- 6 S.A. 2544

การนำกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย และไรโซเบียมมาใช้เป็นวัสดุปรับปรุงดิน เพื่อเพาะชำกล้าไม้กระถินเทพา

ภูวรักษ์ สมจิตร

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2544

ISBN 974-04-0768-4

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยมหิดล

วพ
ต16ก ก
ว544
ก.ฐ

Copyright by Mahidol University

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การนำกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียและไรโซเบียม
มาใช้เป็นวัสดุปรับปรุงดินเพื่อเพาะชำกล้าไม้กระถินเทพา

.....

นายภูวรักษ์ สมจิตร
ผู้วิจัย

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรพินท์ เอี่ยมศิริ Ph.D.
ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรวดี โรจนกนันท์ วท.ม.
กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

อาจารย์อัจฉรา นันทกิจ Ph.D.
กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัญชลี พงศ์พันธุ์
ศศ.ม. (ภาษาศาสตร์ประยุกต์)
รักษาราชการแทนคณบดี
บัณฑิตวิทยาลัย

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรวดี โรจนกนันท์ วท.ม.
ประธานคณะกรรมการประจำหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม
คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์

Copyright by Mahidol University

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การนำกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียและไรโซเบียม
มาใช้เป็นวัสดุปรับปรุงดินเพื่อเพาะชำกล้าไม้กระถินเทพา

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม
วันที่ 17 กันยายน พ.ศ. 2544

.....

นายภูวรักษ์ สมจิตร
ผู้วิจัย

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรพินท์ เอี่ยมศิริ Ph.D.
ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรวดี โรจนกนันท์ วท.ม.
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

อาจารย์มานัส กลีบทอง วทม.
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

อาจารย์อัจฉรา นันทกิจ Ph.D.
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัญชลี พงศ์พันธุ์
ศศ.ม. (ภาษาศาสตร์ประยุกต์)
รักษาราชการแทนคณบดี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

.....

รองศาสตราจารย์อนุชาติ พวงสำลี Ph.D.
คณบดี
คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์
มหาลัยวิทยาลัยมหิดล

Copyright by Mahidol University

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาจากหลายๆท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ดังนี้คือ

ดร. อรพินท์ เอี่ยมศิริ ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ อาจารย์เรวดี โรจนกนันท์ กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ตลอดจนอาจารย์ของคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความเมตตาช่วยเหลือ และให้คำแนะนำในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขเนื้อหาของงานวิจัยฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ อัจฉรา นันทกิจ นักวิชาการการเกษตรจากสถาบันวิจัยไรโซเบียม กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร ที่ได้เป็นกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ และอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการตลอดจนการแนะนำช่วยเหลือทางวิชาการมาโดยตลอด ขอขอบคุณ คุณศิริรักษ์ จิตรอักษร หัวหน้าห้องปฏิบัติการวิจัยพันธุกรรมไรโซเบียมและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการงานวิจัยไรโซเบียมทุกท่านที่ให้ความเอื้อเฟื้อ และช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์มานัส กลิบทอง นักวิชาการป่าไม้ ประจำส่วนเพาะชำกล้าไม้ สำนักส่งเสริมการปลูกป่าที่ให้คำแนะนำ และปรึกษา และขอขอบพระคุณ คุณวสันต์ เอี่ยมศิริ เจ้าหน้าที่บริหารงานป่าไม้ที่ให้คำแนะนำด้านวิชาการป่าไม้มา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องสมุดคุณฝน ฝ่ายการศึกษา เพื่อนๆ เทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อมรุ่นที่ 24 ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลอง และให้กำลังใจผู้วิจัยมาโดยตลอด

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ภูวรักษ์ สมจิตร

Copyright by Mahidol University

4036823 ENTM/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม ; วท.ม. (เทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ : กากตะกอนแอคติเวตเตด/ สายพันธุ์ไรโซเบียม/ กระถินเทพา

ภูวรักษ์ สมจิตร : การนำกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย และไรโซเบียมมาใช้เป็นวัสดุปรับปรุงดิน เพื่อเพาะชำกล้าไม้กระถินเทพา (APPLICATION OF ACTIVATED SLUDGE AND RHIZOBIUM TO IMPROVE SOIL MEDIUM FOR ACACIA MANGIUM WILD SEEDLING) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: อรพินท์ เอี่ยมศิริ Ph.D., อัจฉรา นันทกิจ Ph.D., เรวดี โรจนกนันท์ วท.ม. (เทคโนโลยีบริหารสิ่งแวดล้อม) , 87 หน้า ISBN 974-04-0768-4

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อนำกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงดิน ร่วมกับไรโซเบียมเพื่อการเพาะชำกล้าไม้กระถินเทพา โดยศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใส่กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย และเชื้อไรโซเบียมที่ได้รับการคัดเลือกแล้วต่อการเจริญเติบโตของกล้ากระถินเทพาที่ได้รับการคัดเลือกจำนวน 2 แม่ไม้ การทดลองนี้ได้ทำการสุ่มตัวอย่างโดยใช้การทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) ซึ่งประกอบไปด้วย 11 ตำรับการทดลองๆละ 4 ซ้ำต่อแม่ไม้ 1 ชนิด แล้วเปรียบเทียบผลการทดลอง ทั้งด้านความสูง ความโตที่คอราก น้ำหนักแห้งรวม อัตราการตรึงไนโตรเจน และเปอร์เซนต์ไนโตรเจนของกระถินเทพา รวมทั้งเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจากการทดลอง โดยวิธีการทางเซรุ่มวิทยาและวิธี Enzyme - Linked Immunosorbent Assay สำหรับข้อมูลที่ได้นำมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้ Duncan S Multiple Range Test (DMRT)

จากผลการทดลองพบว่า โดยภาพรวมแล้วพบว่าแม่ไม้สงขลาตอบสนองต่อการใช้กากตะกอนดีกว่าแม่ไม้นครราชสีมา โดยให้ชีวมวลเกือบเท่ากับการใช้ออสโมโคท (ร้อยละ 88) และอัตราส่วนของดินต่อกากตะกอนที่ดีที่สุด คือ อัตราส่วน 1:2 ซึ่งการใช้ไรโซเบียมร่วมด้วยไม่มีความจำเป็น เพราะไรโซเบียมมีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปมต่ำในแม่ไม้นี้ อย่างไรก็ตาม การใช้ไรโซเบียมมีผลต่อแม่ไม้นครราชสีมาซึ่งประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมมีมากกว่า สำหรับไรโซเบียมที่ใช้นั้นพบว่า สายพันธุ์ DASA 35076 และ DASA 35080 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับกระถินเทพา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DASA 35080 สามารถเข้าสร้างปมได้มากกว่า จึงเหมาะต่อการนำมาใช้ในการเพาะชำกล้าไม้กระถินเทพา นอกจากนั้นจากการทดลองยังพบว่าในกรณีของการใช้กากตะกอนร่วมกับไรโซเบียมนี้ไม่ควรใช้ร่วมกับกากตะกอนที่ผสมในดินเกินกว่าร้อยละ 50 เพราะการเจริญเติบโตของกล้าไม้จะลดลงเมื่อใช้ตะกอนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโลหะหนักไปยับยั้งการทำงานของไรโซเบียม จะเห็นได้ว่าการนำกากตะกอนไปใช้ในการปรับปรุงดินนั้นสามารถใช้ได้ในการเพาะชำกระถินเทพา และแม่ไม้สงขลานั้นมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการเพาะชำเพื่อเผยแพร่พันธุ์มากกว่าแม่ไม้นครราชสีมา

Copyright by Mahidol University

4036823 ENTM/M : MAJOR: TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL MANNAGEMENT
M.Sc. (TECHNOLGY OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT)
KEY WORDS : ACTIVATED SLUDGE / ACACIA MANGIUM WILD/ RHIZOBIUM

PHUWARUG SOMCHIT : APPLICATION OF ACTIVATED SLUDGE AND RHIZOBIUM TO IMPROVE SOIL MEDIUM FOR ACACIA MANGIUM WILD SEEDLING. THESIS ADVISOR: AURAPIN EAMSIRI,Ph.D, ADCHARA NANTAKIT,Ph.D, .REVADEE ROJCHANAKANAN,M.Sc..87p. ISBN 974-04-0768-4

The purpose of this work is to study applying activated sludge derived from wastewater treatment plant and incorporating it with *Rhizobium* strain to adjust the soil fertility for *Acacia mangium* planting. The study also examined the relationship between using different ratios of activated sludge and *Rhizobium* strains that are screened for enhancing the growth of two types of *Acacia mangium*. from Songkhla and Nakhonratchasima.

A randomized complete block design was used in this experiment consisting of eleven treatments, four replications and noninoculated without nitrogen as the control. The measurements were commonly observed, that of height, diameter at root corla, biomass and nitrogen fixation rate, as well as percentage of nitrogen content in the shoot. Besides those measurements the effectiveness of nodulation was also determined by means of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Then all the recorded data were statistically processed using Duncan' s Multiple Range Test (DMRT)

The results indicated that *Acacia mangium* of Songkhla type responsed to activated sludge better than Nakhonratchasima type giving yield of biomass (88.0%) close to obtaining from Osmocoat usage. The best ratio of soil and sludge is of 1:2. in which application of *Rhizobium* is unnessary duing to *Rhizobium* nodulation is low. However, *Rhizobium* nodulation efficiency is appeared to be high in Nakhonratchasima type. Among the *Rhizobium* strains used in this experiment it appeared that *Rhizobium strains DASA 35076* and *DASA 35080* dominated the enhancement on *Acacia mangium* growth. Furthermore, the *Rhizobium strain DASA 35080* showed more effectiveness in nodulation than another. Therefore, it should be recommended that *DASA 35080* be used for *Acacia mangium* planting. In addition, experimental results have also showed that in cases of incorporated sludge and *Rhizobium* the ratio of sludge used should not be higher than 50% as the growth of *Acacia mangium* is decreased when the applied sludge is increased. This might be due to the presence of heavy metals, which are toxic, in sludge inhibited *Rhizobium* nodulation.

It can be concluded that activated sludge from domestic wastewater treatment plants is useful to improve soil enhancement for *Acacia mangium* growth. In addition, *Acacia mangium* of the Songkhla type is better than the Nakhonratchasima type for planting

Copyright by Mahidol University

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิทยานิพนธ์	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การตรวจสอบเอกสาร	
2.1 การเจริญเติบโตของต้นไม้	5
2.2 ดินและวัสดุเพาะชำกล้าไม้	6
2.3 กากตะกอนน้ำเสีย	8
2.4 กระถินเทพา	17
2.5 ไรโซเบียม	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การเตรียมการทดลอง	23
3.2 วิธีการทดลอง	25

Copyright by Mahidol University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการวิจัย และวิจารณ์ผล

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อไรโซเบียมและจำแนกสกุล 34

4.2 เปอร์เซนต์การงอกของกระถินเทพา 36

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูง ต่อการเจริญเติบโตกระถินเทพา 36

4.4 การทดสอบ ELISA เพื่อตรวจสอบว่าสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ถูกคัดเลือกมานั้นจัดเป็นกลุ่มเดียวกันหรือไม่ 46

4.5 การหาอัตราส่วน กากตะกอนที่เหมาะสม ร่วมกับการใช้ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้กระถินเทพา 46

4.6 การติดตามและตรวจสอบประสิทธิภาพเชื้อไรโซเบียม โดยศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 61

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล 62

5.2 ข้อเสนอแนะ 63

รายการอ้างอิง 65

ภาคผนวก ก ศูนย์และสถานีเพาะชำกล้าไม้ กรมป่าไม้ 75

ภาคผนวก ข ผลการทดลองเกี่ยวกับสายพันธุ์ และประสิทธิภาพไรโซเบียม 77

ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ 84

ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ ค่า Total Nitrogen โดยวิธี Micro – Kjedahl 86

ประวัติผู้วิจัย 87

Excutive Summary 88

Copyright by Mahidol University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	องค์ประกอบของกากตะกอนน้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆ	9
2-2	องค์ประกอบของกากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานเป๊ปซี่ , เบียร์และสุรา	11
3-1	แสดงวิธีการเตรียมตำรับการทดลองจำนวน 11 ตำรับการทดลอง	29
3-2	แสดงผังตำรับการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) จำนวน 11 treatments 4 replications	30
4-1	ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดินทางเคมี	46
4-2	ผลการวิเคราะห์กากตะกอน	48
4-3	แสดงประสิทธิภาพการเข้าสร้างปมสายพันธุ์ ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูง	61

Copyright by Mahidol University

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
3-1	แสดงตำรับการทดลองโดยใช้ผังการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)	26
3-2	แสดงการฉีดแอนติเจนเจือจางเข้าเส้นเลือดที่ใบหูกระต่าย	32
4-1	รูปร่างลักษณะของเชื้อไรโซเบียมที่ย้อมด้วยสีย้อมคาร์บอลฟูชชิน ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทัศน์	34
4-2	ลักษณะโคโลนีและการจัดกลุ่มตามการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงหรือสูตร Yeast – Manitol Agar (YMA) ที่มี Bromthymol Blue (BTB) เป็น pH Indicator	35
4-3	การจัดกลุ่มไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ว่าเป็นกลุ่มเจริญเร็ว *(Rhizobium)* หรือเจริญช้า	35
4-4	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตกระถินเทพาแม่ไม้ 1 ที่มีปฏิกิริยาต่อสายพันธุ์ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ	38
4-5	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตกระถินเทพาแม่ไม้ 2 ที่มีปฏิกิริยาต่อสายพันธุ์ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ	38
4-6	การชั่งน้ำหนักต้นแห้งกระถินเทพา เมื่อผ่านการอบแห้งโดยตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซนเซียส	39
4-7	แสดงการวิเคราะห์หาไนโตรเจนโดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ	40
4-8	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตกระถินเทพา แม่ไม้ 1 ที่ทำปฏิกิริยากับสายพันธุ์ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ	42
4-9	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตกระถินเทพา แม่ไม้ 2 ที่ทำปฏิกิริยากับสายพันธุ์ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ	44
4-10	แสดงการวิเคราะห์หาไรโซเบียมที่อยู่ในดินโดยวิธี MPN	47
4-11	แสดงการวัดความโตตำรับการทดลองกล้าไม้กระถินเทพา หลังจากครบ 3 เดือน	50
4-12	แสดงการวัดความสูงตำรับการทดลองกล้าไม้กระถินเทพาหลังจากครบ 3 เดือน	51
4-13	แสดงการเจริญเติบโตกล้าไม้กระถินเทพา ตำรับการทดลองต่าง ๆ ของแม่ไม้ 1	54

Copyright by Mahidol University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

4-14 แสดงการเจริญเติบโตกล้าไม้กระถินเทพา ตำรับการทดลองต่าง ๆ ของแม่ไม้ 2 54
4-15 แสดงการเจริญเติบโตเฉลี่ยของกล้าไม้กระถินเทพาแม่ไม้ 1 ตำรับการทดลองต่าง ๆ 55
4-16 แสดงการเจริญเติบโตเฉลี่ยของกล้าไม้กระถินเทพา แม่ไม้ 2 ตำรับการทดลองต่าง ๆ 57

Copyright by Mahidol University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ปัญหาการลดลงของพื้นที่ป่าไม้ของประเทศไทยในปัจจุบันยังเป็นปัญหาเรื้อรังยากต่อการแก้ไขโดยที่ในปี พ.ศ. 2531 มีพื้นที่ป่าไม้ทั่วประเทศ 143,803 ตารางกิโลเมตร คิดเป็นพื้นที่ร้อยละ 28.03 ของประเทศ จนกระทั่งในปี พ.ศ.2541 พื้นที่ป่าไม้ลดลงเหลือเพียง 129,722 ตารางกิโลเมตร คิดเป็น ร้อยละ 25.28 ของพื้นที่ประเทศ รัฐบาลได้ตระหนักถึงความสำคัญของการลดลงของพื้นที่ป่า จึงได้มีการปลูกป่าเพื่อเพิ่มพื้นที่ ซึ่งจากอดีตจนถึงปัจจุบัน กรมป่าไม้ในฐานะหน่วยงานที่รับผิดชอบสามารถปลูกป่าได้เพียง 8,741.22 ตารางกิโลเมตร (1) จึงยังมีความจำเป็นเร่งด่วนในการปลูกป่าพื้นที่ต่างๆ เช่น พื้นที่ป่าอนุรักษ์ที่เป็นป่าเสื่อมโทรม พื้นที่ป่าชุมชน วนเกษตร หรือพื้นที่ปลูกป่าเศรษฐกิจภาครัฐและเอกชน โดยจะต้องใช้กล้าไม้ที่มีความสมบูรณ์ แข็งแรง ทนทาน มีการเจริญเติบโตดี คือมีขนาดความโต ความสูง ที่เหมาะสมในระยะเวลาอันจำกัดก่อนนำไปปลูก ซึ่งจะต้องอาศัยเทคนิค วิธีปฏิบัติการอันละเอียดรอบคอบ

การเพาะชำกล้าไม้ของกรมป่าไม้ได้มีการเพาะกล้าไม้ป่าแจกจ่ายให้แก่โครงการปลูกป่าต่างๆ เช่นโครงการปลูกป่าถาวรเฉลิมพระเกียรติ โครงการป้องกันการแพร่กระจายของดินเค็ม โครงการ วนศาสตร์ชุมชน และนอกจากนี้ยังแจกจ่ายให้แก่ประชาชนทั่วไป ในปี พ.ศ. 2543 มีศูนย์เพาะชำกล้าไม้ของกรมป่าไม้มีจำนวน 13 ศูนย์ และสถานีเพาะชำกล้าไม้จำนวน 66 สถานี พบว่าวัสดุที่เป็นตัวกลางในการเพาะชำได้แก่ หน้าดิน และวัสดุเหลือใช้ที่หาง่ายในท้องถิ่น มีปริมาณและคุณภาพของธาตุอาหารที่กล้าไม้ต้องการค่อนข้างต่ำแตกต่างกันตามลักษณะพื้นที่นั้นๆ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของกล้าไม้แต่ละชนิดซึ่งต้องการธาตุอาหารไม่เหมือนกัน สำหรับดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ มีลักษณะกายภาพไม่ดี ควรให้มีการปรับปรุงคุณสมบัติของดินด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใส่ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมักรวมถึงอินทรีย์วัตถุลงในดินเพื่อเพิ่มธาตุอาหารรวมถึงทำให้คุณสมบัติของดินดียิ่งขึ้น

Copyright by Mahidol University

จากเหตุผลดังกล่าวการหาแหล่งอินทรียวัตถุซึ่งมีราคาถูกหรือเป็นวัสดุเหลือใช้จากขบวนการผลิตใด ๆ มาใช้เพื่อลดต้นทุนในการเพาะชำกล้าไม้จึงเป็นสิ่งจำเป็นและจากสภาพปัจจุบันที่ประเทศได้มีการขยายตัวทางเศรษฐกิจเพิ่มมากขึ้นประกอบกับจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้นด้วย และทำให้มีการปล่อยน้ำเสียลงสู่สิ่งแวดล้อมซึ่งจากการศึกษาปริมาณน้ำเสียที่ปล่อยออกจากโรงงานอุตสาหกรรมในรูปของ บี.โอ.ดี. ในปี 2534 พบว่า มีปริมาณถึง 0.5 ล้านตันต่อปี (เฉลี่ยเท่ากับน้ำโสโครกจากประชากร 27 ล้านคน) โดยร้อยละ 33 เกิดจากโรงงานน้ำตาล ร้อยละ 24 จากโรงงานสุรา เบียร์ และเครื่องดื่ม และร้อยละ 16 จากโรงงานกระดาษ และภายในปี พ.ศ. 2539 ปริมาณน้ำเสียจากภาคอุตสาหกรรมจะสูงขึ้น 0.73 ล้านตัน บี.โอ.ดี.ต่อปี ซึ่งเทียบเท่ากับน้ำโสโครกจากประชากร 40.5 ล้านคน จะเห็นได้ว่าร้อยละ 57 เป็นปริมาณน้ำเสียเกิดจากอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มเป็นส่วนใหญ่ (2) จากการศึกษากากตะกอนแอคติเวตเตดจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มพบว่ามีศักยภาพเพียงพอต่อการนำมาใช้ประโยชน์ ในการเป็นแหล่งธาตุอาหารพืช โดยรพีพร (3) ได้ทดลองใช้กากตะกอนแอคติเวตเตดจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารนำมาผสมกับดินสำหรับปลูกทำให้ผักกาดหอมมีผลผลิตเพิ่มมากขึ้นเทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมี โดยมีการสะสมของโลหะหนักในปริมาณที่ไม่เป็นพิษต่อพืชและสุขภาพคน

จากการศึกษาชนิดไม้ที่นำมาเพาะชำโดยทั่วไปนั้นพบว่า ไม้ป่าชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการปลูกป่า ได้แก่ กระถินเทพา เนื่องจากกระถินเทพาสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินหลายประเภท มีความทนทานต่อดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ซึ่งในการป่าไม้ได้นำเอากระถินเทพามาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านในลักษณะไม้เอนกประสงค์ และด้านหนึ่งก็คือ ช่วยในการปรับปรุงดิน หรือเป็นไม้เบิกนำในพื้นที่ป่าเสื่อมโทรม เพราะกระถินเทพาช่วยในการตรึงไนโตรเจน โดยกระถินเทพามีกิจกรรมพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล Rhizobium โดยแบคทีเรียจะช่วยในการดูดธาตุไนโตรเจนจากอากาศในดินสะสมในส่วนต่างๆของพืช ซึ่งในการจัดการไรโซเบียมที่จะเข้าสู่รากของกระถินเทพาควรเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสม ให้ประโยชน์ในการตรึงไนโตรเจนสูงสุดในสภาพแวดล้อมนั้นๆ

ดังนั้นหากนำกากตะกอนแอคติเวตเตดที่เป็นวัสดุเหลือใช้ ที่จะต้องนำไปกำจัดซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมมาใช้ในการเพาะชำกล้าไม้พืชยืนต้นมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมมากกว่าแล้ว ก็น่าจะทำให้สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกล้าไม้ได้มากยิ่งขึ้น โดยจะศึกษาถึงอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างดินกับกากตะกอนแอคติเวตเตด และไรโซเบียมต่อความต้องการของกล้าไม้ที่ใช้ในการเจริญเติบโตอย่างไรก็ตามไรโซเบียมสายพันธุ์ที่เหมาะสมจะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของกระถินเทพาและความอุดมสมบูรณ์ของดินด้วย จากเหตุผลดังกล่าวจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการวิจัยเพื่อหาสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงมาใช้ในการตรึง

Copyright by Mahidol University

ไนโตรเจนและอัตราส่วนของดินและกากตะกอนที่เหมาะสมต่อความต้องการในการเจริญเติบโตของกระถินเทพา

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิทยานิพนธ์

ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ดังนี้ คือ

1.2.1 เพื่อทดสอบและคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมไม้กระถินเทพาที่มีประสิทธิภาพ ในการตรึงไนโตรเจน และให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงตลอดจนติดตามผลการใช้ไรโซเบียมเหล่านั้นว่าเป็นสายพันธุ์ดีจริงหรือไม่

1.2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดจากโรงงานอุตสาหกรรมเบียร์ เชื้อไรโซเบียมที่ได้รับการคัดเลือกแล้ว ต่อการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตมวลชีวภาพไม้กระถินเทพา

1.3 ขอบเขตการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้กำหนดขอบเขตการศึกษาไว้ดังนี้

1.3.1 ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ดินที่ใช้ในการเพาะชำกล้าไม้ของสถานีเพาะชำกล้าไม้ กรมป่าไม้ โดยใช้ชุดดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำและมีการผลิตกล้าไม้ปริมาณมาก ซึ่งได้แก่ ดินในชุดดินKorat (Kt)

1.3.2 ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้กากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่มประเภทโรงงานเบียร์ ซึ่งใช้ระบบบำบัดแบบ Activated Sludge โดยกากตะกอนที่ใช้ในการทดลองเป็นกากตะกอนแห้งที่ทำการรีดน้ำออกแล้ว

1.3.3 ใช้เมล็ดไม้สำหรับการเพาะชำกระถินเทพาซึ่งเก็บตามหลักวิชาการ โดยสำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้

1.3.4 ไรโซเบียมที่ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์เป็นเชื้อไรโซเบียมของกระถินเทพาที่เก็บจากแหล่งต่างๆจำนวน 39 เชื้อ

Copyright by Mahidol University

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่ได้จากการวิจัยนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ดังต่อไปนี้

1.4.1 สามารถนำกากตะกอนแอคติเวตเตต ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาประยุกต์ใช้ในงานด้านป่าไม้ซึ่งจะช่วยในการพัฒนาเทคนิคด้านการเพาะชำให้มีประสิทธิภาพ โดยสามารถปรับปรุงคุณภาพของดินให้มีความอุดมสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เช่น การเพิ่มธาตุอาหารพืช ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้

1.4.2 สามารถพัฒนาเทคนิคที่เหมาะสมมาใช้ในการทดสอบคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพได้

1.4.3 สามารถเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใส่กากตะกอนการ ใส่เชื้อไรโซเบียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้กระถินเทพาและเปรียบเทียบการเจริญเติบโตกับการใช้ปุ๋ยตามวิธีการของกรมป่าไม้

1.4.4 สามารถเก็บรวบรวมสายพันธุ์ไรโซเบียมกระถินเทพาจากแหล่งต่าง ๆ ไว้ใช้ในการผลิตในอนาคตได้

Copyright by Mahidol University

บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสาร

2.1 การเจริญเติบโตของต้นไม้

การเจริญเติบโตของต้นไม้เป็นการค่อย ๆ เพิ่มขึ้นของสิ่งมีชีวิต โดยกระบวนการธรรมชาติซึ่งพิจารณาได้จากปริมาณที่เพิ่มขึ้น ลักษณะทางกายวิภาค ลักษณะสัณฐานและลักษณะทางสรีรวิทยา (4) พงษ์ศักดิ์ (5) กล่าวว่า การเจริญเติบโตของต้นไม้ คือ กระบวนการสะสมและเพิ่มพูนเซลล์ใหม่ขึ้นมาแบบเดียวกับสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์แต่ถ้าพิจารณาอย่างละเอียดแล้ว การเจริญเติบโตมีความหมายอยู่ 2 ประการ คือ การเพิ่มพูนขนาดและสร้างส่วนใหม่ ๆ ขึ้นมา (6) กล่าวคือ การเจริญเติบโตของพืชจะเกี่ยวข้องทั้งการเจริญเติบโต (Growth) และการพัฒนา (Development) การเจริญเติบโตเป็นการเปลี่ยนแปลงด้านปริมาณซึ่งย้อนกลับไม่ได้ ส่วนการพัฒนาเป็นการเปลี่ยนแปลงด้านคุณภาพรูปร่างและลักษณะซึ่งไม่สามารถวัดออกมาในเชิงปริมาณได้ทุกกรณีแต่สามารถสังเกตเปรียบเทียบหรือวิเคราะห์ได้ การเจริญเติบโตและการพัฒนาเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นต่อเนื่องกันแต่ในบางครั้งการเจริญเติบโตก็มีขอบเขตอยู่เพียงการเพิ่มพูนของขนาดซึ่งตรงกับคำ "Increment" หรือ "Accretion" เท่านั้น (6,7)

การเจริญเติบโตของต้นไม้เป็นผลสืบเนื่องมาจากการกระทำร่วมกันของสิ่งแวดล้อมกับลักษณะทางพันธุกรรมของต้นไม้แต่ละชนิด ปัจจัยสิ่งแวดล้อมดังกล่าวแบ่งได้ 2 ประเภท คือ ปัจจัยคงที่ ได้แก่ สมบัติของดิน สภาพภูมิประเทศและปัจจัยผันแปร ได้แก่ ลักษณะภูมิอากาศและการแข่งขัน (8) ซึ่งสอดคล้องกับ Toumey (6) ได้กล่าวไว้ว่า การเจริญเติบโตแตกต่างกันไปตามลักษณะภายในของต้นไม้แต่ละชนิดและอิทธิพลภายนอก Hocker (9) เน้นว่าปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของต้นไม้แต่ละชนิดได้แก่ อายุ ความหนาแน่นของจำนวนต้นและสภาพท้องที่ซึ่ง Carmean (10) ชี้ว่า การเจริญเติบโตในระยะแรกมีผลจากหลายปัจจัยเช่นการแก่งแย่งธาตุอาหารและแสง ระยะปลูกที่ทำให้ต้นไม้แก่งแย่งธาตุอาหารและน้ำมักเกิดขึ้นในช่วงต่อมาของการเจริญเติบโต ส่วนWalter (11) ได้ระบุว่าระยะเวลาในการปลูก สภาพภูมิอากาศขณะทำการปลูก วิธีการปลูกและการปฏิบัติดูแลรักษาภายหลังการปลูกเป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งต่อการเจริญเติบโตของต้นไม้ด้วย

Copyright by Mahidol University

สิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของต้นไม้ได้แก่ น้ำ สารอาหาร สารประกอบพวกไนโตรเจน เกลือแร่ธาตุ ฮอร์โมน วิตามิน และสารอื่น ๆ อีกหลายอย่าง อัตราการเจริญเติบโตของต้นไม้จึงขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวย ความสามารถในการใช้ประโยชน์จากสภาพแวดล้อมนั้น ๆ ของต้นไม้เองซึ่งเป็นลักษณะประจำทางพันธุ์ ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของต้นไม้ ได้แก่ แสง น้ำ อุณหภูมิ ธาตุอาหาร องค์ประกอบของบรรยากาศ เหนือ และใต้พื้นดิน คุณสมบัติทางฟิสิกส์ และเคมีของดิน แมลง พืชและสัตว์ต่างๆ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีการกระทำร่วมยากที่จะจำแนกได้ว่าปัจจัยใดสำคัญที่สุด

การเจริญเติบโตของต้นไม้สามารถแสดงได้ด้วยเส้นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับขนาดหรือการเจริญเติบโตสะสมมีลักษณะเป็นรูป "S" ที่เรียกว่า Sigmoid Curve ซึ่งสามารถแบ่งกราฟออกได้เป็น 3 ส่วน คือ มีลักษณะเว้าส่วนล่าง เรียบส่วนกลาง และนูนส่วนบน ส่วนแรกเป็นระยะเริ่มต้นของการเจริญเติบโต (Formative Period) ปกติช่วงนี้จะสั้น ส่วนที่สองเป็นระยะที่มีการเพิ่มพูนอย่างรวดเร็ว (Grand Period of Growth) ซึ่งช่วงนี้ยาวกว่าช่วงแรก ส่วนที่สามเป็นระยะที่โตเต็มที่ (Period of Maturity) ระยะนี้มีการเจริญเติบโตน้อย แต่เป็นช่วงที่ยาวนานที่สุดและผันแปรที่สุดทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากการมีชีวิตที่ยืนยาวแตกต่างกันออกไปของไม้แต่ละชนิด การรู้ถึงการเจริญเติบโตเป็นแนวทางสำคัญประการหนึ่งต่อการจัดการป่าและวัดความเพิ่มพูน หรือการเจริญเติบโตที่สุด อีกวิธีหนึ่งก็คือการวัดในรูปของน้ำหนัก (12) และยังนิยมวัดในรูปขนาดอีกด้วย

2.2 ดินและวัสดุเพาะชำกล้าไม้

ดิน คือ วัสดุขั้นพื้นฐานที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ดินเป็นวัตถุธรรมชาติที่ได้มาจากการสลายตัวของหินแร่ชนิดต่าง ๆ ผสมคลุกเคล้ากับเศษซากอินทรียวัตถุที่เน่าเปื่อยผุพัง ดินเป็นวัตถุที่สำคัญที่จะช่วยให้พืชเจริญเติบโต หรือยังชีพอยู่ได้ (13) เราสามารถคาดคะเนความสมบูรณ์ของดินจากผลการวิเคราะห์ดิน และสามารถประเมินความสมบูรณ์ของดินโดยสมบัติทางเคมีบางประการ ซึ่งจากการตรวจสอบดินศูนย์เพาะชำกล้าไม้ 13 แห่ง และสถานีเพาะชำกล้าไม้ สังกัดกรมป่าไม้ 66 สถานี โดยใช้รายงานการสำรวจดิน ของกรมพัฒนาที่ดิน พบว่า มีชุดดินและระดับความอุดมสมบูรณ์ที่เหมือน และแตกต่างกันออกไป ส่งผลต่อคุณภาพการผลิตกล้าไม้ของแต่ละหน่วยงาน จากภาคผนวก ก-1 ซึ่งได้แสดงถึงชุดดินและความอุดมสมบูรณ์ของดินของหน่วยงานเพาะชำกล้าไม้กรมป่าไม้ไว้ปรากฏว่าจากดินของสถานีทั้งหมด 79 สถานีมี 55 ชุดดินโดยร้อยละ 60 (33 ชุดดิน) เป็นดินที่ระดับความอุดมสมบูรณ์ต่ำและคิดเป็นจำนวนถึง 52 สถานีหรือร้อยละ 65.8 ดินเหล่านี้

Copyright by Mahidol University

ปรากฏว่าเป็นชุดดินโคราชมากที่สุดถึงร้อยละ 19.2 (10 สถานี) และรองลงมาคือ ชุดดินร้อยเอ็ด ปรากฏร้อยละ 15.4 (8 สถานี) และยังพบว่ามีศูนย์และสถานีเพาะชำกล้าไม้ใช้ชุดดิน Korat (Kt) ซึ่งเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ แต่มีการเพาะชำกล้าไม้มากที่สุดกล่าวคือมี จำนวนถึง 12,575,000 กล้า ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำดินชุดนี้มาใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับปรุงให้ดินมีคุณภาพที่ดีเหมาะสม

วัสดุเพาะชำเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอย่างยิ่งในการเพาะชำกล้าไม้เพราะวัสดุเพาะชำเป็นตัวช่วยในการพยุงลำต้นให้กับกล้าไม้ ให้อากาศเป็นที่เก็บอาหารและน้ำเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของกล้าไม้ การศึกษาถึงวัสดุเพาะชำที่เหมาะสมจะช่วยให้การเตรียมกล้าไม้มีประสิทธิภาพและประหยัดค่าใช้จ่ายอีกด้วย สมเพียร (14) ได้สรุปคุณสมบัติของวัสดุเพาะชำที่ดีในการปลูกไม้ดอกไม้ประดับว่าควรมีสมบัติดังนี้คือโปร่ง อุ้มน้ำได้ดีพอสมควร ไม่เน่าเปื่อยผุพังเร็วจนเกินไปมีปริมาณเกลือแร่ต่ำ ราคาถูก สะอาดปราศจากโรคแมลงตลอดจนสารพิษเจือปน มีความสม่ำเสมอไม่เป็นกรดหรือด่างจัดและหาง่าย นอกจากคุณสมบัติดังกล่าวแล้วในทางป่าไม้ซึ่งมีความจำเป็นต้องขนย้ายกล้าไม้ไปปลูกในพื้นที่ไกล ๆ หรือพื้นที่กันดารที่ที่เป็นภูเขาสูงชัน การเลือกใช้วัสดุเพาะชำที่มีน้ำหนักเบาสามารถจับยึดกับรากได้ดีในภาชนะเพาะชำที่มีขนาดเล็กจะช่วยให้การขนส่งกล้าไม้ได้ปริมาณมากขึ้น ช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย สุคนธ์ และคณะ (15)ได้ศึกษาส่วนผสมที่เหมาะสมสำหรับกล้าไม้แต่ละชนิดพบว่า จะแตกต่างกันออกไปตามคุณสมบัติของดิน และวัสดุผสมที่หามาได้ในพื้นที่นั้นๆ

ยุภา (16) ได้ศึกษาอิทธิพลของปุ๋ยและวัสดุเพาะชำต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้กระถินเทพาอายุ 4 เดือน โดยใช้วัสดุเพาะชำ 4 ชนิด คือ ดิน ขุยมะพร้าว ดินผสมกับขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 และ 1 : 2 ตามลำดับ ใช้ปุ๋ยออสโมโค๊ท 4 ระดับคือ 0 , 0.4 , 0.8 และ 1.2 กรัม และใช้ปุ๋ยเกล็ดเชลล์ 2 ระดับ คือ ไม่ใส่และใส่ปุ๋ยเกล็ดเชลล์ 15 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร พบว่าชนิดของวัสดุเพาะชำระดับปุ๋ยออสโมโค๊ทและปุ๋ยเกล็ดเชลล์มีผลต่อความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก มวลชีวภาพรวมและพื้นที่ใบของกล้าไม้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยไม่ใส่ปุ๋ยเกล็ดเชลล์ในวัสดุเพาะชำขุยมะพร้าวที่ระดับออสโมโค๊ท 1.2 กรัมให้ความสูงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก มวลชีวภาพรวมและพื้นที่ใบของกล้าไม้มากที่สุดเท่ากับ 38.45 ซม. , 0.34 ซม. , 2.16 กรัมและ 149.33 ตร.ซม. ตามลำดับ โดยเสียค่าใช้จ่าย 45.05 สตางค์ต่อกล้า และเมื่อใส่ปุ๋ยเกล็ดเชลล์วัสดุเพาะชำขุยมะพร้าวที่ระดับปุ๋ยออสโมโค๊ท 0.8 กรัม ให้ค่าความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง มวลชีวภาพรวมและพื้นที่ใบของกล้าไม้สูงที่สุดเท่ากับ 55.90 ซม. , 0.44 ซม. , 4.10 กรัม และ 306.49 ตร.ซม. เสียค่าใช้จ่าย 43.95 สตางค์ต่อกล้า โดยที่ปุ๋ยออสโมโค๊ทระดับต่าง ๆ ในวัสดุเพาะชำขุยมะพร้าวเมื่อใส่ปุ๋ยเกล็ดเชลล์ให้ค่าความ

Copyright by Mahidol University

สูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่คอราก มวลชีวภาพรวมและพื้นที่ใบสูงกว่าเมื่อไม่ได้รดปุ๋ยเกล็ดเชลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.3 กากตะกอนน้ำเสีย

กากตะกอนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นกากตะกอนจากน้ำเสียระบบบำบัดแบบแอคติเวตเตดสลัดจ์

2.3.1 ลักษณะของกากตะกอน

กากตะกอนแอคติเวตเตด เป็นกากตะกอนที่เกิดจากขบวนการกำจัดน้ำเสียโดยวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ช่วยย่อยสลายแบบใช้อากาศ (Aerobic Method) ซึ่งเป็นระบบกำจัดน้ำเสียที่ใช้เครื่องจักรมาก แต่ใช้พื้นที่ในการกำจัดน้ำเสียน้อยกว่าวิธีอื่นๆ(17) กากตะกอนแอคติเวตเตดมีลักษณะเหลวเละเหมือนโคลนมีสีดำคล้ำเมื่อตากให้แห้งจะเป็นก้อนแข็งดำ ซึ่ง Adams (18) กล่าวว่ากากตะกอนแอคติเวตเตด เป็นกลุ่มของตะกอนพวกสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ที่ต้องการออกซิเจน (Aerobic Microorganism) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรีย นอกนั้นก็มีโปรโตซัว (Protozoa) และโรติเฟอร์ (Rotifers)

สำหรับในการศึกษาลักษณะทางเคมีของกากตะกอนได้มีผู้ทำการศึกษามากมายให้ผลที่แตกต่างกันตามแหล่งที่มาของกากตะกอนซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 2-1 กล่าวคือ Anderson (19) ได้ให้ข้อสังเกตว่าในกากตะกอนแอคติเวตเตดมีปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (P_2O_5) อยู่มากแต่มีโพแตสเซียมในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้กากตะกอนแอคติเวตเตดยังมีความเป็นกรดมากทั้งนี้เนื่องมาจากการใช้ Feric Chloride ($FeCl_3$) เป็นสารทำให้ตกตะกอน ในขณะที่ Menzies และ Chaney (20) กล่าวสรุปว่า กากตะกอนแอคติเวตเตดส่วนใหญ่จะมีผลรวมไนโตรเจนเฉลี่ยประมาณร้อยละ 6.2 และ Sommers (21) ได้กล่าวว่าในกากตะกอนแอคติเวตเตดมี ผลรวมฟอสฟอรัสร้อยละ 1.2-3

Yoshida (22) ได้วิเคราะห์กากตะกอนแอคติเวตเตดจากโรงงานผลิตอาหารจำนวน 26 โรงงาน พบว่ามีไนโตรเจนทั้งหมดประมาณร้อยละ 3.84-11.41 ฟอสฟอรัสร้อยละ 1.7-8.62 โพแตสเซียมร้อยละ 0.06-2.01 ต่อมา Yoshida and Yoneyama (23) ได้วิเคราะห์กากตะกอนจากโรงงานต่าง ๆ ใน

Copyright by Mahidol University

เมือง Hanamuro ประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีปริมาณคาร์บอนทั้งหมดโดยเฉลี่ยร้อยละ 17.0 – 40.2 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 2.83 – 6.48 และมีค่า C/N Ratio เท่ากับ 5.21 – 9.01

Sommers et al. (24) ได้เก็บตัวอย่างกากตะกอนแอคติเวตเตดจากแหล่งต่าง ๆ ในช่วงระหว่างปี1974 – 1975 มาทำการวิเคราะห์ธาตุอาหารต่าง ๆ พบว่า กากตะกอนแอคติเวตเตดประกอบด้วยคาร์บอนร้อยละ 50 ส่วนใหญ่อยู่ในรูปอินทรีย์สารมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 1.26–4.33 และอยู่ในรูปของ NH_4^+-N มากกว่าร้อยละ 90 ฟอสฟอรัสมีประมาณร้อยละ 1.1 – 2.4 โพแตสเซียมมีประมาณร้อยละ 0.3 – 0.6 ปริมาณไนโตรเจนส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปที่จะปลดปล่อยให้แก่พืชได้ และในปี 1977 Sommers (21) ก็ได้ทำการสำรวจอีกโดยเก็บตัวอย่างกากตะกอนจากโรงงานต่าง ๆ จำนวน 150 โรงงานมาวิเคราะห์พบว่า มีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแตสเซียมใกล้เคียงกัน คือ ไนโตรเจนทั้งหมดในกากตะกอนจะมีค่าคงที่ในช่วงร้อยละ 2 – 4 และพบว่าไนโตรเจนส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ NH_4^+-N ส่วน NO_3-N จะพบหลังจากทำให้แห้ง ฟอสฟอรัสทั้งหมดจะมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 1.2-3.0 โดยที่ร้อยละ 10 – 30 ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในกากตะกอนจากกระบวนการ Aerobic Digestion จะอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ฟอสฟอรัส

ส่วน Epstein (25) ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากตะกอนจากโรงงาน Blue Plains Wastewater Treatment Plant พบว่า มีปริมาณคาร์บอนร้อยละ 31 ไนโตรเจนร้อยละ 3.8 ฟอสฟอรัสร้อยละ 1.46 โพแตสเซียมร้อยละ 0.19 แคลเซียมร้อยละ 1.39 และแมงกานีสร้อยละ 0.41 ดังตารางที่ 2-1 นอกจากนี้ยังพบว่า องค์ประกอบทางเคมีของกากตะกอนผันแปรตามประเภทของโรงงานและวิธีการกำจัดน้ำเสีย ส่วนปริมาณธาตุอาหารหลักของพืช คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแตสเซียม ที่มีอยู่ในกากตะกอนไม่ค่อยแปรผันมากนัก

ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบของกากตะกอนน้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆ

คุณสมบัติของกากตะกอน	Yoshida (1976)	Yoshida and Yoneyama (1978)	Sommer et al. (1976)	Sommer (1977)	Epstein (1978)
N (%)	3.84 – 11.41	2.83 – 6.48	1.26 – 4.33	2.0 – 4.0	3.8
P (%)	1.70 – 8.62	-	1.10 – 2.40	1.2 – 3.0	1.46
K (%)	0.06 – 2.01	-	0.3 – 0.6	-	0.19
C (%)	-	17.0 – 40.2	50.0	-	31.0
C/N Ratio	-	5.21 – 9.01	-	-	-

ที่มา: *Yoshida (23) , Yoshida and Yoneyama (24) , Sommer et al. (25) , Sommer (22), Epstein (26)*

Copyright by Mahidol University

สำหรับประเทศไทยจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากตะกอนแอคติเวตเตดจากโรงงานเครื่องดื่มเป๊ปซี่ พบว่ามี pH 7.4 ไนโตรเจนร้อยละ 3.64 ฟอสฟอรัสร้อยละ 1.89 โปตัสเซียมร้อยละ 0.40 แคลเซียมร้อยละ 3.00 แมกนีเซียมร้อยละ 0.40 กำมะถัน 0.37 ppm แมงกานีส 10.80 ppm ทองแดง 112.2 ppm อลูมิเนียม 7,782 ppm สังกะสี 490 ppm ตะกั่ว 400 ppm และแบเรียม 11 ppm (21) ในขณะที่ ทัศนีย์ (22) พบว่าในกากตะกอนแอคติเวตเตดจากโรงงานเครื่องดื่มเป๊ปซี่มีอินทรียสารคาร์บอนร้อยละ 82 ผลรวมไนโตรเจนร้อยละ 3.25 ผลรวมฟอสฟอรัสร้อยละ 1.86 ผลรวมโพแตสเซียมร้อยละ 0.40 นอกจากนี้ได้มีผู้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากตะกอนจากโรงงานเบียร์สุรา และน้ำอัดลมพบว่า มีค่าอยู่ในช่วงต่าง ๆ ดังนี้ pH มีค่าร้อยละ 6.6 – 7.4 ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 2.24 – 5.94 ฟอสฟอรัสร้อยละ 0.34 – 1.89 โปแตสเซียมร้อยละ 0.19 – 0.50 แคลเซียมร้อยละ 0.175 – 3.00 แมกนีเซียมร้อยละ 0.07 – 0.41 ค่า C/N Ratio ร้อยละ 4.4 – 7.0 คาร์บอนร้อยละ 33.4 – 33.7 และปริมาณธาตุอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.2 นิภา(28) สุดใจ (29), ศุภมาศ (30) จากค่าปริมาณธาตุอาหารหลักที่มีผู้ศึกษามาจะเห็นได้ว่าปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแตสเซียม จาก 3 โรงงานมีค่าไม่แตกต่างกันและอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้ กล่าวคือ มีค่า C/N Ratio ต่ำกว่า 20 และมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมากกว่าร้อยละ 2 ซึ่ง Inoko (31) ได้เสนอแนวคิดไว้ว่า ลักษณะของวัสดุเหลือใช้ที่นำมาใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ต้องมีองค์ประกอบดังนี้คือ สารอินทรีย์นั้นต้องมี C/N Ratio ต่ำกว่า 20 และสารอินทรีย์นั้นต้องมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมากกว่าร้อยละ 2 อัตราส่วนระหว่างธาตุคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N) ของกากตะกอนแอคติเวตเตดจะมีผลต่อการย่อยสลาย ซึ่งการย่อยสลายของกากตะกอนแอคติเวตเตดจะขึ้นอยู่กับสมบัติของดิน ความชื้น อุณหภูมิ เวลา และ อัตราที่ใส่ (32) ดังนั้น ในการศึกษาคาดว่ากากตะกอนจากโรงงานเหล่านี้สามารถจะนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร โดยใช้เป็นปุ๋ยสำหรับการเพาะปลูกได้ แม้ว่ากากตะกอนน้ำเสียเหล่านี้จะมีปริมาณของโลหะหนักอยู่ในปริมาณที่สูงกว่ามาตรฐาน แต่ในการวิจัยนี้เราได้นำกากตะกอนไปใช้ในการเพาะปลูกไม้ที่นำไปใช้ประโยชน์ในด้านพลังงานและอื่น ๆ ซึ่งไม่มีการนำไปรับประทานถึงแม้ต้นไม้จะดูดซับเอาโลหะหนักเหล่านี้เข้าไปบ้างก็จะไม่เป็นอันตรายใด ๆ

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 2-2 องค์ประกอบของกากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานเป๊ปซี่ , เบียร์และสุรา

คุณสมบัติของกากตะกอน	โรงงานเป๊ปซี่ (นิภา)[1/]	โรงงานเบียร์ (สุดใจ)[2/]	โรงงานเบียร์ (ศุภมาส)[3/]	โรงงานสุรา (ศุภมาส)[3/]
pH	7.4	6.9	7.0	6.6
N (%)	3.64	2.24	4.70	5.94
P (%)	1.89	0.34	1.25	0.56
K (%)	0.40	0.19	0.50	0.50
Ca (%)	3.00	0.19	0.538	0.175
Mg (%)	0.41	0.07	-	-
S (ppm)	0.37	-	-	-
Mn (ppm)	10.80	210	-	-
Cu (ppm)	112.2	75	-	-
AI (ppm)	7782	-	-	-
Zn (ppm)	490	95	-	-
Pb (ppm)	400	-	-	-
Ba (ppm)	11	-	-	-
Fe (ppm)	-	2000	-	-
O.C. (%)	-	9.9	-	-
C/N ratio	-	4.4	7	6
C (%)	-	-	33.4	33.7

ที่มา :1/ *นิภา (28), 2/สุดใจ(29), 3/ศุภมาส (30)*

2.3.2 อิทธิพลของกากตะกอนแอคติเวตเตดต่อคุณสมบัติของดิน

การใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดที่มี pH เป็นกลางลงดินจะทำให้ pH ของดินเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่ค่า pH ของดินอาจเปลี่ยนแปลงได้โดย pH ของดินอาจลดลงอันเป็นผลสืบเนื่องมาจากการแทนที่ไฮโดรเจนอิออนที่ยึดเกาะในดินของเกลืออนินทรีย์ (33;34) Terry et al. (35) พบว่าอิทธิพลของ pH และระดับความชื้นของดิน มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงไนโตรเจนในดินคือ อัตราการเกิดขบวนการปลดปล่อยไนโตรเจน (Nitrification) จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อผสมกากตะกอน

Copyright by Mahidol University

แอคติเวตเตดกับดินที่มี pH เป็นกลางมากกว่าดินที่มี pH เป็นกรดและขบวนการปลดปล่อยไนโตรเจน จะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วที่ระดับความชื้นของดิน –0.25 บาร์ ถึง 0.5 บาร์ มากกว่าที่ระดับความชื้นของดิน –1.0 บาร์ นอกจากนี้ชนิดของดินก็อาจจะมีผลด้วยดังการทดลองของ Tester et al. (35) พบว่าการปลดปล่อยไนโตรเจนจากกากตะกอนแอคติเวตเตดในดินทรายร่วน ในอัตราร้อยละ 2, 4 และ 6 โดยน้ำหนักจะเพิ่มขึ้นตามอัตราของกากตะกอนแอคติเวตเตดที่เพิ่มขึ้น แต่ถ้าใส่ในดินเหนียวละเอียดเป็นดินเหนียวปนซิลท์ (Silty clay) พบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะน้อยมากคือ มีเพียงร้อยละ 17 ของการสลายตัวจากกากตะกอนในดินทรายร่วน (Loamy sand)

นอกจากนี้กากตะกอนแอคติเวตเตดมีประโยชน์เพื่อปรับปรุงดินทั้งทางด้านคุณสมบัติทางเคมีของดิน เช่น ช่วยปรับสภาพความเป็นกรดของดิน และละลายธาตุอาหารให้แก่พืช ส่วนในระยะยาวการใช้กากตะกอนแอคติเวตเตดเป็นเวลาหลายปี มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของดิน กล่าวคือ ช่วยในการปรับปรุงโครงสร้างของดิน ช่วยเพิ่มความพรุนของดินและช่วยในการอุ้มน้ำของดิน (37) อย่างไรก็ตาม การใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดในอัตราที่สูงเกินไปอาจทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต ลดผลผลิตพืช รวมทั้งเกิดการสะสมโลหะหนักในดินซึ่งจะเป็นพิษต่อพืชและมนุษย์ได้ (38) การเติมกากตะกอนแอคติเวตเตดลงดินเสมือนเป็นการเพิ่มอินทรียวัตถุให้แก่ดิน เนื่องจากกากตะกอนแอคติเวตเตดจะปลดปล่อยธาตุอาหารในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช โดยเฉพาะไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ เป็นต้น (39,40) โดยในการเพิ่มไนโตรเจนในดิน ซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับการเจริญเติบโตของพืช อัตราการย่อยสลายไนโตรเจนอินทรีย์เป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ (Mineralization) จะขึ้นกับปริมาณอินทรีย์วัตถุและอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C : N Ratio) ในกากตะกอน (41) กล่าวคือ อินทรียวัตถุที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับหรือต่ำกว่า 10 : 1 จุลินทรีย์ดินจะสามารถเปลี่ยนอินทรีย์สารไปเป็นอนินทรีย์สารได้ดี ค่าขีดจำกัดสูงสุดสำหรับอินทรีย์วัตถุที่สามารถทำให้เกิดขบวนการเปลี่ยนอินทรีย์สารไปเป็นอนินทรีย์สาร โดยจุลินทรีย์ คือ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30 : 1 ถ้าอัตราส่วนสูงกว่านี้อัตราการสลายตัวของอินทรีย์วัตถุจะเป็นไปได้ช้าหรือเกิดการดูดดึงไนโตรเจนจากดินมาใช้ (Immobilization) (13) Chaussod (42) ได้ยืนยันว่า เมื่อใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมากกว่า 10 : 1 ลงดิน อินทรียวัตถุในกากตะกอนแอคติเวตเตดจะย่อยสลายเปลี่ยนเป็นอนินทรีย์สารได้สารได้ช้า และจะเกิดการดูดดึงไนโตรเจนจากดินมาใช้ชั่วคราวเป็นเวลาถึง 2 เดือน แต่สำหรับกากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียชุมชนโดยทั่วไปจะมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ประมาณ 10 – 12 : 1 และจากโรงงานอุตสาหกรรมและเครื่องดื่มซึ่งมีค่า C/N ประมาณ 4

Copyright by Mahidol University

- 9 : 1 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะมีการนำกากตะกอนแอคติเวตเตดมาใช้ในพื้นที่การเกษตรซึ่งจะไม่ทำให้เกิดการขาดแคลนไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน (43)

2.3.3 อัตราการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตด

การใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดลงดิน มีผลในการปรับปรุงลักษณะทางกายภาพ เคมี ชีวภาพ ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการปรับปรุงโครงสร้างดิน ปริมาณน้ำในดิน และส่งผลต่อผลผลิตของพืช ได้ (44) นั่นคือเมื่อนำกากตะกอนแอคติเวตเตดมาใส่ในพื้นที่การเกษตร กากตะกอนจะทำหน้าที่เป็นทั้งสารปรับปรุงดินและเป็นปุ๋ยสำหรับพืชด้วย (39) ผลผลิตของพืชที่ปลูกบนดินเติมกากตะกอนแอคติเวตเตดจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณกากตะกอนแอคติเวตเตด โดยจะมีอัตราการเติมในช่วง 60-90 เมตริกตันต่อเฮกแตร์ หรือ 9,600-14,400 กิโลกรัมต่อไร่ (45) การเติมกากตะกอนแอคติเวตเตดลงดินนั้น ถ้ามีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอต่อความต้องการของพืชแล้ว ผลผลิตของพืชจะใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยเคมี (46) โดยที่อัตราการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดจะมีผลต่อการเพิ่มธาตุอาหารพืชในดินมากว่าชนิดของกากตะกอนแอคติเวตเตดที่ใส่ลงดิน (47) Kelling *et al.* (45) ได้ทดลองใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดลงดินด้วยอัตรา 3.75 – 60 เมตริกตันต่อเฮกตาร์ (600 – 9,600 กิโลกรัมต่อไร่) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของไนโตรเจนอนินทรีย์ ไนโตรเจนอินทรีย์และฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินภายใน 3 สัปดาห์หลังการทดลอง ไนโตรเจนอินทรีย์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะเปลี่ยนแปลงเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจนอย่างรวดเร็ว และธาตุอาหารที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดลงดิน โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะมีปริมาณมากในส่วนชั้นผิวดิน (48) และจากการศึกษาการปลดปล่อยไนโตรเจนจากกากตะกอนของ Premi และ Comfield (49) พบว่า ปริมาณอินทรียวัตถุกับการปลดปล่อยไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์จากกากตะกอนแอคติเวตเตดมีลักษณะเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงถ้าใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดลงไปในดินในอัตราต่ำ แต่ถ้าใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดในอัตราที่สูงเกินกว่าร้อยละ 2 ของน้ำหนักดิน พบว่า ช่วง 4 สัปดาห์แรกไนโตรเจนถูกปลดปล่อยออกมาน้อย เนื่องจากจุลินทรีย์หยุดชะงักกิจกรรม แต่เมื่อพ้นช่วงเวลานี้ไปแล้วการสลายตัวจะเร็วขึ้น และอัตราการปลดปล่อยไนโตรเจนจะสูงกว่าการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดในอัตราต่ำ Ryan et al. (50) ที่ได้ทดลองใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดผสมกับดินในอัตรา 28 - 141 ppmN พบว่าปริมาณการปลดปล่อยไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นตามอัตราการใส่กากตะกอน แต่ถ้าเพิ่มอัตราการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดจาก 28 ppmN เป็น 141 ppmN การปลดปล่อยไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ภายใน 16 สัปดาห์จะลดลงจากร้อยละ 48 เป็นร้อยละ 4 ของไนโตรเจนทั้งหมดในกรณีงานทดลองของ

Copyright by Mahidol University

Epstein et al. (25) ซึ่งได้ใช้กากตะกอนแห้ง (raw sludge)(ร้อยละ 39.6 C, ร้อยละ 3.55 N) กับดินในอัตรา 0 – 1814 ppmN เป็นเวลา 14 สัปดาห์พบว่า การปลดปล่อยไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นตามอัตราของกากตะกอนแอคติเวตเตต แต่จะมีการสูญเสียไนโตรเจนในรูป NO_3- โดยขบวนการ Immobilization ในช่วง 1 –3 สัปดาห์แรกแต่หลังจากสัปดาห์ที่ 3 ไปแล้วปริมาณการปลดปล่อยไนโตรเจนมีแนวโน้มสูงขึ้น ดังนั้น ในการนำกากตะกอนแอคติเวตเตตไปใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ควรพิจารณาถึงปริมาณการใส่กากตะกอนด้วยเนื่องจากมีผลต่ออัตราการปลดปล่อยไนโตรเจนได้มากน้อยต่างกัน

จากการทดลองของ Sabey et al. (51) ซึ่งใช้กากตะกอนแอคติเวตเตตที่ถูกย่อยโดยขบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจน(Anaerobic Digested Sludge) เป็นปุ๋ยอินทรีย์ในการปลูกข้าวสาลีเปรียบเทียบกับการใส่ปุ๋ยเคมีที่อัตราต่าง ๆ แล้วประเมินค่า N Fertilizer Equivalent ซึ่งเป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตตที่อัตรานั้น ๆ ลงไปในดิน สามารถทำให้ผลผลิตข้าวสาลีได้เท่ากับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนอนินทรีย์ (Inorganic N) ที่อัตราเท่าใด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใส่ในอัตรา 22.4, 56.0, 112.0 และ 224.0 ตัน/เฮกตาร์ (3.61, 9.0, 17.9 และ 35.8 ตัน/ไร่) จะให้ผลผลิตข้าวสาลีเท่ากับการใส่ปุ๋ยเคมีในอัตรา 210, 575, 515 และ 330 กิโลกรัมไนโตรเจน/เฮกตาร์ (33.6, 92.0, 82.4 และ กิโลกรัมไนโตรเจน/ไร่) ตามลำดับ ตามรายงานของ Sabey และ Hart (37) รายงานว่าอัตราที่เหมาะสมของการใส่กากตะกอนน้ำเสีย (sewage sludge) ในดินที่ปลูกข้าวสาลีพบว่าคือ 25 – 50 ตัน/เฮกตาร์ (4 – 8 ตัน/ไร่) โดยผลผลิตจะเพิ่มจากดินธรรมดาโดยเฉลี่ยร้อยละ 36.7

2.3.4 ผลกระทบของกากตะกอนแอคติเวตเตตต่อดิน

ดินที่ใส่กากตะกอนแอคติเวตเตตแล้วมีสภาพเป็นกรดจะมีส่วนในการดูดแคดเมียมของพืชได้มากขึ้น (52) ส่วนดินที่มีสภาพเป็นด่างจะละลายโลหะหนักได้น้อยลง ดังนั้นการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตตแล้วถ้าทำให้ดินเป็นด่างก็จะลดการดูดแคดเมียมลงได้ แต่จากการทดลองของ Robertson et al. (53) พบว่าเมื่อใช้กากตะกอนแอคติเวตเตตที่ย่อยแล้วและเป็นของเหลว (Liquid-digested sludge) ใส่ในดินจำนวนมากพบว่า สารอินทรีย์ร้อยละ 50 ถูกออกซิไดส์เป็นกรดเกิดขึ้นทั้งนี้เพราะสารอินทรีย์ในกากตะกอนแอคติเวตเตตอาจสลายตัวหรือเกิดการเปลี่ยนรูป (Mineralization) ของสารพวกแอมโมเนียให้โปรตอนออกมา Hinesly et al. (54) กล่าวว่ากากตะกอนแอคติเวตเตตสามารถเปลี่ยน pH ของดินจาก 5.6 เป็น 4.9 ในเวลา 2 ปี ดังนั้น pH ซึ่งต่ำขนาดนี้จะทำให้การละลายของโลหะหนักเพิ่มขึ้น (55) แต่อย่างไรก็ตาม Hemphill et al. (56) ได้ทดลองใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต pH จะเปลี่ยนจาก 5.7 เป็น 5.2 แต่สำหรับกากตะกอนแอคติเวตเตตไม่มีผลการ

Copyright by Mahidol University

เปลี่ยน pH ของดินเลย จากการทดลองปลูกข้าวโพดหวานของ Adriano et al. (57) เขาได้แนะนำว่าถ้าใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดอย่างเดียวจะทำให้พืชดูดแคดเมียมมาไว้มากเพราะดินเป็นกรด ดังนั้นให้ใส่ขี้เถ้าลงไปด้วย ขี้เถ้าจะทำให้เกิดด่างช่วยปรับภาวะของดินให้เป็นกลาง พืชจะดูดแคดเมียมได้น้อยลง

Wilson (58) พบว่าบทบาทของกากตะกอนแอคติเวตเตด ในการเป็นตัวเร่งให้มีการเปลี่ยนแปลงไนโตรเจน(nitrifiers) จะลดลงในดินที่ใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดทั้งประเภทที่ได้จากการกำจัดน้ำทิ้งของอาคารบ้านเรือนและจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะกากตะกอนแอคติเวตเตดที่มีโลหะหนักปะปนอยู่หลายชนิด และในปริมาณความเข้มข้นสูงจะลดกระบวนการเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนได้ ซึ่งธาตุโลหะหนักที่ยับยั้งกระบวนการแปรรูปของไนโตรเจนและความสามารถในการยับยั้งกระบวนการดังกล่าวอาจจัดเรียงได้ดังนี้ คือ โครเมียม แคดเมียม ทองแดง สังกะสี แมงกานีส ปรอท

2.3.5 ผลกระทบของกากตะกอนแอคติเวตเตดต่อพืช

Lamb (59) ได้รายงานถึงผลสำเร็จในการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดในดินปลูกหญ้าใกล้กับโยดินาในวอชิงตันว่าให้ผลผลิตมากกว่าการใส่ปุ๋ย Hemphill et al. (56) ได้รายงานว่าผลผลิตที่ได้รับจากการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดในดินจะเท่ากับผลผลิตที่ได้จากการใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่ง Magdoff และ Amadon (60) ก็พบว่าในดินที่ใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดให้ผลผลิตเท่ากับดินที่ใส่ปุ๋ยและ Hartenstine (61) พบว่าเมื่อใส่กากตะกอนแอคติเวตเตด 100 ตัน/เฮกตาร์ (16 ตัน/ไร่) ในการปลูกผักกาดหอมจะได้ผลผลิตของผักกาดหอมเพิ่มขึ้น ในทำนองเดียวกัน Kelling et al. (45) พบว่าเมื่อใส่กากตะกอนที่ได้จากการกำจัดน้ำทิ้งของอาคารบ้านเรือน (sewage sludge) ในอัตรา 0-15 ตัน/เฮกตาร์ (0-2.4 ตัน/ไร่) ปรากฏว่าผลผลิตของข้าวไรน์เพิ่มขึ้นจาก 3.72 ตัน/เฮกตาร์ (600 กก./ไร่) เป็น 4.26 ตัน/เฮกตาร์ (680 กก./ไร่) และผลผลิตของข้าวฟ่าง – ซูดาน เพิ่มจาก 1.93 ตัน/เฮกตาร์ (309 กก./ไร่) เป็น 5.06 ตัน/เฮกตาร์ (810 กก./ไร่) และ Lutrick et al. (62) พบว่า อัตราการได้กากตะกอนแอคติเวตเตดจากเมืองเพนสโคลาในรัฐฟลอริดาที่เหมาะสมสำหรับการปลูกข้าวโพด ข้าวฟ่าง และถั่วเหลือง คือ 28 ตัน/เฮกตาร์ (4.48 ตัน/ไร่)

Hemphill et al. (56) ได้ตรวจหาปริมาณธาตุอาหารในพืชที่ปลูกโดยใส่กากตะกอนแอคติเวตเตด และไม่ใส่ในดิน พบว่าในใบพืชที่ไม่ใส่มีไนโตรเจน 3.8 % และกำมะถัน 0.20 % แต่ในใบพืชที่ใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดมีไนโตรเจน 3.9 – 4.4 % และมีกำมะถัน 0.23 – 0.25 % และ

Copyright by Mahidol University

Zuckerman และ Kirkham (63) พบว่าพืชที่ปลูกในดินที่ใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดจะออกดอกเร็วกว่าปกติ 1 สัปดาห์ และออกผลเร็วกว่าปกติ 2 สัปดาห์

สำหรับความเป็นพิษของกากตะกอนแอคติเวตเตดในการใช้เป็นปุ๋ยพืชนั้น Robert et al. (64) พบว่าเมื่อใส่กากตะกอนแอคติเวตเตด 144 ตัน/เฮกตาร์ (23 ตัน/ไร่) ไม่เป็นพิษต่อพืชที่ปลูกและจากการทดลองของ Mellbye (65) พบว่ากากตะกอนแอคติเวตเตดให้ประโยชน์ในการปลูกข้าวโพดหวานโดยไม่พบความเสียหายอันเนื่องมาจากโลหะหนักทองแดง แคดเมียม โครเมียม แมกนีเซียม แคลเซียม และตะกั่ว เช่น พบปริมาณแคดเมียมในช่วง 0.20 – 0.35 ppm เท่านั้น อย่างไรก็ตามการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดลงในดินสำหรับปลูกพืชถ้าใส่ในอัตราที่มากเกินไปจะเป็นผลเสียต่อพืช เพราะอาจเกิดการสะสมของเกลือและสารพิษหรือความไม่สมดุลของธาตุอาหารได้ ซึ่ง Sabey และ Hart (38) รายงานว่าการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดที่ได้จากการกำจัดน้ำทิ้งของอาคารบ้านเรือนในดินด้วยอัตรา 25 – 125 ตัน/เฮกตาร์ (4-20 ตัน/ไร่) จะลดเปอร์เซนต์การงอกของข้าวฟ่างมิลเลต และหญ้าซูดาน ซึ่งเขาได้กล่าวว่าต้นกล้าของหญ้า และข้าวฟ่างสูญเสียไปร้อยละ 75 และร้อยละ 97.5 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน Hartenstine (61) ได้ทดลองใส่กากตะกอนแอคติเวตเตด 100 ตัน/เฮกตาร์ (16 ตัน/ไร่) พบว่าผลผลิตของเรดิชลดลง

การเติบโตและดูดดึงธาตุอาหารขึ้นไปใช้ของพืชจะได้รับอิทธิพลจากอัตราการใส่กากตะกอนแอคติเวตลงดิน ดังที่ อรวรรณ (40) พบว่า การใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดลงดินอัตราต่าง ๆ เพื่อปลูกผักคะน้า ผลผลิตผักคะน้าจะเพิ่มขึ้นตามอัตรากากตะกอน Mays, Terman และ Duggan (66) เสนอว่า ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของพืชกับอัตราการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดเป็นแบบเส้นโค้ง โดยผลผลิตของพืชจะเพิ่มขึ้น เมื่อใส่อัตรากากตะกอนแอคติเวตเตดในระดับหนึ่ง และผลผลิตจะลดลงเมื่ออัตราการใส่กากตะกอนสูงเกินไป เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างในกากตะกอนแอคติเวตเตดมีปริมาณสูงจนเป็นพิษต่อพืชได้และเป็นผลจากปัจจัยอื่น ๆ ด้วย (67) ดังเช่นผลการทดลองของ Cunningham, Keen และ Ruan (68) ที่พบว่าผลผลิตของข้าวโพดและข้าวไรย์จะเพิ่มขึ้นตามอัตราการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดและให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดในอัตรา 125 เมตริกตันต่อเฮกตาร์ (20,000 กิโลกรัมต่อไร่) แต่ผลผลิตจะลดลงเมื่อใส่ในอัตรา 502 เมตริกตันต่อเฮกตาร์ (80,320 กิโลกรัมต่อไร่)

Kelling et al. (45) ได้ศึกษาผลตกค้างของกากตะกอนที่ใส่ลงดินต่อผลผลิตพืชโดยทดลองปลูกข้าวไรย์ และข้าวฟ่างซูดาน ในดินที่เติมกากตะกอนแอคติเวตเตด และปลูกข้าวโพดตามในฤดูที่สองหลังการเก็บเกี่ยวพืชสองชนิดแรกพบว่าข้าวโพดมีผลผลิตสูงขึ้น และพืชทั้งสามชนิดมีการสะสมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแตสเซียมเพิ่มขึ้นตามอัตราการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตด

Copyright by Mahidol University

อรวรรณ (40) ได้ยืนยันในทิศทางเดียวกันเมื่อทำการศึกษาพบว่า กากตะกอนแอคติเวตเตดที่ใส่ลงดินสามารถเป็นแหล่งธาตุอาหารพืช และให้ผลผลิตผักคะน้าต่อเนื่องในการปลูกครั้งที่สองด้วย

2.3.6 โลหะหนักในกากตะกอนแอคติเวตเตด

เนื่องจากดินที่มีพีเอช (pH) ต่ำนั้น โลหะหนักจะละลายออกมาอยู่ในสารละลายดินได้ดีและง่ายต่อการดูดดึงขึ้นไปสะสมในพืช (53) นอกจากนี้ ช่วงเวลาของการย่อยสลายกากตะกอน ก็มีผลต่อความเข้มข้นของโลหะหนักในดินได้ โดยในขณะที่มีการย่อยสลาย ปริมาณความเข้มข้นของโลหะหนักบางชนิด เช่น แคดเมียม โครเมียม ตะกั่ว และสังกะสีจะสูงขึ้นส่วนปริมาณความเข้มข้นของทองแดงและนิเกิลจะลดลง (69) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของโลหะหนักในพืชตามระยะเวลาโดยส่วนใหญ่มักจะสอดคล้องกับการเพิ่มของโลหะหนักในดิน การใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดเพิ่มขึ้นจะมีผลต่อความเข้มข้นของโลหะหนักต่าง ๆ ในดิน เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ สังกะสี > แมงกานีส > นิเกิล > แคดเมียม > ทองแดง > ตะกั่ว > โครเมียม (70) นอกจากที่กล่าวมาแล้วนั้นรูปทางเคมีของโลหะหนัก และลักษณะของดินก็มีผลต่อการดูดดึงโลหะหนักของพืชด้วยโดยพบว่าพืชที่ปลูกในดินทรายจะสามารถดูดดึงและสะสมโลหะหนักในรูปเกลืออนินทรีย์ได้ดีกว่าพืชที่ปลูกในดินเหนียว (71)

อย่างไรก็ดี Swedish Environmental Protection ได้มีการทบทวนเรื่องสมบัติของกากตะกอนแอคติเวตเตดและความเสี่ยงต่อสิ่งแวดล้อม โดยประชุมเมื่อปี 1989 ผลการประชุมสรุปได้ว่าในระยะสั้นยังไม่มีความเสี่ยงใด ๆ จากการใช้กากตะกอนในทางการเกษตร แต่ควรมีการปรับปรุงสมบัติของกากตะกอนเพื่อผลในการกำจัดกากตะกอนสำหรับพื้นที่การเกษตรในระยะยาวต่อไป (72)

2.4 กระถินเทพา

2.4.1 ลักษณะทั่วไปของกระถินเทพา

กระถินเทพาเป็นพืชยืนต้นที่จัดอยู่ในสกุล Acacia วงศ์ Leguminosae วงศ์ย่อย Mimosoideae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Acacia mangium Wild.* ชื่อสามัญคือ กระถินเทพา กระถินซาบาห์ กระถินณรงค์ใบใหญ่ (73) ส่วนภาษาอังกฤษ เรียกว่า Mangium, Brown salwood, Black wattle, Hickory wattly หรือ Sabah salwood (74) ไม้ในสกุล Acacia มีประมาณ 1,200 ชนิด ทั้งที่เป็นไม้ยืนต้นและไม้

Copyright by Mahidol University

พุ่ม ซึ่งปรากฏในออสเตรเลีย เอเชีย อาฟริกาและอเมริกา เป็นไม้พื้นเมืองทางตอนเหนือของ ออสเตรเลีย แถบรัฐควีนส์แลนด์ บริเวณชายฝั่งกระจายไปจนถึงทางตะวันตกของปาปัวนิวกีนี และบริเวณหมู่เกาะโมลัคคาส์ ประเทศอินโดนีเซีย (75) ในสภาพธรรมชาติพบกระถินเทพาขึ้นอยู่ในที่ที่มีความสูงไม่เกิน 100 เมตรจากระดับน้ำทะเล ช่วงอุณหภูมิ 12 - 34 องศาเซลเซียส จะไม่พบกระถินเทพาขึ้นในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำมากๆ มีการเจริญเติบโตได้ดีในที่มีน้ำฝนเฉลี่ยต่อปีระหว่าง 1,000 มิลลิเมตร ถึงมากกว่า 4,500 มิลลิเมตร ต้องการแสงแดดจัด สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และค่อนข้างเป็นกรด (pH 4.5) (76) นอกจากนี้กระถินเทพาสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินหลายประเภท เช่น ดินที่มีหินปะปน ดินที่ถูกชะล้างมาก่อน ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ และยังขึ้นได้ดีบนดินลึกที่เกิดจากการสลายตัวของวัตถุต้นกำเนิด หรือดินที่เกิดการทับถมของตะกอนบริเวณที่ราบลุ่ม (77) ในพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ดี กระถินเทพาจะเจริญเติบโตได้เร็วมาก เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีความสูงถึง 30 เมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25 - 30 เซนติเมตร ในรัฐซาบาห์ กระถินเทพาบางต้นสูงถึง 23 เมตรในเวลา 9 ปีโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นประมาณปีละ 2 -3 เซนติเมตร และให้ผลผลิตเนื้อไม้ถึง 415 $ม^3$/เฮกตาร์ โดยเฉลี่ยแล้วมีความเพิ่มพูนต่อปี 46 $ม^3$/เฮกตาร์ ในพื้นที่ดินเลว เช่น หน้าดินตื้นมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ หรือที่ซึ่งมีน้ำขังบางฤดูกาลอัตราการเจริญจะลดลง แต่ก็ยังให้ผลผลิตถึงปีละ 20 $ม^3$/เฮกตาร์ (78) ได้มีการทดลองปลูกในหลายประเทศเช่น เนปาล ฟิลิปปินส์ ฮาวาย อินโดนีเซีย ซึ่งกระถินเทพาก็สามารถเติบโตได้ดี สำหรับประเทศไทยได้มีการศึกษาทดลองปลูกกระถินเทพาอยู่หลายแห่ง เช่น อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่, สวนป่าสมเด็จ จังหวัดกาฬสินธุ์, ป่าเขาภูหลวง จังหวัดนครราชสีมา และอำเภอประทิว จังหวัดชุมพร (76) และจากการทดลองปลูกที่สวนป่าสมเด็จโดยเมล็ดที่นำมาจากรัฐซาบาห์ ประเทศมาเลเซีย พบว่าสามารถมีการเจริญเติบโตได้ดี (79)

เนื่องจากเมล็ดกระถินเทพามีเปลือกแข็ง ทำให้น้ำและอากาศภายนอกซึมผ่านได้ยาก จึงมีความจำเป็นในการจัดการเมล็ดก่อนทำการเพาะ เพื่อให้เมล็ดงอกได้รวดเร็วและสม่ำเสมอ วิธีหนึ่งที่นิยมใช้กับไม้ในสกุล Acacia คือการแช่เมล็ดในน้ำร้อน (100 องศาเซลเซียส) ประมาณ 30 วินาที จากนั้นทำการแช่น้ำเย็นทิ้งไว้ข้ามคืน พบว่าวิธีนี้ทำให้เมล็ดงอกได้มากที่สุด และมีอัตราการงอก 33 - 97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถ้าไม่ได้จัดการก่อนเพาะจะมีอัตราการงอก 0 - 21 เปอร์เซ็นต์ และใช้การงอกถึง 21 วัน

กระถินเทพาก็เหมือนพืชตระกูลถั่วที่มีกิจกรรมพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับแบคทีเรียในดินที่อยู่ในสกุล Rhizobium โดยแบคทีเรียจะเข้าสู่รากฝอยบริเวณผิวดิน และเพิ่มเข้าสร้างปมบริเวณราก บักเตรีที่อยู่ในปมจะทำหน้าที่ในการดูดธาตุไนโตรเจนจากอากาศในดิน และเปลี่ยนไนโตรเจนในรูปของสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับไมโครไรซ่า

Copyright by Mahidol University

(Thelephora ramariodes) โดยจะช่วยในการดูดธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง โดยเฉพาะธาตุฟอสฟอรัส ดังนั้นกระถินเทพาจึงเจริญได้ดีแม้ในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ (76)

2.5 ไรโซเบียม (Rhizobium)

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ในดิน มีความสามารถพิเศษในการเข้าสร้างปมที่รากพืชตระกูลถั่วได้ ไรโซเบียมมีขนาดเล็กมากมองด้วยตาเปล่าไม่เห็นจะต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง ต้องการอากาศและสามารถเคลื่อนไหวได้

ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (80) จัดไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียอยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae ไม่สร้างสปอร์ โดยทั่วไป มีรูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่ได้ มีแส้ (flagella) แบบ polar หรือ sub-polar 1 เส้น หรือแบบ peritrechous 2-6 เส้นต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต ติดสีแกรมลบ ใช้คาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิด มักจะสร้างเมือกเมื่อเจริญในอาหารที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต (81) มีขนาดกว้างประมาณ 0.5 – 0.9 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1.2 - 3.0 ไมโครเมตร (82)

ถ้าแบ่งตามลักษณะของการเจริญจะแบ่งได้เป็น 2 พวกคือพวกที่เจริญเร็วมีการแบ่งเซลล์ทุก ๆ 1 – 3 ชั่วโมงจะให้โคโลนีที่มีขนาดใหญ่และปรากฏให้เห็นภายใน 2 – 4 วัน และพวกที่เจริญช้ามีการแบ่งเซลล์ทุก ๆ 4 – 8 ชั่วโมง ให้โคโลนีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร จะปรากฏให้เห็นบนอาหารวุ้นภายใน 5 – 8 วัน อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเจริญของไรโซเบียมจะอยู่ระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส ความเหมาะสมระหว่างสายพันธุ์ไรโซเบียม และชนิดของพืชตระกูลถั่ว (Host – Strain Specificity) จะทำให้ได้ปมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน เพราะถ้าเป็นสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ไม่เหมาะสมกับพืชก็จะมีเพียงปมที่เกิดขึ้นและมีไรโซเบียมอาศัยอยู่แต่พืชจะไม่สร้างเลกฮีโมโกลบิน (Leghaemoglobin) และไม่ให้พลังงาน ซึ่งทำให้ไรโซเบียมตรึงไนโตรเจนไม่ได้ เมื่อไรโซเบียมพบกับรากพืชตระกูลถั่วที่เหมาะสมกับมันแล้วจะมีการเพิ่มปริมาณเชื้ออย่างรวดเร็วที่บริเวณรากขนอ่อน และกระตุ้นให้รากม้วนงอผนังเซลล์อ่อนตัว เกิดเป็นท่อเข้าสู่ภายในราก ไรโซเบียมก็จะเข้าสู่ท่อพร้อมกับมีการแบ่งเซลล์เพิ่มปริมาณ ในขณะที่ไรโซเบียมเข้าสู่รากถั่วนี้ เซลล์รากจะได้รับการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวในเนื้อเยื่อชั้นในเพื่อรับไรโซเบียมที่เข้ามาและเกิดเป็นปมขึ้นในที่สุดไรโซเบียมที่อยู่ภายในปมนี้จะมีรูปร่างที่แตกต่างไปจากเดิม เรียกว่า "แบคทีรอยด์" (Bacteroids) (83) ไรโซเบียมจะอยู่กับปมถั่วในลักษณะของการดำเนินกิจกรรมร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยพืชจะเป็นฝ่ายที่ให้แหล่งพลังงานและคาร์บอน และไรโซเบียม เป็นฝ่ายที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ จะเป็นฝ่ายที่ให้สารประกอบไนโตรเจน (84)

Copyright by Mahidol University

ซึ่งการตรึงไนโตรเจนนี้เป็นขบวนการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนจากแก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศหรือในดินและน้ำให้อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโนซึ่งจะถูกส่งไปยังส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน และถูกสร้างเป็นโปรตีนสะสมไว้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช (85) ขบวนการตรึงไนโตรเจนสามารถเขียนเป็นสมการอย่างง่าย ๆ ได้ดังนี้

$$N_2 + H_2 \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} NH_3$$

$$NH_3 + \text{Keto acid} \xrightarrow{\text{Enzyme}} \text{Amino acid}$$

ทั้ง 2 สมการนี้เป็นปฏิกิริยาหลักที่เกิดขึ้น Nitrogenase เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไรโซเบียม เอนไซม์นี้จะถูกทำลายได้โดยก๊าซออกซิเจน แต่ไรโซเบียมในปมก็ต้องการก๊าซออกซิเจนเพื่อการหายใจด้วย ดังนั้นพืชจึงจำเป็นต้องช่วยนำก๊าซออกซิเจนไปให้แบคทีรอยด์ใช้ผ่านทางเลกฮีโมโกลบินโดยไม่ให้กระทบกระเทือนต่อ Nitrogenase ถ้าไรโซเบียมในปมถั่วมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดีเลกฮีโมโกลบินก็จะมีสีแดง ถ้ามีสีซีดหรือขาวก็แสดงว่าประสิทธิภายในการตรึงน้อยลง (86)

งานวิจัยทางด้านการคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมในประเทศไทยส่วนใหญ่ เน้นทางด้านพืชตระกูลถั่วที่เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษาของ Boonkerd และ Promsiri (87) ได้รายงานว่า ไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในการตรึงไนโตรเจนและไรโซเบียมเองก็มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืชอีกด้วย (88) เนื่องจากความจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมและถั่วนั้นถูกควบคุมโดย Gene ที่มีชื่อว่า Nod D geneซึ่ง Nod D gene นี้ จะมีปฏิกิริยาร่วมกับสารประกอบ Flavanoids ที่พืชสร้างขึ้นมา ซึ่ง Flavanoids นี้ เป็นกลุ่มของสารประกอบโปรตีนที่ Nod D gene สร้างขึ้นมาในเชื้อไรโซเบียมก็จะเป็นตัวกำหนดความจำเพาะเจาะจงที่สัมพันธ์กับสารประกอบ Flavanoids ในพืช (89)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับไรโซเบียมที่เข้าอาศัยอยู่ที่รากพืชตระกูลถั่วที่เป็นไม้ยืนต้นนั้น เริ่มมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความจำเป็นของการปลูกป่าทดแทน ซึ่งต้นไม้ควรมีความแข็งแรงเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตหลังการย้ายปลูก (90) ไม้ยืนต้น (Tree) ที่อยู่ในวงศ์ Leguminosae ที่กระจายอยู่ทั่วโลกนั้นจัดแบ่งออกได้ประมาณ 750 Genera และ 18,000-19,000 Species และมี 4 Sub-family คือ Mimosoideae, Caesalpinoideae, Swartziodeae และ Papilionatae (91) ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ของไรโซเบียมกับพืชยืนต้นตระกูลถั่วเหล่านี้ เพิ่งได้มีการเริ่มศึกษากันอย่างจริงจังเมื่อปี 1981 นี้เอง (92) เนื่องจาก Quispel et al. (91) ได้รายงานว่าการศึกษาเกี่ยว

Copyright by Mahidol University

กับการสร้างปมของไรโซเบียมกับไม้ยืนต้นค่อนข้างจะดูยากเนื่องจากสีของปม รูปร่างที่ไม่แน่นอน สม่ำเสมอ อาจจะมีลักษณะเป็น Celluses หรือ Tumours การที่จะชี้ชัดลงไปทำได้ยากเนื่องจากมีความหลากหลายมาก นอกจากนี้การสร้างปมก็จะมีตำแหน่งไม่เหมือนกัน แตกต่างกันไปทั้งสร้างที่ Lateral root หรือบางพืช เช่น *Prosopis sp.* ที่ปลูกในแทนซาเนีย จะพบปมที่ความลึก 4-5 เมตร และปมจะเกิดเฉพาะบริเวณที่ใกล้ระดับน้ำใต้ดินเท่านั้น (93)

ส่วนไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมกับรากไม้ยืนต้นตระกูลถั่วก็มีความหลากหลายเช่นกัน เช่น บางชนิด ไรโซเบียมเป็นพวกเจริญเติบโตเร็ว (Fast growing) เช่น พืชพวกกระถินยักษ์ (*Leuceana leucocephala*) และ พวก *Mimosa sp.* และบางชนิดก็เป็นไรโซเบียมที่เจริญเติบโตช้า (Slow growing) เช่น พืชพวก *Acacia mangium*, *Albizia lebbek* เป็นต้น (94) จากการศึกษาของ Galiana et al. (95) พบว่า *Acacia mangium* และ *Acacia auriculiformis* จะเกิดปมรากได้ดีและมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้สูงกับไรโซเบียมที่เป็น Bradyrhizobium มากกว่า Rhizobium

การที่จะวัดประสิทธิภาพของไรโซเบียมนั้นสามารถวัดได้หลายวิธีเช่น ดูจากจำนวนปม น้ำหนักปม น้ำหนักต้นแห้ง ตลอดจนวัดการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA (Acetylene Reduction Assay) วัดจากวิเคราะห์ ^{15}N หรือ วัดโดยวิธี Xylem sap analysis (96) ตัวอย่างเช่น Hansen et al. (97) รายงานว่า *Leuceana luecocephala* หรือกระถินยักษ์ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 24.7 μ mole/ethylene/plant/hr พืชพวก Acacia สามารถตรึงไนโตเจนได้ตั้งแต่ <1-30.0 μ mole/ethylene/plant/hr เป็นต้น (96)

จากงานทดลองในเรือนกระจก Umali-Garcia et al. (98) ได้ทำการเพาะกล้าของ *Albizia falcataria* และ *Acacia mangium* โดยวิธีปลอดเชื้อ แล้วนำต้นกล้าไปปลูกในดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์โดย ใส่เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ลงไปเปรียบเทียบกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนอัตราต่าง ๆ พบว่าการใส่เชื้อไรโซเบียมบางสายพันธุ์ให้อัตราการเจริญเติบโตของต้น และน้ำหนักปมมากกว่าไม่ใส่ไรโซเบียมและการใส่ไรโซเบียมร่วมกับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราต่ำทำให้พืชมีการเจริญเติบโตและมวลชีวภาพ (Biomass) สูงที่สุด Galiana et al. (99) ได้ทำการชักนำให้ตายอดของกระถินเทพาออกรากบนอาหารสังเคราะห์ที่มี Indole-4-butyric acid (IBA) ระดับ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายต้นกล้าไปเลี้ยงในหลอดทดลองให้อาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน ใส่เชื้อไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ คือ Aust13C, TAL72 และ ORS800 ลงไปแล้วนำไปปลูก 5 แหล่งปลูก พบว่า เชื้อไรโซเบียม Aust 13 C ทำให้พืชทั้ง 5 แหล่งปลูกมีค่าของน้ำหนักแห้ง จำนวนปม และการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าอีก 2 สายพันธุ์ นอกจากนั้น Dela Cruz et al. (100) ยังพบว่าพืชยืนต้น 3 ชนิด คือ *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium* และ *Albizia falcataria* ที่ปลูกในดิน pH 5.8 มี อินทรียวัตถุร้อยละ 1.4 มีฟอสฟอรัส 5 ppm ใส่เชื้อไรโซเบียมให้มีปริมาณเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อ

Copyright by Mahidol University

กระถาง และคลุกดินด้วย VA mycorrhiza จำนวน 50 สปอร์ต่อกระถาง พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมากกว่ากระถางที่ไม่ใส่เชื้อเลยอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

การทดลองในประเทศไทยเกี่ยวกับไม้ยืนต้นยังมีน้อยมาก เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อน เมื่อป่าหมดไปสภาพพื้นดินมักแห้งแล้ง ความอุดมสมบูรณ์ต่ำมีสภาพทางเคมี และชีวภาพเปลี่ยนไป เช่นมีความเป็นกรด หรือเป็นเกลือเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการที่จะคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมให้ได้ประโยชน์สูงสุดควรคัดเลือกไรโซเบียมที่มีคุณสมบัติตรึงไนโตรเจนได้สูงและทนสภาพแวดล้อม ตลอดจนมีการแข่งขันการเข้าสร้างปมที่รากพืชอีกด้วย การทดลองของอัญชนา (90) พบว่าเมื่อเลี้ยงกระถินเทพาบนอาหารสังเคราะห์เมื่อนำออกปลูกใส่ไรโซเบียมสายพันธุ์ K.T. 3.1 พบว่าต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อมีการรอดชีวิตร้อยละ 100 ส่วนต้นที่ไม่ใส่เชื้อมีการรอดชีวิตร้อยละ 66.67 และต้องใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ส่วนการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมยังไม่ดีนักจึงควรทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ต่อไป

นันทกร (83) ทำการปลูกถั่วเหลืองที่จังหวัดกาฬสินธุ์และมหาสารคามพบว่า การใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 0 – 9 – 6 กิโลกรัมต่อไร่ร่วมกับการใช้เชื้อไรโซเบียมให้ผลผลิตต่อไร่สูงที่สุด การใส่ปุ๋ยสูตร 12 – 9 – 6 กิโลกรัมต่อไร่ และการไม่ใส่ปุ๋ยแต่ใช้เชื้อไรโซเบียมจะให้ผลผลิตสูงรองลงมา การใส่ปุ๋ย 12 – 0 – 0 กิโลกรัมต่อไร่ จะให้ผลผลิตต่ำสุด และให้ผลที่ใกล้เคียงกับการไม่ใส่ปุ๋ยเคมี และไม่ใช้เชื้อไรโซเบียม

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วมีน้อยมากแต่มีความสำคัญทั้งนี้เนื่องจากไรโซเบียมเมื่ออยู่ในดินไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่สามารถแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมกับไรโซเบียมสายพันธุ์อื่น หรือจุลินทรีย์ดินชนิดอื่นและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ (101, 102) การจำแนกหรือจัดกลุ่มไรโซเบียมที่เกิดขึ้นกับ Host plant ไม่ค่อยสม่ำเสมอนัก และพบว่าลักษณะของ Plasmid ค่อนข้างคลุมเครืออีกด้วย (96) อย่างไรก็ตามมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพยายามศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไรโซเบียมไม้ยืนต้นโดยการเปรียบเทียบลักษณะของ Chromosomal DNA และ Plasmid DNA โดยการหาความสัมพันธ์กับ Host plant ที่ปลูกในพื้นที่และสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกัน (96) นันทกร และคณะ (88) ได้ใช้เทคนิคด้าน Serology, RFLP ในการจำแนกไรโซเบียมถั่วเหลืองในประเทศไทยได้ 5 กลุ่ม ด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถติดตาม และตรวจสอบไรโซเบียมที่ได้รับการคัดเลือกว่ามีความสามารถในการเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนเพียงไร ดังนั้นเมื่อต้องการทราบประสิทธิภาพของไรโซเบียมที่ได้รับการคัดเลือกมาแล้ว จำเป็นที่จะต้องมีการเก็บรักษาตลอดจนมีกรรมวิธีจำแนกเชื้อและติดฉลาก (Marker) เพื่อสามารถติดตามไรโซเบียมดังกล่าวได้ ควรนำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ในการจัดจำแนก และติดตามการทำงานไรโซเบียมไม้ยืนต้นได้

Copyright by Mahidol University

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมการทดลอง

3.1.1 การเตรียมดิน

เตรียมดินจากแหล่งเพาะชำกล้าไม้ โดยใช้ดินชุดดินโคราช Korat (Kt) ซึ่งนำมาจากสถานีเพาะชำกล้าไม้ กรมป่าไม้ที่มีดินชนิดนี้อยู่ เก็บตัวอย่างมาในปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทดลอง แล้วนำมาตากดินให้แห้ง ร่อนดินโดยตะแกรงให้ละเอียด เพื่อให้ปราศจากเศษไม้ หรือเศษวัชชพืช เตรียมไว้เป็นกองสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.2 การเตรียมกากตะกอน

เตรียมกากตะกอนจากโรงงานอุตสาหกรรมเบียร์ (โดยนำมาจากบริษัทไทยอมฤตบริวเวอรี่ ถ. ติวานนท์ ต.บ้านใหม่ อ.เมือง จ.ปทุมธานี, เมื่อวันที่ 10 มกราคม 2543) นำเอากากตะกอนมาตากให้แห้งในร่ม จากนั้นใช้เครื่องบดดินทำการบดให้มีขนาดเล็กละเอียด แล้วนำมากองไว้ใช้ในการทดลอง

3.1.3 การเตรียมเมล็ดกระถินเทพา

เตรียม เมล็ดกระถินเทพา 2 แม่ไม้ ได้แก่ 1) หมายเลข 98-0028 อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา เก็บเมื่อ 1 มีนาคม 2541 2) หมายเลข 99-0021 เก็บที่ อ.ปักธงชัย จ.นครราชสีมา เก็บเมื่อ 1 มีนาคม 2542 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่จัดเก็บโดย สำนักวิชาการ กรมป่าไม้ จากนั้นนำไปเพาะตามวิธีการทดลองต่อไป

Copyright by Mahidol University

3.1.4 การเตรียมสายพันธุ์ไรโซเบียม

3.1.2.1 สายพันธุ์ไรโซเบียมจากการสุ่มเก็บนอกพื้นที่ ได้จากการ Isolated จากปมรากของกระถินเทพาในพื้นที่เรือนเพาะชำกล้าไม้ กรมป่าไม้ โดยเลือกพื้นที่ละ 2 ชนิดได้แก่ รหัสสายพันธุ์ บ้านนา 1 ปม 4 , บ้านนา 1 ปม 5 , ประจวบคีรีขันธ์ 1 ปม 5 , ประจวบคีรีขันธ์ 2 ปม 5 , ชุมพร 1 ปม 7 , ชุมพร 1 ปม 5 , ราชบุรี 2 ปม 6 และราชบุรี 2 ปม 5

3.1.2.2 ไรโซเบียมจาก กลุ่มวิจัยไรโซเบียม กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเก็บมาจากแหล่งต่างๆ จำนวน 31 รหัสสายพันธุ์ได้แก่ 1)DASA 35001 2)DASA 35004 3)DASA35007 4)DASA35009 5) DASA35011 6) DASA35013 7) DASA35014 8) DASA35017 9) DASA35018 10) DASA35022 11) DASA35027 12) DASA35030 13) DASA35039 14) DASA35041 15) DASA35042 16) DASA35046 17) DASA35049 18) DASA35052 19) DASA35058 20) DASA35070 21) DASA35073 22) DASA35076 23) DASA35077 24) DASA35078 25) DASA35080 26) DASA35084 27) DASA35087 28) DASA35092 29) DASA35093 30) DASA35095 31) DASA35096

3.1.5 การเตรียมสารเคมี และอุปกรณ์

3.1.5.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม สูตร Yeast –Manitol Agar (YMA) และ Yeast –Mannitol Broth (YMB) (103)

3.1.5.2 กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) เข้มข้น สำหรับใช้ในการเพาะกระถินเทพา และปลูกต้นกระถินเทพา

3.1.5.3 สูตรอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน สำหรับต้นกล้าในถุงเลี้ยงต้นกล้า

3.1.5.4 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ อะเซทิลีนรีดักชั่น (Acetylene Reduction Assay) ได้แก่ ขวดแก้วและจุกสำหรับเก็บก๊าซ หลอดดูดสูญญากาศ ก๊าซอะเซทิลีน (Accetylene) และเอทิลีน (Ethylene) เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas Chomatograp) ของ Perkin Elmer Model F 17

3.1.5.5 สารเคมีในการวิเคราะห์ โดยวิธี Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA) รวมทั้ง Goat Anti- Rabbit IgG Alkaline Phosphatase Cojugate และ Freund's Complete Adjuvant

Copyright by Mahidol University

3.1.5.6 สัตว์ทดลองในการผลิตแอนติเซรั่ม ใช้ในกระต่ายพันธุ์ Newzealand White

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การรวบรวมและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อไรโซเบียม

3.2.1.1 รวบรวม และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไรโซเบียม โดยรวบรวมเชื้อไรโซเบียมจากกระถินเทพาที่เป็นตัวแทนจากแหล่งต่างๆ จำนวน 39 สายพันธุ์ ทำการแยกเชื้อจากปมรากกล้าไม้กระถินเทพาจากแหล่งดังกล่าว โดยเก็บปมต้นละประมาณ 20 ปม ทำการแยกเชื้อตามวิธีการของ Somasegaran และ Hoben (103) แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไรโซเบียม โดยทำการย้อมเชื้อไรโซเบียมด้วยสีย้อมคาร์บอลฟูชชิน (Carbol fuschin) ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 100x

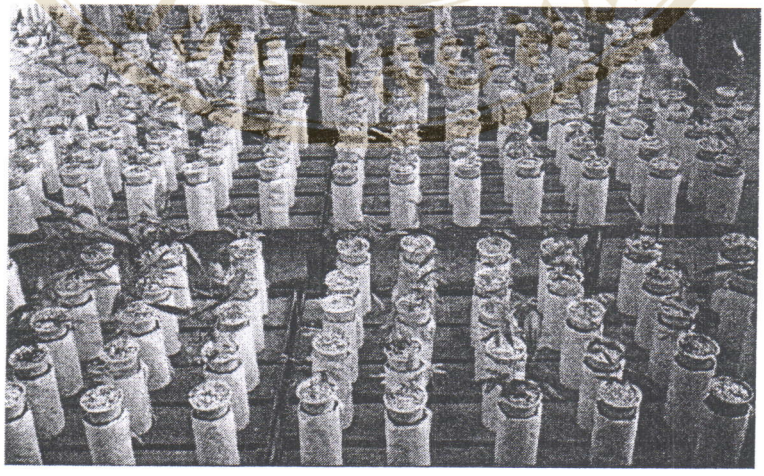
3.2.1.2 จัดจำแนกสกุลไรโซเบียมตามความสามารถในการผลิตกรด-ด่าง โดยการนำเชื้อไรโซเบียมที่ใช้มาศึกษา Cross streak ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีสูตรอาหาร Yeast - Manitol - Agar (YMA) เติม Blomthymol blue ลงไปแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน (109) ตรวจผลโดยการบันทึกเปลี่ยนแปลงสีอาหาร หากเปลี่ยนสีอาหารสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่าเป็นไรโซเบียมชนิดโตเร็ว หากเป็นสีน้ำเงินเป็นชนิดโตช้า

3.2.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมที่รวบรวมได้ และการเพาะเมล็ดกระถินเทพา นำเชื้อแต่ละสายพันธุ์และ isolated มาเลี้ยงในหลอดแก้วบรรจุอาหารเหลวสูตร Yeast-Mannitol Broth (YMB) เขย่าฟลาสก์บนเครื่องเขย่า 10 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน เชื้อจะเจริญเกิดความขุ่นในอาหารเหลว ปิเปตตัวอย่างเชื้อใส่ใน Cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยค่า $O.D._{600}$ ประมาณ 0.45-0.60 และประเมินว่ามีปริมาณไรโซเบียม 10^9 cfu/มิลลิลิตร ขึ้นไป เพียงพอที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ แล้วนำเชื้อดังกล่าวมา Inoculateg ลงบนรากกระถินเทพาที่เมล็ดเก็บจาก 2 แม่ไม้ คือ หมายเลข 98-0028 และ หมายเลข 99-0021

Copyright by Mahidol University

3.2.2 ประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดไม้กระถินเทพา

เพาะเมล็ดกระถินเทพา 2 แม่ไม้ ได้แก่หมายเลข 980028 และ 99-0021 ด้วยการใช้กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) เข้มข้น เพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดกระถินเทพา ทำความสะอาดพื้นผิวของเมล็ดและทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนลง ตามวิธีการของ Somasegaran และ Hoben (103) แต่ดัดแปลง โดยทำการแช่เมล็ดกระถินเทพาในกรดซัลฟุริกเข้มข้น เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงเพาะเมล็ดลงบนจานสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ชุ่มทั่วสำลีก่อน แล้วจึงเกลี่ยเมล็ดให้กระจายทั่วจานสำลี แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมล็ดจะเริ่มงอกรากภายในระยะเวลา 2-7 วัน เมล็ดที่งอกได้รากยาว 0.5-1.5 เซนติเมตร จึงจะนำไปปลูกลงในขวดทราย (Leonard's jar) ให้อาหารพืชโดยน้ำยาที่ไม่มีไนโตรเจนตามวิธีของ Somasegaran และ Hoben (103) เติมสารอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน ตามสูตรของ Broughton และ Dillworth (104) แต่ใช้สาร FeNaEDTA 6.9266 กรัม/ลิตร แทน Fe-citrate ที่มีอยู่ในสูตร โดยเติมอาหารเหลวนี้ 50 มิลลิลิตรต่อขวด (105) ใส่เมล็ดกระถินเทพาที่งอกแล้ว ขวดละ 2 สายพันธุ์ดังกล่าว แล้วใส่เชื้อ (inoculate) ไรโซเบียมบริสุทธิ์ที่เลี้ยงไว้ 1 มิลลิลิตร/เมล็ด (10^9 cfu/มิลลิลิตร) ที่บริเวณรากเมล็ด (95, 106) ในการทดลองจะใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลองละ 3 ซ้ำ (Replication) นำ Leonard's jar ไปไว้ในเรือนทดลอง และคอยเติมสารอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนใน Leonard's jar เพื่อให้มีสารอาหารเพียงพอ



ภาพที่ 3-1 แสดงตำรับการทดลองโดยใช้ผังการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)

Copyright by Mahidol University

3.2.3 วิเคราะห์ประสิทธิภาพสายพันธุ์ไรโซเบียมต่อการเจริญเติบโตกระถินเทพา

หลังจากเลี้ยงกระถินเทพา เป็นเวลา 3 เดือน เก็บตัวอย่างพืช เพื่อประเมินการเจริญเติบโต โดย การวัดส่วนสูง การนับปม น้ำหนักปมแห้ง น้ำหนักแห้งต้นพืช และการตรึงไนโตรเจน

1) การวัดความสูง วัดความสูงจากบริเวณคอรากจนถึงปลายยอดกล้ากระถินเทพา

2) การนับจำนวนปม ตัดรากกล้ากระถินเทพาแล้วนำรากมาล้างให้สะอาด นำปมออกแล้วนับด้วยเครื่องนับ

3) การวัดน้ำหนักปมแห้ง นำปมแห้งเข้าอบในตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้

4) การหาน้ำหนักแห้งต้นพืช นำส่วนลำต้นเหนือคอรากทั้งหมด (Shoot) เข้าตู้อบที่ 60 องศาเซนเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้

5) วิเคราะห์หาอัตราการตรึงไนโตรเจนของกระถินเทพาโดยวิธี อะเซทิลีนรีดักชั่น (Acethylene Reduction Assay) โดยนำขวดเลี้ยงกล้ากระถินเทพาไปตั้งให้รับแสงแดดประมาณ 1 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างพืช ตัดตรงบริเวณรอยต่อระหว่างต้น รากกับปม นำส่วนรากไปใส่ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง (Doubble stopper) ให้แน่น ซึ่งปริมาตรอากาศในฟลากส์หลังปิดจุกจะเป็น 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใช้หลอดฉีดยา (Sylinge) ขนาด 50 มิลลิลิตร ดูดอากาศภายในฟลาส์กออก 25 มิลลิลิตร (ซึ่งเท่ากับ 10 เปอร์เซนต์ของปริมาตรอากาศภายในฟลาสก์) แล้วจึงฉีดก๊าซอะเซทิลีน 25 มิลลิลิตร ลงไปในฟลาสก์ แล้วจับเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงดูด Reduced gas ออกมาโดยดึงก้านหลอดฉีดยา (ซึ่งมีทั้งก๊าซ อะเซทธิลีน และก๊าซเอทธิลีนรวมกัน) 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสูญญากาศ แล้ววัดกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยวัดอะเซทิลีนรีดักชั่น หาพื้นที่ใต้กราฟของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน (Standard ethylene) โดยฉีดก๊าซเอทธิลีนบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร เข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph ;GC) ใช้เครื่อง GC ของ Perkin Elmer Model F 17 ซึ่งมี Detector เป็นแบบ Hydrogen Flame Ionization Detector (FID) คอลัมน์ บรรจุสาร Porapak N ขนาดคอลัมน์ 0.6 X 4.5 เซนติเมตร และใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซนำพา (Carrier gas) ด้วยความเร็ว 55 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 55 องศาเซลเซียส ก๊าซที่ต้องการนำมาวิเคราะห์เป็นก๊าซเอทิลีนที่เกิดจากการรีดิวส์อะเซทิลีน ซึ่งเกิดจากผลของปฏิกริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนส คำนวณหาปริมาณเอทธิลีนได้โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทธิลีนมาตรฐานจากสูตร

$$\text{อัตราการตรึงไนโตรเจนของพืชตัวอย่าง} = \frac{10^3 \text{ X B X V}}{2200 \text{ std. X A X 22.4}}$$

Copyright by Mahidol University

หน่วยเป็นไมโครโมลของเอทธิลีน (C_2H_2) ต่อต้นพืช ต่อชั่วโมง (UMolmd./C_2H_2/plomt/hr.)

เมื่อใช้เอทธิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาตรที่แน่นอนเป็น 2,200 มิลลิลิตร

B = พื้นที่ใต้กราฟของพีคตัวอย่าง

V = ปริมาตรของฟลาสก์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง เป็นมิลลิลิตร

Std = พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน

A = เวลาในการรีดิวส์ก๊าซอะเซทธิลีน เป็นชั่วโมง

รายละเอียดและหลักการคำนวณอัตราการตรึงไนโตรเจน ดัดแปลงจากวิธีของ Hardy et al. (107) และ Somasaegaran และ Hoben (103)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ข้อมูลประกอบด้วยน้ำหนักแห้งต้นพืช (กรัม) จำนวนปม และค่า Acethylene Reduction Assay (ARA) (ไมโครโมลเอทธิลีน/ต้นพืช/ชั่วโมง) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยการใช้ผังการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างข้อมูล กระถินเทพาแต่ละแม่ไม้ที่ได้รับการใส่เชื้อไอโซเลทต่างๆโดยใช้ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเกิดปม และการตรึงไนโตรเจน มาจำนวน 5 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการทดสอบว่าเป็นกลุ่ม หรือชนิดเดียวกันหรือไม่ต่อไป

3.2.1.5 การจัดกลุ่มของไรโซเบียมกระถินเทพาโดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ซึ่งจะใช้ในการตรวจสอบว่าเป็นกลุ่มหรือชนิดเดียวกันหรือไม่ วิธีการทดลองตามในข้อที่ 3.2.5.2

3.2.4 การหาอัตราส่วน กากตะกอน ไรโซเบียม ในดิน ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตกล้ากระถินเทพา

3.2.4.1 การวิเคราะห์ดิน นำตัวอย่างดินที่เก็บมาจากบริเวณชุดดินโคราช นำมาวิเคราะห์

1) คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ปฏิกริยาความเป็นกรด - ด่าง ปริมาณธาตุอาหารพืช (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแตสเซียม) ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน (O.M.) ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี (108)

2) คุณสมบัติทางชีวภาพได้แก่ การหาเชื้อไรโซเบียมในดิน โดยวิธี Most Probable Number (MPN) ตามวิธีของ Somasaegaran and Hoben (103) โดยใช้ถั่ว Seratose หากตรวจพบว่าในตัวอย่างดินพบเชื้อไรโซเบียม ก่อนการผสมดินต้องนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อไรโซเบียมเสียก่อน

Copyright by Mahidol University

3.2.4.2 การวิเคราะห์กากตะกอน นำกากตะกอนจากโรงงานผลิตเบียร์มาเพื่อ วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ปฏิกริยาความเป็นกรด ด่าง ปริมาณธาตุอาหารพืช (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปรตัสเซียม) ค่าการนำไฟฟ้า ค่าปริมาณอินทรียวัตถุในดินและปริมาณโลหะหนัก ตามวิธีของ คณาจารย์ภาคปฐพีวิทยา (108)

3.2.4.3 การเตรียมตำรับการทดลอง เตรียมสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพที่ได้จากการคัดเลือกแล้วตามข้อ 3.2.1.5 จากนั้นนำมาผสมกัน เพื่อนำมาปลูกเชื้อลงในกล้ากระถินเทพา (Innoculation) โดยใช้ปริมาณไรโซเบียมบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร/เมล็ด (10^9 cfu/มิลลิลิตร)

การวิจัยนี้ใช้การวางผังการทดลอง แบบ Randomized Complete Block Design (RCB) โดยประกอบไปด้วย 11 ตำรับการทดลอง (Treatment) โดยทำการทดลองตำรับละ4 ซ้ำ (Replication) รวมเป็น 44 การทดลอง สำหรับแต่ละแม่ไม้คือ แม่ไม้สงขลา 44 การทดลอง และแม่ไม้นครราชสีมาจำนวน 44 ตำรับการทดลอง รวมเป็น 88 การทดลอง ดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-1 แสดงวิธีการเตรียมตำรับการทดลอง จำนวน 11 ตำรับการทดลอง

ลำดับที่	ตำรับการทดลอง
1	ดิน(Control)
2	ดิน + ปุ๋ยละลายช้า (Osmocot) สูตร 14 - 14 - 14 จำนวน 1 ครั้ง 10 กรัม/1 ถุง
3	ดิน + เชื้อไรโซเบียม (S + R)
4	ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 1 (S +1:1)
5	ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 2 (S + 1:2)
6	ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 3 (S + 1:3)
7	ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 4 (S + 1:4)
8	ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 1 + เชื้อไรโซเบียมผสมประสิทธิภาพสูง(S +1:1 +R)
9	ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 2 + เชื้อไรโซเบียมผสมประสิทธิภาพสูง(S +1:2 +R)
10	ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 3 + เชื้อไรโซเบียมผสมประสิทธิภาพสูง(S +1:3 +R)
11	ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 4 + เชื้อไรโซเบียมผสมประสิทธิภาพสูง(S +1:4 +R)

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 3-2:แสดงผังตำรับการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB)

11Treatments 4 replications

Treatment	แม่ไม้ 1 (สงขลา)				แม่ไม้ 2 (นครราชสีมา)			
	SR_1	SR_2	SR_3	SR_4	NR_1	NR_2	NR_3	NR_4
T_1	SR_1T_1	SR_2T_1	SR_3T_1	SR_4T_1	NR_1T_1	NR_2T_1	NR_3T_1	NR_4T_1
T_2	SR_1T_2	SR_2T_2	SR_3T_2	SR_4T_2	NR_1T_2	NR_2T_2	NR_3T_2	NR_4T_2
T_3	SR_1T_3	SR_2T_3	SR_3T_3	SR_4T_3	NR_1T_3	NR_2T_3	NR_3T_3	NR_4T_3
T_4	SR_1T_4	SR_2T_4	SR_3T_4	SR_4T_4	NR_1T_4	NR_2T_4	NR_3T_4	NR_4T_4
T_5	SR_1T_5	SR_2T_5	SR_3T_5	SR_4T_5	NR_1T_5	NR_2T_5	NR_3T_5	NR_4T_5
T_6	SR_1T_6	SR_2T_6	SR_3T_6	SR_4T_6	NR_1T_6	NR_2T_6	NR_3T_6	NR_4T_6
T_7	SR_1T_7	SR_2T_7	SR_3T_7	SR_4T_7	NR_1T_7	NR_2T_7	NR_3T_7	NR_4T_7
T_8	SR_1T_8	SR_2T_8	SR_3T_8	SR_4T_8	NR_1T_8	NR_2T_8	NR_3T_8	NR_4T_8
T_9	SR_1T_9	SR_2T_9	SR_3T_9	SR_4T_9	NR_1T_9	NR_2T_9	NR_3T_9	NR_4T_9
T_{10}	SR_1T_{10}	SR_2T_{10}	SR_3T_{10}	SR_4T_{10}	NR_1T_{10}	NR_2T_{10}	NR_3T_{10}	NR_4T_{10}
T_{11}	SR_1T_{11}	SR_2T_{11}	SR_3T_{11}	SR_4T_{11}	NR_1T_{11}	NR_2T_{11}	NR_3T_{11}	NR_4T_{11}

หมายเหตุ: T = Treatment R = Replication S = แม่ไม้สงขลา N = แม่ไม้นครราชสีมา

3.2.2.4 การเก็บรวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูล

1) วัดความสูง (Height) จากบริเวณคอรากถึงปลายยอดกระถินเทพา

2) วัดความโตที่คอราก (Diameter at root corla, Do_o) ใช้เทปวัดความโตบริเวณโคนลำต้นกระถินเทพา

3) น้ำหนักแห้งรวม (Total Dried Biomass) โดยนำส่วนลำต้นเหนือบริเวณคอรากทั้งหมดเข้าตู้อบ 60 องศาเซนเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้

4) วิเคราะห์หาอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี อะเซทิลีนรีดักชั่น (Acethylene Reduction Assay)

5) วิเคราะห์หาค่าการตรึงไนโตรเจนจากการวัด Nitroginase Acitivity โดยวิธี Micro-Kjedahl รายละเอียดตามภาคผนวก ค หลังครบเวลา 3 เดือน จากข้อมูลที่รวบรวมได้นำมาประมวลผล และทดสอบทางสถิติโดยใช้โปรแกรม DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เป็นเกณฑ์

Copyright by Mahidol University

3.2.5 การติดตาม และตรวจสอบประสิทธิภาพสายพันธุ์ไรโซเบียม

3.2.5.1 วิธีการทางเซรุ่มวิทยา (Serology method)

1) การเตรียมแอนติเจน (Antigen production) นำเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงที่ได้รับการคัดเลือกแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB (Yeast Mannitol Broth Medium) เป็นเวลา 5-7 วัน จนได้ปริมาณเซลล์ถึง 10^9 คิวบิกเซลล์ / มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแยก (Centrifuge) และล้างด้วยน้ำเกลือ จำนวน 10 มิลลิลิตร จะได้ปริมาณเซลล์ มีความเข้มข้นประมาณ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เรียกว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง (Concentration Suspension : CS) จากนั้นแบ่งสารละลายออกมาให้เจือจางให้ได้ปริมาณเซลล์ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ได้จำนวน 15 มิลลิลิตร เรียกว่า Working Suspension : WS นำแอนติเจนทั้งสองชนิดใส่ในหลอดแล้วนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น เติม Merthiolate ร้อยละ 1 เพื่อรักษาสภาพเซลล์ และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-7 องศาเซนเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

2) การผลิตแอนติเซรั่ม (Antiserum production) นำแอนติเจนที่เตรียมไว้สองชนิดมาทำการฉีดกระต่ายที่มีขนาดอายุ 6 เดือนขึ้นไป และมีน้ำหนักตัว 1.5 – 2 กิโลกรัม ฉีดแอนติเจนไรโซเบียมให้แก่กระต่าย โดยใช้เชื้อ 1 สายพันธุ์ฉีดกระต่าย 1 ตัว

วันที่ 1 -ฉีดแอนติเจนเจือจาง (ws) จำนวน 0.5 มล. เข้าเส้นเลือดที่ใบหู

วันที่ 2 -ฉีดแอนติเจนความเข้มข้นสูง (cs)จำนวน 1 มล. เข้าใต้ผิวหนังที่คอ

-ฉีดส่วนผสมแอนติเจนเข้มข้นสูงกับ Freund's Complete Adjuvant ในอัตรา 1:1 จำนวน 1 มิลลิกรัมเข้ากล้ามเนื้อต้นขา

วันที่ 3 -ฉีดแอนติเจนเจือจาง (ws) จำนวน 1 มล. เข้าที่เส้นเลือดใบหู

วันที่ 4 – 6 -หยุดพัก

วันที่ 7 -ฉีดแอนติเจนเจือจาง (ws) จำนวน 1.5 มล. เข้าที่เส้นเลือดใบหู

วันที่ 8 -ฉีดแอนติเจนเจือจาง (ws) จำนวน 2 มล. เข้าที่เส้นเลือดใบหู

วันที่ 9 -ฉีดแอนติเจนเจือจาง (ws) จำนวน 2 มล. เข้าที่เส้นเลือดใบหู

วันที่10 – 17 -หยุดพัก

วันที่ 18 -ฉีดแอนติเจนเข้มข้นสูง (cs) จำนวน 1 มล. เข้าที่กล้ามเนื้อ

วันที่ 19 – 25 -หยุดพัก

วันที่ 26 -ทำการเจาะเลือดที่ใบหูเพื่อตรวจหาปริมาณแอนติบอดี้ (Antibody) มาเช็ค Titer โดยวิธี Aggluatination (109) เมื่อได้ปริมาณสูงมากกว่า 500 จึงทำการเจาะเลือดจากหัวใจในปริมาณ 20 –30 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ 3 – 4 ชั่วโมง เพื่อให้เลือด

Copyright by Mahidol University

แดงแข็งตัว แล้วจึงแยกเอาแต่น้ำเลือดใสที่เรียกว่าซีรัม (Serum) ออกมาใส่หลอดเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซนเซียส เพื่อนำไปใช้ต่อไป

ภาพที่ 3-2: แสดงการฉีดแอนติเจนเจือจางเข้าเส้นเลือดที่ใบหูกระต่าย

3.2.5.2 การทำ ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) นำเซลล์ไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ (จากปมกระถินเทพาทั้งหมดที่ได้จากการทดลอง) บี้ปมให้แตก แล้วมาปั่นตกตะกอนเซลล์ เทน้ำใสทิ้งทั้งหมด เติม Coating buffer pH 9.6 ลงไปในหลอดละ 1 มล.และนำเซลล์ที่เตรียมไว้นี้ของแต่ละสายพันธุ์โดยวิธีการ ELISA ดังขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) ใส่เซลล์ไรโซเบียมแอนติเจนที่เจือจางลงในหลุมของ Microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำ 2 หลุมต่อ 1 สายพันธุ์ แล้วปิดฝา Micro title plate นั้น

2) ทำ Plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 –7 องศาเซนเซียส เป็นเวลา 12 –16 ชั่วโมง

3) เทของเหลว (เซลล์แอนติเจน) ออกจาก Plate ให้หมดล้างหลุมด้วย Phosphate – Buffered Salain – Tween (PBST) โดยใส่ให้เต็มหลุม ทิ้งไว้ 1 – 3 วินาที แล้วเททิ้ง สลัดน้ำออกให้หมดจากในหลุมของ plate ทำการล้างด้วย PBST สองครั้ง

4) ใส่หางนมสด (Skim Milk) 3% จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมทุกหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซนเซียส ปืนเวลา 1 ชั่วโมง

5) ล้างหางนม (Skim Milk) ออก วิธีการล้างทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3

6) ใส่แอนติเซรัม ที่เตรียมจากกระต่ายที่ถูกทำให้เจือจางประมาณ 1 : 2000 ลงในหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซนเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7) ทำการล้างเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 3.3

Copyright by Mahidol University

สำนักหอสมุด

8) ใส่ Goat Antirabit IgG Alkaline Phosphase ที่ทำให้เจือจางใน Phosphate – Buffered Salain (PBS) อัตราส่วน 1: 4000 ลงในหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

9) ทำการล้างเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 3.3

10)ใส่สารละลาย Substrate ที่เตรียมใหม่ ๆ ละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อณหภูมิ 37 องศาเซนเซียส เป็นเวลา 30 – 60 นาทีจนกระทั่งเกิดสีเหลืองที่มองเห็นได้ชัดเจน

11) หยุดปฏิกิริยา โดยการเติม 3 M NaOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร

12) อ่านค่า Absorbance ที่ 405 นาโนเมตร (nm) โดยเครื่องอ่าน ELISA (ELISA reader)

Copyright by Mahidol University

ใบอนุญาต ก.2

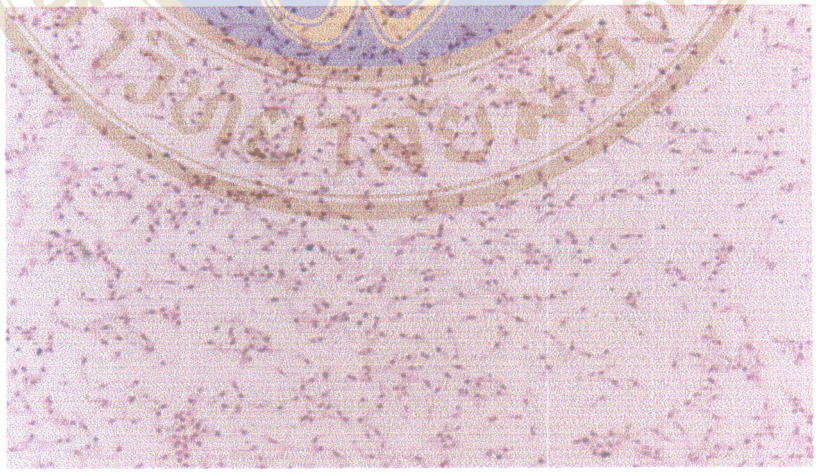
บทที่ 4

ผลการวิจัย และวิจารณ์ผล

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อไรโซเบียมและจำแนกสกุล

4.1.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไรโซเบียม

หลังจากได้รวบรวมเชื้อไรโซเบียมจากกระถินเทพาแหล่งต่างๆ จำนวน 39 ต้นซึ่งจะได้สายพันธุ์ไรโซเบียมจำนวน 39 สายพันธุ์ นำมาแยกเชื้อตามวิธีของ Somasegaran และ Hobben (103) ตรวจหาความบริสุทธิ์ ของเชื้อไรโซเบียม โดยทำการย้อมสีด้วย คาร์บอนฟูชชิน (Carbon fuschin) ภายใต้กล้องจุลทัศน์ กำลังขยาย 100 x ไรโซเบียมจะมีลักษณะเป็น ขีดหรือ ท่อนสีม่วงแดง มีจุดกึ่งกลางซึ่งเหมือนกับนิวเคลียส (ดังภาพที่ 4-1)



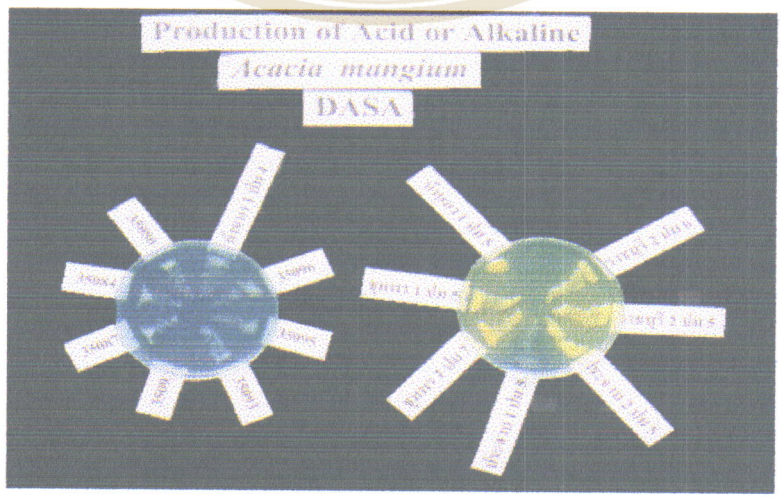
ภาพที่ 4-1: รูปร่างลักษณะของเชื้อไรโซเบียมที่ย้อมด้วยสีย้อมคาร์บอลฟูชซินตรวจสอบด้วยกล้องจุลทัศน์

Copyright by Mahidol University

4.1.2 การจำแนกสกุล (Genus) ของไรโซเบียม

การจำแนกสกุล (Genus) ของไรโซเบียมโดยอาศัยความสามารถในการผลิตกรด ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร Yeast Manitol Agar (YMA) ที่มี Bromthymol Blue (สีเขียว) ไอโซเลต(Isolate) ส่วนใหญ่ สร้างด่างเปลี่ยนสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน จัดเป็นพวก *Bradyrhizobium* ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 23 ไอโซเลต (ตามภาคผนวก ข-1) และจัดพวกที่ผลิตกรดเป็นพวก *Rhizobium* (80) เปลี่ยนสีอาหาร สีเขียวเป็นสีเหลือง มีจำนวนทั้งสิ้น 14 ไอโซเลต และ 2 ไอโซเลต มีสีเขียวเป็นกลาง พบว่าพวกที่เป็น *Bradyhizobium* การเจริญเติบโตของโคโลนี ใช้เวลา 4 – 5 วัน ส่วนพวก *Rhizobium* จะใช้เวลาในการเกิดโคโลนี 2 –4 วัน สอดคล้องกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (80) ว่า *Rhizobium* เป็นกลุ่มที่เจริญเร็ว ส่วน *Braddyrhizobium* เป็นกลุ่มที่เจริญช้า (ดังภาพที่ 4-2, 4-3)

ภาพที่ 4-2 : ลักษณะโคโลนีและการจัดกลุ่มตามการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast-Mannitol Agar (YMA) ที่มี Bromthymol Blue (BTB) เป็น pH indicator



ภาพที่ 4-3 : การจัดกลุ่มไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ว่าเป็นกลุ่มเจริญเร็ว *(Rhizobium)* หรือเจริญช้า*(Bradyrhizobium)*

Copyright by Mahidol University

4.1.3 การตรวจสอบกล้าเชื้อไรโซเบียม

หลังจากนำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และ ไอโซเลต (Isolated) เลี้ยงในหลอดแก้วบรรจุอาหารเหลวสูตร Yeast-Mannitol Broth (YMB) เขย่าฟลาสก์บนเครื่องเขย่า 10 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน เชื้อเจริญ เกิดความขุ่นในอาหารเหลว ปิเปตตัวอย่างเชื้อใส่ใน Cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่า $O.D._{600}$ ประมาณ 0.45-0.60 แล้วพบว่ามีปริมาณไรโซเบียม 10^9 เซลล์ /มิลลิลิตร ขึ้นไป ซึ่งเพียงพอที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ

4.2 เปอร์เซนต์การงอกของกระถินเทพา

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดไม้กระถินเทพา 2 ชนิดนั้น พบว่ากระถินเทพาหมายเลข 98-0028 เก็บจากจังหวัดสงขลามีการงอกร้อยละ 94 และหมายเลข 99-0021 เก็บจากจังหวัดนครราชสีมา การงอกร้อยละ 89 สังเกตได้ว่าแม่ไม้กระถินเทพาแม่ไม้ที่เก็บมาจากจังหวัดที่มีฝนตกชุก หรือมีความชื้นสูงจะมีอัตราการงอกสูง แม่ไม้สงขลาจึงเป็นสายพันธุ์แม่ไม้ที่ให้เปอร์เซนต์การงอกดีกว่าแม่ไม้จังหวัดนครราชสีมา กล้าไม้ทั้ง 2 แม่ไม้ดังกล่าวจะนำ มาใช้ในการเป็น Host หาไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการเจริญเติบโตกระถินเทพา

หลังจากเลี้ยงกล้ากระถินเทพาจากแม่ไม้ 2 แหล่ง โดยใส่เชื้อไรโซเบียมจำนวน 39 สายพันธุ์ 39 ตำรับทดลองและไม่ใส่เชื้อ (Control) 2 ตำรับทดลองใน Leonard's jar เป็นเวลา 3 เดือน ตามผังการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เก็บตัวอย่างพืชมา ซึ่งแสดงผลไว้ ดังในตารางที่ ข-2 และ ข-3 แล้วบันทึกผลที่ได้ได้แก่

4.3.1 ความสูง

จากการสังเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ดังภาพที่ 4-8) การเจริญเติบโตด้านความสูง แม่ไม้ 1 จังหวัดสงขลาพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติโดยต้นที่ทำการใส่เชื้อไรโซเบียม

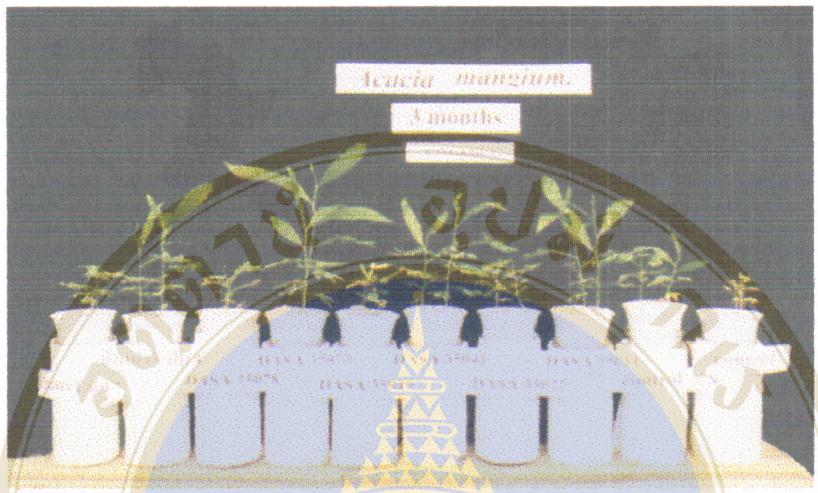
Copyright by Mahidol University

มีค่าเฉลี่ยความสูงต่อต้นอยู่ในช่วง 7.92 - 15.08 เซนติเมตร โดยที่สายพันธุ์ DASA35001 มีความสูงสูงสุด 15.08 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ 35009 350073 และ 350084 ซึ่งมีความสูง 14.58, 14.25 และ 14.17 เซนติเมตร ตามลำดับ แม่ไม้ 2 รหัส No. 990021 นครราชสีมา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งความสูงอยู่ในช่วง 7.17 - 12.67 เซนติเมตร โดยที่สายพันธุ์ประจวบ 1 ปม 5 สูงสุด มีความสูง 13.92 เซนติเมตรรองลงมาได้แก่สายพันธุ์ DASA35001 DASA35009 และ DASA35070 ซึ่งมีความสูง 13.33, 12.92 เซนติเมตร และ 12.67a-d ตามลำดับ ซึ่งต้นไม้ที่ไม่ได้ใส่เชื้อไรโซเบียม (Control) ในแม่ไม้ 1 มีความสูง 6.42 เซนติเมตร และต้นไม้ที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมีความสูง 8.50 เซนติเมตร และในแม่ไม้ 2 ต้นไม่ได้ใส่เชื้อไรโซเบียม (Control) มีความสูง 5.17 เซนติเมตร และต้นที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมีความสูง 9.00 เซนติเมตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใส่เชื้อไรโซเบียมลงในต้นไม้ของแม่ไม้ทั้ง 2 ชนิดจะทำให้ความสูงกระถินเทพามากกว่าใส่ปุ๋ยและไม่ใส่อะไรเลย

4.3.2 จำนวนปมต่อต้นและน้ำหนักปม

จากผลการทดลองพบว่าปมรากจะเกิดขึ้นในตำรับการทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อไรโซเบียมโดยลักษณะการเกิดปมของกระถินเทพาที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมชนิด *Bradyrhizobium* ซึ่งมีประสิทธิภาพ ส่วนมากปมจะมีขนาดใหญ่ จำนวนปมเฉลี่ยประมาณ 3-38 ปม และมีน้ำหนักปมแห้งโดยเฉลี่ยประมาณ 0.004 –0.0048 กรัมแต่ถ้าเป็นพวก *Rhizobium* ที่ไม่มีประสิทธิภาพ ต่อปมรากกระถินเทพาปมจะมีขนาดเล็ก จำนวนเฉลี่ย 1-44 ปม และต้นที่ไม่ใส่เชื้อกับต้นที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนจะไม่มีการเกิดปมราก กลุ่มสายพันธุ์ *Bradyrhizobium* ที่ทำให้เกิดปมสูงสุดจากการสังเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ดังภาพที่ 4-8) ในแม่ไม้ที่ 1 ได้แก่สายพันธุ์ DASA35080 มีจำนวนปม 38 ปมรองลงมาได้แก่ สายพันธุ์ DASA35076 DASA35001 DASA35084 เท่ากันตามลำดับมีจำนวนปม 37, 33, 33 ปม ส่วนน้ำหนักปมสูงสุดในแม่ไม้ที่ 1 ได้แก่สายพันธุ์ DASA35058 มีน้ำหนักปม 0.051 กรัม รองลงมาได้แก่ DASA35080 DASA35009 มีน้ำหนักปมดังนี้ 0.048, 0.041 กรัมตามลำดับ สำหรับในแม่ไม้ที่ 2 ได้แก่ สายพันธุ์ DASA35042 มีจำนวนปม 46 ปมรองลงมาได้แก่ DASA35093 DASA35076 มีจำนวนปม 37 ปมและ 35 ปมตามลำดับในแม่ไม้ที่ 2 น้ำหนักปมสูงสุดได้แก่ สายพันธุ์ DASA35042 โดยมีน้ำหนักปม 0.046 กรัมรองลงมาได้แก่ DASA35080 DASA35076 DASA35009 ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ย 0.036, 0.035, 0.033 กรัมตามลำดับ

Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 4-4: เปรียบเทียบการเจริญเติบโตกระถินเทพาแม่ไม้ 1 ที่มีปฏิกิริยาต่อสายพันธุ์ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ

ภาพที่ 4-5: เปรียบเทียบการเจริญเติบโตกระถินเทพาแม่ไม้ 2 ที่มีปฏิกิริยาต่อสายพันธุ์ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ

Copyright by Mahidol University

4.3.3 น้ำหนักต้นแห้ง

จากการสังเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ดังภาพที่ 4-8) น้ำหนักต้นแห้งของพืชโดยการชั่งน้ำหนักมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยในแม่ไม้ที่ 1 พบว่าน้ำหนักต้นแห้งโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.053 – 0.584 กรัม โดยต้นที่มีน้ำหนักแห้งสูงสุด ได้แก่ DASA35084 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักต้นแห้ง 0.584 กรัมรองลงมาได้แก่ DASA35009 DASA35080 และ DASA35058 ตามลำดับมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักต้นแห้ง 0.512, 0.475, 0.455 กรัม ส่วนต้นที่ไม่ใส่อะไรเลยมีน้ำหนักต้นแห้งเฉลี่ย 0.053 กรัม และต้นที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมีน้ำหนักต้นแห้ง 0.164 กรัม ดังนั้นน้ำหนักต้นแห้งเฉลี่ยต้นปลูกเชื้อไรโซเบียมจะสูงกว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อทางสถิติ ส่วนแม่ไม้ที่ 2 พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง มีน้ำหนักต้นแห้งสูงสุด ได้แก่ DASA35042 มีน้ำหนักต้นแห้งเฉลี่ย 0.616 กรัมรองลงมาได้แก่ DASA35076 ประจวบ 1 ปม5 และ DASA35093 โดยเฉลี่ยน้ำหนักต้นแห้ง ได้แก่ 0.606, 0.551, 0.503 กรัมตามลำดับ โดยต้นที่ไม่ใส่อะไรเลยมีน้ำหนักต้นแห้งเฉลี่ย 0.039 กรัม และต้นที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมีน้ำหนักต้นแห้งเฉลี่ย 0.130 กรัมจะเห็นได้ว่าต้นที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมยังคงมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งต้นสูงกว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไรโซเบียม และใส่ปุ๋ย น้ำหนักต้นแห้งโดยเฉลี่ยแม่ไม้ที่ 1 จะสูงกว่าแม่ไม้ที่ 2 เนื่องจากแม่ไม้ที่ 1 มีถิ่นกำเนิดในบริเวณที่มีฝนตกชุกทางภาคใต้ ซึ่งทำให้พันธุกรรมของกล้าไม้กระถินเทพาแม่ไม้ 1 นี้มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าแม่ไม้ 2 ซึ่งอยู่ในถิ่นแห้งแล้ง

ภาพที่ 4-6: การชั่งน้ำหนักต้นแห้งกระถินเทพา เมื่อผ่านการอบแห้งโดยตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซนเซียส

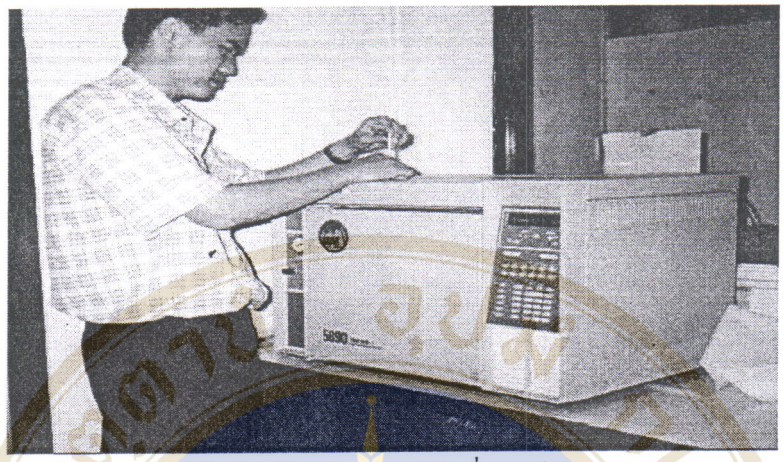
Copyright by Mahidol University

4.3.4 วิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylen Reduction Assay (ARA)

จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่า ARA (Acetylyne Reduction Asay) พบว่าในแม่ไม้1 มีประสิทธิภาพ ในการตรึงไนโตรเจนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีอัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.41-5.987 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง สายพันธุ์ที่มีการตรึงไนโตรเจนสูงสุดได้แก่ DASA35080 มีการตรึงไนโตรเจน 5.987ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง รองลงมาได้แก่ DASA35084 DASA35058 และDASA 35073 มีอัตราการตรึงไนโตรเจน 5.308, 3.378 และ 2.938 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง ส่วนแม่ไม้ที่ 2 ความแตกต่างไนโตรเจนแต่ละสายพันธุ์มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเช่นกัน โดยมีอัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.316-3.833 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง สายพันธุ์ไรโซเบียมที่ตรึงไนโตรเจนสูงสุดได้แก่ DASA35009 มีค่าเฉลี่ยการตรึงไนโตรเจน 3.833 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง รองลงมาได้แก่ DASA35076 DASA35093 DASA35073 มีอัตราการตรึงไนโตรเจน 3.671, 3.568, 3.321 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนต้นที่ไม่ใส่อะไรเลยและต้นที่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนไม่พบการตรึงไนโตรเจน

จากการทดลองพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักต้นแห้ง กับ ค่า ARA ไม่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงเสมอไป แม้พืชมีน้ำหนักต้นแห้งมาก จะมีแนวโน้มให้ ARA มากแต่ก็ไม่เป็นเกณฑ์ตายตัว ดังจะพบในการทดลองของ Romero et.al (110) ซึ่งหากิจกรรมของไนโตรจีเนส ในหน่วยของนาโนโมลเอทิลีน/พืช/ชั่วโมง โดยทดลองกับพืช Cajunus cajan ; ณัฐพร (111) ทดลองกับถั่วเหลืองได้ความสัมพันธ์เช่นเดียวกัน อธิบายว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมบริเวณปมรากเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน โดยการนำผลผลิตเอนไซม์ไนโตรจีเนสไปใช้ ขึ้นกับการเจริญของไรโซเบียมในปม ด้วยเหตุผลนี้จึงเป็นปกติที่พบว่าสายพันธุ์ที่ให้การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงกว่า Shishido และ Paper (112) ได้หาความสัมพันธ์เดียวกันเมื่อทดลองใน Alfafa ; Skot et., al (113) วิเคราะห์ค่า ARA จากต้นพืช Pisum sativum ที่ใส่เชื้อด้วยไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้วิธี ARA พบว่าเชื้อแต่ละตัวให้ค่า ARA คิดเป็นไมโครโมลเอทิลีน/กรัมน้ำหนักปมแห้ง/นาที ต่างกันตั้งแต่ 0.29-1.29 ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบที่น้ำหนักแห้งเดียวกันเชื้อแต่ละตัวแต่ละสายพันธุ์จะให้ค่า ARA ไม่เท่ากัน

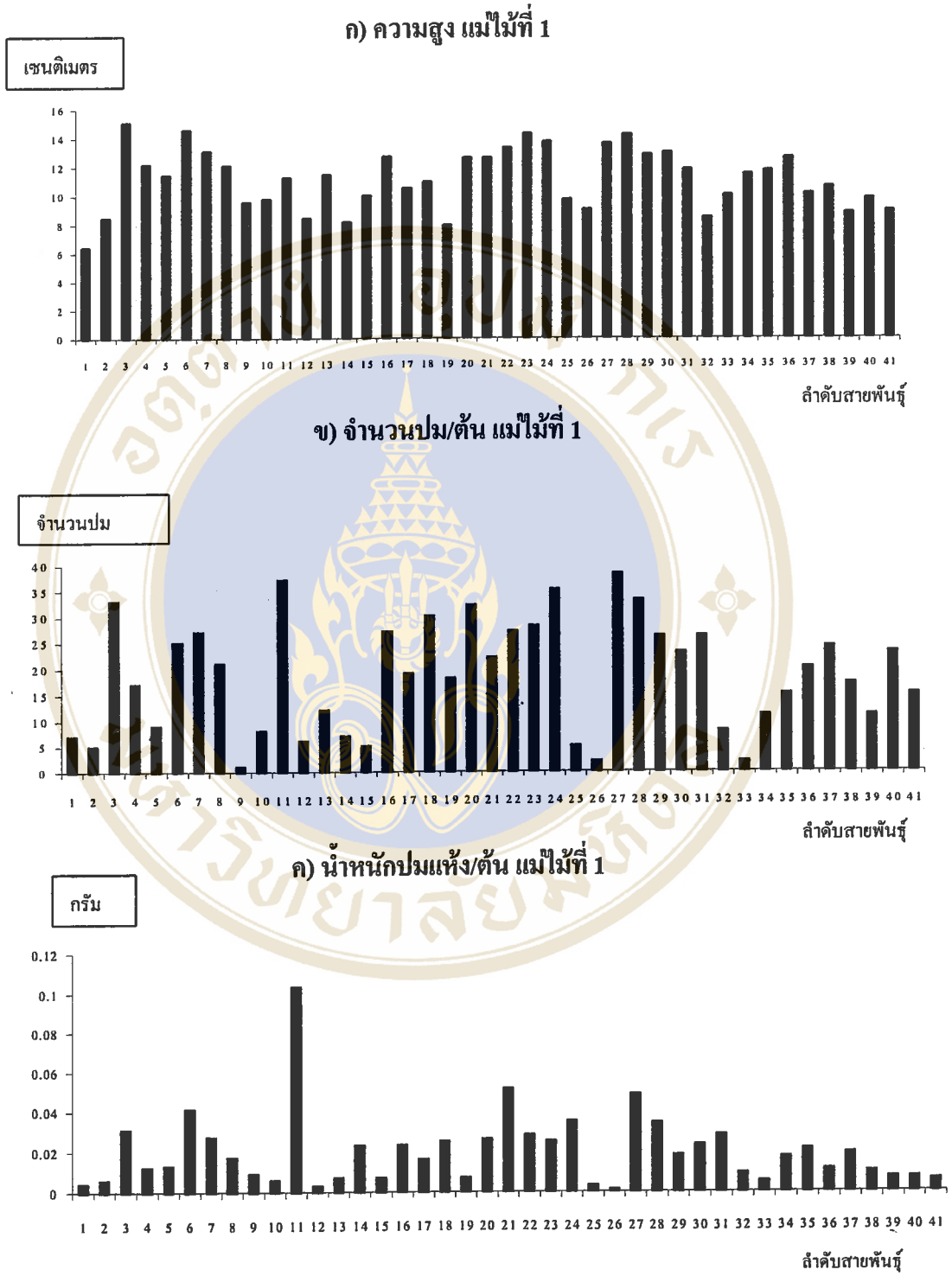
Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 4-7: แสดงการวิเคราะห์หาไนโตรเจนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chomatograph)

จากการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียม 39 สายพันธุ์ ที่ช่วยในการเจริญเติบโตของแม่ไม้กระถินเทพา 2 แม่ไม้โดยทำการทดลองใน Leonard's Jar สามารถสรุปได้ว่าสายพันธุ์ไรโซเบียม DASA 35080 DASA35076 DASA3578 DASA35084 DASA35086 และ DASA 35073 มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากให้น้ำหนักต้นแห้ง ความสูง ปริมาณการตรึงไนโตรเจน จำนวนปม และน้ำหนักปมแห้งสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ จากนั้นจึงนำ สายพันธุ์ไรโซเบียม ทั้ง 6 สายพันธุ์นี้มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการช่วยการเจริญเติบโตของแม่ไม้กระถินเทพา 2 แม่ไม้ร่วมกับการใช้กากตะกอนจากโรงงานอุตสาหกรรมเบียร์ ซึ่งจะได้ทำการทดลองต่อไป

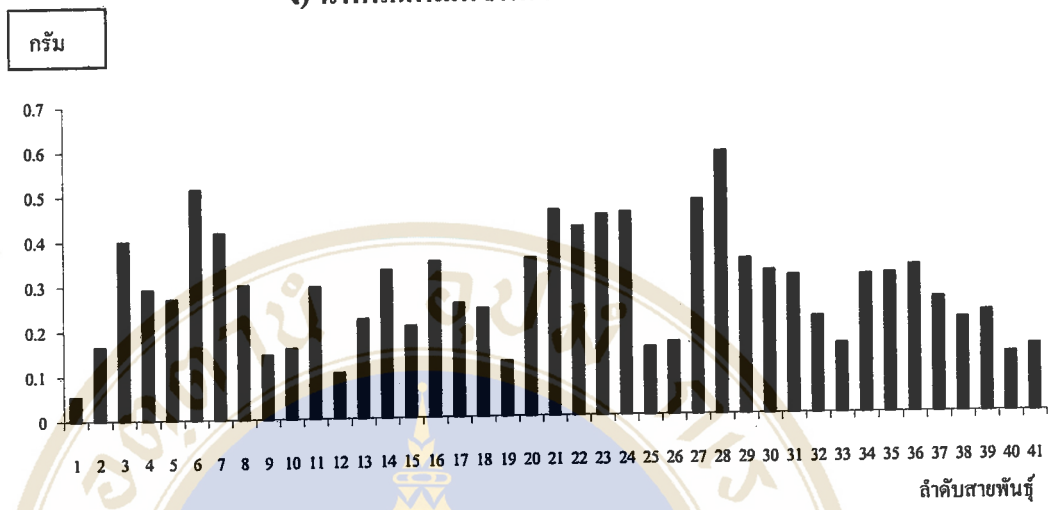
Copyright by Mahidol University



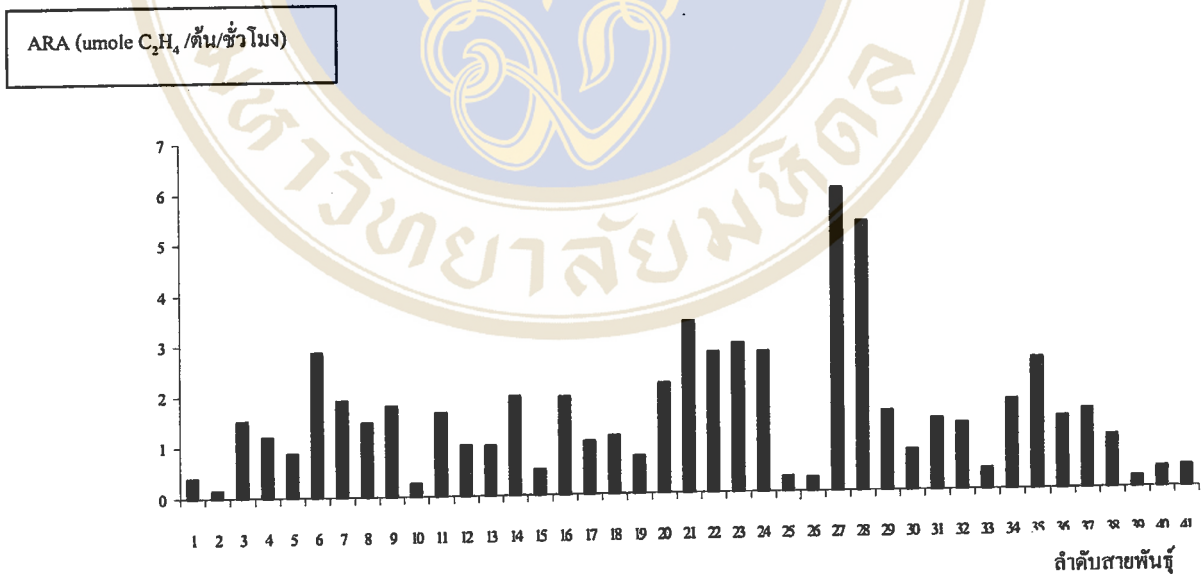
ภาพที่ 4-8: เปรียบเทียบการเจริญเติบโตกระถินเทพา แม่ไม้ 1 สงขลา ที่ทำปฏิกิริยากับสายพันธุ์ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ ก)ความสูง ข)จำนวนปมแห้ง ค)น้ำหนักปมแห้ง ง)น้ำหนักต้นแห้ง จ)การตรึงไนโตรเจน

Copyright by Mahidol University

ง) น้ำหนักต้นแห้ง/ต้น แม่ไม้ที่ 1



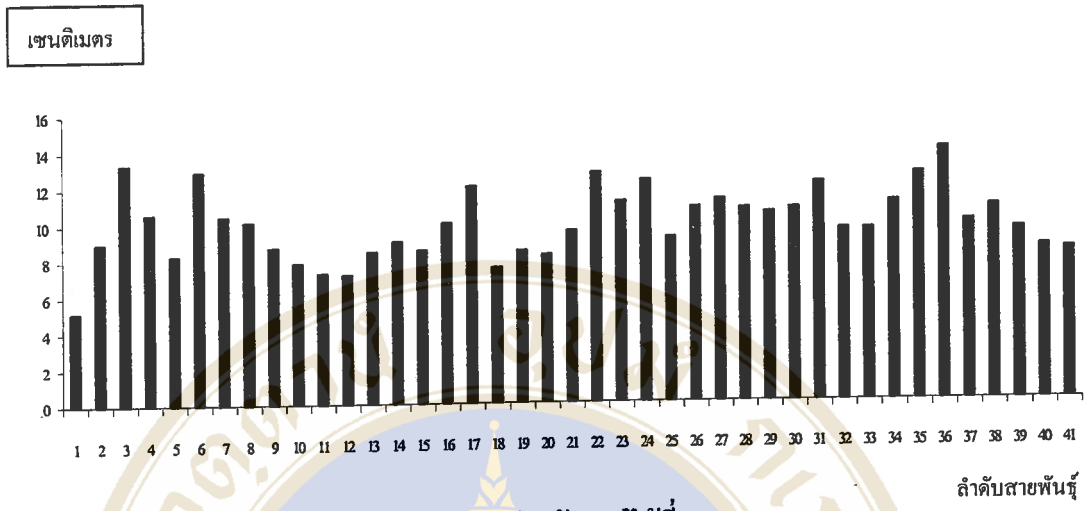
จ) การตรึงไนโตรเจนจากการวัด Nitrogenase Activity (ARA) แม่ไม้ที่ 1



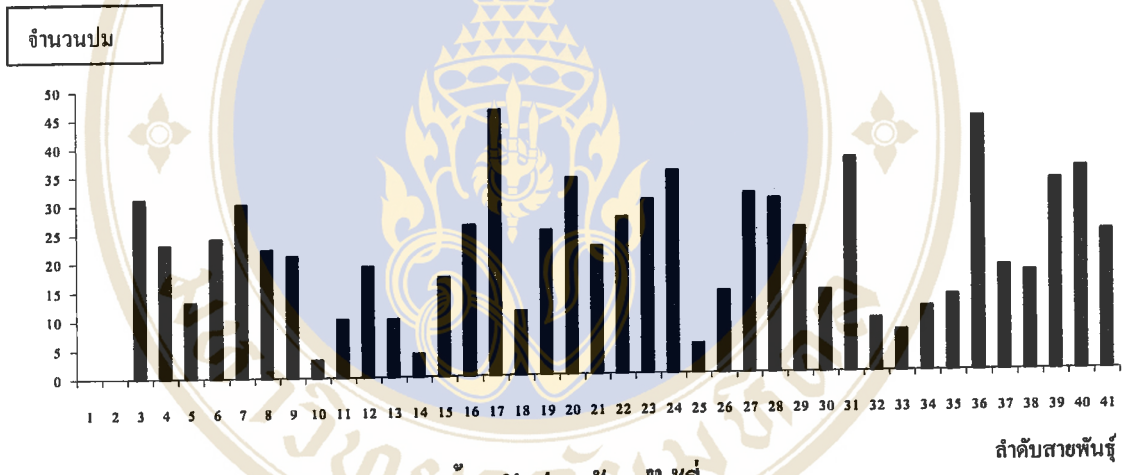
หมายเหตุ: 1) control 2) control +N 3) DASA 35001 4)DASA 35004 5)DASA35007 6)DASA35009 7) DASA35011 8) DASA35013 9) DASA35014 10) DASA35017 11) DASA35018 12) DASA35022 13) DASA35027 14) DASA35030 15) DASA35039 16) DASA35041 17) ASA35042 18) DASA35046 19) DASA35049 20) DASA35052 21) DASA35058 22) DASA35070 23) DASA35073 24) DASA35076 25) DASA35077 26) DASA35078 27) DASA35080 28) DASA35084 29) DASA35087 30) DASA35092 31) DASA35093 32) DASA35095 33) DASA35096 34) บ้านนา 1 ปม 4 35) บ้านนา 1 ปม 5 36) ประจวบ 1 ปม 5 37)ประจวบ 2 ปม 5 38)ชุมพร 1 ปม 5 39)ชุมพร 1 ปม 7 40) ราชบุรี 2 ปม 5 และ41)ราชบุรี 2 ปม 6

Copyright by Mahidol University

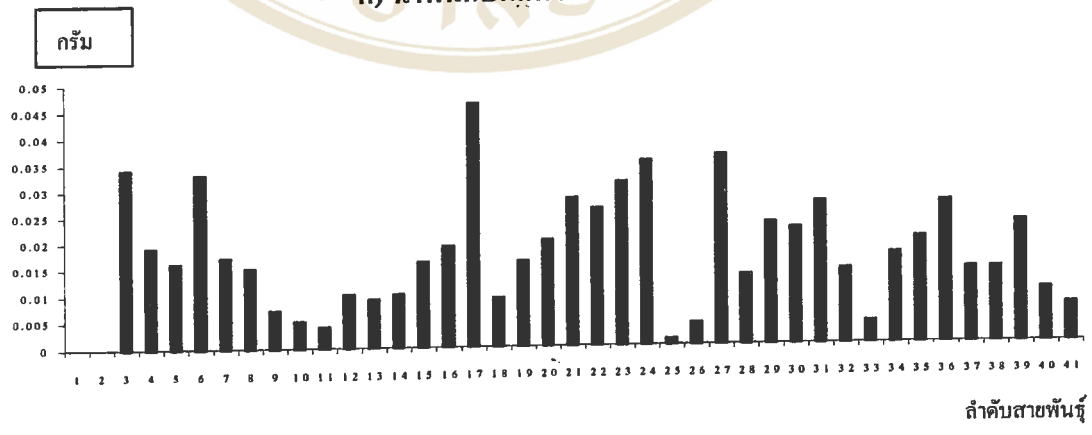
ก) ความสูง แม่ไม้ที่ 2



ข) จำนวนปม/ต้น แม่ไม้ที่ 2



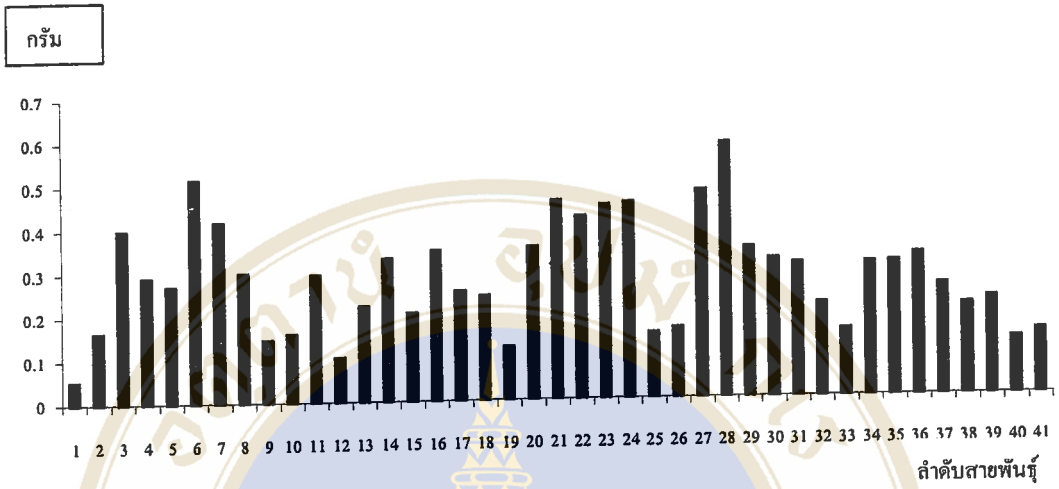
ค) น้ำหนักปมแห้งแม่ไม้ที่ 2



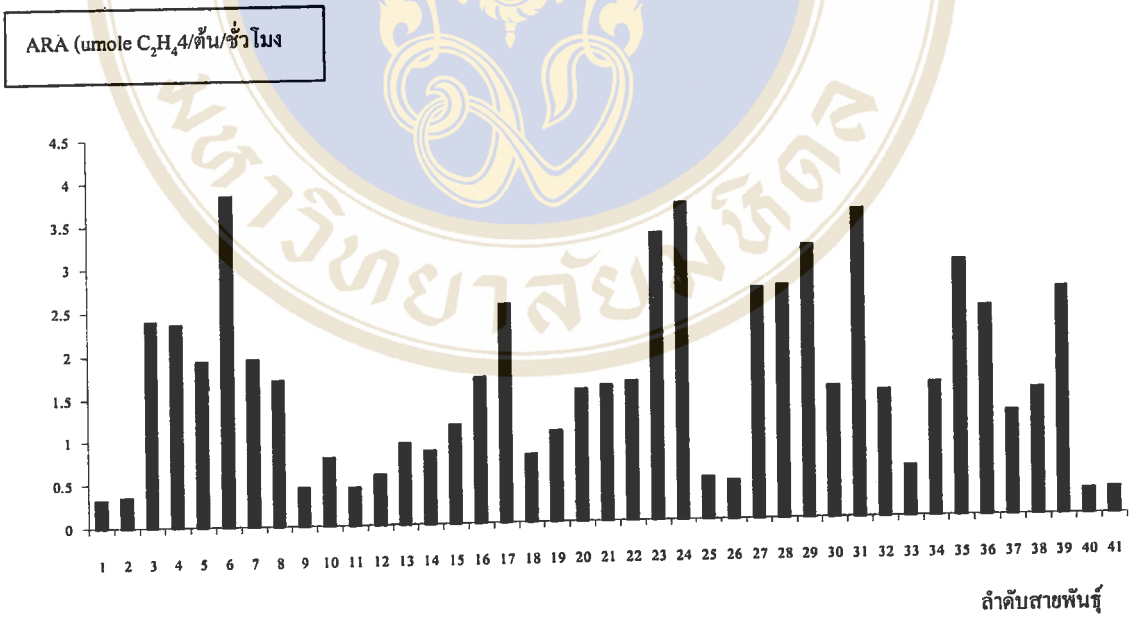
ภาพที่ 4-9: เปรียบเทียบการเจริญเติบโตกระถินเทพา แม่ไม้ 2 นครราชสีมา ที่ทำปฏิกิริยากับสายพันธุ์ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ ก)ความสูง ข)จำนวนปมแห้ง ค)น้ำหนักปมแห้ง ง)น้ำหนักต้นแห้ง จ)การตรึงไนโตรเจน

Copyright by Mahidol University

ง) น้ำหนักต้นแห้ง แม่ไม้ที่ 2



จ) การตรึงไนโตรเจนจากการวัด Nitrogenase Activity (ARA) แม่ไม้ที่ 2



หมายเหตุ: 1) control 2) control +N 3) DASA 35001 4)DASA 35004 5)DASA35007 6)DASA35009 7) DASA35011 8) DASA35013 9) DASA35014 10) DASA35017 11) DASA35018 12) DASA35022 13) DASA35027 14) DASA35030 15) DASA35039 16) DASA35041 17) ASA35042 18) DASA35046 19) DASA35049 20) DASA35052 21) DASA35058 22) DASA35070 23) DASA35073 24) DASA35076 25) DASA35077 26) DASA35078 27) DASA35080 28) DASA35084 29) DASA35087 30) DASA35092 31) DASA35093 32) DASA35095 33) DASA35096 34) บ้านนา 1 ปม 4 35) บ้านนา 1 ปม 5 36) ประจวบ 1 ปม 5 37)ประจวบ 2 ปม 5 38) ชุมพร 1 ปม 5 39) ชุมพร 1 ปม 7 40) ราชบุรี 2 ปม 5 และ 41)ราชบุรี 2 ปม 6

Copyright by Mahidol University

4.4 การทดสอบ ELISA เพื่อตรวจสอบว่าสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ถูกคัดเลือกมานั้นจัดเป็นกลุ่มเดียวกันหรือชนิดเดียวกันหรือไม่

ผลการจัดกลุ่มเชื้อไรโซเบียมโดยใช้เทคนิค ELISA เมื่อใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA35087 เป็นบวกและสายพันธุ์ DASA35078 เป็นลบ จากค่า Absorbance ที่อ่านได้จากเครื่องอ่าน ELISA พบว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA35073 DASA35080 และ DASA35093 เป็นบวก จัดว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับ DASA35087 ดังนั้น จึงต้องเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดเป็นตัวแทนกลุ่ม จึงเลือกสายพันธุ์ DASA35080 เป็นตัวแทน ส่วน DASA35076 นั้นค่า Absorbance มีค่าต่างจากกลุ่มมาก โดยมีค่าใกล้เคียงกับสายพันธุ์ DASA35078 มีค่าเป็นลบ และจัดว่าเป็นคนละกลุ่มกับกลุ่มแรก จึงสามารถเลือกสายพันธุ์ DASA35076 มาใช้เป็นตัวแทนได้อีกหนึ่งชนิด

เพื่อเป็นการตรวจสอบผลที่ได้อีกครั้งหนึ่ง จึงได้นำสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ DASA01008 DASA01009 DASA01010 มาทดสอบเปรียบเทียบว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกันหรือไม่ ปรากฏว่าไม่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับสายพันธุ์ไรโซเบียมของกระถินเทพา เนื่องจากค่าที่ได้มีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นสรุปว่า การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงได้ 2 ชนิด คือ สายพันธุ์ DASA35076 กับ DASA35080

4.5 การหาอัตราส่วน กากตะกอนที่เหมาะสม ร่วมกับการใช้ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของแม่ไม้กระถินเทพา 2 แม่ไม้

4.1.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ดิน

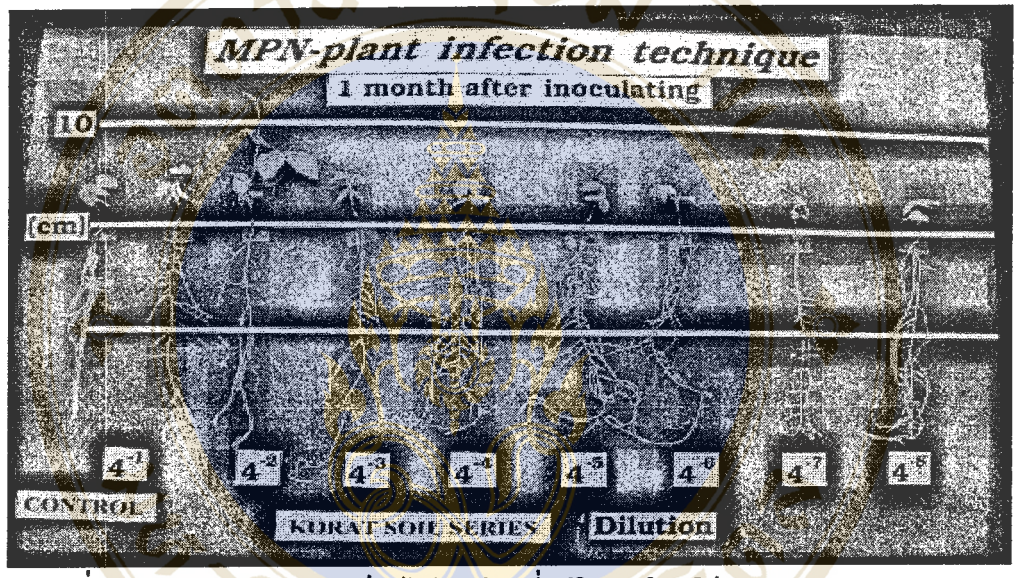
4.5.1.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดินทางเคมี มีค่าวิเคราะห์ดังนี้

ตารางที่ 4-1 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดินทางเคมี

ชนิดค่าวิเคราะห์	ค่าวิเคราะห์
ค่าความเป็นกรด – ด่าง	4.64
ค่าการนำไฟฟ้า	0.060
เปอร์เซนต์อินทรียสาร	0.47
N (%)	0.112
PO^{-} (ppm)	29
K (ppm)	88

Copyright by Mahidol University

4.5.1.2 การตรวจวิเคราะห์ดินทางชีวภาพ นำดินมาวิเคราะห์หาไรโซเบียมที่มีอยู่ในดินโดยวิธี Most Probable Number (MPN) ตามวิธีของ Somasaegaran and Hoben (1985) โดยใช้ถั่ว Seratose พบว่าในดินที่เก็บมาจากดินในชุด โคราชนั้นไม่ปรากฏพบเชื้อไรโซเบียมอยู่ในดิน เนื่องจากไม่พบปมไรโซเบียมบริเวณรากถั่ว Serato ดัง (ภาพที่ 4-10) ดังนั้นจึงสามารถนำดินชุดโคราชนี้มาใช้ในการทดลองได้โดยไม่ต้องฆ่าเชื้อในดินก่อนทำการทดลอง



ภาพที่ 4-10 แสดงการวิเคราะห์หาไรโซเบียมที่อยู่ในดินโดยวิธี Most Probable Number (MPN)

Copyright by Mahidol University

4.1.2 ผลการตรวจวิเคราะห์กากตะกอน

ตารางที่ 4-2 ผลการวิเคราะห์กากตะกอนมีผลการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

ชนิดค่าวิเคราะห์	ค่าวิเคราะห์
ค่าความเป็นกรด – ด่าง	4.64
ค่าการนำไฟฟ้า	0.060
เปอร์เซนต์อินทรียสาร	0.47
N (%)	1.566
PO^{-} (ppm)	495
K (ppm)	928
Mn (ppm)	119.18
Cr (ppm)	122.53
Ni (ppm)	26.11
Zn (ppm)	88.53
Cu (ppm)	92.73
Cd (ppm)	26.11
Pb (ppm)	467.62

จะเห็นได้ว่ากากตะกอนนั้นมีค่าโลหะหนักค่อนข้างสูงเนื่องมาจากกระบวนการในการผลิตกากตะกอนในโรงงานอุตสาหกรรมเบียร์มีการปนเปื้อนของโลหะหนักในปริมาณที่สูง

4.5.3 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของกากตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสียไรโซเบียมต่อการเจริญเติบโตกระถินเทพา

หลังจากนำเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงที่ได้จากการคัดเลือกแล้ว 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ DASA35080 และDASA35076 มาเลี้ยงในหลอดแก้วบรรจุอาหารเหลวสูตร Yeast Monitol Broth (YMB) จากนั้นนำเอาเชื้อมาผสมกันใน Hood ตรวจวัดปริมาณไรโซเบียมบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร หยดลงในวัสดุเพาะชำ ที่ปลูกกล้าไม้กระถินเทพาในตำรับการทดลองต่างๆ 11 ตำรับการทดลองตามผังการทดลองแบบ Ramdomized Compleate Block Design (RCB) เป็นระยะเวลา 3 เดือนแล้ว ทำการเก็บข้อมูลและประเมินผลทางสถิติ โดยใช้DMRT (Duncan's Multiple Range

Copyright by Mahidol University

Test)ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 0.05 เกี่ยวกับ ความโต ความสูง มวลชีวภาพ ค่าปริมาณไนโตรเจนในพืช และปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ ดังแสดงในตารางภาคผนวก ค-1 และ ค-2

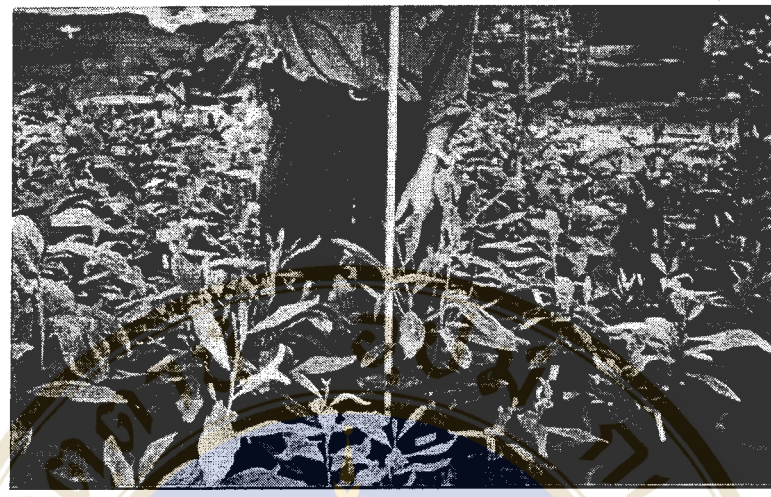
4.5.3.1 ความโตของกล้าไม้บริเวณคอราก (Diameter at root collar, Do_0) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงให้เห็นว่า ในแม่ไม้ 1 สงขลา แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ยความโตของกล้าไม้บริเวณคอรากที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยความโตอยู่ในช่วง 0.438-0.720 เซนติเมตร และเมื่อแบ่งกลุ่มสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด ได้แก่ ตำรับที่ใส่ปุ๋ยและตำรับตำรับที่กากตะกอนในอัตรา 1:1 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.720 และ 0.653 เซนติเมตรตามลำดับ กลุ่มที่สองได้แก่ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1: 2 ใส่เชื้อร่วมกับกากตะกอน 1 : 1 กากตะกอนในอัตรา 1 :2 กากตะกอน 1:3 กากตะกอน 1:4 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.615, 0.610, 0.591, 0.585 และ 0.579 เซนติเมตรตามลำดับ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตำรับ ใส่เชื้อเพียงอย่างเดียว และใส่เชื้อร่วมกับกากตะกอน 1 :2 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.538 และ0.532 เซนติเมตร กลุ่มที่4 ได้แก่ ใส่เชื้อร่วมกับกากตะกอน 1:4 และ ไม่ได้ใส่อะไรเลยโดยมีค่าเฉลี่ย 0.472 และ 0.438 เซนติเมตร (ภาพที่ 4-15) สำหรับแม่ไม้ 2 แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ยความโตของกล้าไม้บริเวณคอรากที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยความโตอยู่ในช่วง 0.297 – 0.590 เซนติเมตร และเมื่อแบ่งกลุ่มพบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด ได้แก่ ตำรับที่ใส่ปุ๋ย โดยมีค่าเฉลี่ย 0.590 เซนติเมตร กลุ่มที่ 2 ได้แก่ตำรับที่ใส่กากตะกอนในอัตรา 1 : 3 , ใส่เชื้อร่วมกับกากตะกอน 1 : 3 , ใส่เชื้อร่วมกับกากตะกอน 1 : 1 ,ใส่กากตะกอน 1 : 1 ,ใส่กากตะกอน 1:4 , ใส่เชื้อร่วมกับกากตะกอน 1 : 4 , ใส่เชื้อไรโซเบียมอย่างเดียว , ใส่กากตะกอน 1 : 2 และ ไม่ใส่อะไรเลยโดยมีค่าเฉลี่ย 0.470 , 0.416, 0.411, 0.410, 0.393, 0.372, 0.370, 0.370 และ 0.328 เซนติเมตรตามลำดับ กลุ่มที่สามได้แก่ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1: 2 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.297 เซนติเมตร (ภาพที่ 4-16)

Copyright by Mahidol University

ภาพที่ 4-11 แสดงการวัดความโตตำรับการทดลองกล้าไม้กระถินเทพา หลังจากครบ 3 เดือน

4.5.3.2 ความสูงของกล้าไม้จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ แม่ไม้ 1 สงขลา แสดงให้เห็นว่า แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ยความสูงของกล้าไม้ ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยความสูงอยู่ในช่วง 39.475 – 55.325 เซนติเมตร และเมื่อแบ่งกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด ได้แก่ ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1:1 , ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:2 ,ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:3 , ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมอย่างเดียว , ตำรับที่ใส่ปุ๋ย ,ตำรับที่ใส่กากตะกอนอัตรา1:4 , และตำรับที่ใส่กากตะกอนอัตรา 1:1 โดยมีค่าเฉลี่ย 55.325, 54.650, 54.013, 53.325, 53.125, 50.875, 49.825 และ 45.250 เซนติเมตรตามลำดับ กลุ่มที่สอง ได้แก่ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1: 4 โดยมีความสูงเฉลี่ย 43.7 เซนติเมตร กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตำรับ ที่ไม่ได้ใส่อะไรเลย โดยมีความสูงเฉลี่ย 42.375 เซนติเมตรและกลุ่มที่สี่ ได้แก่ ตำรับที่ใส่เชื้อร่วมกับกากตะกอน 1 :3โดยมีค่าเฉลี่ย 39.475 เซนติเมตร และภาพที่ 4-15 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ แม่ไม้ 2 นครราชสีมา แสดงให้เห็นว่า แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ยความสูงของกล้าไม้ ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยความสูงอยู่ในช่วง 26.65-60.65 เซนติเมตร พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด ได้แก่ ตำรับที่ใส่ปุ๋ย โดยมีค่าเฉลี่ย 60.65 เซนติเมตรกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:3 มีค่าเฉลี่ย 40.83 เซนติเมตร กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:1 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:2 ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมอย่างเดียว และ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1: 1 โดยมีค่าเฉลี่ยดังนี้ 34.50, 33.25, 31.33 และ 30 เซนติเมตร ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 4 ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 2 โดยมีค่าเฉลี่ยดังนี้ 28.40, 27.75 เซนติเมตรตามลำดับ กลุ่มที่ 5 ได้แก่ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 ,ตำรับที่ใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 4 โดยมีค่าเฉลี่ย 26.83 และ 26.65 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-16)

Copyright by Mahidol University



ภาพที่ 4-12 แสดงการวัดความสูงการทดลองกล้าไม้กระถินเทพาหลังจากครบ 3 เดือน

4.5.3.3 น้ำหนักต้นแห้ง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ แม่ไม้ 1 สงขลา แสดงให้เห็นว่า แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของกล้าไม้ ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 14.50 – 35.75 กรัม พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด ได้แก่ ตำรับที่ใส่ปุ๋ยโดยมีค่าเฉลี่ย 32.75 กรัม กลุ่มที่2 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:2 ,ตำรับใส่ไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอนอัตรา 1:1 , ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอนอัตรา 1:2 โดยมีค่าเฉลี่ยดังนี้ 26.63, 24.50 และ 24.00 กรัม กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:4 , ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:3โดยมีค่าเฉลี่ยดังนี้ 19.75, 19.65 กรัม ตามลำดับ , กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ตำรับใส่ไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอนอัตรา 1:4 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยดังนี้ 18.90 กรัม กลุ่มที่ 5 ได้แก่ ตำรับที่ใส่เชื้อไรโซเบียมเพียงอย่างเดียว ,ตำรับที่ใส่กากตะกอนอัตรา1:1 , และตำรับใส่ไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอนอัตรา 1:3 โดยมีค่าเฉลี่ย 17.25, 15.00 และ 14.75 กรัม (ภาพที่ 4-15) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ แม่ไม้ 2 นครราชสีมา แสดงให้เห็นว่า แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งกล้าไม้ ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 5.25 – 17.03 กรัม เป็นเกณฑ์พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้คือกลุ่มที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด ได้แก่ ตำรับที่ใส่ปุ๋ย , ตำรับใส่ไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอนอัตรา 1:1 โดยมีค่าเฉลี่ย 17.03 และ 13.50 กรัมกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:3 มีค่าเฉลี่ย 10.83 กรัม กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:1 มีค่าเฉลี่ย 8.00 กรัม กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:2, ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมอย่างเดียว, ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1:2, ตำรับใส่ไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอนอัตรา 1:3, ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1:4 , ตำรับใส่ไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอนอัตรา 1:4 และ

Copyright by Mahidol University

ตำรับที่ไม่ได้ใส่อะไรเลยโดยมีค่าเฉลี่ยดังนี้ 6.93, 6.65, 6.75, 6.75, 6.00, 5.25 และ 5.00 กรัม (ภาพที่ 4-16)

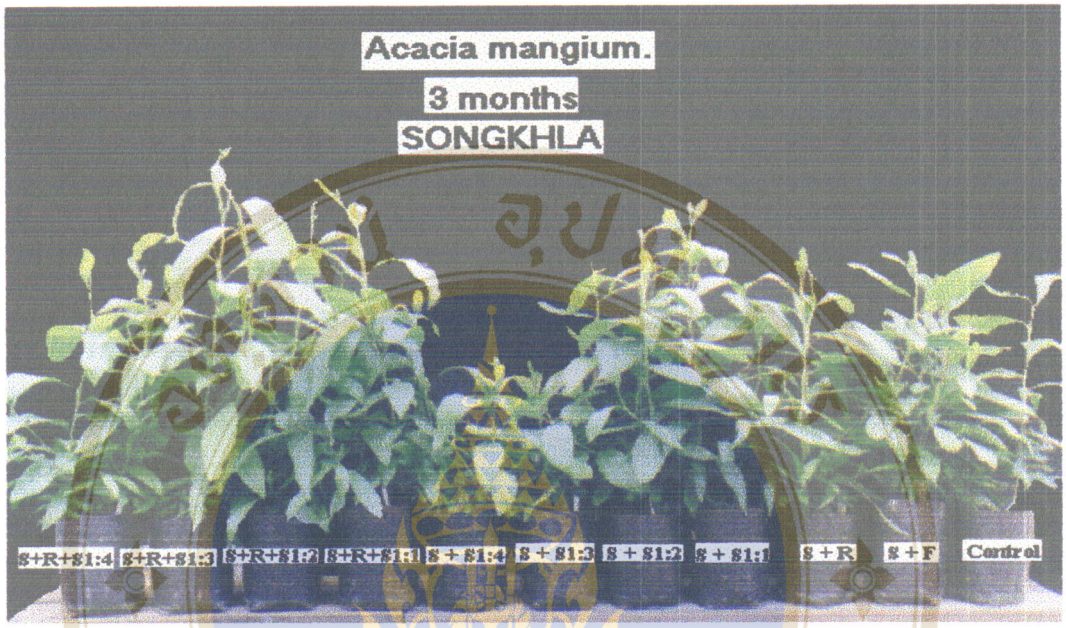
4.5.3.4 ปริมาณไนโตรเจนในต้นพืช เปอร์เซนต์ความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็นปัจจัยหนึ่งในการวัดการเจริญเติบโตของกล้าไม้ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ แม่ไม้ 1 สงขลา แสดงให้เห็นว่า แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์ความเข้มข้นของไนโตรเจนกล้าไม้ ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์ความเข้มข้นของไนโตรเจนอยู่ในช่วง 1.75 –4.31 เปอร์เซนต์ พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด ได้แก่ ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 1 โดยมีค่าเฉลี่ย 4.31 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 2 มีค่าเฉลี่ย 3.64 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 2 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 4 ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 4 มีค่าเฉลี่ย 3.08, 2.92, 2.88, 2.8 เปอร์เซนต์ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมอย่างเดียว ตำรับที่ใส่ปุ๋ย ตำรับที่ใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 1 ตำรับที่ไม่ได้ใส่อะไรเลย โดยมีค่าเฉลี่ย 2.24, 2.11, 2.09, 1.91, 1.75 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ภาพที่ 4-15) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ แม่ไม้ 2 นครราชสีมา แสดงให้เห็นว่า แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์ไนโตรเจนต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์ไนโตรเจนอยู่ในช่วง 2.05 –3.79 เปอร์เซนต์ เป็นเกณฑ์ พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ คือ กลุ่มที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุดได้แก่ตำรับที่ใส่ปุ๋ยโดยมีค่าเฉลี่ย 3.79 เปอร์เซนต์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 1 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 4 ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 1 ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 2 ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 ตำรับใส่เชื้อเพียงอย่างเดียว โดยมีค่าเฉลี่ยดังนี้ 3.24, 3.15, 3.15, 3.09, 2.93, 2.81 เปอร์เซนต์ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 2 ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 4 ตำรับไม่ได้ใส่อะไรเลยโดยมีค่าเฉลี่ยดังนี้ 2.26, 2.15, 2.15, 2.05 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ภาพที่ 4-16)

4.5.3.5. ค่าอัตราการตรึงไนโตรเจนในกระถินเทพา ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ แม่ไม้ 1 สงขลา แสดงให้เห็นว่า แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ย.อัตราการตรึงไนโตรเจนกล้าไม้ ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ย.ค่าอัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.017-1.753 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด ได้แก่ ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมเพียงอย่างเดียว โดยมีค่าเฉลี่ย 1.753 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง กลุ่มที่ 2ได้แก่ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1: 1 มีค่าเฉลี่ย 1.39 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตำรับที่ใส่ไร

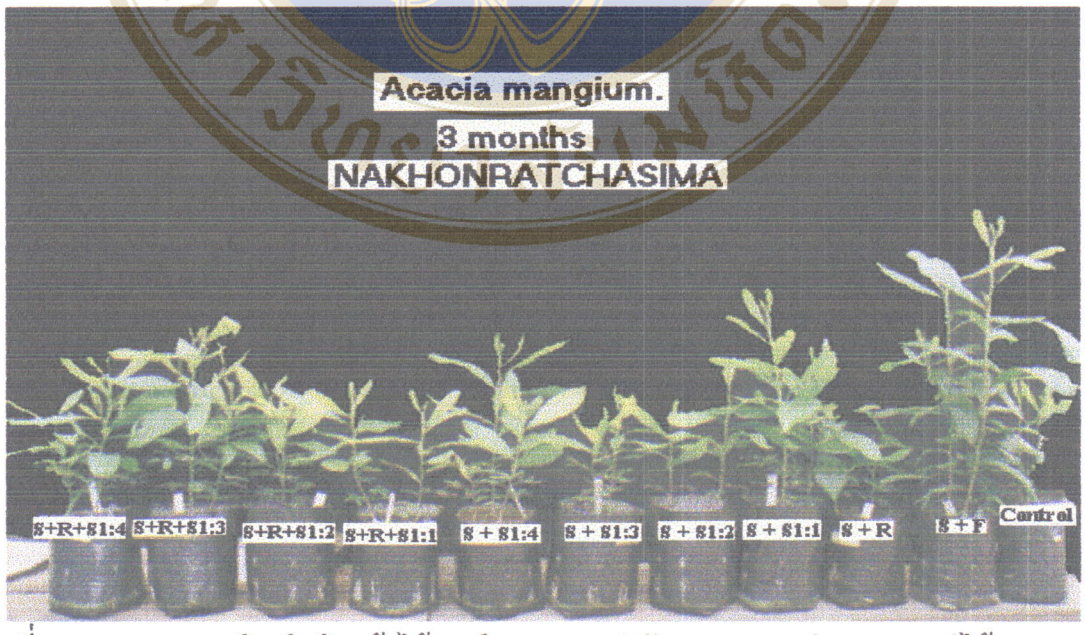
Copyright by Mahidol University

โซเบียมร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 1 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 2 ตำรับใส่ปุ๋ย ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 4 ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 มีค่าเฉลี่ย 0.30, 0.242, 0.222, 0.160, 0.146, 0.144 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 ตำรับที่ไม่ได้ใส่อะไรเลย โดยมีค่าเฉลี่ย 0.85, 0.17 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 4-15) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแม่ไม้ 2 นครราชสีมา แสดงให้เห็นว่า แต่ละตำรับการทดลองมีค่าเฉลี่ยอัตราการตรึงไนโตรเจนต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.050 – 1.97 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ให้ค่าเฉลี่ยสูงสุด ได้แก่ ตำรับที่ใส่ไรโซเบียมอย่างเดียว โดยมีค่าเฉลี่ย 1.197 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 1 มีค่าเฉลี่ย 0.296 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง กลุ่มที่ 3 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 2 ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 2 ตำรับใส่ปุ๋ย ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 4 ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 4 ตำรับใส่เชื้อร่วมกับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 1 ตำรับใส่กากตะกอนอัตรา 1 : 3 ตำรับควบคุมโดยมีค่าเฉลี่ยดังนี้ 0.86, 0.064, 0.058, 0.058, 0.054, 0.050, 0.048, 0.031 และ 0.015 ไมโครโมล/ต้น/ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 4-16)

Copyright by Mahidol University



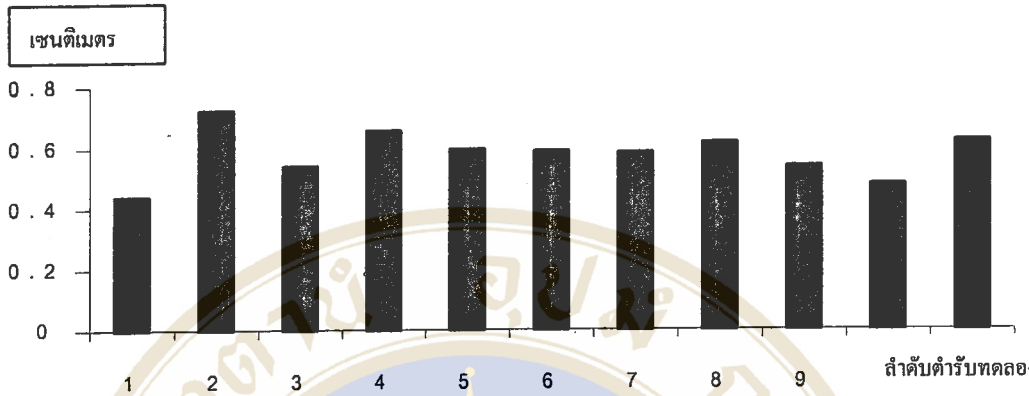
ภาพที่ 4-13 แสดงการเจริญเติบโตกล้าไม้กระถินเทพา 11 ตำรับการทดลองต่าง ๆ ของแม่ไม้ 1



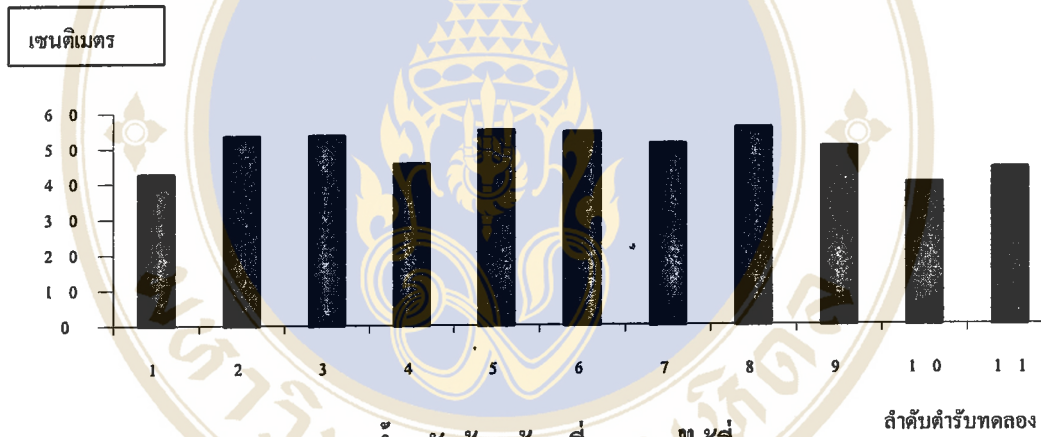
ภาพที่ 4-14 แสดงการเจริญเติบโตกล้าไม้กระถินเทพา 11 ตำรับการทดลองต่าง ๆ ของแม่ไม้ 2

Copyright by Mahidol University

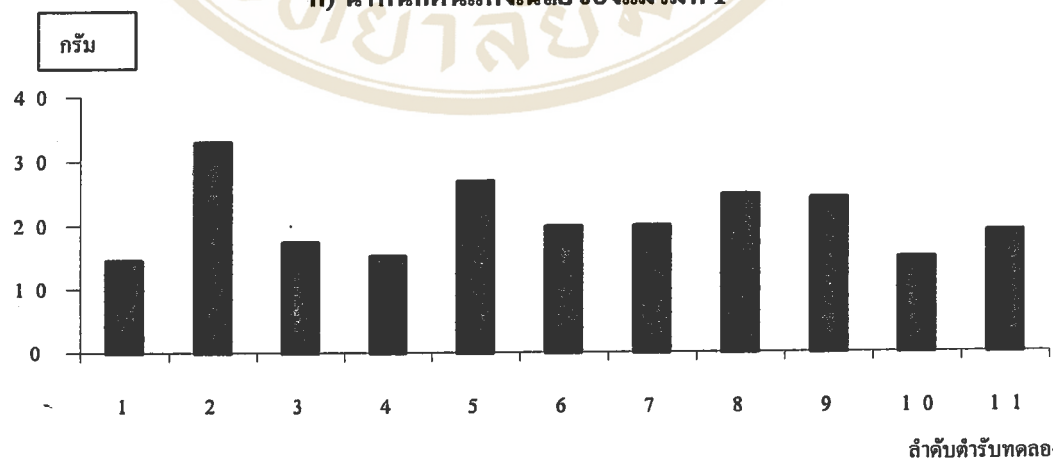
ก) ความโตเฉลี่ยของกล้าไม้บริเวณคอรากของแม่ไม้ 1



ข) ความสูงเฉลี่ยของแม่ไม้ที่ 1



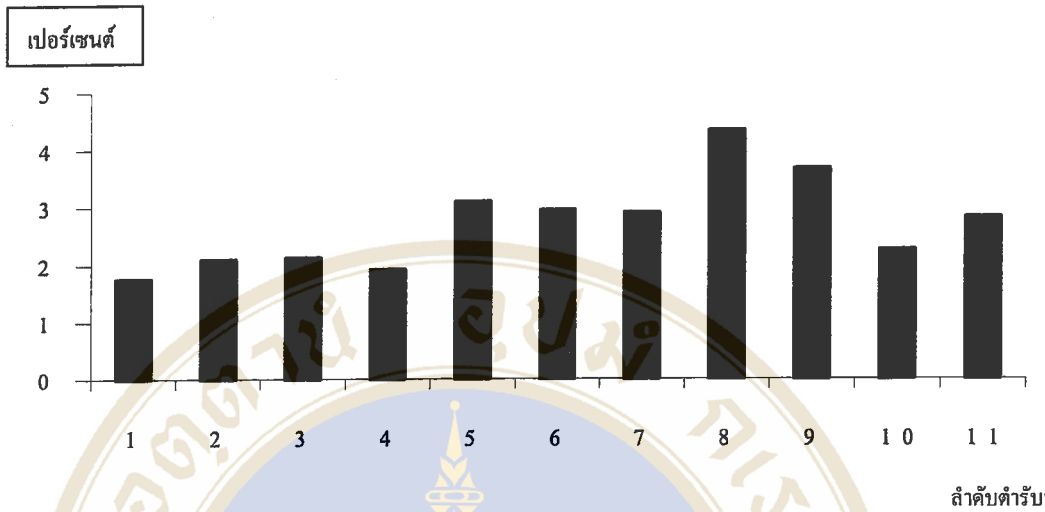
ค) น้ำหนักต้นแห้งเฉลี่ยของแม่ไม้ที่ 1



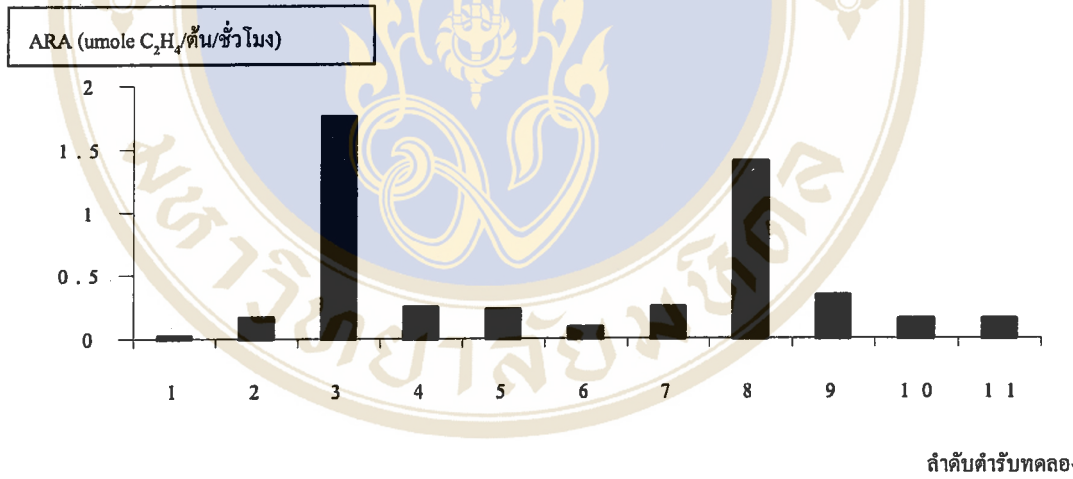
ภาพที่ 4-15 แสดงการเจริญเติบโตเฉลี่ยของกล้าไม้กระถินเทพา แม่ไม้ 1 สงขลาจำนวน 11 ตำรับการทดลองต่าง ๆ ได้แก่ ก)ความโตของกล้าไม้บริเวณคอราก ข) ความสูง ค)น้ำหนักต้นแห้ง ง)เปอร์เซนต์ความเข้มข้น จ) การตรึงไนโตรเจน (ARA)

Copyright by Mahidol University

ง) เปอร์เซนต์ความเข้มข้นของไนโตรเจนเฉลี่ยของแม่ไม้ที่ 1



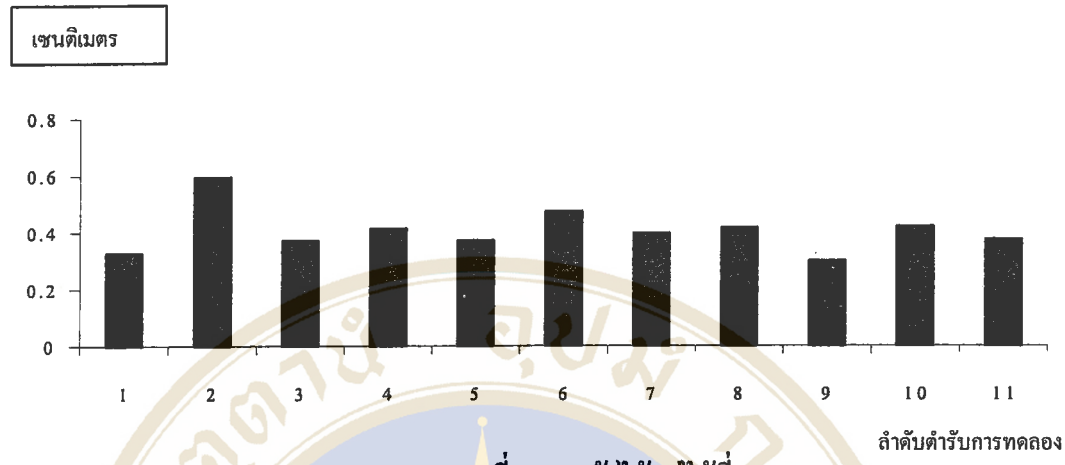
จ) การตรึงไนโตรเจนจากการวัด nitrogenase activity (ARA)เฉลี่ยของแม่ไม้ที่ 1



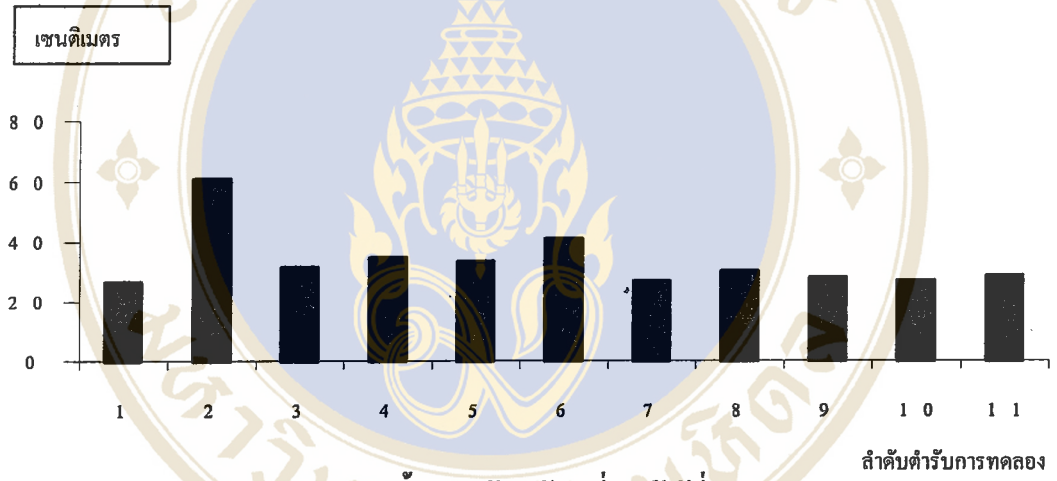
หมายเหตุ: 1)ดิน(Control) 2)ดิน + ปุ๋ยละลายช้า (Osmocot) 3)ดิน + เชื้อไรโซเบียม 4) ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 1 5) ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 2 6) ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 3 7) ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 4 8) ดิน +ไรโซเบียม+ กากตะกอน อัตรา 1 : 1 9) ดิน +ไรโซเบียม+ กากตะกอน อัตรา 1 : 2 10) ดิน + ไรโซเบียม+ กากตะกอน อัตรา 1 : 3 11) ดิน +ไรโซเบียม+ กากตะกอน อัตรา 1 : 4

Copyright by Mahidol University

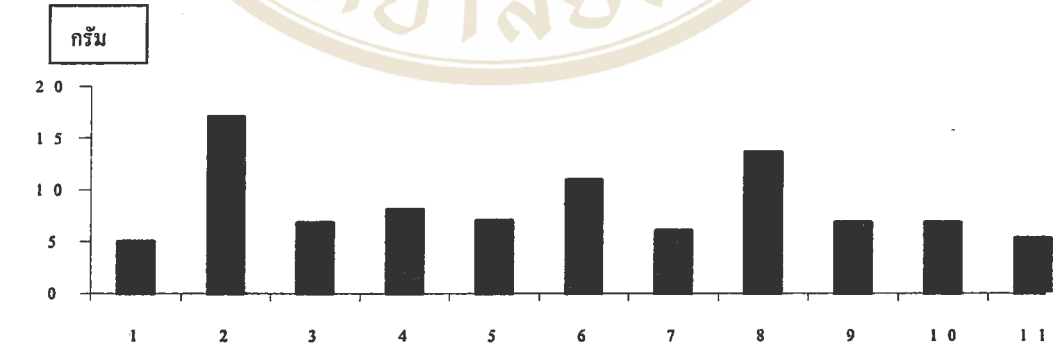
ก) ความโตเฉลี่ยของกล้าไม้บริเวณคอรากแม่ไม้ที่2



ข) ความสูงเฉลี่ยของกล้าไม้แม่ไม้ที่ 2



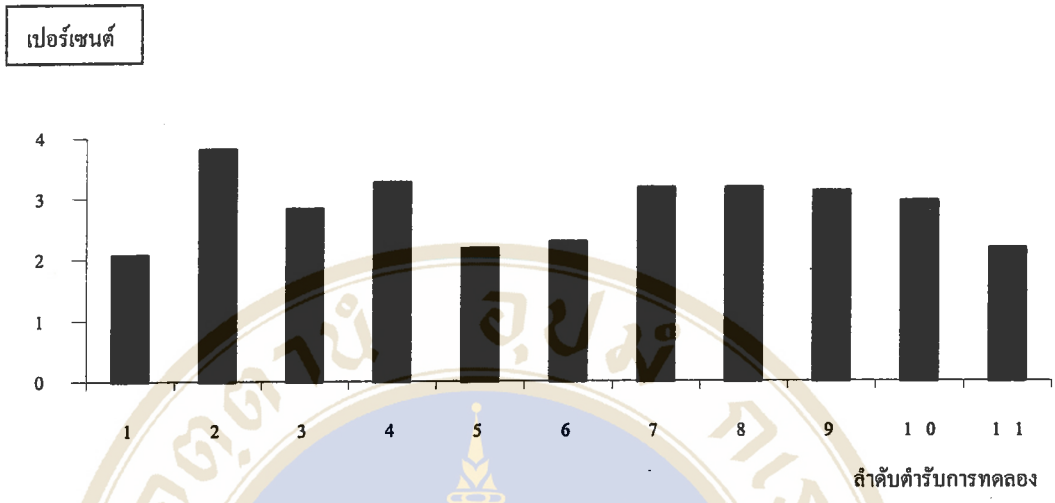
ค) น้ำหนักต้นแห้งเฉลี่ยแม่ไม้ที่ 2



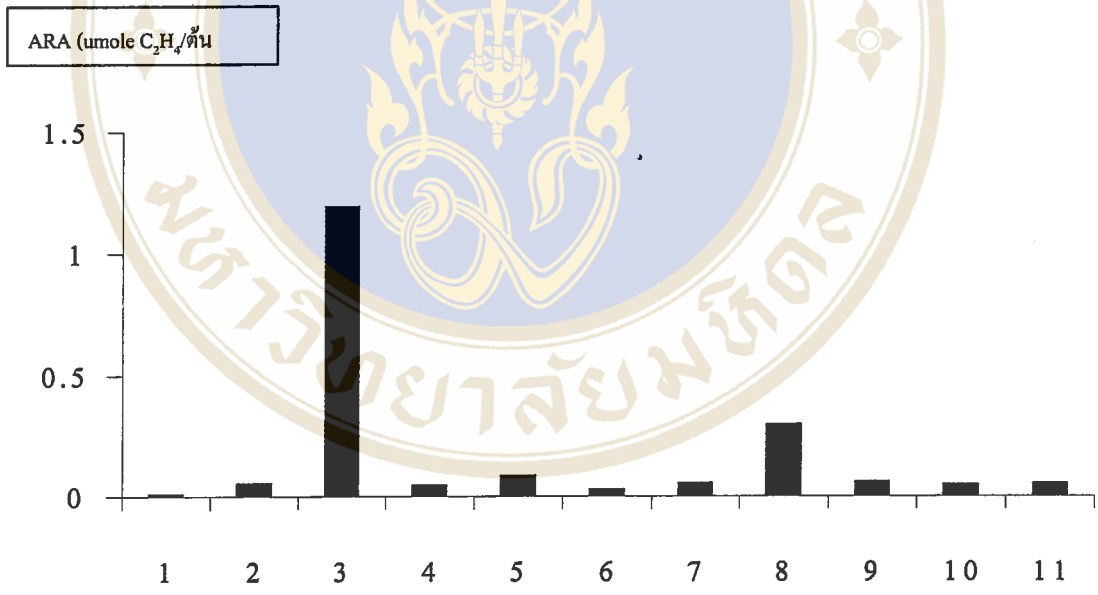
ภาพที่ 4-16 แสดงการเจริญเติบโตเฉลี่ยของกล้าไม้กระถินเทพา แม่ไม้ 2 จำนวน 11 ตำรับการทดลองต่าง ๆ ได้แก่ ก) ความโตของกล้าไม้บริเวณคอราก ข) ความสูง ค) น้ำหนักต้นแห้ง ง) เปอร์เซนต์ความเข้มข้น จ) การตรึงไนโตรเจน (ARA)

Copyright by Mahidol University

ง) เปอร์เซนต์ความเข้มข้นของไนโตรเจนแม่ไม้ที่ 2



จ) การตรึงไนโตรเจนจากการวัด nitrogenase activity (ARA)แม่ไม้ที่ 2



หมายเหตุ: 1)ดิน(Control) 2)ดิน + ปุ๋ยละลายช้า (Osmocot) 3)ดิน + เชื้อไรโซเบียม 4) ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 1 5) ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 2 6) ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 3 7) ดิน + กากตะกอน อัตรา 1 : 4 8) ดิน +ไรโซเบียม+ กากตะกอน อัตรา 1 : 1 9) ดิน +ไรโซเบียม+ กากตะกอน อัตรา 1 : 2 10) ดิน +ไรโซเบียม+ กากตะกอน อัตรา 1 : 3 11) ดิน +ไรโซเบียม+ กากตะกอน อัตรา 1 : 4

Copyright by Mahidol University

จากผลการทดลองตามตำรับทดลองทั้งหมดสามารถระบุได้ว่า การใส่ปุ๋ยออสโมโค๊ทจะทำให้การเจริญเติบโตสูงสุดรองลงมาได้แก่การใส่เชื้อไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอน โดยการใส่เชื้อไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอนอัตรา 1:1 ดีที่สุดรองลงมาได้แก่ ตำรับที่ใส่กากตะกอนในอัตราส่วน 1:2 และใส่เชื้อร่วมด้วยกากตะกอนในอัตรา 1:2

หากวิเคราะห์การใส่เชื้อไรโซเบียมร่วมกับการตะกอนอัตรา 1 : 1 กับการใส่ปุ๋ยออสโมโค๊ท การเจริญเติบโตกล้ากระถินเทพาไม่ต่างกันมากนัก Hemphill et. al (56) ได้รายงานว่าผลผลิตที่ได้รับจากการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดในดินจะเท่ากับผลผลิตที่ได้รับจากการใส่ปุ๋ย แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่ง Magdoff และ Amadon (60) พบว่าในดินที่ใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดให้ผลผลิตเท่ากับดินที่ใส่ปุ๋ย เนื่องจากในกากตะกอนมีธาตุอาหารที่มีประโยชน์ต่อพืช โดยเฉพาะไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแตสเซียม โดยกากตะกอนเพิ่มไนโตรเจนในดิน ซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ กากตะกอนยังมีประโยชน์ในการปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของดิน นั่นคือปรับปรุงโครงสร้างของดิน ช่วยเพิ่มความพรุนของดิน และช่วยในการอุ้มน้ำของดิน (37) และกากตะกอนเป็นวัสดุเหลือทิ้งซึ่งต้องนำไปกำจัด เราสามารถนำกากตะกอนที่อุดมไปด้วยธาตุอาหารมาใช้แทนการใส่ปุ๋ยในการเพาะชำกล้าไม้ เนื่องจากปุ๋ยที่ใช้ในกิจการป่าไม้ได้แก่ปุ๋ยออสโมโค๊ท ซึ่งตามปกติตลาดจะจำหน่ายในราคากิโลกรัมละ 175 บาท ซึ่งในการเพาะชำกล้าไม้โดยเฉพาะกล้าไม้ถุงใหญ่จะใส่ Osmocot 10 กรัม/ถุง (ถุง 6 x 12 เซนติเมตร) ซึ่งค่าใช้จ่ายจะตกถุงละ 1 บาท 75 สตางค์ ซึ่งเราสามารถลดค่าใช้จ่ายในการใส่ปุ๋ยลงได้ หากเรานำเอากากตะกอนมาใช้ทดแทนปุ๋ย แต่ค่าใช้จ่ายในการขนส่งกากตะกอนจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในคิดต้นทุนจากระยะทางระหว่างบ่อบำบัดน้ำเสียและแหล่งเพาะชำกล้าไม้ หากอยู่ไม่ห่างไกลนักจะสามารถขนส่งกากตะกอนมาใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่ามากกว่าที่ระยะห่างไกลเกินไป

แต่อย่างไรก็ตามการใส่กากตะกอนในอัตราที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต ลดผลผลิตพืชได้ (38) จากการทดลองพบว่าการใส่กากตะกอนในอัตราส่วนที่มากจนเกินไปทำให้การเจริญเติบโตของกล้ากระถินเทพาช้ากว่าที่ควรจะเป็น สังเกตได้จากตำรับการทดลองที่ใส่กากตะกอนในอัตราสูง ลักษณะของกล้ากระถินเทพาจะมีลำต้นเตี้ย แคระ แกรน และ ทรงพุ่มใบจะมีจำนวนใบน้อยกว่า ความอุดมสมบูรณ์ของใบน้อยกว่าปกติ และในบางตำรับการทดลองได้ผลการทดลองเท่ากับการไม่ได้ใส่อะไรเลย เนื่องจากในกากตะกอนมีโลหะหนักที่จะทำให้เกิดการเป็นพิษต่อพืชเมื่อใส่ในปริมาณที่มากขึ้น จะทำให้การเจริญเติบโตกล้ากระถินเทพาช้าลง โลหะหนักยังมีผลต่อกระทบต่อจุลินทรีย์ในดิน Mays, Terman และ Duggan (66) เสนอว่า ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของพืชกับอัตราการใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดเป็นแบบเส้นโค้ง โดยผลผลิตของพืชจะเพิ่มขึ้นเมื่อใส่อัตรากากตะกอนแอคติเวตเตดในระดับหนึ่ง และผลผลิตจะลดลงเมื่ออัตราการใส่กาก

Copyright by Mahidol University

ตะกอนสูงเกินไป เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างในกากตะกอนแอคติเวตเตดมีปริมาณสูงจนเป็นพิษต่อพืชได้และเป็นผลจากปัจจัยอื่น ๆ ด้วย (67) ดังเช่น ผลการทดลองของ Cunningham, Keen and Ruan (68) ที่พบว่าผลผลิตของข้าวโพดและข้าวไรย์จะเพิ่มขึ้นตามอัตราใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดและให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดในอัตรา 125 เมตริกตันต่อเฮกตาร์ (20,000 กิโลกรัมต่อไร่) แต่ผลผลิตจะลดลงเมื่อใส่ในอัตรา 502 เมตริกตันต่อเฮกตาร์ (80,320 กิโลกรัมต่อไร่) การใส่กากตะกอนจะทำให้ดินมี pH ต่ำลงนั้นคือมีความเป็นกรดมากขึ้นโลหะหนักจะละลายออกมาอยู่ในสารละลายดินได้ดี และง่ายต่อการดูดดึงขึ้นไปสะสมในพืชซึ่งจะทำให้พืชสะสมสารพิษ และชงักการเจริญเติบโต (56) จากการวิเคราะห์โลหะหนักในกากตะกอนพบว่ามีแมงกานีส โครเมียม และสังกะสีในปริมาณสูง โดยโครเมี่ยม ดินที่ใส่กากตะกอนแอคติเวตเตดแล้วมีสภาพเป็นกรดจะมีส่วนในการดูดแคดเมี่ยมของพืชได้มากขึ้น Wilson (61) พบว่าบทบาทของกากตะกอนแอคติเวตเตดจะเป็นตัวเร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไนโตรเจน (nitrifiers) จะลดลงในดิน โดยเฉพาะกากตะกอนที่มีโลหะปะปนอยู่หลายชนิด ความเข้มข้นสูงจะลด กระบวนการเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนได้ ซึ่งโลหะหนักที่ยับยั้งกระบวนการ ดังกล่าวอาจเรียงได้ตามลำดับคือ โครเมียม แคดเมียม ทองแดง สังกะสี แมงกานีส ปรอท แต่อย่างไรก็ตามการใช้กากตะกอนกับไม้ยืนต้นจะมีผลกระทบต่อมนุษย์น้อยมากเนื่องจากไม่ใช่พืชเกษตรที่จะนำมาบริโภค และไม้ยืนต้นจะมีความทนทานต่อพิษของโลหะหนักได้ดีกว่า พืชทางการเกษตร

จากการทดลองของ Vesper และ Weidensaul (114) พบว่าปริมาณแคดเมียม นิเกิ้ล ทองแดง และสังกะสี ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือสูงกว่านี้จะมีผลในการลดประสิทธิภาพในการเกิดปมและลดการประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจรของเชื้อไรโซเบียม วิทยา (115) กล่าวว่าในการนำเอากากตะกอนจากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต้องพิจารณาการปนเปื้อนของโลหะหนักชนิดต่างๆด้วยซึ่งจะมีผลต่อการผลิตปมไรโซเบียมที่จะใช้ในการตรึงไนโตรเจนมาใช้ประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของกระถินเทพา

ดังนั้นการเจริญเติบโตของกระถินเทพาในอัตราที่ช้าลงจากการใส่กากตะกอนในอัตราที่สูงนั้น สามารถเกิดขึ้นได้จากความเป็นพิษต่อพืช และการลดประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมในรากกระถินเทพา

Copyright by Mahidol University

4.6 การติดตามและตรวจสอบประสิทธิภาพเชื้อไรโซเบียม โดยศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ผลของการติดตามและตรวจสอบประสิทธิภาพเชื้อไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ DASA35076 และ DASA35080 ตรวจสอบโดยวัดจากการเข้าสร้างปมรากในแม่ไม้กระถินเทพา ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้ผลดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 แสดงประสิทธิภาพการเข้าสร้างปมสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูง

ชนิดสายพันธุ์ไรโซเบียม	ประสิทธิภาพการเข้าสร้างปมร้อยละ
DASA 35076	23.82
DASA 35080	76.18

จากผลการทดลองเมื่อนำเอาเชื้อไรโซเบียม 2 สายพันธุ์มาผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน แล้วมาทดสอบปฏิกริยา โดยวิธีทาง ELISA ร่วมกัน โดยทำการทดลองฉีดกระต่ายจำนวน 2 ตัว ด้วยแอนติเจนไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ และนำเลือดใสของกระต่ายที่มีแอนติบอดีของสายพันธุ์ไรโซเบียมนั้นมาทำปฏิกริยากับแอนติเจนไรโซเบียมพบว่า กระต่ายทั้ง 2 ตัว จะให้แอนติบอดี้ที่ทำปฏิกริยากับแอนติเจนเหมือนกันทุกประการ โดยไรโซเบียมที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันนี้มีปฏิกริยาทาง ELISA ร่วมกันมีผลเป็นบวก คือติดสีเหลืองเมื่อใช้ Substrate indicator เป็นดัชนี พบว่าสายพันธุ์ไรโซเบียม DASA35076 มีการติดสีจากการอ่าน Absorbance เครื่องอ่าน ELISA ร้อยละ 23.82 และ DASA35080 ร้อยละ 76.18 สรุปได้ว่า สายพันธุ์ที่สามารถทำให้เกิดปมบริเวณรากของกระถินเทพา 2 แม่ไม้ได้มากที่สุดคือสายพันธุ์ DASA35080 ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการสร้างปมได้มากกว่า DASA35076

ข้อสังเกต ถึงแม้สายพันธุ์ DASA35076 จะมีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตกระถินเทพาได้ดีกว่า ซึ่งจัดได้จากการทดลองในการหาประสิทธิภาพเชื้อ แต่ประสิทธิภาพการเข้าสร้างปมบริเวณรากกระถินเทพานั้น สายพันธุ์ DASA35080 มีความสามารถมากกว่า อาจเนื่องจากสายพันธุ์นี้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นอุปสรรคมากกว่า และมีการแข่งขันในการเข้าสร้างปมได้ดีกว่า ดังนั้นอิทธิพลของสายพันธุ์ DASA35080 จึงมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตกระถินเทพามากกว่า

Copyright by Mahidol University

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

ผลการศึกษาที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า

5.1.1 การตรวจสอบเชื้อไรโซเบียม พบว่าเชื้อไรโซเบียมจากกล้องจุลทัศน์มีลักษณะเป็นขีดมีลักษณะเหมือนนิวเคลียสอยู่ตรงกลางติดสีม่วงแดง สามารถจำแนกสกุลสายพันธุ์ทั้งหมดที่รวบรวมมาโดยส่วนใหญ่จัดเป็นกลุ่ม *Bradyrhizobium* จำนวน 23 สายพันธุ์ กลุ่ม *Rhizobium* 14 สายพันธุ์ และเป็นกลาง 2 สายพันธุ์

5.1.2 เปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดกระถินเทพาพบว่าหมายเลข 98-0028 เก็บจากจังหวัดสงขลามีเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดร้อยละ 94 และหมายเลข 99-0021 เก็บจากจังหวัดนครราชสีมาเปอร์เซ็นต์การงอกร้อยละ 89

5.1.3 คัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการเจริญเติบโตกระถินเทพาทั้ง 2 แม่ไม้ พบว่าสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพทำให้กระถินเทพา มีความสูง จำนวนปมต่อต้น และน้ำหนักปม น้ำหนักต้นแห้ง มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี Acetylene Reduction Assay ดี ได้แก่ สายพันธุ์ DASA35073 DASA35076 DASA35078 DASA35080 DASA35084 และ DASA35087 DASA35093

5.1.4 ตรวจสอบไรโซเบียมว่าเป็นสายพันธุ์ หรือชนิดเดียวกันหรือไม่โดยวิธี ELISA พบว่ารหัส DASA35087 DASA35073 DASA35080 DASA35093 เป็นสายพันธุ์เดียวกัน เลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดคือ DASA35080 เป็นตัวแทน ส่วนสายพันธุ์ DASA35076 และ DASA35078 เป็นชนิดเดียว

Copyright by Mahidol University

มหาวิทยาลัยมหิดล สำนักหอสมุด

กันจึงเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดได้แก่ DASA35076 เป็นตัวแทน สรุปว่าสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูง 2 สายพันธุ์ได้แก่ DASA35076 และ DASA35080

5.1.5 จากผลการทดลองพบว่า แม่ไม้สงขลาให้ผลการตอบสนองต่อการใช้ ออสโมโคท เป็นปุ๋ยสูงสุด (32.75) ในขณะที่การใช้กากตะกอน (15.00) หรือ ไรโซเบียม (17.25) จะให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะต่ำกว่าการใช้ออสโมโคท อย่างไรก็ตามการใช้กากตะกอนในอัตราส่วน 1:2 จะให้ผลดีที่สุด (26.63) และ การเจริญเติบโตของกล้าไม้กระถินเทพา จะลดลงเมื่อมีการใช้กากตะกอนในอัตราส่วนที่สูงขึ้น เมื่อมีการใช้ไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอน การเจริญเติบโตกล้าไม้กระถินเทพาที่ได้รับสูงสุดจะพบเมื่อใช้ไรโซเบียมร่วมกับกากตะกอนในอัตราส่วน1:1 และ 1:2 (24.5 และ24.0) แต่จะไม่แตกต่างกับการใช้กากตะกอนแต่เพียงอย่างเดียวในอัตรา 1:2 (26.63)อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการใช้ไรโซเบียมไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้สงขลา สำหรับแม่ไม้นครราชสีมาจะพบว่ามีการตอบสนองต่อออสโมโคท (17.03) ต่ำกว่าแม่ไม้สงขลา ในขณะที่การใช้กากตะกอนหรือ ไรโซเบียมอย่างเดียวจะให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (8.00, 6.75) แต่จะต่ำกว่าการใช้ออสโมโคทมาก เมื่อพิจารณาถึงอัตราส่วนการใช้กากตะกอนพบว่าการใส่เชื้อไรโซเบียมร่วมด้วยกากตะกอนในอัตราส่วน 1:1ให้ผลสูงสุด และลดลงเมื่อมีการใช้กากตะกอนมากขึ้นเช่นเดียวกัน

โดยสรุปจะเห็นได้ว่า โดยภาพรวมแล้วพบว่าแม่ไม้สงขลาตอบสนองต่อการใช้กากตะกอนดีที่สุด โดยให้ชีวมวลเกือบเท่ากับ (ร้อยละ 88) การใช้ออสโมโคท และอัตราส่วนของดินต่อกากตะกอนที่ใช้ดีที่สุด คือ อัตราส่วน 1:2 ซึ่งการใช้ไรโซเบียม ร่วมด้วยไม่มีความจำเป็น เพราะไรโซเบียมมีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปมในแม่ไม้นี้ต่ำ อย่างไรก็ตามการใช้ไรโซเบียมมีผลต่อแม่ไม้นครราชสีมาซึ่งประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมมีมากกว่า นอกจากนั้นจากการทดลองยังพบว่าในกรณีของการใช้กากตะกอนร่วมกับไรโซเบียมนี้ไม่ควรใช้ร่วมกับกากตะกอนที่ผสมในดินเกินกว่าร้อยละ 50 เพราะโลหะหนักในดินจะทำให้การเจริญเติบโตของกล้าไม้ลดลงด้วยไปยับยั้งการทำงานของไรโซเบียม จะเห็นได้ว่าการนำกากตะกอนไปใช้ในการปรับปรุงดินนั้นสามารถใช้ได้ ในการเพาะชำกระถินเทพา และแม่ไม้สงขลานั้นมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการเพาะชำเพื่อเผยแพร่พันธุ์มากกว่าแม่ไม้นครราชสีมา

5.1.6 การติดตามและตรวจสอบประสิทธิภาพเชื้อไรโซเบียมโดยศึกษาคุณสมบัติของฟีโนไทป์ วิธี Enzyme – Linked Immunosorbent Assay พบว่าประสิทธิภาพการเข้าสร้างปมสูงสุดได้แก่ สายพันธุ์ DASA35080 สามารถเข้าสร้างปมได้ร้อยละ 76.18 ดีกว่า สายพันธุ์ DASA35076 ที่เข้าสร้างปมได้น้อยกว่า คือสามารถเข้าสร้างปมได้ร้อยละ 23.82

Copyright by Mahidol University

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากในกากตะกอนมีปริมาณโลหะหนัก การใส่กากตะกอนในอัตราที่มากเกินไปค่า pH ต่ำลง หรือมีความเป็นกรดจัด จะทำให้เกิดเป็นพิษต่อพืชและเป็นพิษต่อเชื้อไรโซเบียมซึ่งจะทำให้ชงักการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียม และทำให้การเจริญเติบโตของพืชช้าลง ดังนั้นควรระมัดระวังในการใส่กากตะกอน โดยหากพบว่ามี pH ลดลงมากให้ใส่ด่าง เช่น ขี้เถ้า หรือปูนขาวลดความเป็นกรดโลหะหนักจะถูกปลดปล่อยออกมาในสารละลายในดินได้ลดลง

5.2.2 จากผลการทดลองการใส่กากตะกอนในอัตราที่เหมาะสม จะให้ผลการเจริญเติบโตกล้าไม้กระถินเทพาดี หากนำมาใช้ในงานเพาะชำกล้าไม้ จะช่วยในการประหยัดค่าใช้จ่ายแทนปุ๋ยเนื่องจากกากตะกอนเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่ต้องกำจัด แต่อุดมไปด้วยธาตุอาหารพืชซึ่งจะสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุเพาะชำได้ ดังนั้นนำมาใช้ทดแทนปุ๋ยโดยเฉพาะออสโมโคทได้ซึ่งจะช่วยในการประหยัดงบประมาณในการเพาะชำกล้าไม้ลง แต่ข้อควรคำนึงคือ ระยะทางระหว่างแหล่งเพาะชำกับบ่อบำบัดน้ำเสียควรไม่ไกลเกินไป ซึ่งจะช่วยประหยัดค่าขนส่งได้

5.2.3 จากวิธีการในการหาประสิทธิภาพเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงนี้ ทำให้สามารถนำมาใช้ประยุกต์กับการหาสายพันธุ์ไรโซเบียมที่เหมาะสมกับแม่ไม้กระถินเทพาในท้องถิ่นต่างๆ ซึ่งจะทำให้สามารถหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับแม่ไม้ชนิดนั้นๆ ได้ ซึ่งวิธีการสามารถนำวิธีการตามวิธีวิจัยนี้มาเป็นแบบอย่างได้

5.2.4 ในการแข่งขันเข้าสร้างปมของสายพันธุ์ไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์จะมีประสิทธิภาพที่ไม่เท่ากัน ถึงแม้สายพันธุ์ไรโซเบียมใดจะมีประสิทธิภาพสูงต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้ ก็ไม่ได้หมายความว่าจะสามารถเข้าสร้างปมได้ดี ดังนั้นในการวิจัยต่อไป ควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตกล้าไม้และควรเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้าสร้างปมสูงควบคู่กันไป

Copyright by Mahidol University

รายการอ้างอิง

1. กรมป่าไม้. เอกสาร สรุปแผนงานเพาะชำกล้าไม้ ประจำปีงบประมาณ 2543 ส่วนเพาะชำกล้าไม้ สำนักส่งเสริมการปลูกป่า; 2543
2. ธีระ พันธมวนิช, ภาณุ กฤติพร และ เกริกพงศ์ ชาญประทีป. การพัฒนาอุตสาหกรรม และคุณภาพสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องนโยบายและแนวทางการกำจัดน้ำเสียของประเทศไทย, สำนักคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ; 2533.
3. รพีพร จรดล. การใช้ประโยชน์ของกากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่มเพื่อเป็นปุ๋ยอินทรีย์ วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยมหิดล; 2539
4. Kramer, P.J. and T.T. Kozlowski. Physiology of Woody Plants. Acodemic Press, New York.; 1979. P. 811 .
5. พงษ์ศักดิ์ สหุนาพ.. การเจริญเติบโตของต้นไม้. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ; 2521. 452 น.
6. Toumey, J.W. . Foundations of Silviculture : Upon an Ecological Basis. John Wiley & Sons, Inc., New York. ; 1947. 468 p.
7. Spurr, S.H. . Forest Inventory. The Ronald Press Company., New York; 1952. 476 p.
8. Husch , B., C.I. Miller and T.W. Beers. Forest Mensuration. The Ronald PressCompany, New York. 410 p. ;1972.
9. Hocker, H. W. . Introduction to Forest Biology. John Wiley & Sons, Newyork; 1979. 467 p.
10. Carmean, W.H. . Forest site quality evaluation in the United States. Adv. Agron. ; 1975. p.209-269.
11. Walter, C.A. Saligna eucalyptus growth in a 15-year-old Spacing study in Hawaii. USFS. Res. Paper.; 1980. P. 151 .
12. Buker, F.S. Principles of Silviculture. McGraw-Hill Book company, Inc., New York ;1950. 414 p.
13. คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยาก. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพมหานคร โรงพิมพ์ชวนพิมพ์; . 2530

Copyright by Mahidol University

14. สมเพียร เกษมทรัพย์. การปลูกไม้ดอก. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ;2528.

15. สุคนธ์ สิบสิริ, ทินกร วุฒิวิจารณ์ และบุญชุบ บุญทวี. ผลของปุ๋ยเคมีต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้ป่าบางชนิด, ใน รายงานการสัมมนาทางวนวัฒนวิทยา ครั้งที่ 4, 18-22 มกราคม 2535. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ;2535 .หน้า. 138- 156.

16. ยุภา รามอินทร์. อิทธิพลของปุ๋ยและวัสดุเพาะชำต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้กระถินเทพา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 2535.

17. เสริมพล รัตสุข และไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. พิมพ์ครั้งที่ 2 2525 การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งชุมชน. กรุงเทพฯ ; 2518.

18 Adams, A.D. Bacteriological Sludge on Diary Waste Activated Sludge Wargeringen : H. Vecman and Zonen N.V.; 1966.

19. Anderson, M. S. . Sewage Sludge for Soil improvement. U. S. D. A. Circular No. 972. Anonymous. 1988. Nitrogen fixing Tree for Wastelands. Rapa Publication, United Nation, Bangkok. ; 1955.104 p.

20. Menzies, J.D. and R.L. Chaney. Nitrogen and heavy metal distribution in soil utilized as sludge disposal sites. Oregon ; M.S. Thesis, Oregon State University; 1974.

21. Sommers, L.E. Chemical composition of sewage sludges and analysis of their potential use as Fertilizers. J. Envion. Qual. 6 (2) ; 1977. P. 225-232

22. Yoshida T. Ultilization of activated sludge from industrail waste water as fertilizers.In : Organic Mater and Rice. Inst. Rice. Res. Int. Los Banos Laguna Philippines.; 1976.

23. Yoshida T. and Yoneyama T. Nitrogen minerization of sewage sludge in soil. Soil Sci. Plant Nutr. 24 ; 1978 . p. 139-144

24 Sommers, L.E. ; D.W. Nelson and A.J. Yost. Variable nature of chemical composltion of sewage sludge. J. Environ. Qual. 5 : 1976. P. 303-306

25. Epstien E., Willson G.B. and Parr J.FThe Beltsville aerated pill method for composting sewage sludge. In : New Processer of Waste Water Treatment and Recovery. Edited by Mattock G. Ellis Horwood Ltd, New York ;1978.

26. สรสิทธิ์ วัชโรทยาน, วิสุทธิ์ วีรสาร, อิทธิสุนทร นันทกิจ, นิภา พนาพิทักษ์กุล, สมชาย กรีฑาภิรมย์ และ สุริยา สาสนรักกิจ. การใช้ผลพลอยได้และเศษเหลือของโรงงานอุตสหกรรมที่มีอยู่ในประเทศไทยให้เกิดประโยชน์ในการใช้เป็นปุ๋ย และวัสดุบำรุงดิน. เอกสารราย

Copyright by Mahidol University

งานการวิจัยดินและปุ๋ย. ภาคปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร; 2526.

27. ทัศนีย์ อัตตนันท์ . คู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (โรเนียว); 2520.

28. นิภา พนาพิทักษ์กุล . ผลของอินทรีย์วัตถุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมต่อคุณสมบัติของดินและการเจริญเติบโตของพืช วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์). คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2524.

29. สุดใจ สุขช่วย, . การใช้อินทรีย์วัตถุเหลือใช้บางชนิดเป็นปุ๋ยพืชไร่ในดินเปรี้ยวชุดดินรังสิต วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ; 2533.

30 ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, สุริยา สาสนรักกิจ และ สรสิทธิ์ วัชโรทยาน. การใช้อินทรีย์วัสดุเหลือใช้ในการเกษตร I. ผลของอินทรียวัสดุต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของข้าว การทดาลองที่ 1. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยานิพนธ์) 19 ; 2528. หน้า 195-205

31. Inoko A. . Compost as a source of plant nutrient. In : Organic Matter and Rice. Int. Rice. Res. Inst. Los Banos Laguna, Philip pines; 1982.

32. Miller, R.H. facter affecting the decomposition of an aerobically digested sewage slude in soil. J. Environ. Qual. 3 : 374-380 ; 1974.

33. Kunte, H. , Pluquet, Stark, J.H., and Coopoia, S. Current techniques for the evaluation of Metal problems Due to sludge In P.L' Hermite, and H. Otl (eds.), Processing and use of sewage sludge , pp. 394-403. Holland : D. Reidol Publishing Company; . 1984.

34. Orawan Siriratpiriya , vigerust , E. , and Selmer - Olsen, A.R. Effect of temperature and heavy metal application on metal content in lettuce. Scientific reports of the Agricultural University of Norway. ;1985.

35. Terry Re., Nelson DW. And Sommers LE. Nitrogen transformation in sewage sludge amended soil as affected by soil environment factors. Soc Amer. Proc. 45 ; 1981. P. 506-513

36. Tester CF., Sikora LJ., Taylor JM. And Parr. J.F. Decomposition of sewage sludge compost in Soil I. Carbonand nitrogen transformation. J. Environ. Qual. 6 ; 1977. P.459-467

37. Lunt HA. The case for sewadge sludge as a soil improves with emphasis on value of pH control and toxicity of minor elements. Abstr. In : Soil and fertilizer; 1953. P. 17 - 49

Copyright by Mahidol University

38. Sabey, B.R. and Hart, W.E. "Land Application of Sewage Sludge : I Effect on Growth and Chemical Composition of Plants." J. Environ. Qual. ,4(2) ; 1975 :p. 252-256

39. Gilles, J.A. , Kushwaha, R.L.,Wang, C.P. , and ford, R.J. Heavy metal residues in soil and crops from applications of anaerobically digetted sludge. J.WPCF 61 ; 1989. p. 1673-1677

40. อรวรรณ ศิริรัตน์พิริยะ.การใช้ประโยชน์จากกากตะกอนน้ำเสียในรูปของปุ๋ย สำหรับพื้นที่เกษตรกรรม จ.ฉะเชิงเทรา : สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อมจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ; 2529

41. Hall, J.E. Predicting the Nitrogen value of sewage sludge in P.L. Hermite, and H. Ott (eds.) Processing and use of sewage sludge; 1984.pp. 268-277.

42. Chaussod, R. Valeur fertilisante ozote des boues residyaires. In Proceedings of Second European Symposium on the treatment and use of sewage sludge. Vienna : Dordrecht, quoted in Hall, J.E. Predicting the Nitrogen Values of Sewage sludge. In P.L. Hermite, and H. Ott (eds.) Processing and use of sewage sludge, pp. 268 -277 Holland. D. Reidal Publishing Company; 1981.

43. Follett , Ray H., Marphy, Larry S., and Dona hue, Roy L. Fertilizers and Soil Amendment Newjerey : Prentice hall Inc; 1981.

44. Guidi, G. , and Hall, J.E. effect of sewage sludge on the physical and Chemical properties of soil. (n P. L' Hermite, and H. Otl ceds.) , Processing and use of sewage sludge , pp. 295-305 Holland. D. Peidal Publishing Company; 1984.

45. Kelling, K.A. , Peterson, A.E., walsh, L. M. , Ryan, J.A. , and keeney, D.R. A Field study of the agricultural use of Sewage Sludge. I Effect on crop yield and uptake of N and P. J. Environ. Qual. 6 ; 1977.p. 339-344.

46. Hem, J.D. Chemistry and occurence of cadmium and zinc in surface water and ground water. Water Resoures 8 ; 1972 . 661-679.

47. Stark, S.A. , and Clapp, C. E. Residual nitrogen availability from soils treated with sewage sludge in a field experiment J. Environ. Qual. 9 ; 1980.p. 505 –511.

48. Furrer, O.J. , Gupta, S.K, and stauffer, W sewage sludge as a source of phosphorus and consequence of phosphorus accumulation in soils. In P.L' Hermite, and H. OTL (eds.), Processing and use of sewage sludge; . 1984. P. 279-293.

49. Premi, P.R. and Cornfield, A.H. "Incubation Studyof Nitrogen Mineralization in Soil Treated With Dried Sewage Sludge." Environ. Pollut. 2; 1971 ; 1-4.

Copyright by Mahidol University

50. Ryan JA., Keeney DR. and Walsh LM. Nitrogen transformation and availability of an aerobic digested sewage in soil. J. Environ. Qual. 2 ; 1973. p489-492.

51. Sabey, B.R., N.N. Agbim, and D.C. Mark Storn, "Land Application of Sewage Sludge : IV. Wheat growth, N Content N Fertilizer Value, and N Use Efficiency as Influenced by sewage Sludge and W and Waste Mixture J. Environ. Qual.;1977 .p. 52-58.

52. Mahler, R.J. ; F. T. Bingham ; G. Sposito and A. L. Page. Cadmium – enriched sewage sludge application to acid and calcareous soils, relation between treatment cadmium in saturation extracts, and cadmium uptake J. Environ. Qual. ;1980 : p. 359-364.

53. Robertson, W.K. : M.C. Lutrick and T.L. Yuan Heavy applications of liquid. digetsted sludge on three Ultisols, Soil fertility. J. Environ. Qual. 11 ;1982 .p. 278-282.

54. Hinsley, T. D. , Ziegler, E.L. and Jones, R.L. "Effects on Corn by Applications of Heated Anaerobically Digested Sludge." Compost Sci. (13); 1972 . p. 26-30.

55. Emmerich., W.E. ; L.J. Lund ; A.L. Page and A.C. Change. Solid phase forms of heavy metals in sewage sludge treated Soils. J. Environ. Qual;1982.. 178-181.

56. Hemphill, D.D. , Jr. ; T.L. Jackon ; L.M. Martin ; G.L. Klemnee ; D. Hanson and V.V. Volk. Sweet corn respouse to application of three sewage sludges. J. Environ. Qual; 1982. . p. 191-196.

57. Adriano, D.C. ; A.L. Page ; A.A. Elsee wi ; A.C. Chang and I.A. Straeghan Utilzation and disposal of fly ash and other cool residues in terrestrial ecosystems. J. Environ. Qual. ; . 1980.p. 333-344.

58. Wilson, D.O. Nitrification in soil treated with domestic and industrial sewage sludge. Environ. Pollut;1977. :p 73-82.

59. Lamb, C. Sewage sludge produce nay. Environ action Bull. 3(21) ; 1972.p. 4-5.

60. Magdoff, F.R. and J.F. Amadon. Nitrogen Availibity from sewage sludge. J. Environ. Qual. ;1980. P.451-455.

61. Hartenstine, C.C. Growth and Cadminem uptake by Lettuce and radished fertilized with Cadmium, Zinc. and sewagesludge. Soil Crop Sci. Soc. of fla. Proc; 1980. p 58-62.

62. Lutrick, M.C. ; W.K. Robertson and J.A. Cornell. Heavy Applications of liquid-digested sludge on three Ultisols. II Effects on mineral uptake and crop yield. J. Environ. Qual. ; 1982.p. 283-287.

Copyright by Mahidol University

63. Zukerman, L.S. and M.B. Kirk hamCadmium and Zinc availability in soil irrigated with sludge containing a cationic conditionner. Water, Air, Soil Polletion; . 1978. p. 467-473.

64. Robert, L.J. ; T.D. Hinesly and E.L. Ziegler. Cadmium content of soybeans grown in sewage - sludge amende soil. J. Environ. Qual; . 1973. 351-353.

65. Mellbye, M.E. ; D.D. Hemphill and V.V. Volk. sweet corn growth on incinerated sewage sludge - amended soil. J. Environ. Qual.; 1982.p. 60-163.

66. Mays, D.A., Terman, G.L. and Dnggan, J.C. "Municipal Compost . Effect on Crop Yields and Soil Properties." J. Environ. Qual. 2(1); 1973.p. 89-92.

67. Dolar, S.G., Boyle, J.R. and Keeney, D.R. "Paper Mill Shedge Disposal on Soils: Effects on the Yield and Mineral Nutrition of Outs (Avena Satira L.)." J.Environ.Qual; (1972) p. 405-409.

68. Cunningham, J.D., Keen, D.R. and Ruan, J.A. Yield and Metal composition of corn and Rye Grown on Sewage Sludge Amended Soil. J.Environ. Qual ;1975 .p. 448-454.

69. Wagner, D. J., Bacon, G. D. , Knocke, W. R. , and Switzenbaum, M.S. Changes and Variability in Concentration of Heavy Metals in Sewage Sludge During Composting. Environmental Technology;1990.p 949-960 .

70. Vigevust, E., Selmes- Ol sen, A.R. and Orawan Siriratpiriya. Utilization of sewage sludge especially in regard toils effects on heavy metals in plants. In J. Lag (ed.), The Norwagian Academy of science and litters on Commercial Fertilizers and Geo medical Problems. , 1987 ,p. 121 –139.

71. Coltenies, A. Kiekans, L. , and Van Landschoot, G. Problem of the Mobility and Predictability of Heavy Metal Uptake by Plants. In P.L' Hermite, and H. OH (eds.), Processing and Use of Sewage Sludge; 1984 .p. 124-131. .

72. Balmer, P., and Frost, R.C. Swedish plant owner wins public consent. Water Quality International; 1990.p. 28-29

73 สะอาด บุญเกิด, จาร สดากร และทิพย์พรรณ สดกร. ชื่อพันธุ์ไม้ในประเทศไทย บริษัทจิรการพิมพ์. กรุงเทพมหานคร; 2525. หน้า 657.

74. National Academy of Sciences. Mangium and Other Fast Growing Acacias for the Humid Tropics. National Academy Press, Washington, D. C; 1983.p.63.

Copyright by Mahidol University

75. Doran, J. C. and D. J. Skelton. *Acacia mangium* seed collections of international Provenance trials. For Genet. Res. Information. Rome. FAO; 1982.p. 47-53.

76. อิทธิฤทธิ์ อึ้งวิเชียร, สุทธิเจตน์ จันทรศิริ, วินัย สุพัฒนกุล, โกวิทย์ ยันตศาสตร์, พนัส บูรณศิลปิน และ ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร.กระถินเทพา ไม้โตเร็วที่น่าสนใจ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการพลังงาน , บางเขน, กรุงเทพมหานคร;2528. หน้า 22 .

77. Hu, T. W., W. E. cheng and T. A. Shen. . Growth of the seedlins of four leguminous tree species in relation to soil pH in the pot test. NFT Res Rep. 1 ; 1983. 24-25.

78. Yu, Z. Y. , S. L. Peng and W. Q. Zhang. Coenobgical analysis of the man-made forest on hilly land in Heshan, Guangdong province. II. The community structure of *Acacia nangium* forest Acta Botanica Aus tro Sinica. ; 1989.p. 95-100.

79. ชวลิต เนื่องดี และคณิต มวานิล. การเจริญเติบโตของใบกระถินซาบา (*Acacia mangium* Willd) ในแปลงทดลองที่สวนป่าสมเด็จ จังหวัดกาฬสินธุ์. วนสาร 43 (2) ; 2528.หน้า 87-92.

80. Jordan, D.C. Family III, Rhizobiaceae Conn 1938. Pp. 234 – 256.

81. Elkan and Bunn .Taxonomy of rhizobia. Can. J. Microbiol. 38 ; 1992. P. 446 – 450.

82. Alekander, M. Introduction to Soil Microbiology, Johnwiley and Sans, Inc., NewYork; 1967.p. 472 .

83. นันทกร บุญเกิด คู่มือการใช้เชื้อไรโซเบียม. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร; 2529. หน้า 55.

84. สมศักดิ์ วังใน, การตรึงไนโตรเจน, ไรโซเบียม - พืชตระกูลถั่ว. ภาควิชาปฐพีวิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร; 2525 .หน้า 244.

85. Streeter, J.G. Nitrogen nutrition of field grown soybean plants II. Seasonal valiation In nitrate reductase, glutamate dehydrogenase and nitro gen constituents of plant parts. Agron J. ; 1972.p. 315 – 319.

86. นันทกร บุญเกิด และจิระศักดิ์ อรุณศรี. ชีววิทยาของเชื้อไรโซเบียม และเทคนิคการใช้ เชื้อไรโซเบียม; 2535. หน้า 19 – 42. ในปุ๋ยชีวภาพ. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร; กรุงเทพมหานคร

87. Boonkerd, N. and S. Promsiri. Effectiveness in N_2 fixation of Sesbania spectosa and Sesbania Rostrata rhizobia isolated from different location. The Kasetsart Joumal. ; 1993. P. 292-302.

Copyright by Mahidol University

88 นันทกร บุญเกิด เย็นใจ วสุวัต และ ประพนธ์ วิไลรัตน์. การตรวจและปรับปรุงสายพันธุ์ไรโซเบียม โดยวิธีพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและการ ผลิตเชื้อ. รายงานการวิจัยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.; 2536.หน้า52.

89. Denarie J., F. Debelle, G. Trucher and J-C. Prome. Rhizobium and Legume Nodulation : A Molecular Dialogue, New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publisher London pp; 1993. P.19-42.

90. อัญชนา พัฒนสุพงษ์. การขยายพันธุ์กระถินเทพาและการเกิดปมโดยไรโซเบียมในสภาพปลอดเชื้อ วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2536. หน้า 82 .

91. Quispel A., C. Rodriques-Barrueco and N.S. Subba Rao. Some General Consideration onSymbioses of Nitrogen-fixing Trees. International Science Publisher. New York.; 1993 .p.1-17.

92. Allen, O.N. and E.K. Allen.The Leguminosae. A source Book of Characteristics Uses andNodulation. The University of Wisconsin Press; 1981.

93. Hoberg, P. Nitrogen-fixation and nutrient relations in savana woodland trees (Tansania).Journal of Applied Ecology 23; . 1986.p. 675-688.

94. Rinick, M.J. and P.A. Hadobas. Biology of the Parasponia- radyrhizobiumSymbiosis. In : Nitrogen Fixation with Non-Legunes. F.A. Skinner, R.M. Boddy and I. ;1989.

94. Galiana, A., J. Chaumont H.G. Ahaurnont, J., Diern, and Y.R. Dammergues Nitrogen fixing potential of Acacia mangium and Acacia auriculiformis seedings inoculated with Bradyrhizobium and Rhizobium spp. Biology and Fertility of Soil.. 9 ; 1990. P.261-267.

96. Sutherland J.M. and J.I. Sprent. Nitrogen Fixation by Legume Trees. 1993. International Scicncc Publishcr. New York. Pp; 1993. 33-54.

97. Company.Hansen, A.P.,J.S. Pate, A. Hansen and D.T. Bell Nitrogen economy of post-fire stands of Shurb legumes and Jarrah. (Eucalyptus marginaca Donn & Sm.). Forest of S.W. AustraliaJournal of Experimental Botany. 38 ;1987. 26-41.

98. Umali-Garcia, M.J.,J.S. Libuit and R.L. Baggayan. Effect of Rhizobium inoculation on growth And nodulation of Albizia falcataria (L.) Fosh. And Acacia mangium wild. In the nursery. Plant and Soil. 108 : 71-78 Newman, V. 1989 Occasional technical and Sciencetific notes: Result of media trials using sawdust on germination of Acasia mangium (willd.) Forest Research Centre FRC Publication Sandakan, Sabah. ; 1988. 344-355.

Copyright by Mahidol University

99. Galiana, A., A. Tibok and E. Dohoux. Nitrogen fixing potential of micropropagated clones Of Acacia mangum inoculated with different *Bradyrhizobium spp*. Strains. Plant and Soil; 1991. 161-166.

100. Dela Cruz, R.E., M.G. Manola, N.S> Aggangan and J.D. tambalo. Growth of three legumeree inoculated with VA mycorhiza fungi and Rhizobium. Plant and Soil ;1988.p 108 .

101. Schofield, P.R.,A.H. Gibson, W.F. Dudman and J.M. Watson. Evidence for genetic Exchange and recombination of Rhizobium symbiotic plasmids in a soil population. Applied and Environmental Microbiology. 53 ; . 1987.p 2942-2947.

102. Dela Cruz, R.E., M.G. Manola, N.S> Aggangan and J.D. tambalo. Growth of three legumeree inoculated with VA mycorrhiza fungi and Rhizobium. Plant and Soil ;1988.p 108 .

103. Samasegaran , P . and H.J. Hoben, Methods in Legume - *Rhizobium* technology. NifTAL Project, University of hawii. Paia.; 1985. P. 367.

104. Broughton ; W.J. and M.J. Dillworth. Control of leg haemoglobin synthesis in snake bean Biochem. J. 125 ; 1970. 1075 – 1080

105. Turk D. and H.K. Keyser. Rhyzobia that nodulate tree legumes : specificity of host for nodulation and effectiveness. Can. J . Microbiol. 34 : 88 - 92Fendrik (eds.) Khwer Academic Publisher, London.;1992 .p. 25 –33.

105. Hartman n, A. and N. Amarger. Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* Field population assesed by plasmid prifiles, DNA fingerprinting and insertion seguence typing. Can. J. Micro biol. 37 ; 1991. P.600-608.

107. Hardy R.W.F., R.C. Burns. and R.D. Holsten. Application of the acetylene - ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil biol.Biochem. 5 ; 1973. P. 47 – 81.

108. คณาจารย์ ภาคปฐพีวิทยา. แบบฝึกหัดและคู่มือปฏิบัติการ การวิเคราะห์ดินและพืช พิมพ์ ครั้งที่ 6 กรุงเทพมหานคร; 2537.

109. Somaseagaran, P. and H.J. Hoben. Hand book for Rhizobium. Methods in Legume – Rhizobium Technology. Springer – Verlage, New York; 1985.

110. Romero, F., A.B. Claveria and J.E. Ruiz – sainz. Broad host – effective mutants of *Rhizobium fredii* strains. J. Appl. Bacteriol. 74 ; 1993 . p.610-619.

111. ณัฐพร สุนทรวิจารณ์ เรสทริกชั่น แฟรกเมนท์ เลงร์ โพลีมอพิซึมของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Braddyrhizobium japonicum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร; 2534.

Copyright by Mahidol University

112. Shishido, M. and I. L. Pepper. Identification of dominant indigineaus *Rhizobium melilottii* By plasmid profiles and intrinsic antibioric resistance. ; 1990.

113. Skot, L., P.R. Hirsch and J. F. Witty .Genetic factors in Rhizobium affecting the Symbiotic carbon costs of N_2 fixation and nost plant biomass production. J. Appl. Bacteriol. 61; 1986. 239 – 246

114. Vesper, S. L., and T. C. Weidensaul. Effect of cadmium, nikel, copper and Zinc on nitrogen Fixation by soybeons. Water Air and Soil Pollution 9 ; 1978. p. 413 – 422

115. วิทยา ธนานุสนธิ์ . เอกสารการประชุมวิชาการประจำปี กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการกษตร. กรุงเทพมหานคร. 2543.

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก-1: ศูนย์ และสถานีเพาะชำ สังกัดกรมป่าไม้

หน่วยงาน	ชุดดิน(soil series)	ปริมาณกล้าไม้ (กล้า)
ศูนย์เพาะชำกล้าไม้ที่ 1 อ.เชียงยืน จ.มหาสารคาม	Korat (Kt)	3,562,500
ศูนย์เพาะชำกล้าไม้ที่ 2 อ.เมือง จ. อุดรธานี	Korat (Kt)	3,650,000
ศูนย์เพาะชำกล้าไม้ที่ 3 อ.เมือง จ.ยโสธร	Korat (Kt)	3,562,500
ศูนย์เพาะชำกล้าไม้ที่ 5 อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	Tha Muang (Tm)	990,000
ศูนย์เพาะชำกล้าไม้ที่ 6 อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	Saiburi (Bu) /Ruso(Ro)	990,000
ศูนย์เพาะชำกล้าไม้ที่ 7 อ.เมือง จ.ราชบุรี	Yang Talat (Yt)	1,040,000
ศูนย์เพาะชำกล้าไม้ที่ 12 อ. เด่นชัย จ.แพร่	Hang Dong (Hd)/Lampang (Lp)	990,000
ศูนย์เพาะชำกล้าไม้ที่ 13 กิ่ง อ. ป่าพยอม จ.พัทลุง	Chumporn and Sawi (Cp&Sw)	892,500
สถานีเพาะชำกล้าไม้ สิงห์บุรี อ.อินทร์บุรี จ.สิงห์บุรี	Tha Muang (Tm)	400,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ ลพบุรี อ.เมือง จ.ลพบุรี	LopBuri-Low-Phase (Lb-Lo)	400,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้อ่างทอง อ.โพธิ์ทอง จ.อ่างทอง	Chai Nat (Cn)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ชลบุรี อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี	Sattahip (Sh)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ระยอง อ.เมือง จ.ระยอง	Rayong (Ry)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ตราด อ.บ่อไร่ จ.ตราด	Khong Chak (Kc)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้จันทบุรี อ.มะขาม จ.จันทบุรี	Chumphon (Cp)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ปราจีนบุรี อ.นาดี จ.ปราจีนบุรี	Korat (Kt)	400,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ฉะเชิงเทรา อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา	Suttahip (Sh)	400,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้นครนาก(ทุ่งโพธิ์) อ.บ้านนา จ.นครนายก	Hin Kong (Hk)	400,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ หนองเต็ง-จักราช อ.จักราช จ.นครราชสีมา	Sa Tuk (Suk)	400,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ชัยภูมิ อ.เมือง จ.ชัยภูมิ	Roi et(Re)	400,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้บุรีรัมย์ อ.คูเมือง จ.บุรีรัมย์	Roi et (Re)	400,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้อุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	Korat (Kt)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ศรีสะเกษ อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ	Roi et (Re)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้สุรินทร์ อ.รัตนบุรี จ.สุรินทร์	Roi et (Re)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ ขอนแก่น กิ่ง อ.บ้านแฮด จ.ขอนแก่น	Roi et (Re)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ กาฬสินธุ์ อ.ยางตลาด จ.กาฬสินธุ์	Korat (Kt)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ ร้อยเอ็ด อ.เสลภูมิ จ.ร้อยเอ็ด	Roi et (Re)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ อุดรธานี อ.เมือง จ.อุดรธานี	Korat (Kt)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ สกลนคร อ.กุดบาก จ.สกลนคร	Korat (Kt)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ เทพพนม อ.เมือง จ. นครพนม	That Phanom (Tp)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้มุกดาหาร อ.เมือง จ.มุกดาหาร	Roi et (Re)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้หนองบัวลำภู อ.เมือง จ.หนองบัวลำภู	Korat (Kt)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ลำปาง อ.งาว จ.ลำปาง	Hang Dong (Hd)	400,000

Copyright by Mahidol University

หน่วยงาน	ชุดดิน(soil series)	ปริมาณกล้าไม้ (กล้า)
สถานีเพาะชำกล้าไม้พะเยา อ.เมือง จ.พะเยา	Phayao (Pao)	350,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้เชียงใหม่ อ.หางดง จ.เชียงใหม่	Korat (kt)/Sanpatong(Sp)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ลำพูน อ.แม่ทา จ.ลำพูน	Tha Yang/LatYa(Ty/Ly)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้พิษณุโลก อ.วังทอง จ.พิษณุโลก	Roi et (Re)	350,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้อุตรดิตถ์ อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์	That Phanom (Tp)	350,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้พิจิตร อ.ทับคล้อ จ.พิจิตร	Mae Sai (Ms)	350,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้ตาก อ.เมือง จ.ตาก	ThaYang/Lat ya Association (Ty/Ly)	400,000
สถานีเพาะชำ อุทัยธานี อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	Doem Bang(Db)	350,000
สถานีเพาะชำ ประจวบคีรีขันธ์ อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์	Sattahip (Sh)	300,000
สถานีเพาะชำกล้าไม้เขาย้อย อ.เขาย้อย จ.เพชรบุรี	Tha Yang (Ty)	400,000
สถานีเพาะชำ ชุมพร อ.หลังสวน จ.ชุมพร	Tha Muang (Tm)	300,000
สถานีเพาะชำ พังงา อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	Moderately deepvariant Phangnga, (Pga-md)	300,000
สถานีเพาะชำ ตรัง อ.นาโยง จ.ตรัง	Bang Nara (Ba)	390,000
สถานีเพาะชำสตูล อ.ทุ่งหว้า จ.สตูล	Khlong Teng / Khao Khut association(Klt/Kkt)	300,000
สถานีเพาะชำระนอง อ.เมือง จ.ระนอง	Phangnga(Pga)	300,000
สถานีเพาะชำภูเก็ต อ.ถลาง จ.ภูเก็ต	Khok Khian,Finedeclayed Variant and Tha Sala soils (Ko-fe)	300,000
สถานีเพาะชำกระบี่ อ.คลองท่อม จ.กระบี่	Tha Sae-gravelly phase (Te-g)	300,000
สถานีเพาะชำยะลา อ.รามัน จ.ยะลา	Ruso (Ro)	300,000

ที่มา:1/ กรมป่าไม้ , 2543

2/รายงานการสำรวจดินจังหวัด , 2516 , 2523

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ข

ผลการทดลองเกี่ยวกับสายพันธุ์และประสิทธิภาพไรโซเบียม

ตารางที่ ข-1: แสดงผลความสามารถในการผลิตกรด ด่าง ของไรโซเบียม จากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ (YMA +BTB)

No.	Rhizobial strain	Time to visible colony size (days)	Reaction in (YMA) BTB		
			Fast	Medium	Slow
1	DASA 35001	4			X
2	DASA 35004	4			X
3	DASA 35007	2	X		
4	DASA 35009	4			X
5	DASA 35011	4			X
6	DASA 35013	4			X
7	DASA 35014	2	X		
8	DASA 35017	4			X
9	DASA 35018	2	X		
10	DASA 35022	2	X		
11	DASA 35027	2	X		
12	DASA 35030	2	X		
13	DASA 35039	2	X		
14	DASA 35041	4			X
15	DASA 35042	4			X
16	DASA 35046	4			X
17	DASA 35049	4			X
18	DASA 35052	4			X
19	DASA 35058	4			X
20	DASA 35070	4			X
21	DASA 35073	2	X		
22	DASA 35076	4			X
23	DASA 35077	2	X		
24	DASA 35078	2	X		
25	DASA 35080	4			X
26	DASA 35084	4			X
27	DASA 35087	4			X
28	DASA 35092	4			X
29	DASA 35093	4			X
30	DASA 35095	4			X
31	DASA 35096	4			X
32	บ้านนา 1 ปม 4	4			X
33	บ้านนา 1 ปม 5	4			X
34	ประจวบฯ 1 ปม 5	2	X		
35	ประจวบฯ 2 ปม 5	2	X		
36	ชุมพร 1 ปม 5	3		X	
37	ชุมพร 1 ปม 7	3		X	
38	ราชบุรี 2 ปม 5	2	X		
39	ราชบุรี 2 ปม 6	2	X		

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ ข-2: ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของความสูง จำนวนปม น้ำหนักปมแห้ง น้ำหนักต้นแห้ง ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ (ARA) แม่ไม้ที่ 1

ลำดับที่	สายพันธุ์	ความสูง (ซม.)	จำนวนปม/ต้น	น.น.ปมแห้ง	น.น.ต้นแห้ง (g/ต้น)	ปริมาณ N2 ที่ตรึงได้ (umol/pol/hr)
1	CONTROL	6.42 l	7 fgh	0.004 e	0.053 h	0.394 d
2	CONTROL+N	8.50 h-l	5 fgh	0.006 d-e	0.164 e-h	0.140 d
3	DASA 35001	15.08 a	33 abc	0.031 b-e	0.397 a-f	1.497 cd
4	DASA 35004	12.17 a-k	17 a-h	0.012 cde	0.290 b-h	1.177 cd
5	DASA 35007	11.42 a-k	9 d-h	0.013 cde	0.269 b-h	0.860 cd
6	DASA 35009	14.58 ab	25 a-g	0.041 bcd	0.512 ab	2.849 bcd
7	DASA 35011	13.08 a-g	27 a-g	0.027 b-e	0.415 a-e	1.895 cd
8	DASA 35013	12.08 a-k	21 a-h	0.017 b-e	0.299 b-h	1.453 cd
9	DASA 35014	9.58 e-l	1 h	0.009 de	0.145 fgh	1.783 cd
10	DASA 35017	9.75 d-l	8 e-h	0.006 de	0.158 fgh	0.251 d
11	DASA 35018	11.25 a-k	37 ab	0.103 a	0.294 b-h	1.634 cd
12	DASA 35022	8.42 I-l	6 fgh	0.003 e	0.102 gh	0.993 cd
13	DASA 35027	11.42 a-k	12 c-h	0.007 de	0.221 d-h	0.979 cd
14	DASA 35030	8.17 jkl	7 fgh	0.023 b-e	0.328 b-g	1.936 cd
15	DASA 35039	10.00 c-l	5 fgh	0.007 de	0.204 d-h	0.496 cd
16	DASA 35041	12.67 a-I	27 a-g	0.023 b-e	0.346 a-g	1.921 cd
17	DASA 35042	10.50 b-l	19 a-h	0.016 b-e	0.253 c-h	1.039 cd
18	DASA 35046	10.92 a-k	30 a-e	0.025 b-e	0.241 c-h	1.149 cd
19	DASA 35049	7.92 kl	18 a-h	0.007 de	0.122 gh	0.730 cd
20	DASA 35052	12.58 a-j	32 a-d	0.026 b-e	0.351 a-g	2.165 cd
21	DASA 35058	12.58 a-j	22 a-h	0.051 b	0.455 a-d	3.378 bc
22	DASA 35070	13.25 a-f	27 a-g	0.028 b-e	0.419 a-d	2.770 bcd
23	DASA 35073	14.25 abc	28 a-f	0.025 b-e	0.444 a-d	2.938 bcd
24	DASA 35076	13.67 a-e	35 ab	0.035 b-e	0.450 a-d	2.769 bcd
25	DASA 35077	9.67 e-l	5 gh	0.003 e	0.151 fgh	0.287 d
26	DASA 35078	9.00 f-l	2 h	0.001 e	0.162 fgh	0.265 d
27	DASA 35080	13.58 a-e	38 a	0.048 bc	0.475 abc	5.987 a
28	DASA 35084	14.17 a-d	33 abc	0.034 b-e	0.584 a	5.308 ab
29	DASA 35087	12.75 a-I	26 a-g	0.018 b-e	0.344 a-g	1.560 cd
30	DASA 35092	12.92 a-h	23 a-h	0.023 b-e	0.317 b-g	0.797 cd
31	DASA 35093	11.75 a-k	26 a-g	0.028 b-e	0.306 b-g	1.409 cd
32	DASA 35095	8.42 I-l	8 e-h	0.009 de	0.215 d-h	1.301 cd
33	DASA 35096	10.00 c-l	2 h	0.005 de	0.154 fgh	0.397 d
34	บ้านนา 1 ปม 4	11.42 a-k	11 c-h	0.017 b-e	0.306 b-g	1.766 cd
35	บ้านนา 1 ปม 5	11.67 a-k	15 b-h	0.021 b-e	0.309 b-g	2.589 cd
36	ประจวบ 1 ปม 5	12.58 a-j	20 a-h	0.011 de	0.326 b-g	1.420 cd
37	ประจวบ 2 ปม 5	10.08 c-l	24 a-h	0.019 b-e	0.256 c-h	1.563 cd
38	ชุมพร 1 ปม 5	10.58 b-l	17 a-h	0.010 de	0.210 d-h	1.037 cd
39	ชุมพร 1 ปม 7	8.75 g-l	11 c-h	0.007 de	0.225 c-h	0.215 cd
40	ราชบุรี 2 ปม 5	9.75 d-l	23 a-h	0.007 de	0.131 gh	0.407 d
41	ราชบุรี 2 ปม 6	8.92 f-l	15 b-h	0.006 de	0.148 fgh	0.423 d
CV %		19.9	61.6	92.2	44.8	92.3

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกัน 5% โดยวิธี DMRT

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ ข- 3: ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของความสูง จำนวนปม น้ำหนักปมแห้ง น้ำหนักต้นแห้ง ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ (ARA) แม่ไม้ที่ 2

ลำดับ	สายพันธุ์	ความสูง (ซม.)	จำนวนปม/ต้น	น.น.ปมแห้ง	น.น.ต้นแห้ง/ต้น	ปริมาณ N2 ที่ตรึงได้ (umol/pol/hr)
1	CONTROL	5.17 h	0 hi	0.000 h	0.039 j	0.316 e
2	CONTROL+N	9.00 c-h	0 I	0.000 h	0.130 g-j	0.345 e
3	DASA 35001	13.33 ab	31 a-e	0.034 abc	0.479 a-e	2.380 a-e
4	DASA 35004	10.58 a-g	23 a-I	0.019 b-h	0.389 a-h	2.353 a-e
5	DASA 35007	8.25 e-h	13 c-I	0.016 b-h	0.266 d-j	1.925 a-e
6	DASA 35009	12.92 abc	24 a-I	0.033 a-d	0.487 a-e	3.833 a
7	DASA 35011	10.42 a-g	30 a-f	0.017 b-h	0.323 c-I	1.941 a-e
8	DASA 35013	10.08 a-g	22 a-I	0.015 b-h	0.327 c-I	1.694 a-e
9	DASA 35014	8.67 d-h	21 a-I	0.007 fgh	0.124 hij	0.438 e
10	DASA 35017	7.83 gh	3 ghi	0.005 fgh	0.154 f-j	0.785 cde
11	DASA 35018	7.25 g-h	10 d-I	0.004 gh	0.111 hij	0.434 e
12	DASA 35022	7.17 g-h	19 b-I	0.010 c-h	0.127 hij	0.583 de
13	DASA 35027	8.42 e-h	10 d-i	0.009 e-h	0.190 f-j	0.943 cde
14	DASA 35030	9.00 c-h	4 f-I	0.010 d-h	0.164 f-j	0.847 cde
15	DASA 35039	8.50 e-h	17 c-I	0.016 b-h	0.229 d-j	1.143 b-e
16	DASA 35041	10.00 e-g	26 a-h	0.019 b-h	0.318 c-j	1.691 a-e
17	DASA 35042	12.00 a-f	46 a	0.046 a	0.616 a	2.523 a-e
18	DASA 35046	7.50 gh	11 c-I	0.009 e-h	0.159 f-j	0.781 cde
19	DASA 35049	8.42 e-h	25 a-I	0.016 b-h	0.171 f-j	1.054 cde
20	DASA 35052	8.17 fgh	34 a-d	0.020 b-h	0.299 c-j	1.536 a-e
21	DASA 35058	9.50 b-g	22 a-i	0.028 a-f	0.335 b-I	1.570 a-e
22	DASA 35070	12.67 a-d	27 a-g	0.026 a-g	0.377 a-I	1.615 a-e
23	DASA 35073	11.08 a-g	30 a-f	0.031 a-e	0.491 a-e	3.321 abc
24	DASA 35076	12.25 a-e	35 a-d	0.035 ab	0.606 ab	3.671 a
25	DASA 35077	9.08 c-h	5 f-I	0.001 h	0.186 f-j	0.483 e
26	DASA 35078	10.75 a-g	14 c-I	0.004 gh	0.216 e-j	0.440 e
27	DASA 35080	11.17 a-g	31 a-e	0.036 ab	0.386 a-I	2.665 a-e
28	DASA 35084	10.67 a-g	30 a-f	0.013 b-h	0.409 a-g	2.690 a-e
29	DASA 35087	10.42 a-g	25 a-i	0.023 a-h	0.385 a-I	3.154 abc
30	DASA 35092	10.67 a-g	14 c-i	0.022 b-h	0.311 c-j	1.523 a-e
31	DASA 35093	12.08 a-f	37 abc	0.027 a-g	0.503 a-d	3.568 ab
32	DASA 35095	9.50 b-g	9 d-I	0.014 b-h	0.211 e-j	1.475 a-e
33	DASA 35096	9.50 b-g	7 e-I	0.004 gh	0.198 f-j	0.576 de
34	บ้านนา 1 ปม 4	11.00 a-g	11 c-i	0.017 b-h	0.321 c-I	1.555 a-e
35	บ้านนา 1 ปม 5	12.58 a-d	13 c-i	0.020 b-h	0.428 a-f	2.959 a-d
36	ประจวบ 1 ปม 5	13.92 a	44 ab	0.027 a-g	0.551 abc	2.422 a-e
37	ประจวบ 2 ปม 5	9.92 a-g	18 b-I	0.014 b-h	0.303 c-j	1.206 b-e
38	ชุมพร 1 ปม 5	10.75 a-g	17 c-i	0.014 b-h	0.251 d-j	1.467 a-e
39	ชุมพร 1 ปม 7	9.50 b-g	33 a-e	0.023 b-h	0.415 a-f	2.632 a-e
40	ราชบุรี 2 ปม 5	8.50 e-h	35 a-d	0.010 d-h	0.160 f-j	0.286 e
41	ราชบุรี 2 ปม 6	8.33 e-h	24 a-i	0.007 fgh	0.108 ij	0.296 e
CV %		20.4	62.8	68.8	42.9	75.0

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกัน 5% โดยวิธี DMRT*

Copyright by Mahidol University

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไรโซเบียมโดยวิธีการ ELISA TEST

ตารางที่ ข-4: การจัดกลุ่มระหว่างสายพันธุ์ไรโซเบียม กระถินเทพา จากปฏิกิริยา ELISA

A	BLANK	0.170		0.106	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER		0.020	
B	0.006	0.160		0.127	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER		0.029	
C	0.147	0.161		0.146	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER		0.030	
D	0.153	0.174		0.141	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER		0.026	
E	0.151		0.168	0.001	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	-0.041	-0.005	0.009
F			162	-0.012	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	0.022	0.003	0.015
G			161	-0.011	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	-0.007	-0.011	0.012
H			150	0.150	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	UNDER	-0.003	-0.003	0.009

หมายเหตุ :

DASA35087 *DASA35078* *DASA35073* *DASA35080* *DASA35093*

DASA35076 *DASA35084* *DASA01008* *DASA01009* *DASA01010*

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ ข-5:แสดงปฏิกิริยา ELISA ระหว่างสายพันธุ์ไรโซเบียม DASA35076 และDASA35080 ที่ได้จากปมรากกระถินเทพา ต่อแอนติซีรัม (antisera) ของสายพันธุ์ ทั้งสองที่ได้จากเครื่องอ่าน ELISA

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X	/	X	/	/	X	X	X	X	/	/
/	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	/	/
/	/	/	X	/	X	X	X	X	/	/
/	X	/	X	/	X	X	X	X	X	X
X	X	/	/	/	/	X	X	X	X	X
/	X	X	X	/	X	X	X	X	/	/
/	X	/	X	/	/	/	/	/	/	/

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X	X	X	X	/	X	/	/	X	/	X
/	/	X	/	/	X	X	/	X	/	/
/	X	X	X	X	/	/	/	/	X	/
X	/	/	X	/	/	/	X	X	X	X
X	X	/	X	/	/	/	X	/	/	X
X	X	X	X	X	X	/	/	/	/	/
X	X	/	/	/	X	X	/	/	X	/
/	X	X	/	/	/	X	/	/	/	X

หมายเหตุ :*x = สายพันธุ์ DASA 35076 : / = สายพันธุ์ DASA 35080*

Copyright by Mahidol University

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
/	X	X	X	X	/	X	/	X	X	X
/	X	X	X	X	X	X	X	/	X	X
/	/	X	X	X	X	X	X	/	X	X
/	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
/	X	/	X	X	X	X	X	X	X	X
/	/	X	X	X	X	X	/	X	X	X
/	/	X	X	X	X	X	/	X	X	X
/	/	X	/	X	/	X	X	X	X	X

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X	/	/	/	/	/	X	X	X	X	X
/	/	X	/	X	/	X	X	/	X	/
/	/	/	X	/	X	X	X	X	X	X
/	X	X	/	X	X	/	X	X	/	/
/	/	/	/	X	X	/	X	X	X	X
/	/	/	/	X	X	X	X	X	/	X
X	/	X	/	/	X	/	/	X	X	X
X	/	/	/	X	/	X	X	/	X	X

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X	/	X	/	/	X	/	/	/	X	X
X	X	/	X	X	X	X	X	X	X	/
X	X	X	X	X	X	/	X	X	X	/
X	/	X	X	X	X	/	X	/	X	X
X	/	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	/	X	X	/	/	X	X	X	X	X
/	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	/	X	/	X	/	X	X	X	X	X

หมายเหตุ :*x = สายพันธุ์ DASA 35076 : / = สายพันธุ์ DASA 35080*

Copyright by Mahidol University

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X	X	/	X	X	X	/	X	/	X	X
X	/	X	X	/	X	X	X	X	X	X
X	X	/	X	X	X	X	X	X	X	X
X	/	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	/	X	X	X	X	X	X	X
X	X	/	X	X	X	X	X	X	X	X

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X	X	X	X	X	X	X	X	X	/	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	/	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	/	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	/	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	/	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X	X	/	X	X	/	X	/	/	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	/	/	/
X	X	X	X	X	X	/	X	X	X	/
X	X	/	/	X	X	X	X	X	X	/
X	X	X	X	X	X	/	/	X	/	/
X	X	X	X	X	X	X	/	/	/	/
/	X	X	X	X	X	/	/	/	/	/
X	X	X	X	X	X	X	X	X	/	/

หมายเหตุ :*x = สายพันธุ์ DASA 35076 : / = สายพันธุ์ DASA 35080*

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค-1 : ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของ ความโตบริเวณคอราก ความสูง น้ำหนักต้นแห้ง ปริมาณไนโตรเจนในต้นพืช การตรึงไนโตรเจน (ARA) แม่ไม้ที่ 1 สงขลา

ลำดับที่	ตำรับการทดลอง	ความโตบริเวณคอราก (ซม.)	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/ต้น)	ปริมาณไนโตรเจน(%)	การตรึงไนโตรเจน (umole C_2H_4/ต้น/ชม)
1	Control	0.438 d	42.375 cd	14.50 e	1.75 d	0.017 d
2	S + f	0.720 a	53.125 ab	32.75 a	2.09 d	0.160 cd
3	S + R	0.538 cd	53.325 ab	17.25 e	2.11 d	1.753 a
4	S + Sl 1 : 1	0.653 ab	45.250 a-d	15.00 e	1.91 d	0.242 cd
5	S + Sl 1 : 2	0.591 bc	54.650 a	26.63 b	3.08 c	0.222 cd
6	S + Sl 1 : 3	0.585 bc	54.013 a	19.65 cde	2.92 c	0.085 d
7	S + Sl 1 : 4	0.579 bc	50.875 abc	19.75 cde	2.88 c	0.244 cd
8	S + R + Sl 1:1	0.610 bc	55.325 a	24.50 bc	4.31 a	1.398 b
9	S + R + Sl 1:2	0.532 cd	49.825 abc	24.00 bcd	3.64 b	0.330 c
10	S + R + Sl 1:3	0.472 d	39.475 d	14.75 e	2.24 d	0.144 cd
11	S + R + Sl 1:4	0.615 bc	43.700 bcd	18.90 de	2.80 c	0.146 cd
	CV %	11.1	12.5	16.1	11.7	33.6

หมายเหตุ :*1) S=Soil Sl=Sludge R= Rhizobium*

2) ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5% โดยวิธี DMRT

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ ค-2: ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของ ความโตบริเวณคอราก ความสูง น้ำหนักต้นแห้ง ปริมาณไนโตรเจนในต้นพืช การตรึงไนโตรเจน (ARA) แม่ไม้ที่ 2 นครราชสีมา

ลำดับที่	ตำรับการทดลอง	ความโตบริเวณคอราก (ซม.)	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/ต้น)	ปริมาณไนโตรเจน(%)	การตรึงไนโตรเจน (umole C_2H_4/ต้น/ชม)
1	Control	0.328 bc	26.38 e	5.00 d	2.05 c	0.015 d
2	S + f	0.590 a	60.65 a	17.03 a	3.79 a	0.058 cd
3	S + R	0.370 bc	31.33 cde	6.75 d	2.81 b	1.197 a
4	S + Sl 1 : 1	0.410 bc	34.50 c	8.00 cd	3.24 b	0.048 cd
5	S + Sl 1 : 2	0.370 bc	33.25 cd	6.93 d	2.15 c	0.086 c
6	S + Sl 1 : 3	0.470 bc	40.83 b	10.83 bc	2.26 c	0.031d
7	S + Sl 1 : 4	0.393 bc	26.65 e	6.00 d	3.15 b	0.058 cd
8	S + R + Sl 1:1	0.411 bc	30.00 cde	13.50 ab	3.15 b	0.296 b
9	S + R + Sl 1:2	0.297 c	27.75 de	6.75 d	3.09 b	0.064 cd
10	S + R + Sl 1:3	0.416 bc	26.83 e	6.75 d	2.93 b	0.050 cd
11	S + R + Sl 1:4	0.372 bc	28.40 de	5.25 d	2.15 c	0.054 cd
	CV %	30.2	10.6	30.2	12.8	17.8

หมายเหตุ :*1) S=Soil Sl=Sludge R= Rhizobium*

2) ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5% โดยวิธี DMRT

Copyright by Mahidol University

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ค่าTotal Nitrogen โดยวิธี Micro – Kjedahl หลังจากเวลาครบ 3 เดือน

เตรียม H2 SO4 –Na2SO4 – Se mixture digestion ชั่งตัวอย่างพืชจำนวน 0.200-0.400 กรัม ลงในหลอด test tube ขนาด 75 มล. เติม H2SO4 – Na2SO4-Se mixture ภายใต้ fume hood ควบคุมอุณหภูมิของเครื่อง digesteng apparatus ตัวอย่างพืชให้ได้สารละลายใสจึงยกทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทสารละลายใสส่วนบนเก็บไว้ให้ตกตะกอน เทสารละลายในส่วนบนเก็บไว้ขวดพลาสติกขนาด 100 มล. ที่มีฝาปิดเพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าไนโตรเจน พร้อมกับตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาค่าปริมาณไนโตรเจน (Distrillation) ปิเปตสารละลาย (aliquot) ที่ได้จากการ digest พืช ($H_2SO_4 – Na_2SO_4$ – Se mixture digestion) จำนวน 10 มล. ใส่ลงใน distrillation flask เติมร้อยละ 40 NaOH ลงไป 10 มล. แล้วทำการกลั่น ไนโตรเจนที่กลั่นได้ซึ่งจะออกมาในรูปสารละลายใน Flask ซึ่งบรรจุ boric acid indicator 5 มล. กลั่นจนกระทั่งสารละลายที่กลั่นได้นี้ด้วย standard 0.05 NH_2SO_4 ทำ blank พร้อมตัวอย่างร้อยละไนโตรเจน ในพืช = ml acid used (sample – blank titration) X Normality of std. Acid X 0.014 x50 x100 หารด้วย Weight of plant sample (gm) x ml. Of aliquot

Copyright by Mahidol University

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นายภูวรักษ์ สมจิตร
วัน เดือน ปีเกิด	5 ธันวาคม 2512
สถานที่เกิด	จังหวัดแพร่ ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	โรงเรียนป่าไม้ จังหวัดแพร่, (2530-2532) ประกาศนียบัตรวิชาการป่าไม้ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, (2533-2539) ส่งเสริมการเกษตรบัณฑิต (ป่าไม้) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, (2535-2538) วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วนศาตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล, (2540-2544) วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม)
ตำแหน่งและสถานที่ทำงานปัจจุบัน	พ.ศ. 2533 – ปัจจุบัน กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ตำแหน่งนักวิชาการป่าไม้ 4

Copyright by Mahidol University

Executive Summary

Application of Activated Sludge and Rhizobium to improve Soil Medium for *Acacia Mangium* Willd. Seedling

Abstract

The purpose of this work is to study applying activated sludge derived from wastewater treatment plant and incorporating it with *Rhizobium* strain to adjust the soil fertility for *Acacia mangium* planting. The study also examined the relationship between using different ratios of activated sludge and *Rhizobium* strains that are screened for enhancing the growth of two types of *Acacia mangium.* from Songkhla and Nakhonratchasima. A randomized complete block design was used in this experiment consisting of eleven treatments, four replications and noninoculated without nitrogen as the control. The measurements were commonly observed, that of height, diameter at root corla, biomass and nitrogen fixation rate, as well as percentage of nitrogen content in the shoot. Besides those measurements the effectiveness of nodulation was also determined by means of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Then all the recorded data were statistically processed using Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

The results indicated that *Acacia mangium* of Songkhla type responsed to activated sludge better than Nakhonratchasima type giving yield of biomass (88.0%) close to obtaining from Osmocoat usage. The best ratio of soil and sludge is of 1:2. in which application of *Rhizobium* is unnessary duing to *Rhizobium* nodulation is low. However, *Rhizobium* nodulation efficiency is appeared to be high in Nakhonratchasima type. Among the *Rhizobium* strains used in this experiment it appeared that *Rhizobium strains DASA 35076* and *DASA 35080* dominated the enhancement on *Acacia mangium* growth. Furthermore, the *Rhizobium strain DASA 35080* showed more effectiveness in nodulation than another. Therefore, it should be recommended that *DASA 35080* be used for *Acacia mangium* planting. In addition, experimental results have also showed that in cases of incorporated sludge and *Rhizobium* the ratio of sludge used should not be higher than 50% as the growth of *Acacia mangium* is decreased when the applied sludge is increased. This might be due to the presence of heavy metals, which are toxic, in sludge inhibited *Rhizobium* nodulation. It can be concluded that activated sludge from domestic wastewater treatment plants is useful to improve soil enhancement for *Acacia mangium* growth. In addition, *Acacia mangium* of the Songkhla type is better than the Nakhonratchasima type for planting

Introduction

Soils are complex biochemical materials on which plants may grow. They also are dynamic ecological systems, providing plants with support, water, nutrients, and air for growth and supporting a large population of microorganisms that recycle the materials of life. The information obtained from the soil map indicated that seventy-nine locations of plant nursery stations of the Department of Forestry are mostly Korat soil series (19.2 %) that has low fertility, therefore it should be improved in its property before use as soil medium in forest seedling.

The basic properties of materials which are suitable for improving the soil fertility are having enough porosity, able to hold water, and not easily decomposed, as well as composting nontoxic substances (1).

Copyright by Mahidol University

Activated sludge derived from wastewater treatment system could be applied to plant in case of being as the plant nutrient and supporting material. Usually, applying it could also improve the soil structure such as the porosity and water holding capacity if it was applied for a long period.(2) Sommers et.at (3) noted that the activated sludge consists of carbon, nitrogen, phosphorus, and potassium which most of them are in organic form. With having available nutrient form, the activated sludge should be appropriated to apply to plant as a nutrient source for seedling.

Acacia Mangium is widely popular in forest seedling because of the advantages of fast growing wood. *Acacia Mangium* is classified in genera Acacia and family Leguminosae.(4) It can associated with soil bacteria particulary Rhizobium genus within the nodule site as a symbiosis relationship. With this relationship, *Acacia Mangium* will supply organic substance to Rhizobium and it obtains nitrogen compound from nitrogen fixation processed by Rhizobium at the same time.(5) Therefore, it is useful to investigate the relationship between the best ratio of activated sludge applied and effective Rhizobium for growth and yield of biomass of *Acacia Mangium*.

Materials and Methods

For preparing materials, Korat soil series were collected from the plant nursery station for use as the medium. In case of activated sludge, we used the sludge obtained from a beverage wastewater treatment plants. *Acacia Mangium* seeds used for this experiment were of No.98-0028 and No. 99-0021 which were restored by Department of Forestry and they were collected from Amphoe Hadyai, Songkhla and Amphoe Pakthongchai, Nakhonratchasima province on March,1998, representing two types of *Acacia Mangium*.

1. Screening and evaluating the effectiveness of Rhizobium strains for enchancement of *Acacia Mangium* growth

Collect Rhizobium thirty-nine strains which were associated with *Acacia Mangium*. The isolation was carried out by Somsegaram & Hoben (6), then purification test of these cultures and classification Rhizobium in genus were conducted using the ability of acidic and alkaline production as indicator.(7) To culture two types of *Acacia Mangium* seeds, the seeds were treated with concentrated sulfuric acid to stimulate the germination of them. The experiment consists of forty-one treatments, each of treatment in this will be done in triplicate, and noninoculated without nitrogen as the control. At the end of three months, the plant growth and the effectiveness of Rhizobium in nitrogen fixation process has been examined by measuring the height of shoot, determining dry weight, and number of nodule, including nitrogen content. After those data were interpreted, the effective Rhizobium which promoted the *Acacia Mangium* growth were screened, and then were classified by means of ELISA technique.

Copyright by Mahidol University

2. Determination of a appropriate ratio of activated sludge incoroporating with Rhizobium to *Acacia Mangium* growth.

This experiment was designed as RCBD with eleven treatments, as shown below, and four replications. It became forty-four experimental units for each of type of *Acacia Mangium*. Inoculate one ml.of the effective Rhizobium on *Acacia Mangium* seedlings. The measurements were observed that is the height, diameter of corla root, dry weight, nitrogen fixation rate by using acetylene reduction assay, and analysis of N content. These data were statistically processed by DMRT at 95 percent significantly confidence level.

	Treatment
1	soil (control)
2	soil+osmocoat 14-14-14 10g/bag applied one time
3	soil+Rhizobium (S+R)
4	soil+activated sludge ratio 1:1 (S+1:1)
5	soil+ activated sludge ratio 1:2 (S+1:2)
6	soil+ activated sludge ratio 1:3 (S+ 1:3)
7	soil+ activated sludge ratio 1:4(S+1:4)
8	soil+ activated sludge + the effective Rhizobium (S+1:1+R)
9	soil+ activated sludge + the effective Rhizobium (S+1:2+R)
10	soil+ activated sludge + the effective Rhizobium (S+1:3+R)
11	soil + activated sludge + the effective Rhizobium (S+1:4+R)

3. Evaluation of the effectiveness Rhizobium strains in case of nodulation.

It was carried out by serology method (ELISA). The first step of this method is antigen preparation of two the effective Rhizobium strains which were already screened. Then the prepared antigen were injected into each of rabbit, so that they would produce antiserum. Then, the received antiserium was transfered for ELISA test. Added antiserum to somatic Rhizobium cell, resulting in a colored product which were measured by the microplate reader. If the results appeared more than fifty percentage in comparison with the positive control, it could be assumed that it is the same positive strain.

Results and Discussion

The classification of Rhizobium by using the ability of acidic and alkaline production as an indicator indicated that there are fourteen acidic producing isolates, 23 alkaline producing isolates,and 2 isolates without changing in color of medium. The characteristics of the effective Bradyrhizobium is most likely to have a big nodule, average number of nodule about 3-38 nodules, including the dry weight of nodule approximately 0.004-0.0048 gram whereas the ineffective Rhizobium belongs to small nodules and the average number of nodules approximately 1-44 nodules.

Copyright by Mahidol University

1. The effectiveness of Rhizobium strain to *Acacia Mangium* growth

This experiment was set up in greenhouse, and the results showed that Rhizobium strain DASA 35080,35076, 3578, 35084, 35086, and DASA 35073 have a high effectiveness in promoting the growth of both *Acacia Mangium* type because of providing the highest dry weight, height, nitrogen fixation rate, number of nodules, and nodule dry weight when compared to the others. These six strains were tested whether these are the same grouping or not by ELISA method. The results from the tests demonstrated that Rhizobium strain DASA 35076 and DASA 35080 are different grouping.

2. Determination of the appropriate ratio of activated sludge and Rhizobium to growth and yield of *Acacia Mangium*

Dry weight of shoot was the most important indicators. As the results shown in Figure 1, it is indicated that Songkhla type responsed the highest to treatment with osmocote applied whereas the treatment with activated sludge ratio 1:1 and Rhizobium gave the dry weight not significantly different in statistic. Nevertheless, the application of activated sludge at the ratio of 1:2 also gave the highest yield, but at the higher ratio could inhibit plant growth. The treatment with Rhizobium incoroporating to the activated sludge ratio 1:1 and 1:2 were considered to enhance the plant growth compared to the others but it didn't significantly differ from treatment with ratio 1:2. All of these observations demonstrated that applied Rhizobium didn't promote the growth of *Acacia Mangium* Songkhla type.

For the Nakhonratchasima type, the data received showed that it is mostly response to applied osmocote less than Songkhla type. In addition to the applied activated sludge with ratio 1:1 or only Rhizobium using not only provided the yield not significantly different in statistic, but also gave the yield less than osmocate application. When negligible treatment osmocote, treatment with Rhizobium incoroporating to the activated sludge ratio 1:1 could produce the yield higher than the others, however the yield would be decreased when the higher ratio of activated sludge was applied.(8) It was a results of the higher ratio of activated sludge could inhibit plant growth according to the obsevervations gained from this experiment which indicated that the higher ratio inhibited *Acacia Mangium* seedling growth. Some treatments such as treatment with the activated sludge ratio 1:3 or 1:4 or the same ratio with Rhizobium applied in Songkhla type produced the yield that is equal to the control. It may be caused by the presence of heavy metal in the activated sludge which is toxic to plant when was applied in high quantity. Besides being toxic to plant, it affects also to soil microorganisms. These results agree with work done by Mays Terman & Duggan(9) who stated that the relationship between the yield of plant and the ratio of activated sludge applied is as a curve function. It means that the high yield will appear when the appropriate activated sludge is applied. At the same time, the yield will decrease when the higher activated sludge quantity is applied duing to some chemical composition of activated sludge too toxic to plant.

Copyright by Mahidol University

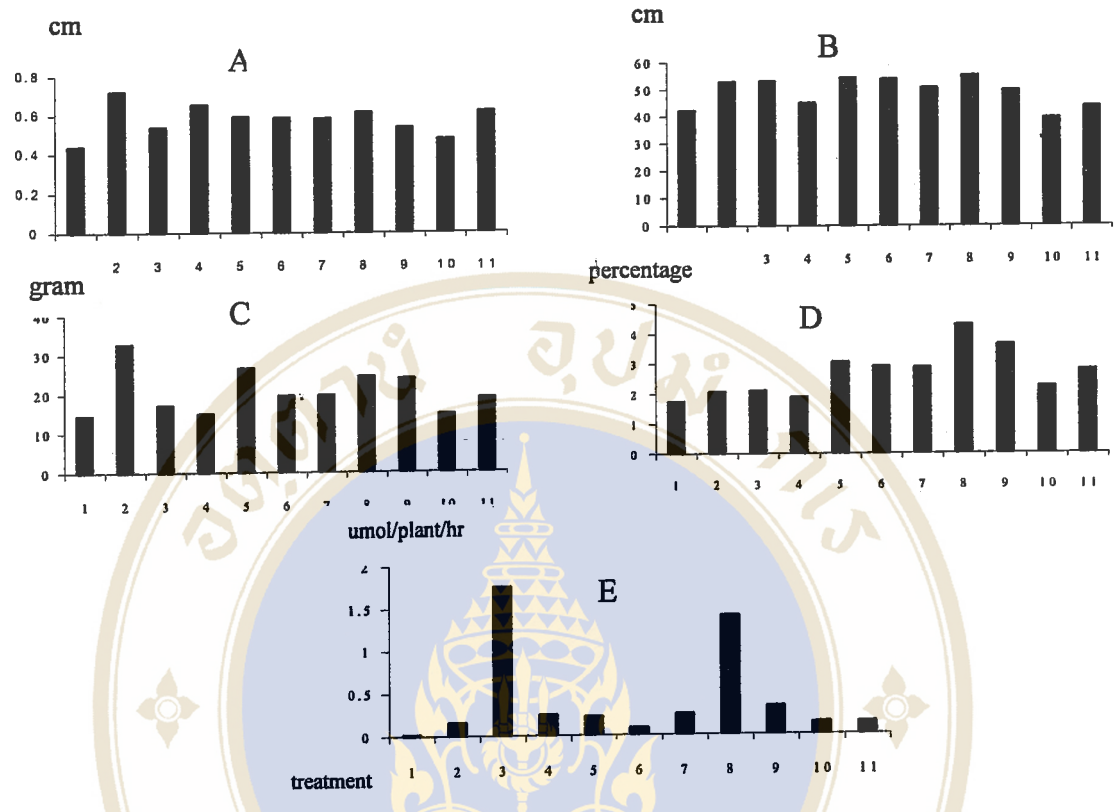
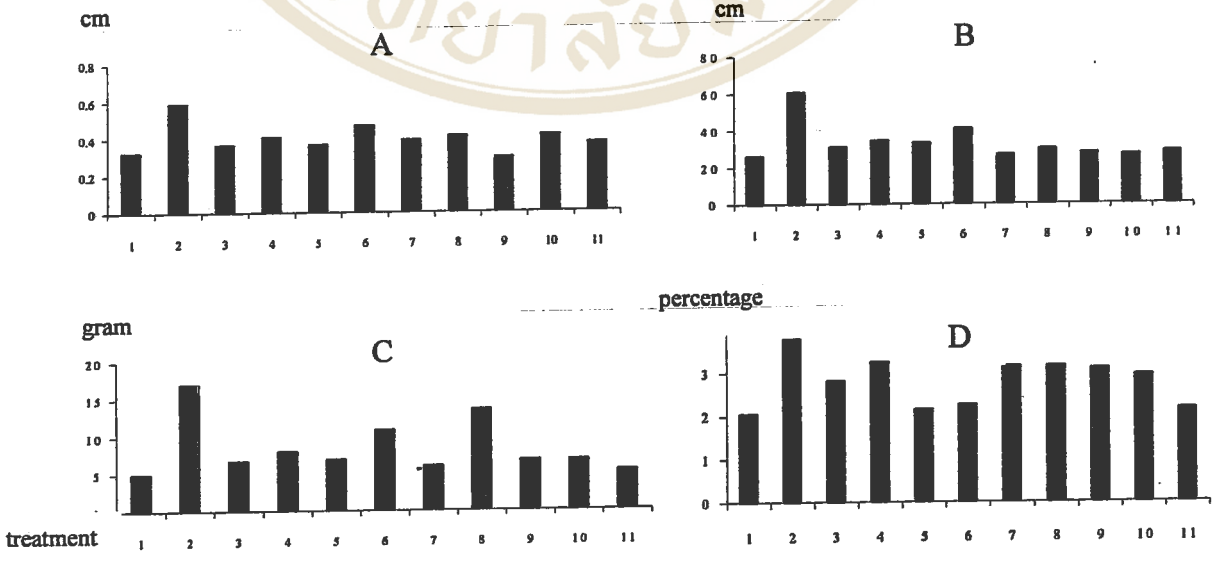


Figure 1: Comparison on *Acaia Mangium* growth of 11 treatments;. (A) Diameter, (B) Height, (C) Dried Shoot, (D) Nitrogen content, (E) Nitrogen fixation rate, for Songkhla (above) and Nakhonratchasima plant (below)



Copyright by Mahidol University

3. Monitoring and determining the effectiveness of Rhizobium strain in nodulation.

The results of monitoring and determining the effectiveness of Rhizobium strain in nodulation by ELISA technique was shown in Table 1. It can be summarized that Rhizobium strain DASA 35080 is more effective in nodulation with both types of *Acacia Mangium* than strain DASA 35076.

Table :1 The effectiveness of Rhizobium strain in nodulation

Strain	percentage of nodulation
DASA 35076	23.82
DASA 35080	76.18

Conclusion

Based on the results of this research, Songkhla type is responsible to applied osmocote better than the other treatments. In case of activated sludge or Rhizobium usage alone, they didn't provide the yield at significant level, but application of activated sludge at the ratio of 1:2 is most likely to be a suitable ratio to enhancement *Acacia Mangium* growth. There is no clear effect of Rhizobium on Songkhla type growth. Furthermore, the Nakhonratchasima type provided the results according to that of Songkhla type but there are slightly difference in that Nakhonratchasima responsed to osmocote less than that one.

Overall interpretations, It can be concluded that Songkhla type responses biomass production to activated sludge ratio 1:2 approximately eighty-eight percentage when compare with osmocoat usage. However, adding of Rhizobium has lower effectivenes, therefore the application of Rhizobium is unnecessary to seedling due to low in effectiveness of nodulation. In addition, in case of the application of Rhizobium incoroporating with activated sludge may be a good means of seedling if the activated sludge is applied no more than fifty percentage because the activated sludge contains heavy metal which is toxic to Rhizobium and plant growth as described above. Songkhla type is better than the Nakhonratsima type for seedling.

References

1. สมเพียร เกษมทรัพย์. การปลูกไม้ดอก. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ;2528.

2. Lunt HA. The case for sewadge sludge as a soil improves with emphasis on value of pH control and toxicity of minor elements. Abstr. In : Soil and fertilizer; 1953. P. 17 - 49

3. Sommers, L.E. ; D.W. Nelson and A.J. Yost. Variable nature of chemical composltion of sewage sludge. J. Environ. Qual. 5 : 1976. P. 303-306

4. สะอาด บุญเกิด, จาร สดากร และทิพย์พรรณ สดกร. ชื่อพันธุ์ไม้ในประเทศไทย บริษัทจิรการพิมพ์. กรุงเทพมหานคร; 2525. หน้า 657.

Copyright by Mahidol University

5. สมศักดิ์ วังใน, การตรึงไนโตรเจน, ไรโซเบียม - พืชตระกูลถั่ว. ภาควิชาปฐพีวิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร; 2525 .หน้า 244.

6. Samasegaran , P . and H.J. Hoben, Methods in Legume - *Rhizobium* technology. NifTAL Project, University of hawii. Paia.; 1985. P. 367.

7. Somaseagaran, P. and H.J. Hoben. Hand book for Rhizobium. Methods in Legume – Rhizobium Technology. Springer – Verlage, New York; 1985.

8 Sabey, B.R. and Hart, W.E. "Land Application of Sewage Sludge : I Effect on Growth and Chemical Composition of Plants." J. Environ. Qual. ,4(2) ; 1975 :p. 252-256

9 Mays, D.A., Terman, G.L. and Duggan, J.C. "Municipal Compost . Effect on Crop Yields and Soil Properties." J. Environ. Qual. 2(1); 1973.p. 89-92.

Copyright by Mahidol University