟาร์มสุกรด้วยพืชน้ำ. *วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์* 1: 55-64.
- [5] สุรางค์รัตน์ พันแสง และพวงผกา แก้วกรม. (2019). ฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกในส่วนต่างๆ ของต้นกำลังช้างเผือกและผลต่อลิโมนีไซด์ และโมนีไซด์ในหนู. *วารสารนเรศวรพะเยา* 12(1): 10-12.

[6] สุรางค์รัตน์ พันแสง และพวงผกา แก้วกรม. (2019). พืชสมุนไพรท้องถิ่นและการใช้ประโยชน์ในชุมชนไทหล่ม อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์. *แก่นเกษตร* 47 (6): 1119-1126.

[7] สุรางค์รัตน์ พันแสง และพวงผกา แก้วกรม. (2019). การประเมินคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติด้านเชื้อแบคทีเรีย ของสมุนไพรบางชนิดในจังหวัดเพชรบูรณ์. *ว. วิทย์. มช.* 47(4): 691-698.

3. ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาวสมเพียร พักทอง

Miss Sompian Fagtong

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3670100751040

3. ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานปฏิบัติการ ชีววิทยา

4. ตำแหน่งทางวิชาการ -

5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก

ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ. เพชรบูรณ์ 76000

โทรศัพท์ 056-717100 ต่อ 2709, 089-4619199 E-mail : mai_bio45@hotmail.com

6. ประวัติการศึกษา : วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์) มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ : การตรวจวิเคราะห์อาหาร การตรวจวิเคราะห์น้ำทางด้านจุลินทรีย์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

- วิทยานิพนธ์ เรื่อง เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตีปลากัง

4. ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาวแสงจันทร์ สอนสว่าง

Miss Sangjan Sonswang

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3670100389472

3. ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานปฏิบัติการ ชีววิทยา

4. ตำแหน่งทางวิชาการ -

5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก

ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ. เพชรบูรณ์ 76000

โทรศัพท์ 056-717100 ต่อ 2709, E-mail : Sangjanbio@hotmail.com

6. ประวัติการศึกษา : วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์) มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ : การตรวจวิเคราะห์อาหาร เทคนิคทางชีววิทยา

การเก็บรวบรวมพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย -