บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

พืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากอย่างหนึ่งของประเทศไทยคือ ข้าว ซึ่งนอกจากจะเป็นสินค้าออกที่ทำรายได้เข้าประเทศแล้ว ยังเป็นอาหารหลักของคนไทยอีกด้วย ดังนั้นจึงต้องเพิ่มผลผลิตข้าวให้เพียงพอกับความต้องการ วิธีที่ดีที่สุด คือ การเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ โดยทางรัฐบาลได้แนะนำให้เกษตรกรปลูกข้าวพันธุ์ดี ให้ผลผลิตสูง แต่ข้าวพันธุ์ดีจะให้ผลผลิตสูงก็ต่อเมื่อได้รับธาตุอาหารอย่างเพียงพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม

ต้นพืชประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ ประมาณ 15-20 %อีกประมาณ 80% ประกอบด้วยน้ำ (ดนัย, 2539) โดยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืชแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของพืช และอีกกลุ่มทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งมีหลายธาตุที่ทำหน้าที่ทั้ง 2 ประการ เช่น ธาตุไนโตรเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิดในพืช เมื่อขาดธาตุไนโตรเจน พืชจะโตช้ามาก

ดังนั้นธาตุไนโตรเจนจึงเป็นธาตุที่มีผลตอบสนองต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของข้าวมากที่สุด และมักจะเกิดการสูญหายไปจากดินได้ง่ายโดยกระบวนการต่าง ๆ จึงมีการศึกษาถึงวิธีการ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน เพื่อให้ข้าวสามารถนำขึ้นไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่ง Tanaka (1968) ได้แบ่งการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ indica ออกเป็น 4 ระยะ คือ

1. ระยะการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว (active vegetative stage) โดยเริ่มจากระยะปักดำจนถึงระยะข้าวมีการแตกกอสูงสุด ซึ่งในระยะนี้ ความสูง การแตกกอ และน้ำหนักของฟางจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

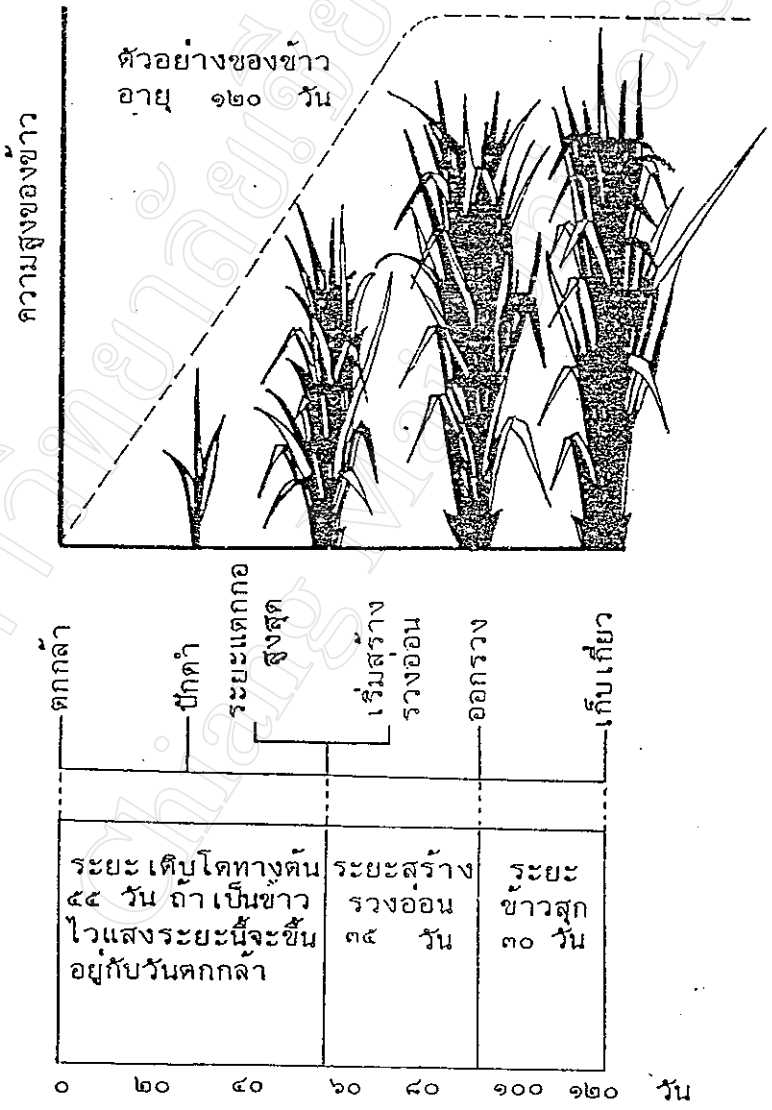
2. ระยะการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นเป็นไปอย่างช้า (vegetative lag phase) เริ่มต้นตั้งแต่ระยะที่ข้าวมีการแตกกอสูงสุด จนถึงระยะที่ข้าวเริ่มกำเนิดช่อดอก หรือสร้างรวงอ่อน

3. ระยะการเจริญเติบโตทางด้านการสืบพันธุ์ (reproductive phase) ระยะนี้เริ่มตั้งแต่ระยะที่ข้าวเริ่มสร้างรวงอ่อน จนถึงระยะข้าวเริ่มออกดอก

4. ระยะสุกแก่ของเมล็ด (ripening phase) เริ่มตั้งแต่ระยะที่ข้าวออกดอก จนถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยที่น้ำหนักของรวงจะเพิ่มขึ้นแต่น้ำหนักของฟางจะลดลงหรือคงที่

Mikkelsen (1970) รายงานว่า ทั้ง 4 ระยะนี้ เป็นระยะที่ข้าวต้องการปุ๋ยไนโตรเจนเป็นปริมาณมาก โดยระยะที่ 1 นั้น ข้าวส่วนมากมีอายุประมาณ 25-65 วัน สำหรับระยะที่ 2 นั้น

มักจะเปลี่ยนแปลงไปตามความยาวของช่วงแสง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับข้าวพันธุ์ที่ไวต่อช่วงแสง ส่วนระยะที่ 3 และ 4 นั้น ข้าวจะใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 25-35 วัน ในข้าวเกือบทุกพันธุ์ (IRRI, 1970) ประสูติ (2524) รายงานไว้ว่า สำหรับข้าวพันธุ์ที่ไม่ไวแสง จะมีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น การสืบพันธุ์และช่วงที่ข้าวสุกจะแน่นอนในแต่ละพันธุ์ ไม่ว่าจะปลูกเดือนไหน ดังนี้คือ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การเจริญเติบโตระยะต่าง ๆ ของต้นข้าวพันธุ์ที่ไม่ไวแสง ที่มีอายุ 120 วัน (ที่มา : ประสูติ, 2524)

ส่วนข้าวพันธุ์ที่ไวแสง ระยะเวลาการเจริญเติบโตทางลำต้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวแล้ว ยังอาจแตกต่างกันได้ในพันธุ์เดียวกันด้วย คือ ถ้าปลูกเร็วระยะนี้จะยาว ถ้าปลูกช้าระยะเวลานี้จะสั้น เพราะวันออกดอกของข้าวแต่ละพันธุ์ค่อนข้างแน่นอน

สำหรับพันธุ์ข้าว Evatt and Beachell (1962) ได้แบ่งข้าวออกตามอายุได้ 4 ชนิด คือ ข้าวพันธุ์เบามาก มีอายุ 96-117 วัน ข้าวพันธุ์เบา มีอายุ 109-132 วัน ข้าวอายุปานกลาง มีอายุ 132-150 วัน และข้าวพันธุ์หนัก มีอายุ 150-180 วัน

เนื่องจากในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของข้าว มีความสัมพันธ์กับการนำธาตุไนโตรเจนขึ้นไปใช้ Nishigaki *et al.* (1970) รายงานไว้ว่า การที่พืชจะนำธาตุไนโตรเจนขึ้นไปใช้ประโยชน์ได้มากน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของธาตุไนโตรเจนในดินรวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ ที่จะมีผลทำให้ธาตุไนโตรเจนเป็นประโยชน์ได้มากขึ้น (Viets, 1965) ปัจจัยเหล่านี้ ได้แก่ อายุและเวลาการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ที่ใช้ปลูก จำนวนปุ๋ยที่ใส่ เวลาในการใส่ปุ๋ย ชนิดของปุ๋ยไนโตรเจน ความชื้นและระดับน้ำในนา และปริมาณของวัชพืช (Evatt, 1965) ซึ่งการสูญเสียปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ลงไปเกิดขึ้นได้ง่าย เพราะธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย Allison (1966) และ Broeshart (1969) สรุปว่า กระบวนการสำคัญที่ก่อให้เกิดการสูญเสียปุ๋ยไนโตรเจนในดินนา คือ leaching, denitrification และ ammonia volatilization

ปุ๋ยไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตข้าว ส่วนใหญ่เป็นปุ๋ยเคมีที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ แต่เนื่องจากปุ๋ยมีราคาสูงเกินกว่าที่เกษตรกรจะหามาใช้ให้เพียงพอต่อความต้องการของพืชได้ จึงทำให้ผลผลิตต่ำ และการใช้ปุ๋ยเคมีในปริมาณมากติดต่อกันเป็นเวลานานยังมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของสมบัติดินด้วยเช่น การใช้ปุ๋ยโซเดียมไนเตรทในปริมาณมากๆ และติดต่อกันเป็นเวลานาน โซเดียมจะถูกยึดไว้กับอนุภาคของดินเหนียว ทำให้อนุภาคของดินเกิดการฟุ้งกระจายและดินแข็งแน่นทึบ ซึ่งยากต่อการไถพรวน หรืออีกสาเหตุหนึ่งคือ อนุมูลไนเตรทถูกพืชดูดไปใช้ประโยชน์ ปริมาณโซเดียมจะถูกสะสมอยู่ในดิน ทำให้โซเดียมทำปฏิกริยากับกรดคาร์บอนิค (H_2CO_3) เกิดเป็นสารประกอบโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เป็นผลทำให้อนุภาคดินฟุ้งกระจาย ดินแข็ง และแน่นทึบได้เช่นเดียวกัน จนอาจทำให้อากาศและน้ำในดินมีปริมาณน้อยเกินไป ไม่เพียงพอต่อกระบวนการต่าง ๆ สำหรับกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินได้ และการใช้ปุ๋ยเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต ในอัตราสูง คือ ประมาณ 400 กิโลกรัม/ไร่ ติดต่อกันเป็นเวลา 10 ปี จะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดินจาก 5.75 ลดลงเป็น 4.80 ดินจะมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น (เกษมศรี , 2541) ดังนั้นการใช้ปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ๆ ทำให้มีผลกระทบต่อคุณสมบัติทางกายภาพของดิน ทำให้ดินแข็งตัว ขาดจุลินทรีย์ และอินทรีย์วัตถุอื่น ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของดิน ทำให้เกษตรกรต้องใช้ปุ๋ยเพิ่มขึ้นขณะที่ผลผลิตคงที่หรือลดลง

ทางหนึ่งที่จะได้สารประกอบไนโตรเจนทดแทนปุ๋ยเคมี คือ จากการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ จุลินทรีย์กลุ่มที่มีเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) ซึ่งสามารถใช้ไนโตรเจนจากบรรยากาศ ซึ่งมีมากถึง 78% เปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนได้ ภายใต้อุณหภูมิและความดันปกติ เรียกกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (biological nitrogen fixation) สามารถแบ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่อยู่แบบอาศัยซึ่งกันและกันกับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiotic nitrogen fixing microorganisms) และพวกที่อยู่อย่างอิสระ (free-living nitrogen fixing microorganisms) เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ใน Division Cyanophyta เป็นพวกโปรคารีโอต (prokaryote) มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ และสังเคราะห์แสงได้ เจริญเติบโตได้ดีในสภาพพื้นที่น้ำขัง เช่น นาข้าว ซึ่งสารประกอบที่สาหร่ายสังเคราะห์ได้จากการตรึงไนโตรเจนคือ NH^{+}_{4}-N จะเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเมื่อสารประกอบนี้ถูกปลดปล่อยออกมา จึงมีการนำเอาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมาใช้ประโยชน์ ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ เพื่อนำมาใช้เพิ่มผลผลิตข้าว และลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน

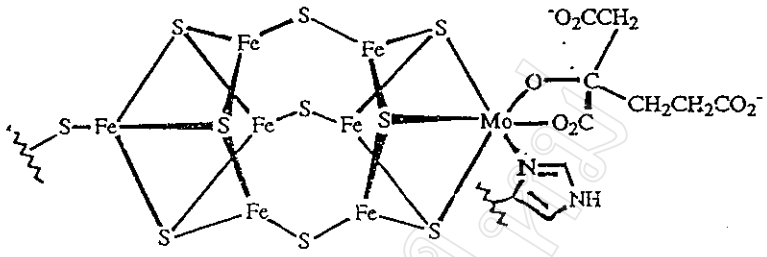
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

มีทั้งเซลล์เดี่ยวและเป็นเส้นสาย (filamentous) โดยเซลล์ส่วนใหญ่จะมีสีเขียวแกมน้ำเงิน เรียกว่าเป็น เซลล์พื้นฐาน (vegetative cell) ทำหน้าที่เก็บอาหารจำพวกแร่ธาตุ และสามารถปรุงอาหารได้เอง โดยการสังเคราะห์แสง มีเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซีส (heterocyst) แทรกอยู่เป็นระยะ เซลล์มีลักษณะสีจาง และมีผนังเซลล์เห็นได้ชัด มีหน้าที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศจากรูปก๊าซไนโตรเจน เป็นสารประกอบไนโตรเจน ส่วนเซลล์อีกจำพวกหนึ่ง คือ เซลล์ที่เรียกว่า อะคีนีต (akinete) ทำหน้าที่สืบพันธุ์ มีความสามารถพิเศษในการทนสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และเมื่อได้รับสภาพที่เหมาะสมก็จะเจริญเป็นสาหร่ายใหม่

การตรึงไนโตรเจน

เกิดจากการทำหน้าที่ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) ซึ่งบางชนิดอยู่ใน heterocyst แต่บางชนิดมีปะปนอยู่ใน vegetative cell ซึ่งพวกหลังจะตรึงไนโตรเจนได้น้อยกว่า และต้องอยู่สภาพไร้อากาศ (anaerobic condition)

เอนไซม์ไนโตรจีเนส ประกอบด้วย โปรตีนที่มีโมลิปดินัม และเหล็ก (Mo-Fe Protein) เรียก azofermo และส่วนโปรตีนที่มีเหล็ก (Fe Protein) เรียก azofer เป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (ที่มา:Richards, 1997)

ซึ่งปฏิกิริยาที่กระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส เขียนได้ดังสมการ

$$N_2 + 6e^- + 12ATP + 8H^+ \xrightarrow{N_2ase} 2NH_4^+ + 12ADP + 12Pi$$

$$2H^+ + 2e^- + 4ATP \longrightarrow H_2 + 4ADP + 4Pi$$

นั่นคือ การลดออกซิเจนของก๊าซไนโตรเจน 1 โมเลกุล ใช้อิเล็กตรอน (ผ่านมาทางเอนไซม์ไนโตรจีเนส) จำนวน 6 อิเล็กตรอน ใช้ ATP 12 mole หรือ อิเล็กตรอนไหลผ่าน 1 อิเล็กตรอน อาศัยพลังงาน 2 ATP ได้แอมโมเนีย 2 mole และก๊าซไฮโดรเจน ที่เหลือ 2 โปรตอน ถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสให้กลายเป็นก๊าซไฮโดรเจนถูกปลดปล่อยจากเซลล์ต่อไป (สมศักดิ์, 2541)

การแพร่กระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สมถวิล (2531) ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในดินนา 4 ภาค พบว่ามีการแพร่กระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินค่อนข้างสูงในบริเวณภาคเหนือและภาคกลาง รองลงมาคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนภาคใต้มีการแพร่กระจายน้อยที่สุด โดยพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 12 สกุล ได้แก่ *Anabaena*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Fisherella*, *Gloeotrichia*, *Hapalosiphon*, *Mastigocladus*, *Nostoc*, *Rivularia*, *Scytonema*, *Stigonema* และ *Tolypothrix*

ประกิต (2536) ได้สำรวจการแพร่กระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในตัวอย่างดินทั่วประเทศประมาณ 1,000 ตัวอย่าง พบ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ 14 สกุล 254 สายพันธุ์ ดังนี้ *Anabaena*, *Aulosira*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Fisherella Gloeotrichia*, *Hapalosiphon*, *Mastigocladus*, *Nostoc*, *Stigonema*, *Scytonema*, *Rivularia Tolypothrix* และ *Westiellopsis* สำหรับพื้นที่ในจังหวัดมหาสารคาม ขอนแก่น กาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด และบุรีรัมย์ พบว่า

มีการแพร่กระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ดีและพบได้บ่อย 7 ชนิด คือ *Anabaena ambique*, *A. oscillaroides*, *A. iyengarii*, *N. ellipsosporum*, *N. spongiaeform*, *N. paludosum* และ *Aphanizomenon flos-aquae* (สุมลวรรณ และคณะ ,2538)

ในการศึกษาประชากรสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในดินในระบบนิเวศที่ต่างกันของ อภิชาติ (2544) พบว่า จากตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ทั้งหมด 853 ตัวอย่างที่เก็บจากตัวอย่างดินในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้นพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล *Nostoc* และ *Anabaena* เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งพื้นที่ที่ทำการเกษตรที่ใช้สำหรับปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องและปลูกพืชไร่สลับข้าวมีปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมากกว่าบริเวณพื้นที่ภูเขาและที่รกร้างว่างเปล่า โดยในพื้นที่ทำการเกษตรจำนวนประชากรสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงฤดูฝน และลดลงเมื่อถึงหน้าแล้ง ส่วนพื้นที่อื่นไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมากนัก

จากการสำรวจการแพร่กระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในนาข้าว อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งหมด 3 อันดับ 6 วงศ์ 20 สกุล 66 ชนิด ได้แก่ *Aphanocapsa* spp., *Chroococcus* spp., *Eucapsis* sp., *Gloeothece* sp., *Merismopedia* spp., *Lyngbya* spp., *Oscillatoria* spp., *Phormidium* sp., *Pseudanabaena* spp., *Spirulina* spp., *Anabaena* spp., *Cylindrospermopsis* sp., *Cylindrospermum* spp., *Raphidiopsis* sp., *Nostoc* spp., *Scytonema* spp., *Calothrix* spp., *Gleotrichia* spp., *Hapalosiphon* sp. และ *Stigonema* sp. (ทวีเดช, 2544)

Watanabe (1951) ได้รายงานการแพร่กระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากดินนาหลายแห่งคือ สุมาตรา บอร์เนียว ฟิลิปปินส์ มลายู อินโดจีน พม่า ฟอร์โมซ่า ญี่ปุ่น ซัคคาริน จีน และไทย พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศเพียง 13 ชนิดเท่านั้น โดยทั้งหมดอยู่ในอันดับ Nostocales และ Kolte and Goyal (1985) รายงานว่าพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอย่างหนาแน่นในบริเวณดินนาบริเวณ Vidarbha ของรัฐ Maharashtra ประเทศอินเดีย ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Anabaena* และ *Nostoc* ซึ่ง Venkataraman (1975) กล่าวไว้เช่นเดียวกันว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 2 สกุลนี้จะพบในทุกหนทุกแห่ง แต่ในบริเวณทะเลทราย Sahara จากการศึกษาไม่ค่อยพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากดิน (Compere ,1985)

นิเวศวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในนาข้าว

นิเวศวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในนาข้าว พบว่า ระยะก่อนน้ำท่วม จะเป็นพื้นที่โล่งรับแสงเต็มที่ หลังจากน้ำท่วม ดินจะมี pH ต่ำ ทั้งไม่มีใบพืชคลุม ทำให้แสงมีความเข้มมากที่ผิวน้ำ และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์อื่น เป็นสภาพที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไม่ชอบ แต่สาหร่ายสีเขียวและไดอะตอมเจริญเติบโตได้ดี ทำให้สาหร่าย

สีเขียวแกมน้ำเงินเจริญได้น้อย ในระหว่างเพาะปลูก ความเข้มแสงลดลง ปริมาณไนโตรเจนลดลงตามการเจริญเติบโตของต้นข้าว และดินมี pH เพิ่มสูงขึ้น เป็นสภาพที่เหมาะต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สำหรับช่วงสุดท้ายของการเพาะปลูก พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีปริมาณลดลง ซึ่งนาข้าวจะมีใบข้าวคลุมพื้นที่ แสดงว่า แสงเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

การให้ไนโตรเจนที่ตรึงได้ต่อข้าว

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะปลดปล่อยไนโตรเจนในรูป exudation และในรูปของแอมโมเนียมไนโตรเจนซึ่งได้จากการสลายตัวเมื่อเซลล์ตายแล้ว

ไนโตรเจนเหล่านี้ข้าวสามารถนำใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลผลิต นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังสร้างสารช่วยการเจริญเติบโตให้กับต้นข้าวอีกด้วย ซึ่งก็คือสารประกอบประเภทฮอร์โมนและสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน (amino acid) มีรายงานว่าการแช่เมล็ดข้าวในน้ำที่สกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะช่วยให้เมล็ดงอกรากและต้นเร็วขึ้น และต้นกล้าโตเร็ว ช่วยเพิ่มน้ำหนักและปริมาณโปรตีนของเมล็ดข้าวอีกด้วย ซึ่งมีผลคล้ายกับเมล็ดที่แช่ด้วย gibberellic acid หรือ Vitamin B12 ซึ่งพบว่ามีอยู่ในเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 1.5 ไมโครกรัม/กรัม (Venkataraman, 1968; อ้างโดย สมพร, 2539)

นอกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้ว ยังพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถปรับปรุงสมบัติของดินให้ดีขึ้นได้ด้วย Roychoudhury *et al.* (1979) พบว่า การใส่สาหร่ายลงไปในดินมีผลต่อการจับตัวกันเป็นก้อนของเม็ดดิน ซึ่งเมื่อดินจับตัวเป็นก้อน จะมีผลต่อการซึมของน้ำ การถ่ายเทอากาศและอุณหภูมิดินดีขึ้น การทดลองกับดินชนิดต่าง ๆ โดยการใส่สาหร่ายลงไปพบว่า ดินประเภท Sandy loam จะมีการจับตัวเป็นก้อนเพิ่มขึ้น 85% Loam 130% และ Silty clay loam 160% และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Chroococcus* sp. และ *Phormidium* sp.ช่วยป้องกันหน้าดินไม่ให้พัง รักษาความชุ่มชื้นของดิน (Dawson, 1966; อ้างโดยสมถวิล, 2531) Echlin (1996) รายงานว่า การใส่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินลงไปในดินนอกจากจะช่วยทำให้ปริมาณไนโตรเจนในดินเพิ่มขึ้น ยังช่วยเพิ่มอินทรียวัตถุและความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน ทำให้ดินที่เคยไร้ประโยชน์ปลูกพืชได้

ได้มีการทดลองนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไปใช้ในนาข้าวในหลาย ๆ ประเทศ พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทำให้ข้าวมีการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตได้เพิ่มขึ้น Samal and Kannaiyan (1996) ได้ทดลองนำเอา *Anabaena azollae* ที่แยกได้จาก *Azolla filiculoides* (AS-K4) และ *Azollae microphylla* สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (AS-S1) , *Anabaena* (FL) และ *Nostoc* (FL)

โดยใช้ polyurethane foam เป็น carrier สำหรับใช้ในนาข้าว พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทำให้ข้าวเจริญเติบโต และให้ผลผลิตสูง โดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้จาก *A. microphylla*

สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในประเทศไทย พงศ์เทพ และคณะ (2530) ได้ทำการศึกษาผลของปุ๋ยชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินผสม 4 สายพันธุ์ คือ *Anabaena siamensis*, *A. lutea*, *Nostoc* sp. No. 46, *Nostoc* sp. No. 79 กับข้าวพันธุ์ กข. 23 ซึ่งปลูกในดินนา 4 ตัวอย่าง คือ ดินรังสิต, ดินโคกสำโรง, ดินสกลนคร และดินสุรินทร์ ปรากฏว่า ปุ๋ยชีวภาพมีผลทำให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือ น้ำหนักแห้งของเมล็ดข้าว และปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้นด้วย

พงศ์เทพ และประเสริฐ (2531) ทำการทดลองปลูกข้าวพันธุ์ กข. 23 ในพื้นที่เกษตรกร อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี โดยใส่ปุ๋ยฟอสเฟต อัตรา 6 กิโลกรัม/ไร่ ปุ๋ยชีวภาพจากสาหร่าย (ประกอบด้วย *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. *Gloeotrichia* sp. *Hapalosiphon* sp.)ในช่วงระยะปักดำ พบว่า ข้าวที่ได้รับปุ๋ยชีวภาพมีผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้าวมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบต่ำ สำหรับข้าวที่ไม่ได้รับปุ๋ยชีวภาพ จะสร้างส่วนของต้นและใบมาก มีเมล็ดลีบมาก ต่อมาในปี พ.ศ. 2532 พงศ์เทพ และคณะ ได้ทดสอบปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยสาหร่าย 5 สายพันธุ์ คือ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Hapalosiphon* sp., *Fisherella* sp. และ *Calothrix* sp. ในไร่นาของเกษตรกร ที่จังหวัดปุทมธานี โดยใช้ปุ๋ยชีวภาพ ในอัตรา 10 กิโลกรัม/ไร่ โดยหว่านในระยะปักดำ ผลการทดลองพบว่า การใส่ปุ๋ยชีวภาพร่วมกับปุ๋ยเคมีสามารถเร่งการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตข้าว ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ยชีวภาพ 18%

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ได้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ ที่ประกอบไปด้วยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena* sp., *Calothrix* sp. *Cylindrospermum* sp., *Hapalosiphon* sp., *Nostoc* sp., *Scytonema* sp. และ *Tolypothrix* sp. ซึ่งเมื่อนำไปทดลองในแปลงเกษตรกร จ.นครปฐม และปทุมธานี พบว่า ข้าวเจริญเติบโตได้ดี เมล็ดข้าวโต มีเมล็ดลีบน้อย ผลผลิตเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 10-25% (พงศ์เทพ และคณะ, 2536)

สมพรและคณะ (2534) ได้ทำการทดลองเพื่อหาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตข้าว กข. 23 โดยปลูกข้าวในกระถางใส่ดินนึ่งฆ่าเชื้อ ใส่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 5 ชนิด คือ *Anabaena oryzae*, *Aulosira* sp., *Calothrix* sp., *Nostoc* sp. และ *Tolypothrix*sp. ปรากฏว่า การใส่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทำให้ข้าวมีจำนวนเมล็ดดีและน้ำหนักเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้น 12-26% แต่ในสภาพแปลงทดลองที่อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียง 3-5% เท่านั้น สาเหตุที่ผลการทดลองใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในกระถางดีกว่าในแปลงทดลอง อาจเนื่อง

มาจากการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในกระถางดีกว่า เพราะสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้

อานนท์ และคณะ (2540) ได้ทำการศึกษาโดยนำปุ๋ยชีวภาพจากสถาบันวิจัยฯ ดังกล่าวข้างต้น ทดลองในนาข้าวแล้วพบว่า ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตข้าวได้อย่างชัดเจน ทั้งที่ใช้อย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่ำ และการทดลองที่ใช้ปุ๋ยชีวภาพดังกล่าวในดินนาชุดสันทราย มี pH 7.1 ในอัตรา 10 และ 100 เท่าของอัตราแนะนำ พบว่า ทำให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นจากการไม่ใส่ปุ๋ยเพียง 7% และ 8% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากการไม่ใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ศรีวุฒิ, 2535)

สมศักดิ์ (2536) ได้ทำการแยกเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากดินกรดดอยสะเก็ด และนำมาเปรียบเทียบกับปุ๋ยชีวภาพดังกล่าว (วท.) นั้น พบว่า เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 7.8 เป็นเวลา 1 เดือน มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน คือ เชื้อที่แยกได้ (*Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp.) ให้น้ำหนักมากกว่าสาหร่ายจากปุ๋ยชีวภาพดังกล่าวประมาณ 2 เท่า ($P < 0.02$)

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นได้ว่า ในการนำเอาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมาใช้ประโยชน์นั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สภาพแวดล้อมในระบบนิเวศของการทำนาข้าว ซึ่งบางครั้งทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไม่สามารถเจริญเติบโตอย่างมากได้, ประสิทธิภาพในการใช้ไนโตรเจนที่ตรึงได้ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินของต้นข้าว เพราะโดยปกติข้าวจะใช้ไนโตรเจนด้วยประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าพืชอื่น

การสะสมไนโตรเจนในพืชส่วนใหญ่ได้มาจาก 2 ทางด้วยกัน คือ จากไนโตรเจนที่มีอยู่ในดิน ซึ่งดินมักขาดไนโตรเจนมากกว่าธาตุอื่น ๆ และไนโตรเจนที่ใส่เพิ่มลงไปในดินในรูปของปุ๋ยเคมีหรืออินทรีย์วัตถุต่าง ๆ ซึ่งการใช้วิธีการวิเคราะห์ดิน เพื่อวัดปริมาณของไนโตรเจนในดินที่จะเป็นประโยชน์ต่อพืชนั้นข้อมูลที่ได้มีค่าไม่แน่นอน เนื่องจากธาตุไนโตรเจนมักจะเกิดการสูญหายได้อย่างรวดเร็วในระหว่างที่ทำการเก็บตัวอย่างดิน ในการติดตามดูว่าไนโตรเจนที่ใส่ลงไปในดินนั้น พืชจะสามารถดูดซับขึ้นไปได้มากน้อยเพียงใด สามารถทำได้โดยใช้ไอโซโทปไนโตรเจน (^{15}N) Allison (1966) และ Nishigaki (1970) ได้รายงานว่า ผลจากการใช้ ^{15}N ในการศึกษาพฤติกรรมของธาตุไนโตรเจน นอกจากจะมีคุณสมบัติประจำตัวแล้ว การใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถจะติดตามผล และทำการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องขึ้น ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ลงไป รวมทั้งการกระจายไปสะสมยังส่วนต่าง ๆ ของพืช

ไอโซโทปของธาตุไนโตรเจน

ไอโซโทป (isotope) คือ นิวไคลด์ที่มีอะตอมมิคนัมเบอร์ (atomic number) เดียวกันแต่มีแมสนัมเบอร์ (mass number) ต่างกัน โดย อะตอมมิคนัมเบอร์ (atomic number) สัญลักษณ์ คือ Z หมายถึง จำนวนทั้งหมดของโปรตอนในนิวเคลียสหรือจำนวนทั้งหมดของอิเลคตรอนในวงโคจร

รอบนิวเคลียส เป็นลักษณะเฉพาะตัวของแต่ละธาตุ สำหรับ แมสนัมเบอร์ (mass number) หรือน้ำหนักอะตอม ใช้ M เป็นสัญลักษณ์ คือ ผลรวมระหว่างจำนวนโปรตรอนและนิวตรอน ซึ่งแมสนัมเบอร์เป็นดัชนีของมวลอะตอม

จะเห็นได้ว่า ไอโซโทป เป็นรูป (form) ต่าง ๆ ของธาตุเดียวกัน โดยรูปเหล่านี้มีความแตกต่างกันเล็กน้อย ไอโซโทปของธาตุเดียวกัน มีสมบัติทางเคมี และลักษณะเฉพาะตัวเหมือนกัน ไอโซโทปมีอยู่ 2 ชนิด คือ ไอโซโทปกัมมันตรังสี (radioactive isotope) ซึ่งมีกัมมันตรังสี และไอโซโทปเสถียร (stable isotope) ซึ่งไม่มีกัมมันตรังสี

ไอโซโทปของธาตุไนโตรเจน (ตารางที่ 1) แบ่งเป็น ไอโซโทปกัมมันตรังสี (radioactive isotopes) เช่น ^{12}N, ^{13}N, ^{16}N และ ^{17}N ซึ่งมีครึ่งชีวิต (half life) สั้นมาก จึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นตัวติดตามพฤติกรรม และการแปรสภาพของธาตุไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงใช้ไอโซโทปเสถียร (stable isotope) ซึ่งได้แก่ ^{14}N และ ^{15}N ซึ่งในธรรมชาติมี ^{14}N มากที่สุด คือ 99.634 atom% และ ^{15}N 0.366 atom% ซึ่งจะเป็นสัดส่วนที่คงที่ (นพรัตน์และวิทยา, 2534) หากทำให้ระบบหรือสารที่ต้องการศึกษามีสัดส่วนระหว่าง ^{15}N และ ^{14}N แตกต่างจากสัดส่วนตามธรรมชาติของระบบนั้น ก็สามารถทำให้ติดตามการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนในระบบนั้นได้ โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของ ^{15}N

ตารางที่ 1 แสดงไอโซโทปของไนโตรเจนและสมบัติบางประการ

รายการ	ไอโซโทป					
	^{12}N	^{13}N	^{14}N	^{15}N	^{16}N	^{17}N
1.ครึ่งชีวิต	0.011 วินาที	10.13 + 0.1 นาที	เสถียร	เสถียร	7.35+0.005 วินาที	4.14+0.04 วินาที
2.รังสีที่แผ่	β^+, α	β^+	ไม่มี	ไม่มี	β^-, γ	β^-, η
3.ปริมาณในธรรมชาติ (at.%)	ไม่มี	ไม่มี	99.635	0.365	ไม่มี	ไม่มี
4.น้ำหนักนิวไคลด์	12.0187	13.0057	14.0031	15.001	16.0061	17.0139

ที่มา : Semat, 1966; Littlefield and Thorley, 1968 และ Krell, 1976; อ้างโดย อำนาจ, 2531

สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ได้จากการทดลอง เพื่อนำไปวัดหาปริมาณ ^{15}N นั้น มีอยู่ 2 วิธี ได้แก่ Kjeldahl-Rittenberg Oxidation คือ การย่อยตัวอย่างที่ได้ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น ซึ่งมีการเติม hydrogen peroxide หรือ ตัวเร่งที่เหมาะสม (catalysts) ในการย่อยอินทรีย์วัตถุ เพื่อให้ได้ NH^{+}_{4} สำหรับการเปลี่ยนเป็น N_2 ทำได้โดย Rittenberg-method โดยใช้ alkaline sodiumhypobromite solution (NaOBr) เป็นตัว oxidize นั่นเอง และอีกวิธีคือ Dumas-dry combustion method โดยนำตัวอย่างไปเผาที่อุณหภูมิสูงกว่า 450 ^{0}C ในเตาเผาที่ปิดสนิทไม่มีไนโตรเจน จากอากาศเจือปน โดยใช้ copper oxide (CuO) และ calcium oxide (CaO) ด้วย หลังจากการเตรียมตัวอย่างแล้ว นำตัวอย่างที่เปลี่ยนรูปเป็นก๊าซไนโตรเจนที่มีอัตราส่วนระหว่าง $^{15}N/^{14}N$ อยู่นั้น ไปวัดหาปริมาณ ^{15}N โดยใช้เครื่องมือ คือ emission spectrometer และ mass spectrometer

เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง emission spectrometer กับ mass spectrometer พบว่า การใช้ emission spectrometer ไม่จำเป็นต้องใช้สภาพที่มีสูญญากาศสูง และการใช้ การติดตั้ง และการควบคุมมีความยุ่งยากน้อยกว่าแต่มีความแม่นยำ เที่ยงตรงน้อยกว่า mass spectrometer (Hardason, 1990)

การวัดปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้โดยขบวนการทางชีวภาพโดยใช้ปุ๋ยที่ติดฉลากด้วย ^{15}N แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีทางตรง (direct method) ทำได้โดยแทนที่ $^{14}N_2$ ที่จะถูกตรึงด้วย $^{15}N_2$ ทั้งหมดหรือบางส่วน แล้ววัดปริมาณ $^{15}N_2$ ที่ถูกแปรเปลี่ยนเป็นไนโตรเจนที่รวมกับธาตุอื่น หรือวัดปริมาณ $^{15}N_2$ ที่หายไปจากอากาศ ซึ่งต้องสร้างห้องครอบพืช แล้วปรับสภาพแวดล้อมภายในห้องให้เหมือนกับสภาพธรรมชาติ Mohr *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาในถั่ว alfalfa (*Medicago sativa*) ซึ่งปลูกใน chamber ที่มี ^{15}N พบว่า ที่ระยะเก็บเกี่ยว ต้นถั่วสะสมไนโตรเจนในรูป ^{15}N ประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่ามี ^{15}N บางส่วนอยู่ในดินประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์

อีกวิธีคือ วิธีทางอ้อม (indirect method) โดยใช้ ^{15}N-dilution technique หลักการคือ ไนโตรเจนที่ได้จากการตรึง ทำให้ ^{15}N ในพืชเจือจางลงเมื่อเทียบกับ ^{15}N ในพืชมาตราฐาน ซึ่งหากไม่ใช้พืชชนิดและพันธุ์เดียวกันกับพืชที่ตรึงไนโตรเจน ต้องมีลักษณะที่สำคัญคือ มีระบบรากที่คล้ายคลึงกับพืชที่ตรึงไนโตรเจน โดยมีการแผ่รากลงไปในดินที่ระดับความลึกเดียวกัน แต่ไม่ตรึงไนโตรเจน มีระยะเวลาการเจริญเติบโตจนถึงระยะสุกแก่ (maturity) และอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละช่วงอายุ รวมทั้งมีการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมเหมือนกับพืชที่ตรึงไนโตรเจนนั่นเอง (วิโรจ, 2524) โดยจะต้องทำให้อัตราส่วน $^{15}N/^{14}N$ ในดินสูงกว่าในบรรยากาศ โดยการใส่ปุ๋ยที่ติดฉลากด้วย ^{15}N ลงไปในดิน

Ledgard *et al.* (1985) ได้ทำการศึกษาในถั่ว *Trifolium subterraneum* L. Woogenellup และ *Lolim rigidum* L. Wimmera เป็นพืชเปรียบเทียบ โดยใช้ปุ๋ยโซเดียมไนเตรตที่มี ^{15}N เป็นองค์ประกอบ พบว่า ถั่วสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 95% และการศึกษาในทำนองเดียวกันใน

ถั่วเหลืองพบว่า การใช้ *Rhizobium japonicum* strain G1A101 เป็นผลให้ต้นถั่วเหลืองสะสมไนโตรเจนที่ตรึงได้ประมาณ 38-70% (Rennie *et al.*, 1982 และจันทนา และคณะ, 2541)

สำหรับการศึกษาไนโตรเจนที่ได้จากขบวการทางชีวภาพ สามารถหาปริมาณการตรึงไนโตรเจนจากอากาศในพืช (N_{fix}) ได้จาก

$$N_{fix} = \frac{\%Ndfa}{100} \times N_p$$

โดย N_p = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในพืช

%Ndfa = %ไนโตรเจนในพืชที่ได้จากไนโตรเจนที่ตรึงได้จากอากาศ

หาได้จาก

$$\%Ndfa = \frac{(1 - \%\ ^{15}N \text{ atom excess ของพืชที่ตรึงไนโตรเจน})}{\%\ ^{15}N \text{ atom excess ของพืชมาตรฐาน}} \times 100$$

และอีกวิธีหนึ่งในการวัดการตรึงไนโตรเจนโดยขบวนการทางชีวภาพทำได้โดย อาศัยปริมาณ ^{15}N ในธรรมชาติ (natural abundant) (อำนาจ, 2531) ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยหลักการของ Isotope dilution technique (วิธีทางอ้อม) โดยไม่มีการใส่ปุ๋ยติดฉลากด้วย ^{15}N แต่อาศัยปริมาณ ^{15}N ในธรรมชาติของดิน ซึ่งสูงกว่าปริมาณ ^{15}N ในธรรมชาติของบรรยากาศแทน เพื่อให้เกิดความแตกต่างด้านปริมาณ ^{15}N ในดินและในบรรยากาศ จึงต้องเลือกดินที่มีปริมาณ ^{15}N ตามธรรมชาติแตกต่างจากบรรยากาศมากพอ

ในการศึกษาการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ที่อยู่บริเวณรากพืชนั้น Robert *et al.* (1983) ได้ทดสอบ *Azotobacter paspali* กับหญ้า *Paspalum notatum* cv. Batatais โดยใส่ $(^{15}NH_4)_2SO_4$ ทุกเดือนเป็นเวลา 12 เดือน พบว่า พืชสะสมไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงของ *Azotobacter paspali* ประมาณ 8-25%

Lethbridge and Devidson (1983) รายงานว่า การใช้ *Azospirillum brasilense* sp. 107 ร่วมกับการปลูกข้าวโพดสายพันธุ์ Cadet ที่ถูกติดฉลากด้วย ^{15}N ในเมล็ดก่อนปลูก ครบ 14 สัปดาห์ พบว่า การใช้เชื้อที่ตายแล้วได้ผลผลิตเมล็ด 2.19 กรัมต่อต้น มี ^{14}N 13.1 มิลลิกรัมต่อต้น และมี ^{15}N 5.18 มิลลิกรัมต่อต้น ส่วนการใช้เชื้อที่มีชีวิตอยู่ ได้ผลผลิตเมล็ด 2.06 กรัมต่อต้น มี ^{14}N 13.0 มิลลิกรัมต่อต้น และมี ^{15}N 5.26 มิลลิกรัมต่อต้น โดยพบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง

ที่ตายแล้วและมีชีวิตอยู่ จะได้ผลผลิตและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบมากกว่าการปลูกแบบไม่ใส่เชื้อ

ในการศึกษาประสิทธิภาพของปุ๋ยไนโตรเจนในกระถางทดลอง ทำได้โดยใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ติดฉลากด้วย ^{15}N แทนปุ๋ยไนโตรเจนธรรมดา สำหรับการศึกษาในแปลงทดลองเพื่อประเมินผลผลิตด้วย นิยมแบ่งแปลงทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เก็บข้อมูลด้านผลผลิตพืช และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่พืชดูดไปใช้ และแปลงไอโซโทป (isotope subplot) เพื่อศึกษาปริมาณ ^{15}N ที่สะสมในพืชและในดิน โดยสูตรมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณประสิทธิภาพของปุ๋ย (Fertilizer Use Efficiency, FUE) หรือสัดส่วนของธาตุอาหารในปุ๋ยที่พืชดูดไปใช้ (อำนาจ, 2531) ได้แก่

$$\text{ประสิทธิภาพของปุ๋ย (\%FUE)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่พืชดูดจากปุ๋ย}}{\text{ปริมาณทั้งหมดของไนโตรเจนในปุ๋ยที่ใส่}} \times 100$$

Yanagiswa *et al.* (1967) พบว่า การใส่ปุ๋ย ^{15}N เป็นปุ๋ยรองพื้นก่อนหว่านเมล็ดข้าว ข้าวสามารถนำไนโตรเจนไปใช้ได้เพียง 7.2 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าใส่ที่ระยะที่มีการไขน้ำเข้านาเป็นครั้งแรก, ระยะแตกกอ, ระยะออกดอก และ 15 วันก่อนระยะที่ข้าวจะออกรวง ข้าวสามารถนำ ^{15}N ขึ้นไปใช้ได้ 25, 44, 49 และ 55 เปอร์เซ็นต์ และการใส่ปุ๋ย ^{15}N เป็นปุ๋ยแต่งหน้าที่ระยะข้าวออกดอก พบว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ของ ^{15}N ไปสะสมอยู่ที่ช่อดอก เช่นเดียวกับปุ๋ย ^{15}N ที่ข้าวนำขึ้นไปใช้ในระยะแรกก็จะมีการสะสมอยู่ในลำต้นหรือใบ ไม่ว่าปุ๋ยไนโตรเจนที่ใช้จะเป็น $^{15}NH_4^+$-N , $^{15}NO_3^-$-N แต่ $^{15}NH_4^+$-N จะมีปริมาณมากกว่า $^{15}NO_3^-$-N ประมาณ 2 เท่า (Muhamud and Kumazawa, 1972)

ประสาน (2517) ได้ทดลองกับข้าวพันธุ์ กข.1 โดยใช้ ($^{15}NH_4)_2SO_4$ 1 และ 4 % at. excess เพื่อวัดปริมาณ ^{15}N ที่ข้าวนำไปใช้ในระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโต ผลการทดลองพบว่า การแบ่งใส่ปุ๋ย ^{15}N เป็นระยะมีแนวโน้มทำให้น้ำหนักของรวง จำนวนเมล็ดทั้งหมดต่อรวง เมล็ดดีต่อรวง น้ำหนักเมล็ดดีต่อรวงเพิ่มขึ้น โดย ^{15}N สะสมในฟางสูงสุดที่ระยะข้าวออกรวง สะสมอยู่ในเมล็ดสูงสุดในระยะเก็บเกี่ยว การใส่เป็นปุ๋ยแต่งหน้าที่ระยะ 7 วันก่อนกำเนิดช่อดอก ทำให้ข้าวนำ ^{15}N ทั้งหมดไปใช้ได้อัตราสูงสุด

Zhi-Hong Cao *et al.* (1984) ได้ทำการประเมินผลการใช้ไนโตรเจนจากปุ๋ยของข้าว (*Oryza sativa*) พบว่า การใช้ ^{15}N USG (urea super granules) แบบหยอดเป็นหลุม ในอัตราปุ๋ยไนโตรเจน 1 กิโลกรัมต่อเมล็ดข้าว 51 กิโลกรัม ให้ผลผลิตสูงสุด และมี ^{15}N ในเมล็ดและฟางข้าว 75% และ 65% ในฤดูแล้ง และฤดูฝน ตามลำดับ

Snitwongse *et al.* (1988) ทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยไนโตรเจน ซึ่งติดฉลากด้วย 5% atom ^{15}N excess พบว่า ข้าวได้รับปุ๋ยไนโตรเจนจาก urea super granules (USG) 50% และ sulphur coated urea (SCU) 31% มากกว่าปุ๋ย ammonium sulphate, ammonium chloride และยูเรียธรรมดา และพบว่ามีไนโตรเจนสูญหายไปประมาณ 13-24 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการศึกษาถึงประสิทธิภาพของปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ร่วมกับอินทรียวัตถุในนาข้าว โดยวิธีไอโซโทปไนโตรเจน พบว่า การใช้ฟางข้าว ทำให้พืชดูดไนโตรเจนไปใช้ได้ 25 เปอร์เซ็นต์ มีการสูญเสียไนโตรเจน 3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนอย่างเดียว พืชดูดไนโตรเจนไปใช้ 50.6 เปอร์เซ็นต์ และมีการสูญเสีย 22 เปอร์เซ็นต์ และการใส่แหนแดงที่ระยะ 42 วันหลังปักดำ ร่วมกับยูเรียที่ใส่ในระยะก่อนปักดำ 1 วันนั้น ประสิทธิภาพของไนโตรเจนในพืชมีเพียง 39 เปอร์เซ็นต์ และมีการสูญเสีย 11 เปอร์เซ็นต์ (นพรัตน์ และวิทยา, 2534)

Kai *et al.* (1988) แสดงให้เห็นว่าในนาข้าวน้ำขังในประเทศแถบเอเชีย ต้นข้าวจะใช้ไนโตรเจนจากฟางข้าวประมาณ 44-56 เปอร์เซ็นต์ ในการปลูกข้าวครั้งที่ 1 (หลังการใช้ฟางข้าว) ในการปลูกครั้งต่อไปต้นข้าวจะใช้ไนโตรเจนจากฟางข้าวประมาณ 12-15 เปอร์เซ็นต์ และในการปลูกข้าวหนที่ 3 ต้นข้าวจะได้ไนโตรเจนจากฟางข้าวประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ และการดูดใช้ไนโตรเจนจากฟางข้าวโดยต้นข้าวจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ไนโตรเจน

Prayoon *et al.* (1988) ได้มีการศึกษาการใช้ไอโซโทปไนโตรเจนเพื่อดูดการเคลื่อนย้ายไนโตรเจนไปยังต้นข้าว พบว่า การใส่ปุ๋ยยูเรียที่ติดฉลากด้วย ^{15}N จะให้ % ^{15}N recovery มากที่สุด คือ 73-79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใส่แหนแดงที่ติดฉลากด้วย ^{15}N เป็นปุ๋ยพืชสดนั้น ให้ % ^{15}N recovery 33-40 เปอร์เซ็นต์ และการคำนวณค่าของไนโตรเจนที่ข้าวได้จากปุ๋ยยูเรียหรือแหนแดง (%NdfF) ผลผลิตไนโตรเจน (N-yield) และประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยของข้าว (% Recovery) คำนวณจากสมการดังนี้

$$\%NdfF = \frac{\%\ ^{15}N \text{ atom excess ในพืช}}{\%\ ^{15}N \text{ atom excess ของปุ๋ย}} \times 100$$

$$\text{Fertilizer N-Yield} = \frac{\%NdfF}{100} \times \text{total N-yield } (N_p)$$

$$\%\ \text{Recovery} = \frac{\text{Fertilizer N-Yield}}{\text{Fertilizer N-applied}} \times 100$$

ซึ่งเทคนิคการศึกษา ^{15}N balance ในการศึกษาค้นคว้าเรื่องปุ๋ย ให้ข้อมูลเฉพาะปริมาณปุ๋ยที่ถูกนำไปใช้โดยต้นพืช และส่วนที่สูญหายไป แต่ไม่ได้ข้อมูลถึงลักษณะการสูญหาย

สำหรับการใช้ ^{15}N ศึกษาการสะสมไนโตรเจนจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกับต้นข้าวนั้น Wilson *et.al.* (1980) ได้ทำการทดลองในข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Aulosira* 68 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มี KNO_3 อยู่ 0.66 กรัม/ลิตร (31% atom ^{15}N excess) ครบ 29 วัน นำไปอบให้แห้ง พบว่า การใส่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยการฝังที่ระดับลึก 5-7 เซ็นติเมตร จากผิวหน้าดิน มี N recovery 52% และการหว่านสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั่วผิวหน้าดินมี N recovery 37%

Tirol *et al.* (1982) ได้ทำการทดลองโดยใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc* sp. กับข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยผสมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ถูกติดฉลาก ^{15}N (75% atom ^{15}N) กับดินในแปลงทดลอง พบว่า ความสามารถดูดซับของ ^{15}N จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน อยู่ระหว่าง 23-28 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูปลูกแรก และ 27-36 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูปลูกที่สอง ส่วนการทดลองในกระถาง นั้น ในฤดูปลูกแรก พบว่า ความสามารถในการดูดซับของไนโตรเจนของข้าวจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินน้อยกว่าการใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ แต่ในฤดูปลูกที่สองนั้นไม่แตกต่างกัน และมี ^{15}N ตกค้างอยู่ในดินประมาณ 57 เปอร์เซ็นต์ และ 30-40 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ตามลำดับ

แม้ว่าวิธีใช้ไอโซโทปจะมีข้อจำกัดในเรื่องของราคาปุ๋ยที่ติดฉลากด้วยไอโซโทป และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่มีราคาค่อนข้างสูง แต่เนื่องจากวิธีการใช้ไอโซโทปไนโตรเจนเป็นวิธีที่ให้ผลการวิจัยมีความถูกต้องแม่นยำสูง ทั้งยังช่วยย่นระยะเวลาการทดลองให้เร็วขึ้นอีกด้วย สามารถเก็บข้อมูลได้ทันทีที่ใส่ ^{15}N และ ^{15}N ไม่มีอันตราย เพราะเป็นสารกัมมันตรังสีที่ไม่ปลดปล่อยรังสีออกมา (stable isotope) ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่นำมาศึกษาประสิทธิภาพของไนโตรเจน และการเคลื่อนย้ายธาตุไนโตรเจนจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการใช้ปุ๋ยอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป