- 7 S.A. 2544

# ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียในปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล

สุธา ไอยราคม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการวางแผนสิ่งแวดล้อมเพื่อพัฒนาชนบท
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2544

ISBN 974-04-0785-4

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยมหิดล
Copyright by Mahidol University

วพ
ส 784 ป
2544
ฉ.2

**วิทยานิพนธ์**

**เรื่อง**

**ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียในปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล**

.....

นายสุธา ไอยราคม

ผู้วิจัย

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุชาติ นวกวงษ์ วท.ม.

ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์อัจฉราพร สังข์เพ็ชร Ph.D.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นาฏสุดา ภูมิจำนงค์ Ph.D.

กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....

ศาสตราจารย์เลียงชัย ลิ้มล้อมวงศ์ Ph.D.

คณบดี

บัณฑิตวิทยาลัย

.....

อาจารย์สัญชัย สูติพันธ์วิหาร วท.ม.

ประธานคณะกรรมการบริหารหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

เทคโนโลยีการวางแผนสิ่งแวดล้อม

เพื่อพัฒนาชนบท

คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์

Copyright by Mahidol University

**วิทยานิพนธ์**

**เรื่อง**

**ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียในปุ๋ยหมักกากตะกอน**
**จากโรงงานน้ำตาล**

**ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร**
**ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต เทคโนโลยีการวางแผนสิ่งแวดล้อมเพื่อพัฒนาชนบท**
**วันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2544**

.....
นายสุธา ไอยราคม
ผู้วิจัย

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุชาติ นวกวงษ์ วท.ม.
ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์อัจฉราพร สังข์เพ็ชร Ph.D.
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
นายบรรหาร แตงฉ่ำ M.Ag.
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นาฏสุดา ภูมิจำนงค์ Ph.D.
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
ศาสตราจารย์เลียงชัย ลิ้มล้อมวงศ์ Ph.D.
คณบดี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

.....
รองศาสตราจารย์อนุชาติ พวงสำลี Ph.D.
คณบดี
คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

Copyright by Mahidol University

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุชาติ นวกวงษ์ ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัจฉราพร สังข์เพ็ชร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นาฏสุดา ภูมิจำนงค์ อาจารย์ เบญจภรณ์ ประภักดี และ คุณ บรรหาญ แตงฉ่ำ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและความร่วมมือที่ดีตลอดมา

ท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงได้รับจากการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอมอบความดีแด่ บิดา มารดา พี่ชาย และพี่สาว อันเป็นที่เคารพสูงสุด ตลอดจนคณาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้อันมีคุณค่าแก่ผู้วิจัย

สุธา ไอยราคม

Copyright by Mahidol University

4036864 ENRD/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีการวางแผนสิ่งแวดล้อมเพื่อพัฒนาชนบท ; วท.ม.
( เทคโนโลยีการวางแผนสิ่งแวดล้อมเพื่อพัฒนาชนบท )
คำสำคัญ : แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน / ปุ๋ยหมักกากตะกอน / โรงงานน้ำตาล

สุธา ไอยราคม : ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียในปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล ( EFFICIENCY OF NITROGEN FIXATION BY BACTERIA IN COMPOSTED FILTER SLUDGE FROM SUGAR MILL ) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ สุชาติ นวกวงษ์. วท.ม., อัจฉราพร สังข์เพ็ชร.Ph.D., นาฏสุดา ภูมิจำนงค์. Ph.D. 105 หน้า.
ISBN 974-04-0785-4

การศึกษาครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน 4 สายพันธุ์ คือ *Azotobacter venilandii*, *Beijerinckia indica*, *Azospirillum brasilense*และ *Acetobacter diazotrophicus* ซึ่งได้ทำการวางแผนการทดลองเป็นแบบ Completely Randomized Design ( CRD ) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 Treatment 3 ซ้ำ โดยในการทดลองได้วางแผนการดำเนินการ คือ นำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 4 สายพันธุ์ มาหมักร่วมกันกับปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล เพื่อหาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิด

ผลการวิจัยพบว่า คุณสมบัติทางกายภาพ ของปุ๋ยหมักกากตะกอน ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ pH ตลอดการทดลอง มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 32 องศาเซลเซียส pH 6.5-6.8 ส่วนความชื้น 60 % เป็นระดับความชื้นที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน สำหรับคุณสมบัติทางเคมี พบว่าปุ๋ยหมักกากตะกอนมีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ปุ๋ยหมักกากตะกอนที่เติมเชื้อ *Beijerinckia indica* มีค่าไนโตรเจนสูงกว่าปุ๋ยหมักกากตะกอนที่เติมเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 99 % ส่วนค่าฟอสฟอรัส โพแทสเซียม อินทรียวัตถุ และ C/N ratio เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารอื่นๆ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คุณสมบัติทางชีวภาพ เชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์คือ *Azotobacter venilandii*, *Beijerinckia indica*, *Azospirillum brasilense*และ *Acetobacter diazotrophicus* สามารถเจริญอยู่ได้ในปุ๋ยหมักกากตะกอนโดยเชื้อ *Beijerinckia indica* มีความสามารถในการอยู่รอดและตรึงไนโตรเจนได้มากกว่าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์อื่นๆ จากการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าเชื้อ *Beijerinckia indica* มีความสามารถในการอยู่รอดและตรึงไนโตรเจนได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์อื่นๆ และสามารถที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรได้ในโอกาสต่อไป

Copyright by Mahidol University

4036864 ENRD / M : MAJOR : TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PLANNING FOR RURAL DEVELOPMENT ; M.Sc. ( TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PLANNING FOR RURAL DEVELOPMENT )
KEY WORDS : NITROGEN-FIXING-BACTERIA / FILTER SLUDGE / SUGAR MILL

SUTHA IYARAKOM : EFFICIENCY OF NITROGEN FIXATION BY BACTERIA IN COMPOSTED FILTER SLUDGE FROM A SUGAR MILL. THESIS ADVISORS : SUCHART NAWAGAWONG. M.Sc., ATCHARAPHORN FANGPHET. Ph.D., NARTSUDA PHOOMJAMNONG. Ph.D., 105 p. ISBN 974-04-0785-4

This study was an experimental research using four kinds of bacteria which had nitrogen fixing ability viz : *Azotobacter venilandii*, *Beijerinckia indica*, *Azospirillum brasilense* and *Acetobacter diazotrophicus*. Completely Randomized Design was used to carry out six treatments with three repititions four kinds of nitrogen-fixing bacteria were fermerted with the composted filter sludge from the sugar mill in order to find the efficiency of nitrogen fixation by each kind of bacteria.

The results of the research found that the temperature and pH of the composted filter sludge had slightly changed throughout the treatments. The average temperature was 32 $^{0}$C. Average pH was 6.5-6.8. The humidity was 60 % which was suitable for the growth of nitrogen-fixing-bacteria. After the treatments the composted filter sludge had more nitrogen. The Nitrogen of the composted filter sludge in *Beijerinckia indica* was higher than that of the composted filter sludge in the other kinds of bacteria at a statistically significant levels of 99 %. The value of Phosphorus, Potassium, Organic matter, and C/N ratio had changed slightly. four kinds of Nitrogen- fixing-bacteria did not effect a change in other nutrients and had no statistically significant difference. As for biological properties, four kinds of bacteria,viz : *Azotobacter venilandii*, *Beijerinckia indica*, *Azospirillum barsilense* and *Acetobacter diazotrophicus* could grow in the composted filter sludge. *Beijerinckia indica* had more ability in surviving and fixing nitrogen than other kinds of nitrogen- fixing-bacteria. This study suggests that *Beijerinckia indica* could be utilized for agriculture in the future.

Copyright by Mahidol University

# สารบัญ


หน้า

กิติกรรมประกาศ ค

บทคัดย่อภาษาไทย ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ จ

สารบัญตาราง ซ

สารบัญภาพ ฎ

บทที่

1. บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา..... 1
2. แนวความคิดในการทำการศึกษา..... 3
3. สมมติฐาน..... 5
4. วัตถุประสงค์..... 5
5. ขอบเขตการศึกษา..... 5
6. ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 5
7. สถานที่ทดลอง..... 6

2. การทบทวนวรรณกรรม

1. ลักษณะทั่วไปและผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมน้ำตาล..... 7
2. ไนโตรเจนในดิน..... 13
3. บทบาทของจุลินทรีย์ดิน..... 15
4. ปุ๋ยอินทรีย์..... 22
5. ความสำคัญของอินทรีย์วัตถุต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน..... 23
6. ปุ๋ยชีวภาพ..... 24

3.วิธีการศึกษา

1. อุปกรณ์ในการทดลองและเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน..... 26
2. การหาค่าความสัมพันธุ์ระหว่างปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน..... 29
   กับความขุ่น ( Optical density:OD. ) ของอาหาร
3. การวิเคราะห์คุณสมบัติของปุ๋ยหมักกากตะกอน ( ก่อนการทดลอง )..... 31


Copyright by Mahidol University

# สารบัญ ( ต่อ )

หน้า

4. ขั้นตอนการปฏิบัติการทดลอง..... 32
5. การวางแผนการทดลอง..... 34
6. นับปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน..... 36
7. วิเคราะห์หาสมบัติทางเคมี..... 37
8. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล..... 38
4. ผลการทดลองและอภิปรายผล
1. ค่าความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อกับความขุ่น..... 39
2. คุณสมบัติทางกายภาพ..... 45
3. คุณสมบัติทางเคมี..... 46
4. คุณสมบัติทางชีวภาพ..... 57
5. สรุปและข้อเสนอแนะ
1. สรุปผลการทดลอง..... 63
2. ข้อเสนอแนะจากการวิจัย..... 66
รายการอ้างอิง..... 68
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน..... 71
ภาคผนวก ข สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน..... 78
ภาคผนวก ค ผลการทดลอง..... 81
ภาคผนวก ง สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล..... 88
ประวัติผู้วิจัย 98
Executive Summary 99

Copyright by Mahidol University

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

1. ส่วนประกอบของสารต่างๆ ในอ้อย..... 8
2. ปริมาณผลิตภัณฑ์และผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล โดยใช้อ้อย 100 ตันเป็นวัตถุดิบ..... 9
3. องค์ประกอบของกากตะกอน..... 11
4. องค์ประกอบของกากตะกอนที่ได้จากกระบวนการกรองต่างกัน..... 11
5. กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของกากตะกอน..... 12
6. ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Azotobacter venilandii* กับความขุ่น..... 41
7. ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Beijerinckia indica* กับความขุ่น..... 42
8. ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Azospirillum brasilense* กับความขุ่น..... 43
9. ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* กับความขุ่น..... 44
10. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดหลังการทดลอง..... 46
11. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของไนโตรเจนก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง..... 47
12. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดหลังการทดลอง..... 49
13. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของฟอสฟอรัสก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง..... 50
14. ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดหลังการทดลอง..... 51
15. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของโพแทสเซียมก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง..... 52
16. ปริมาณอินทรีย์วัตถุหลังการทดลอง..... 53
17. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอินทรีย์วัตถุก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง..... 54
18. ปริมาณ C/N ratio หลังการทดลอง..... 55
19. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ C/N ratio ก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง..... 56


Copyright by Mahidol University

# สารบัญตาราง ( ต่อ )


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 20. | แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน..... | 60 |
| 21. | แสดงการเจริญของเชื้อผสม..... | 61 |
| 22. | แสดงอัตราการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย..... | 62 |
| 23 | อุณหภูมิก่อนการทดลอง..... | 81 |
| 24 | อุณหภูมิหลังการทดลอง..... | 81 |
| 25 | ความชื้นก่อนการทดลอง..... | 82 |
| 26 | pH ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง..... | 82 |
| 27 | ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดก่อนการทดลอง..... | 83 |
| 28 | ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดก่อนการทดลอง..... | 84 |
| 29 | ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดก่อนการทดลอง..... | 85 |
| 30 | ปริมาณอินทรีย์วัตถุก่อนการทดลอง..... | 86 |
| 31 | ปริมาณ C/N ratio ก่อนการทดลอง..... | 87 |
| 32 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนในกลุ่มทดลอง..... | 88 |
| 33 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนก่อนการทดลอง..... และหลังการทดลอง | 89 |
| 34 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสในกลุ่มทดลอง..... | 90 |
| 35 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง..... | 91 |
| 36 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณโพแทสเซียมในกลุ่มทดลอง..... | 92 |
| 37 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณโพแทสเซียมก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง..... | 93 |
| 38 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณอินทรีย์วัตถุในกลุ่มทดลอง..... | 94 |
| 39 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณอินทรีย์วัตถุก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง..... | 95 |
| 40 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณ C/N ratio ในกลุ่มทดลอง..... | 96 |


Copyright by Mahidol University

# สารบัญตาราง ( ต่อ )


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 41 | ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณ C/N ratio ก่อนการทดลอง..... และหลังการทดลอง | 97 |


Copyright by Mahidol University

# สารบัญแผนภาพ


แผนภาพที่ หน้า

1. *Azotobacter venilandii*..... 26
2. *Beijerinckia indica*..... 27
3. *Azospirillum brasilense*..... 27
4. *Acetobacter diazotrophicus*..... 28
5. ขั้นตอนการปฏิบัติการทดลอง..... 32
6. แผนการทดลอง..... 35
7. ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Azotobacter venilandii* กับความขุ่น..... 41
8. ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Beijerinckia indica* กับความขุ่น..... 42
9. ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Azospirillum brasilense* กับความขุ่น..... 43
10. ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* กับความขุ่น..... 44
11. แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน..... 60
12. แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (Mixed )..... 61
13. แสดงอัตราการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย..... 62


Copyright by Mahidol University

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

การใช้ที่ดินเพื่อการเพาะปลูกของประเทศไทย ได้เริ่มต้นมาพร้อมๆกับประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคเขตร้อน กล่าวคือ ความต้องการพื้นที่ในการเกษตรกรรม เพื่อสนองความต้องการด้านอาหารและปัจจัยอื่นๆ ของประชากรที่เพิ่มขึ้นทั้งภายใน และต่างประเทศทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมา การขยายตัวของผลผลิตทางการเกษตรเพิ่มมากขึ้น และมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อเศรษฐกิจของประเทศในด้านนำเงินตราเข้าประเทศในฐานะสินค้าส่งออกที่สำคัญ (1)

อ้อยเป็นพืชหลักทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยมีโรงงานน้ำตาลรวมทั้งสิ้น 46 โรงงาน (2) สามารถผลิตน้ำตาลทรายเป็นสินค้าส่งออกมากเป็นอันดับ 4 ของโลกซึ่งทำรายได้ให้กับประเทศปีละหนึ่งหมื่นห้าพันล้านบาท และยังสามารถช่วยให้เกษตรกรมีรายได้เลี้ยงครอบครัว (3) ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลมีการพัฒนาประสิทธิภาพ และขยายกำลังการผลิตอยู่เสมอ (4) ซึ่งจะก่อให้มีวัสดุเหลือใช้จากการผลิตและกระบวนการแปรรูปผลผลิตในทางอุตสาหกรรมไม่ว่าจะอยู่ในรูปของกากวัตถุดิบ กากตะกอน หรือน้ำทิ้งจากการแปรรูป หากมีการจัดการที่ไม่ถูกต้องย่อมก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือผลผลิตจากกระบวนการแปรรูปทางอุตสาหกรรมสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรกรรมได้ เช่นใช้ปรับปรุงคุณภาพดิน เพื่อเพิ่มธาตุอาหารให้กับพืชและเป็นการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินเพื่อเตรียมพร้อมที่จะทำการเกษตรแบบยั่งยืน สำหรับวัสดุเหลือใช้ หรือผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาลมีอยู่ 3 ชนิดด้วยกันคือ กากอ้อย ส่วนใหญ่นิยมใช้ทำกระดาษ กากน้ำตาล (Board) นิยมใช้ผลิตอาหารสัตว์ เพราะในกากน้ำตาลมีวิตามิน B-Complex และกากตะกอน (Filter cake) มีคุณสมบัติที่เหมาะสำหรับใช้ทำปุ๋ยเนื่องจากกากตะกอนอุดมไปด้วยสารอินทรีย์ไนโตรเจน แคลเซียมและฟอสฟอรัส (3)

Copyright by Mahidol University

กากตะกอนจากโรงงานน้ำตาลที่ได้ผ่านขบวนการการทำปุ๋ยหมักแล้วจะได้ปุ๋ยหมักกากตะกอนซึ่งมีประโยชน์ต่อพืช และเป็นการเพิ่มธาตุอาหารให้แก่ดินโดยตรง ถึงแม้จะไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยเคมี แต่จะค่อยๆปลดปล่อยธาตุอาหารต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อพืชในระยะยาว แต่อย่างไรก็ตามธาตุอาหารหลักบางตัวอาจมีอยู่ในปริมาณไม่เพียงพอ โดยเฉพาะธาตุไนโตรเจน ซึ่งในกรณีนี้อาจต้องมีการใช้ปุ๋ยเคมีร่วมด้วย แต่หากมีการใช้ปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะทำให้ดินเสื่อมคุณภาพได้ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าปุ๋ยที่ใช้กันมากที่สุดคือ ปุ๋ยไนโตรเจน เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก แต่ส่วนมากแล้วปริมาณไนโตรเจนในดินมักมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช กรรมวิธีในการผลิตปุ๋ยไนโตรเจนที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นกรรมวิธีที่ต้องใช้พลังงานในการผลิตสูง จึงส่งผลให้ปุ๋ยที่ได้มีราคาแพง ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นหาวิธีเพิ่มไนโตรเจนให้แก่ดิน โดยขบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์

มีจุลินทรีย์ในดินหลายชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ให้ไปอยู่ในรูปของธาตุไนโตรเจนที่มีประโยชน์ต่อพืช ซึ่งขบวนการตรึงไนโตรเจนในเซลล์พืชนี้ ส่วนหนึ่งของธาตุไนโตรเจนได้จากการที่จุลินทรีย์สามารถดูดซับด้วยตัวเอง และปลดปล่อยออกมาในรูป Nitrate เพื่อให้พืชนำไปใช้ได้ และมีบางส่วนจะอยู่ในดิน ดังนั้นถ้าดินมีจุลินทรีย์กลุ่มนี้อยู่ก็จะสามารถเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจนได้ทุกๆปี จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะมีเอนไซม์ไนโตรจิเนส สามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้กลายเป็นกรดอะมิโน และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆให้พืชนำไปใช้ได้ (5) แหล่งสะสมไนโตรเจนที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกษตรคือ ดิน น้ำ และบรรยากาศ มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของไนโตรเจนกลับไปมาตลอดเวลาเป็นวงจรไนโตรเจน ซึ่งการที่สามารถนำไนโตรเจนจากอากาศกลับลงสู่ดินได้มากเพียงใด ก็ย่อมมีประโยชน์ต่อการเกษตรมากเท่านั้น (6)

ได้มีผู้ประเมินไว้ว่าวงจรของไนโตรเจนที่มีการหมุนเวียนอยู่ในธรรมชาติมีประมาณ 400 ล้านตันต่อปี ซึ่งการสูญเสียจะเกิดจากขบวนการ Denitrification ประมาณ 215 ล้านตัน จากการเผาไหม้และการระเหยประมาณ 185 ล้านตัน ขณะที่ธาตุไนโตรเจนจะได้กลับมาในลักษณะของน้ำฝน น้ำค้าง และอื่นๆ ประมาณ 200 ล้านตัน จากการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพประมาณ 170 ล้านตัน และจากโรงงานอุตสาหกรรม 30 ล้านตัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพซึ่งเกิดขึ้นได้โดยการกระทำของ จุลินทรีย์ดินสามารถนำธาตุไนโตรเจนกลับมาใช้ได้ประมาณ 170 ล้านตันต่อปี ซึ่งถ้าหากนำมาใช้ในการเกษตรก็จะสามารถทดแทนการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนได้ส่วนหนึ่ง ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าปัจจัยที่สำคัญมากประการหนึ่งในการช่วยพัฒนาการเกษตรอย่างยั่งยืน คือการใช้

Copyright by Mahidol University

วิธีการทางชีวภาพ การใช้จุลินทรีย์ในการปรับปรุงคุณภาพดินเพื่อการเกษตร นับเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มผลผลิตพืชได้ ซึ่งนับเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ในระบบการพัฒนาที่ยั่งยืน (5)

## 2. แนวความคิดในการทำการศึกษา

ปัจจุบันมีการนำผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล คือกากตะกอนมาผลิตเป็นปุ๋ยหมัก ซึ่งเป็นการนำเอาของเสียกลับมาใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อการเกษตร และยังเป็นการช่วยกันรักษาสภาพแวดล้อมอีกด้วย

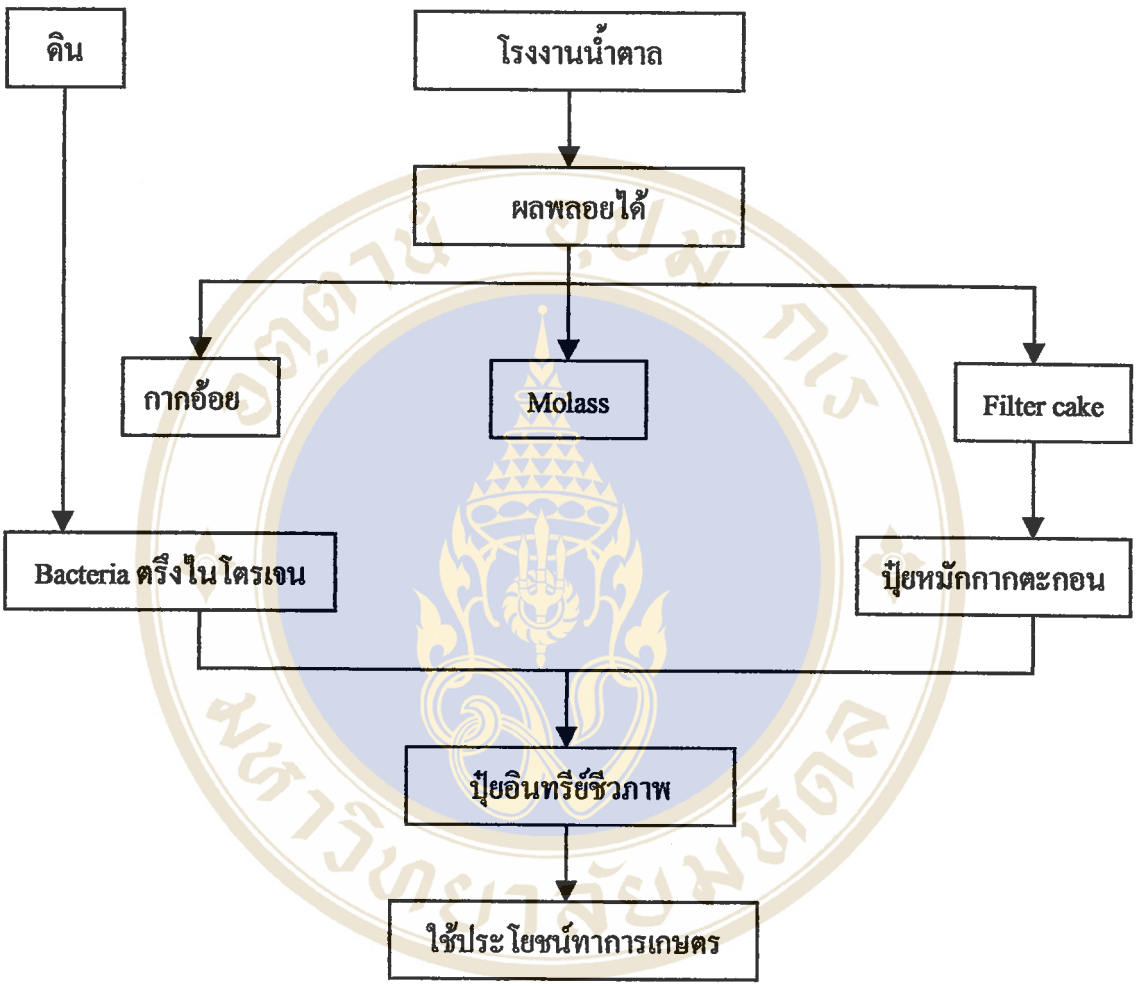
การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อนำวัสดุที่เหลือใช้ หรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตของโรงงานน้ำตาลมาทำเป็นปุ๋ย วัสดุเหลือใช้ที่นำมาศึกษา คือกากตะกอน (Filter cake) ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการผลิตน้ำตาลประมาณ 6 % ของน้ำหนักอ้อย ในแต่ละปีจะมีกากตะกอนเหล่านี้มากมาย จากผลการวิเคราะห์กากตะกอนที่ได้จากกระบวนการ Carbonation พบว่ามีไนโตรเจน 0.69 %, ฟอสฟอรัส 0.28 %, โพแทสเซียม 0.23 % นอกจากนี้ยังมีแคลเซียม และแมกนีเซียมในปริมาณที่สูงซึ่งเหมาะที่จะใช้กับดินที่มีสภาพเป็นกรด ส่วนกากตะกอนที่ได้จากกระบวนการ Defecation นั้นมีธาตุปุ๋ยสูงกว่าพวกแรก คือมีไนโตรเจน 1.77 %, ฟอสฟอรัส 0.69% และโพแทสเซียม 0.52 % (7)

ปุ๋ยหมักที่ใส่ลงในดินมีปริมาณอินทรีย์วัตถุสูง จะช่วยปรับปรุงคุณภาพของดินให้ดีขึ้นและยังช่วยเพิ่มธาตุอาหารให้แก่ดินโดยตรงถึงแม้จะไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยเคมี (8) ในการทำการเกษตรในปัจจุบันมีการใช้ปุ๋ยเคมีร่วมกับการใช้ปุ๋ยอินทรีย์บางครั้งหากมีการใช้ในอัตราส่วนที่ไม่เหมาะสม หรือใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะส่งผลทำให้แร่ธาตุและคุณสมบัติของดินเสื่อมลง

ดังนั้นหากมีการนำจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนมาใช้ร่วมกับปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาลเพื่อใช้เป็นสารพาหะของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนก็จะเป็นการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ซึ่งนับเป็นการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า และยั่งยืน ลดค่าใช้จ่ายในการใช้ปุ๋ยเคมี ยาฆ่าแมลง และยังสามารถกำจัดโรคได้ทางอ้อมอีกด้วย เนื่องจากดินมีความอุดมสมบูรณ์ ต้นพืชก็จะเจริญงอกงามแข็งแรง มีความต้านทานต่อโรคและแมลงส่งผลให้ผลิตผลทางด้านการเกษตรเพิ่มขึ้น

Copyright by Mahidol University

## กรอบแนวความคิด




Copyright by Mahidol University

**3. สมมติฐาน**

ปุ๋ยหมักกากตะกอนสามารถเป็นพาหะของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจน

**4. วัตถุประสงค์**

4.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ในปุ๋ยหมักกากตะกอนของโรงงานน้ำตาล

4.2 เพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณและความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแต่ละชนิด เมื่อผสมร่วมกันกับปุ๋ยหมักกากตะกอนของโรงงานน้ำตาล

4.3 เพื่อนำเอาปุ๋ยหมักกากตะกอนของโรงงานน้ำตาลมาเพิ่มค่าโดยทำเป็นสารพาหะของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน

**5. ขอบเขตการศึกษา**

5.1 ปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาลที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นำมาจากโรงงานบริษัทแผ่นดินทอง

5.2 ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนได้สูง 4 ตระกูล ได้แก่

5.2.1 *Azotobacter venilandii*

5.2.2 *Beijerinckia indica*

5.2.3 *Azospirillum brasilense*

5.2.4 *Acetobacter diazotrophicus*

**6. ผลที่คาดว่าจะได้รับ**

ได้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพที่เพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย และสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์แก่การเกษตรและเพื่อการเกษตรแบบยั่งยืน

Copyright by Mahidol University

## 7. สถานที่ทดลอง

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร



Copyright by Mahidol University

# บทที่ 2
# ทบทวนวรรณกรรม

## 1. ลักษณะทั่วไปและผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมน้ำตาล

1.1 ลักษณะทั่วไปของส่วนประกอบต่างๆของอ้อย

อ้อยเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จำพวกหญ้าที่อยู่ในสกุล (Genus) Saccharum ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับข้าวฟ่าง ข้าวโพด และหญ้าจอห์นสัน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum Officinarum* ชอบอากาศร้อน แสงแดดจัดและชุ่มชื้น นิยมปลูกกันระหว่างเส้นรุ้งที่ 35 องศาเหนือและใต้ในประเทศไทย สามารถปลูกได้ทุกภาคยกเว้นภาคใต้ การปลูกและขยายพันธุ์ทำโดยใช้ท่อนพันธุ์ การปลูกอ้อยมี 2 ลักษณะ คือ การปลูกอ้อยต้นฤดูฝน จะปลูกระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงกรกฎาคม และการปลูกอ้อยปลายฝน หรืออ้อยข้ามแล้ง (ปลูกระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์) (3) อ้อยประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นสารละลายซึ่งหมายถึงน้ำอ้อยสมบูรณ์ (Absolutejuice) และส่วนที่ไม่ละลาย เช่นกากอ้อย เส้นใยต่างๆ น้ำอ้อยจะอยู่ในส่วนลำต้นซึ่งมีน้ำตาลอยู่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 20 เปอร์เซ็นต์จะอยู่ในส่วนเปลือกและข้อปล้อง นอกจากนี้อ้อยยังประกอบไปด้วยสารอื่นๆอีก ดังแสดงในตารางที่ 1

อ้อยที่ปลูกในประเทศไทยแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1.1.1 อ้อยชนิดเปลือกแข็ง จะใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล

1.1.2 อ้อยชนิดเปลือกอ่อน (อ้อยคั้น)

อ้อยชนิดเปลือกอ่อนจะใช้ในการขบเคี้ยว หรือหีบด้วยลูกเหล็กหีบ บรรจุขายเพื่อจำหน่ายเป็นน้ำอ้อย (3)

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารต่างๆในอ้อย

| ส่วนประกอบ | ปริมาณ(%) |
|---|---|
| น้ำ | 69-75 |
| ซูโครส | 8-16 |
| น้ำตาลรีดิวซ์ (เด็กซ์โตรสและเลบวูโลส) | 0.5-2.0 |
| สารอินทรีย์ ( ได้แก่ โปรตีน, กรดอินทรีย์, เพนโตซาน, เพ็คติน, สารเกิดสี, ขี้ผึ้ง เป็นต้น ) | |
| กรดอนินทรีย์เชิงประกอบ ( ได้แก่ ฟอสเฟต, คลอไรด์, ซัลเฟต, ไนเตรท, โซเดียม, โปแตสเซียม, แคลเซียม เป็นต้น ) | 0.2-6.0 |
| สารประกอบไนโตรเจน (ได้แก่ กรดอะมิโน, แอมโมเนีย, อะมิด, อัลบูมินอยส์ เป็นต้น | 0.5-1.0 |
| เถ้า | 0.3-1.0 |
| ใยกากอ้อย (ไฟเบอร์) | 10-16 |

ที่มา : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2541

การสกัดน้ำตาลจากอ้อยมี 2วิธี คือ

1. การสกัดน้ำอ้อยโดยใช้ลูกหีบ 4-6 ชุดๆละ 3 ลูกกลิ้ง จำนวน 1-2 แถว หมายถึง การใช้แรงกดบนลูกหีบ

2. การสกัดน้ำอ้อยโดยใช้ทั้งเครื่องกล และเทคนิคทางชีวภาพ หมายถึง การใช้ลูกหีบและการดูดซึม หรือที่เรียกว่า Diffusion ร่วมกัน

1.2 ผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมน้ำตาล

ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อยนอกจากจะได้น้ำตาลแล้วยังได้ผลิตผลพลอยได้หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

Copyright by Mahidol University

ซึ่งถ้าแบ่งเป็นกลุ่มตามขั้นตอนการผลิตจะแบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ

ส่วนที่หนึ่ง เป็นส่วนที่ได้จากการเก็บเกี่ยวได้แก่ ยอดใบ และขยุยของอ้อย

ส่วนที่สอง เป็นส่วนที่ได้มาในระหว่างกระบวนการผลิต ได้แก่ กากอ้อย, กากน้ำตาลสุดท้าย และกากตะกอน

ตารางที่ 2 ปริมาณผลิตภัณฑ์ และผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลโดยใช้อ้อย 100 ตัน เป็นวัตถุดิบ

| ผลิตภัณฑ์และผลพลอยได้ | ปริมาณ (ตัน)* | ปริมาณ (ตัน)** |
|---|---|---|
| น้ำตาล (Recovera ble sugar) | 12.0 | 11-12 |
| กากอ้อย (ความชื้น 50 %) | 27.5 | 25-30 |
| กากน้ำตาลสุดท้าย (88 ° Brix) | 3.4 | 5 |
| ขี้ตะกอน (ความชื้น 77%) | 3.4 | - |
| ใบสีเขียว | 7.8 | - |
| ใบแห้ง | 6.9 | - |
| ยอดอ้อย | 6.9 | - |

หมายเหตุ * GEPLACEA/UNDP,Cited in Silverio (1991)

** สำรวจจากประเทศไทย

ที่มา : สถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2541

ผลพลอยได้ในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาล ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

1. กากอ้อย เป็นส่วนเส้นใยของลำต้นอ้อย ที่ได้หลังจากผ่านการบีบคั้นสกัดน้ำออกแล้ว ประกอบด้วยน้ำเส้นใย และรังสีที่ละลายได้จำนวนเล็กน้อย ส่วนใหญ่กากอ้อยที่ได้จะนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เยื่อใย เช่น กระดาษ และ Board ชนิดต่างๆ ตลอดจนใช้เป็นเชื้อเพลิงได้อีกด้วย

Copyright by Mahidol University

2. กากน้ำตาล เป็นของเหลวสุดท้ายที่ได้จากการผลิตน้ำตาลโดยการตกตะกอนซ้ำๆ หลายครั้ง มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลปนดำ แยกออกจากผลึกน้ำได้ โดยวิธีต่างๆ เช่น แยกด้วยหม้อปั่นในขั้นสุดท้ายและไม่นำกลับไปผลิตน้ำตาลอีก

กากน้ำตาลนอกจากจะเป็นสินค้าส่งออกของประเทศแล้วยังมีการนำกากน้ำตาลมาผลิตเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์โดยเฉพาะเป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงลูกวัวและแกะ เพราะในกากน้ำตาลจะมีวิตามิน B Complex ที่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งในลูกวัวและแกะไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินเองได้

นอกจากนั้นกากน้ำตาลยังมีธาตุอาหารรองซึ่งจำเป็นต่อการมีสุขภาพดีของสัตว์ และยังมีพวก Lodine, Copper, Manganese และ Zinc ในปริมาณที่เท่ากับที่พบในหญ้าแห้ง ยกเว้น Cobalt (ประมาณ 0.6 PPM) ซึ่งมีปริมาณเป็น 7 เท่า ของในหญ้าแห้ง ดังนั้นการเติมกากน้ำตาลลงในอาหารสัตว์จึงเป็นวิธีการรักษาสัตว์ที่เป็นโรค ที่เกิดจากการขาด Cobalt และเนื่องจากในกากน้ำตาลยังมี Potassium ซึ่งมีผลในการระบาย แต่ถ้ามีในปริมาณสูงจะมีผลกระทบต่อระบบการย่อยอาหารได้ นอกจากนี้กากน้ำตาลยังมีรสชาดดี ช่วยปรับปรุงคุณสมบัติการเกาะตัวเมื่อผ่านกรรมวิธีการทำแห้งก็จะเป็นพาหนะในการนำยูเรีย และกรดฟอสฟอริคในอาหารสัตว์ที่เป็นของเหลว

3. กากตะกอน ในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายสิ่งเจือปนต่างๆ ที่อยู่ในน้ำอ้อยเมื่อผ่านความร้อนผสมด้วยปูนขาว หรือฟอกด้วย $SO_2$ หรือ $CO_2$ หลังจากการทำให้ตกตะกอนแล้วจะถูกแยกออกโดยการกรอง เกิดการรวมตัวเป็นก้อน เรียกว่ากากตะกอน กากตะกอนเหล่านี้มีความชื้นแตกต่างกันไป และส่วนใหญ่จะเป็น anion ที่ได้จากกระบวนการทำใส (Defecation) การกรองในโรงงานทั่วไป จะใช้เครื่อง Rotary Vacuum filter โดยใช้ผงละเอียดของกากอ้อยเป็นตัวช่วยกรอง (Filter Aids) กากตะกอนที่ได้จากเครื่องจะมีความชื้นประมาณ 80% ปริมาณ และองค์ประกอบกากตะกอนขึ้นอยู่กับ สถานที่ปลูกพันธุ์อ้อย ประสิทธิภาพการกรอง และวิธีการทำใสฯ ดังแสดงในตารางที่ 3 ตารางที่ 4 และตารางที่ 5 (3)

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกากตะกอน

| ส่วนประกอบ | ช่วงโดยทั่วไป ( %โดยน้ำหนักแห้ง ) |
|---|---|
| ขี้ผึ้ง และไขมัน | 5-14 |
| เยื่อใย | 15-30 |
| น้ำตาล | 5-15 |
| โปรตีน (Nx6.25) | 5-15 |
| เถ้าทั้งหมด | 9-20 |
| $SiO_2$ | 4-10 |
| CaO | 1-4 |
| $P_2O_5$ | 1-3 |
| MgO | 0.5-1.5 |

ที่มา : Paturau (1982)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของกากตะกอนที่ได้จากกระบวนการกรองต่างกัน

| %โดยน้ำหนักเปียก | Vacum Filter ( % ) | Filter press ( % ) |
|---|---|---|
| ซูโครส | 2.1 | 7.3 |
| ความชื้น | 78.2 | 60.4 |
| ขี้ผึ้ง | 2.0 | 2.1 |
| ไขมัน | 1.6 | 1.8 |
| ไนโตรเจน | 0.4 | 0.7 |
| $P_2O_5$ | 0.4 | 0.7 |
| $K_2O$ | 0.02 | 0.02 |
| CaO | 0.8 | 1.1 |
| เยื่อใย | 4.3 | 6.5 |

ที่มา : Paturau (1982

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 5 กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของกากตะกอน
(หน่วย % N กรดอะมิโนใน N โปรตีนทั้งหมด)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Aspartic acid | 4.4 | Iso-leucine | 2.1 |
| Threonine | 2.8 | Leucine | 3.6 |
| Serine | 3.4 | Tyrosine | 0.6 |
| Glutamic acid | 3.7 | Phenylalanine | 1.3 |
| Proline | 2.7 | Tryptophan | 1.2 |
| Glycine | 7.2 | Histidine | 2.2 |
| Alanine | 5.8 | Lysine | 2.1 |
| Valine | 3.5 | Arginine | 2.9 |
| Methionine | 0.5 | | |

ที่มา : Paturau (1982)

นอกจากนี้ยังพบว่า สารใดก็ตามที่เป็นแหล่งฟอสเฟตและมีปริมาณไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (ประมาณ1%) จะทำให้อ้อยเจริญเติบโตดี กากตะกอนที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย มีฟอสเฟตและโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะเป็นแหล่งที่ดีในการให้ Humic Substance แก่อ้อย นอกจากนี้ยังพบว่ากากตะกอนที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล สามารถเก็บความชื้นและปรับสภาพดินได้อย่างดีอีกด้วย (3)

(9) ศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้ของอุตสาหกรรมน้ำตาล ซึ่งพบว่ากากตะกอนที่ได้จากอุตหกรรมน้ำตาล และ Vinasse ที่ได้จากการกลั่นแอลกอฮอล์เป็นผลผลิตที่มีสารอินทรีย์ในปริมาณสูงโดยที่กากตะกอนมีส่วนผสมของฟอสเฟตในปริมาณสูง Vinasse มีส่วนประกอบของโพแทสเซียม แคลเซียมสูง สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยในการปรับปรุงดินให้มีประสิทธิภาพ

(10) ได้ทำการศึกษาและพบว่าเมื่อใช้กากตะกอนน้ำตาลใส่ลงในดินจะเป็นการเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ ธาตุฟอสฟอรัส แคลเซียมให้แก่ดิน และทำให้ดินมี pH เพิ่มขึ้น ได้ผลผลิตอ้อยในการเก็บเกี่ยวแต่ละครั้งเพิ่มขึ้น

Copyright by Mahidol University

(11) ได้ทดลองใส่ Triple superphosphate (TPS) และกากตะกอนลงในดินในเขตเพาะปลูกพืชที่เมือง Faisalabad ประเทศปากีสถานพบว่า TPS จะเพิ่มฟอสฟอรัสให้กับดินในช่วงการเพาะปลูกแรกและครั้งที่สอง แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปประสิทธิภาพของ TPS จะลดลง ในขณะที่กากตะกอนจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นตามเวลา ดังนั้นในช่วงการเพาะปลูกครั้งที่สามและครั้งที่สี่กากตะกอนจะมีประสิทธิภาพมากกว่า TPS อันเนื่องมาจากสารอาหาร และสารอินทรีย์ต่างๆ ที่มีอยู่ในกากตะกอน

กากตะกอนสามารถใช้เพิ่มประสิทธิภาพของดินในบริเวณที่ปลูกอ้อยได้ซึ่งจากการศึกษาของ (12) ใช้กากตะกอนพ่นลงบนดินจะช่วยลดความเค็มของดิน เพิ่มความชุ่มชื้นให้กับดินและทำให้ดินมีความร่วนซุย ทำให้ผลผลิตอ้อยในเขตดีขึ้น

(13) ได้ทดลองใส่กากตะกอนลงในดินเหนียวที่อุ้มน้ำ 50 % และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 75 วัน พบว่ากากตะกอนจะเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้กับดินในช่วง 45 วันแรก หลังจากนั้นฟอสฟอรัสจะลดลงในขณะที่ไนโตรเจนยังคงที่ นอกจากนี้การใช้กากตะกอนในปริมาณที่สูงจะช่วยเพิ่มปริมาณสังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณสังกะสีจะลดลง ในขณะที่ปริมาณทองแดงจะเพิ่มมากขึ้นให้กับดิน

(14) ได้ทำการศึกษาพบว่าเมื่อใส่กากตะกอนในปริมาณ 50 และ 100 ตัน ต่อเฮกตาร์ลงในดิน (Plastic dark Soil) จะทำให้ลักษณะทางกายภาพของดินดีขึ้น กล่าวคือทำให้ดินร่วนซุย น้ำอากาศ สามารถผ่านได้สะดวก ทำให้เกิดผลดีต่อการปลูกพืชในบริเวณนั้น

## 2. ไนโตรเจนในดิน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มของธาตุอาหารหลัก ซึ่งพืชต้องการใช้ในปริมาณค่อนข้างสูง และต้องการตลอดระยะของการเจริญเติบโตของพืช ในการปลูกพืชโดยทั่วไปแล้วมักต้องมีการใส่ไนโตรเจนเพิ่มเติมลงไปในดินในรูปของปุ๋ยเสมอ ธาตุไนโตรเจนที่มีอยู่ในธรรมชาติส่วนใหญ่อยู่ใน รูปที่ไม่เป็นประโยชน์โดยตรงสำหรับพืช ทั้งนี้จะต้องถูกทำให้เปลี่ยนมาอยู่ในรูปอนุมูลไนเตรท ($NO^-_3$) หรือ อนุมูลแอมโมเนียม ($NH^+_4$) เสียก่อนพืชถึงใช้ประโยชน์ได้

Copyright by Mahidol University

2.1 แหล่งที่มาของไนโตรเจนในดิน

2.1.1 ได้มาจากก๊าซไนโตรเจน ($N_2$) ที่เป็นองค์ประกอบ ของอากาศในดินโดยผ่านทางกระบวนการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ และสิ่งที่มีชีวิตชนิดต่างๆ ในดิน (Biological Nitrogen Fixation)

2.1.2 ได้มาจากก๊าซไนโตรเจน ($N_2$)ในบรรยากาศที่ถูกอ๊อกซิไดท (Oxidation) แล้วละลายมากับน้ำฝน หรือหิมะลงมากับพื้นดิน

2.1.3 ได้มาจากปุ๋ยที่ใส่ลงไปในดินโดยเฉพาะปุ๋ยเคมีที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้ $N_2$ เป็นวัตถุดิบ

2.2 ไนโตรเจนที่ได้รับจากการใส่ลงไปในรูปของปุ๋ย

ดินที่ใช้เพาะปลูกโดยส่วนใหญ่แล้วมักจะมีธาตุไนโตรเจนไม่พอเพียงที่จะให้ประโยชน์แก่พืช (15) เนื่องจากธาตุไนโตรเจนสามารถสูญเสียจากดินได้โดยธรรมชาติ และโดยขบวนการ Denitrifi cation ของจุลินทรีย์บางชนิดซึ่งจะทำให้ธาตุไนโตรเจนในดิน สูญเสียไปในสภาพที่เป็นก๊าซ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมธาตุไนโตรเจนให้แก่ดินในลักษณะของการใส่ปุ๋ยเคมี หรือโดยการใส่จุลินทรีย์ดินที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ (5)

จากการผลิตอ้อย ธาตุอาหารนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุไนโตรเจนนับว่าเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการเพิ่มผลผลิตอ้อย เนื่องจากไนโตรเจนช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีนในเซลล์ (16) จากการศึกษาพบว่าปริมาณอ้อย 20 ตัน จะดูดธาตุไนโตรเจนจากดินไปใช้ 16 ถึง 22 กิโลกรัม (17)

(18) ได้ทำการศึกษาพบว่าปัจจุบันเกษตรกรชาวไร่อ้อยร้อยละ 95 นิยมใส่ปุ๋ยเคมีบำรุงดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุไนโตรเจน ซึ่งแหล่งที่สำคัญของไนโตรเจน (ร้อยละ 78 ) อยู่ในรูปก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศ

2.3 กิจกรรมการให้ธาตุไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์

มีจุลินทรีย์ในดินหลายชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นธาตุไนโตรเจนที่มีประโยชน์กับพืช โดยกระบวนการตรึงไนโตรเจนในเซลล์พืช ส่วนหนึ่งของธาตุไนโตรเจนจากการที่ จุลินทรีย์สามารถดูดซับธาตุไนโตรเจนด้วยตนเอง อีกส่วนหนึ่งจะปลดปล่อยไปในรูป Nitrate

Copyright by Mahidol University

เพื่อให้พืชนำไปใช้ได้ และส่วนหนึ่งจะอยู่ในดิน ดังนั้นถ้าดินมีจุลินทรีย์กลุ่มนี้อยู่ก็จะสามารถเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจนได้ทุกๆปี จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะมีเอนไซม์ไนโตรจิเนส สามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้กลายเป็นกรดอะมิโน และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ให้พืชนำไปใช้ได้ จุลินทรีย์พวกที่ตรึงไนโตรเจนได้นี้ จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ พวกที่ต้องอาศัยร่วมกับพืชจึงจะตรึงไนโตรเจนได้ และพวกที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เองโดยอยู่อย่างอิสระ (5)

**3. บทบาทของจุลินทรีย์ในดิน**

บทบาทของจุลินทรีย์ในดินที่สำคัญคือการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินจนกลายเป็นฮิวมัสและทำให้ดินมีสีดำ ฮิวมัสมีความสำคัญดังนี้

1. เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของพืชและจุลินทรีย์
2. ทำให้ดินมีคุณภาพดีขึ้น เหมาะสำหรับการเพาะปลูก
3. ทำหน้าที่เป็น buffer ทำให้ pH ของดินเปลี่ยนแปลงไปอย่างช้าๆ
4. ช่วยให้ดินอุ้มน้ำได้มากขึ้น
5. ช่วยเพิ่มแร่ธาตุต่างๆ ในดินจนเหมาะต่อการเจริญเติบโตของพืช

การย่อยสลายและการเปลี่ยนแปลงของอินทรีย์สารต่างๆโดยจุลินทรีย์จะทำให้ได้สารประกอบ อนินทรีย์ต่างๆ เช่น กำมะถัน ฟอสเฟต แคลเซียม เป็นต้น สำหรับวัฏจักรของสารในดินที่สำคัญได้แก่ วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรคาร์บอนและวัฏจักรกำมะถัน

วัฏจักรไนโตรเจนที่สำคัญได้แก่

Nitrogen fixation เป็นการนำก๊าซไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนแปลงให้เป็นสารประกอบของไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม ได้แก่ จุลินทรีย์ที่อยู่อิสระในดิน และจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับพืชชั้นสูง จุลินทรีย์อิสระ Azotobacter จะมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดีที่สุด

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินนั้นมีอยู่ 6 พวกใหญ่ๆ คือ แบคทีเรียแอคตีโนมายซีส ราสาหร่าย โปรโตซัวและไวรัส ซึ่งการแบ่งจุลินทรีย์ของดินนั้น นักวิทยาศาสตร์ได้แบ่งตามความต้องการ ธาตุอาหาร อากาศ สภาพแวดล้อมต่างๆ ฯลฯ ซึ่งทำให้มีการแบ่งจุลินทรีย์ออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ Autochthonous เป็นจุลินทรีย์พวกที่ได้รับธาตุอาหารจากดินโดยตรงโดยเฉพาะ

Copyright by Mahidol University

อินทรีย์วัตถุที่มีอยู่ในดินทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ตลอดเวลา ส่วนกลุ่มที่สองคือ Zymogenous เป็นพวกจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อสิ่งแปลกปลอมที่เพิ่มขึ้นในดิน ทำให้ปริมาณของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแต่ปริมาณจะลดลงถ้าสิ่งแปลกปลอมที่มีอยู่ในดินนั้นลดลงโดยทั่วไปจุลินทรีย์พวกนี้จะมีปริมาณน้อยมากในดิน (19)

3.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์ และสิ่งที่มีชีวิตในดิน

กระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจน ($N_2$) ที่เป็นองค์ประกอบของอากาศที่อยู่ในช่องว่างของดินโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และไนโตรเจนส่วนดังกล่าว จะเป็นประโยชน์ต่อพืชในภายหลัง ซึ่งกระบวนการนี้แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

3.1.1 กระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจนโดยอาศัยอยู่ร่วมกันกับรากพืชตระกูลถั่ว ซึ่งเป็นขบวนการที่เป็นกิจกรรมร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ดิน และพืชโดยที่จุลินทรีย์จะได้รับสารประกอบอินทรีย์พวกคาร์โบไฮเดรตจากถั่วที่มันอาศัยร่วมอยู่ และสามารถตรึงเอาก๊าซไนโตรเจนจากอากาศในดินมาใช้เป็นประโยชน์ได้ จุลินทรีย์ดังกล่าวได้แก่แบคทีเรียใน Genus Rhizobium

3.1.2 กระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจน โดยสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่อย่างเป็นอิสระในดิน แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

3.1.2.1 แบคทีเรีย (Bacteria ) ซึ่ง มี 2 ประเภท

1. ประเภทที่ชอบสภาพของดินที่มีถ่ายเทอากาศดี ดินมีปริมาณออกซิเจนพอเพียงที่สำคัญได้แก่ *Azotobacter* ,*Beijerrinckia*

2. ประเภทที่ชอบสภาพของดินที่มีการถ่ายเทอากาศไม่ดี และขาดออกซิเจนที่สำคัญได้ แก่ *Pseudomonus* ,*Azospirillum*

3.1.2.2 ราบางประเภท (Some Soil Fungi)

3.1.2.3 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae) และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (15)

3.2 ชนิดของ Bacteria อิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่สำคัญสำหรับชีวิตซึ่งเป็นองค์ประกอบ Nucleic acid โปรตีน สิ่งมีชีวิตทั้งหลายจะไม่เจริญเติบโตเมื่อขาดธาตุไนโตรเจนที่อยู่ในรูปที่จะสามารถนำไปใช้ได้ ในอากาศ น้ำทะเล และในดินมีธาตุไนโตรเจนในรูปของแก๊สอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่สามารถจะนำไปใช้ได้ ในธรรมชาติแก๊สไนโตรเจนในอากาศถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้บ้าง เช่น โดยขบวนการทางกายภาพ ฟ้าแลบ และฝน โดยขบวนการทางเคมี

Copyright by Mahidol University

เช่น เกิดจากภูเขาไฟ หรือหมอก ควัน ซึ่งมนุษย์ทำขึ้น และโดยขบวนการทางชีวภาพโดยขบวนการนี้จะเกิดขึ้นถึง 170 ล้านตัน และในจำนวนนี้ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นจากการเกษตรถึง 89 ล้านตัน และเป็นการเกิดโดยไม่ใช่พืชตระกูลถั่วและหญ้าถึง 54 ล้านตัน

จุลินทรีย์อิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนสามารถแบ่งออกตามความต้องการออกซิเจนได้ 3 กลุ่ม คือ

3.2.1 กลุ่มที่ต้องการออกซิเจน ได้แก่ Family Azotobacteraceae

3.2.2 กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนต่ำซึ่งได้แก่ Family Bacillaceae,Enterobacteriaceae และ Spirillaceae

3.2.3 กลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน ได้แก่ Family Bacillaceae_ได้แก่ Genus *Clostridium*, Family Spirillaceae ได้แก่ Genus *Desulfovibrio* และ *Desulfomaculum*

3.3 จุลินทรีย์อิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงที่ส่วนใหญ่นำมาใช้ในด้านการค้นคว้าเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และระบบการพัฒนาการเกษตรอย่างยั่งยืนที่สำคัญ คือ

3.3.1 *Azotobacter*_เป็นแบคทีเรียทีมีลักษณะรูปเซลล์แบบกลมรี รูปร่างสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม และอายุเซลล์อยู่กันเป็นคู่ๆ หรือกลุ่มก้อน ย้อมสีไม่ติดแกรมลบ ไม่สร้าง สปอร์ แต่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เซลล์สร้างผนังหนา *Azotobacter* ใช้คาร์โบไฮเดรทในรูปสารประกอบอินทรีย์ เป็นแหล่งอาหาร และพลังงาน สามารถพบได้ในดินทั่วไป ตั้งแต่เขตหนาว อากาศอบอุ่น ไปจนถึงเขตที่มีอากาศร้อน

3.3.1.1 ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพอิสระโดยเฉลี่ยประมาณ 10 มิลลิกรัม ไนโตรเจนจากแก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศต่อการใช้คาร์โบไฮเดรท 1 กรัม ซึ่งได้ทำการศึกษาพบว่า *Azotobacter* ที่คัดเลือกจากบริเวณรากอ้อย สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 480-1210 N Mole $C_2H_4$/Mg Protein/วัน อัตราการตรึงไนโตรเจนมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และพบว่าเชื้อ *Azotobacter* ที่แยกได้จากบริเวณรากข้าวโพดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 0.015-79.464 N mole $C_2H_4$ /$10^9$ Cell/ วัน (5)

3.3.1.2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับเชื้อ *Azotobacter*

1. ความเป็นกรด เป็นด่าง สภาพความเป็นกรดเป็นด่างของดินที่ *Azotobacter* เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.9-9.0 แต่การตรึงไนโตรเจนจะเกิดได้ในสภาพดินเป็นกลาง คือ

Copyright by Mahidol University

PH 5.5-7.2 (20) ดินที่มีสภาพเป็นกรดยับยั้งการเพิ่มจำนวน และกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน แก้ไขได้โดยการเติมปูนขาว เพื่อลดความเป็นกรด ซึ่งจะช่วยเพิ่มการตรึงไนโตรเจนได้ (21)

2. ออกซิเจน *Azotobacter* ต้องการออกซิเจนในการหายใจ แม้ว่าออกซิเจนจะเป็นสิ่งยับยั้งกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน แต่ถ้าในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำกว่าบรรยากาศจะทำให้กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสูง *Azotobacter* จะหยุดการเจริญเติบโตเมื่อมีออกซิเจนสูง เพราะออกซิเจนยับยั้งการตรึงไนโตรเจน *Azotobacter* ได้พัฒนาการหายใจโดยใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งก่อให้เกิดสารที่มีพลังงานสูง (ATP) สำหรับการดำรงชีวิตของ *Azotobacter* อีกด้วย การสร้างเมือก (Slime) ซึ่งเป็นสารประกอบ Poly soccharide ล้อมรอบเซลล์หรือโคโลนี ทำให้ออกซิเจนผ่านเข้าได้น้อยจนไม่รบกวนกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ทั้งทำให้ออกซิเจนเหมาะสมกับกระบวนการตรึงไนโตรเจน (5)

3. อินทรีย์วัตถุนอกจากจะได้จากสาร ที่รากพืชขึ้นออกมาแล้วยังอาจได้จากการเติมสารอินทรีย์วัตถุให้แก่ดิน เช่นน้ำตาล ฟองข้าว เป็นต้น (20) การเพิ่มอินทรีย์วัตถุเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนจึงทำให้ *Azotobacter* ตรึงไนโตรเจนมากขึ้นและยังเป็นการทำให้ C/N ratio สูงขึ้นทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมกับการตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter*

4. อนินทรีย์วัตถุในดิน เช่น ธาตุแคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน เหล็ก และโมลิบดินัม จำเป็นต่อกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter* โดยเฉพาะเหล็กและโมลิบดินัมซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

5. สารประกอบไนโตรเจน *Azotobacter* ใช้ไนโตรเจนได้ทั้งรูปแก๊ส และสารประกอบไนโตรเจน อย่างไรก็ตามสารประกอบไนโตรเจนบางครั้งก็มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต และการตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter* เช่น เมื่อใส่ปุ๋ย ไนโตรเจน ปริมาณของ *Azotobacter* จะเพิ่มมากขึ้น และเมื่อสารประกอบไนโตรเจนลดลง กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนก็จะพัฒนาขึ้น ทำให้อัตราการตรึงไนโตรเจนในระยะนี้สูงมาก (5)

6. อุณหภูมิ *Azotobacter*เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส *Azotobacter* มีความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าอุณหภูมิสูงโดยสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ แต่การตรึงไนโตรเจนจะลดลงที่อุณหภูมิใกล้ 0 องศาเซลเซียสจะมีผลทำให้ไนโตรจีเนสไม่ทำงานทั้งนี้เนื่องมาจาก Fe Protein ไม่ทำงาน (22)

7. ความชื้น ความชื้นที่เหมาะสมกับเชื้อ *Azotobacter* คือ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ของความสามารถในการหุ้มน้ำของดิน เพราะทำให้เชื้อสามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนได้ยิ่งขึ้น และเหมาะต่อการเจริญเติบโต การตรึงไนโตเจนของ *Azotobacter* (23)

Copyright by Mahidol University

3.3.1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Azotobacter* กับพืช

เชื้อ *Azotobacter* โดยทั่วไปแล้วเจริญอยู่บริเวณรากพืชโดยรากพืชจะปล่อยสารอินทรีย์ออกไปสู่ดินบริเวณรอบๆรากพืช ทำให้ *Azotobacter* ได้รับสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจน พืชต่างชนิดก็มีผลในการตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter* บริเวณรากพืชต่างกันในหญ้า Paspalumnotatum มีเชื้อ *Azotobacter paspali* อาศัยอยู่บริเวณราก (24)

(25) รายงานว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 15-93 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ต่อปี ซึ่งปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้นี้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของหญ้าตลอดฤดูกาลเก็บเกี่ยวแม้ไม่มีการใส่ปุ๋ยเลย รายงานเกี่ยวกับปริมาณตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter* มีการทดลองในรัสเซีย และประเทศอื่นในยุโรปพบว่าผลผลิตของข้าวชนิดต่าง ๆ บีท มันฝรั่ง กะหล่ำปลี มะเขือเทศ แครอท สูงขึ้นเมื่อมีการใส่เชื้อ *Azotobacter* (26) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการคลุกเชื้อ *Azotobacter* ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจนในระดับต่างๆกัน (0,30,60,90 ก.ก. ต่อเอกตาร์) กับข้าวฟ่างเป็นระยะเวลาติดต่อกันระยะเวลา 3 ปี ผลการทดลองปรากฏว่าเชื้อ *Azotobacter* ทำให้การเจริญเติบโตของต้นข้างฟ่าง และผลผลิตเพิ่มขึ้นทั้ง 3 ปี อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาเกี่ยวกับการใส่เชื้อ *Azotobacter* นั้นบางครั้งอาจพบว่าการตอบสนองต่อเชื้อมีน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีเชื้อในปริมาณไม่มากพอ ในประเทศไทยได้ทำการทดลองใช้เชื้อ *Azotobacter* ร่วมกับการปลูกข้าวโพด พบว่าช่วยให้ข้าวโพดเจริญเติบโตดีกว่าไม่ใส่เชื้อ ทั้งสภาพในกระถางทดลองและในสภาพแปลงทดลอง จากการทดลองใช้เชื้อร่วมกับการปลูกข้างฟ่าง และข้าว พบว่าช่วยเพิ่มผลผลิตของข้าวฟ่าง และข้าว (5)

3.3.2 *Beijerinckia* เป็นแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน เมื่อมีออกซิเจนสำหรับหายใจ มีขนาดเซลล์เล็กกว่า *Azotobacter* สามารถเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด บางครั้ง pH ของดินต่ำถึง 3 *Beijerinckia* ก็ยังสามารถเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้ (27) *Beijerinckia* เป็นแบคทีเรียอิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนที่มีรูปร่างกลม และกลมรี หรือแท่งสั้น ๆ เซลล์อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือคู่ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยแฟลเจลลัม เซลล์ย้อมสีติดแกรมลบเมื่อเจริญผลอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ปราศจากไนโตรเจนทุกสายพันธ์เจริญได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Glucose, Fructose และ Sucrose เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มี Peptone เป็นแหล่งคาร์บอน *Beijerinckia* พบได้ในดินเขตร้อน และร้อนชื้นมากกว่าเขตอบอุ่นหรือเขตหนาว

3.3.2.1 ศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของ *Beijerinckia* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 16 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อการใช้น้ำตาลกลูโคส 1 กรัม จากการศึกษา

Copyright by Mahidol University

ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Beijerinckia* ซึ่งรวบรวมจากบริเวณรากอ้อยของประเทศไทย พบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 228 - 1102 NMole $C_2H_4$ / mg Protein / วัน (5)

3.3.2.2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับเชื้อ *Beijerinckia*

1. ความเป็นกรดเป็นด่าง เมื่อ *Beijerinckia* เจริญในอาหารจะทำให้อาหารเป็นกรด เนื่องจากเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ และกรด Actic จากกระบวนการหายใจ จากการศึกษารายงานว่า *Beijerinckia* สามารถเจริญได้ในสภาพเป็นกรด PH 3-10 และสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงที่ pH 4.5

2. ออกซิเจน เชื้อ *Beijerinckia* ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสูงในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำกว่าอากาศ

3. อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส *Beijerinckia* สามารถจะทนต่ออุณหภูมิต่ำได้แม้ว่าจะเก็บในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 3-4 เดือน

3.3.2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Beijerinckia* กับพืช เชื้อ *Beijerinckia* อาศัยอยู่บริเวณรากอ้อย และพบว่าในดินที่ไม่เคยปลูกอ้อยมาก่อน เมื่อปลูกอ้อยแล้วจะมีเชื้อ *Beijerinckia* เพิ่มขึ้น 20-30 เท่า และเมื่อตัดอ้อยแล้ว 2 เดือน พบว่าเชื้อ *Beijerinckia* จะลดลงเป็นจำนวนมาก จากการพบเชื้อ *Beijerinckia* ร่วมกับปุ๋ยยูเรีย อัตรา 40 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ ทำให้ผลผลิตของข้าวเพิ่มมากกว่าใช้เชื้อยูเรีย 40 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์อย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อคลุกเชื้อ *Beijerinckia* ให้แก่ต้นหอม ทำให้น้ำหนักแห้ง และปริมาณธาตุไนโตรเจนในต้นหอมเพิ่มมากขึ้น (24)

3.3.3 *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช และอาศัยอยู่กับรากพืช โดยเฉพาะพืชตระกูลหญ้า เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย ข้าวสาลี และหญ้าชนิดต่าง ๆ ในเขตร้อน การที่จะพบมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ออกซิเจน ความชื้น ความเป็นกรดเป็นด่าง อินทรีย์สารอุณหภูมิ กับชนิดของจุลินทรีย์อื่น โดยทั่วไปแล้วจะพบ Azospirillum ในเขตร้อนมากกว่าในเขตอบอุ่น

3.3.3.1 ศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน ศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของ *Azospirillum* แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด และแหล่งคาร์บอน เช่น *Azospirillum Iipoferum* ตรึงไนโตรเจนได้ 20-50 มิลลิกรัม ไนโตรเจนกรัมกลูโคส *Azospirillum Brasilense* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 262-1018 N Mole C2H4 /Mg Protein /วัน

Copyright by Mahidol University

3.3.3.2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับเชื้อ *Azospirillum*

1. อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ *Azospirillum* อยู่ระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส

2. ความเป็นกรดเป็นด่าง *Azospirillum* สามารถเติบโตได้เร็วที่ pH 5-7 เชื้อ *Azospirillum* จะตายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Molate เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งทำให้อาหารเป็นด่าง

3. ออกซิเจน *Azospirillum* เจริญในอาหารกึ่งเหลวที่มี Molate เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจะเจริญในอาหารลึก 1-3 มิลลิเมตร แสดงว่าเชื้อต้องการออกซิเจนน้อยกว่าปกติ แม้ว่าจะยังไม่ทราบปริมาณความต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการหายใจ แต่ออกซิเจนที่ 0.0005-0.0075 ของความดันบรรยากาศช่วยให้การตรึงไนโตรเจนได้สูง

4. แหล่งอินทรีย์คาร์บอนสารอินทรีย์ที่รากพืชขับออกมา เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อ *Azospirillum* การที่เชื้อเข้าไปอยู่ในท่อน้ำ ท่ออาหารของรากพืช ทำให้เชื้อได้รับ Photosynthates เชื้อใช้ Sucorse เป็นอาหาร ไม่ได้แต่กระบวนการทางชีวเคมีของรากพืชจะเปลี่ยน Surcose ให้เป็นสารอินทรีย์อื่นที่เหมาะสมกับเชื้อ *Azospirillum* ได้

3.3.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Azospirillum* กับพืช เชื้อ *Azospirillum lipoferum* มักจะอาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชที่มีการสังเคราะห์แสงแบบ C-4 เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และหญ้าที่ขึ้นอยู่ในเขตร้อนทั่วๆ ไปยกเว้น อ้อย ซึ่งพบว่า *Azospirillum brasilense* ได้อาศัยร่วมกับรากอย่างมาก จากการศึกษาพบว่าการคลุกเชื้อ Azospirillum ให้แก่ข้าวโพดหวาน และ Setaria italica ซึ่งปลูกในทรายนึ่งฆ่าเชื้อ และปราศจาก ไนโตรเจน ในสภาพเรือนเพาะชำนั้นมีผลทำให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของต้นและใบ ตลอดจนไนโตรเจนทั้งหมดในต้นพืชที่ตรึงไนโตรเจนได้มีปริมาณมากกว่าไม่คลุกเชื้อ Purushothaman and Govindarajan (1986) รายงานว่าปริมาณเชื้อ *Azospirillum* ในบริเวณ Rhizosphere และ Rhizoplane มีค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระตัวอื่น โดยที่เชื้อจะมีปริมาณสูงสุดในช่วงแตกกอ และออกดอก เชื้อเหล่านี้ส่วนใหญ่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนระหว่าง 3 ถึง 24.8 มิลลิกรัมไนโตรเจน ต่อกรัมของกรด Malic หรือเท่ากับ 50-540 N moles ของ Acetylene Reduction Activity (ARA) จากรายงานพบว่าเมื่อจุ่มรากของต้นกล้าข้าวอายุ 15 วันลงไปในสารละลายเชื้อ *Azospirillum* แล้ว เชื้อ *Azospirillum* จะอาศัยอยู่ตรงส่วนที่เรียกว่า Mucilaginoussheath รอบๆรากผลอ่อน และจะพบเชื้อเจริญอยู่ตรงบริเวณดังกล่าวเต็ม

Copyright by Mahidol University

ภายหลังการคลุกเชื้อเพียง 30 นาที แหล่งเกาะอาศัยของเชื้อ *Azospirillum* กับรากขนอ่อนข้างนั้น จะมีตั้งแต่ส่วนปลายรากของรากขนอ่อนจนมาถึงส่วนโคนของราก (5)

3.4 ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยอินทรีย์คือปุ๋ยที่ได้จากวัสดุพวกเศษพืชซากสัตว์ มูลสัตว์ต่างๆ ตลอดจนวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม และจุลินทรีย์ดินบางชนิด ซึ่งปุ๋ยอินทรีย์นี้ยังสามารถแบ่งออกตามผลพลอยได้จากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน

3.4.1 ปุ๋ยจากผลพลอยได้ของโรงงานอุตสาหกรรม คือปุ๋ยที่ได้จากผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กากเบียร์ กากน้ำตาล กากตะกอน กากผงชูรส เป็นต้น ซึ่งวัสดุผลพลอยได้เหล่านี้ สามารถเพิ่มธาตุอาหารพืชเมื่อใส่ลงในดิน และนอกจากนี้สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทยได้ผลิตปุ๋ยชนิดหนึ่งจากเชื้อจุลินทรีย์ดินพวก Azotobacter ซึ่งจุลินทรีย์ที่ผลิตปุ๋ยชนิดนี้สามารถตรึงไนโตรเจน และยังสามารถปลดปล่อยสารกระตุ้นบางอย่างสำหรับการเจริญเติบโตของพืช วิธีการผลิตปุ๋ยชนิดนี้ คือนำเชื้อ Azotobacter ผสมกับหิน ฟอสเฟต และฮิวมัสโดยผ่านกระบวนการต่างๆ จนสามารถผลิตเป็นปุ๋ยได้ เรียกปุ๋ยชนิดว่า ปุ๋ยไนโตรเรีย จึงนับได้ว่าเป็นแหล่งปุ๋ยไนโตรเจนที่สามารถนำมาใช้ทดแทนปุ๋ยเคมีได้เป็นอย่างดี

3.4.2 ประโยชน์ของปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยอินทรีย์จัดได้ว่าเป็นปุ๋ยที่มีประโยชน์และมีความสำคัญต่อประเทศชาติ ทั้งทางด้านการเกษตร เศรษฐกิจ และการแก้ปัญหาสภาพสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี ซึ่งสามารถจะรวบรวม และสรุปเป็นข้อๆ ได้ดังนี้ คือ

3.4.2.1 ช่วยเพิ่มปริมาณอินทรีย์วัตถุให้แก่ดินได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะดินในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

3.4.2.2 ช่วยรักษาสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดิน เพิ่มปริมาณธาตุอาหาร เช่นไนโตรเจน

3.4.2.3 ช่วยในการปรับปรุงโครงสร้างของดินให้เหมาะสมต่อการเพาะปลูก ทำให้ดินร่วนซุยขึ้น

3.4.2.4 ช่วยให้การเตรียมดิน การไถพรวนดินง่ายขึ้น และรักษาความชุ่มชื้น

3.4.2.5 ช่วยเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ต่อการเกษตรมากขึ้น

Copyright by Mahidol University

3.4.2.6 ช่วยทำให้เกษตรกรได้รู้จักการนำวัสดุเหลือใช้ กลับมาใช้ให้เป็นประโยชน์

3.4.2.7 สามารถใช้เป็นอาหารของปลาบางชนิดได้

3.4.2.8 ช่วยลดต้นทุน สำหรับปัจจัยในการผลิตได้อีกทางหนึ่ง

3.4.2.9 ช่วยรักษาความสะอาด และลดมลพิษให้กับประเทศชาติได้เป็นอย่างดี (19)

3.5 ความสำคัญของอินทรีย์วัตถุ ต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน อินทรีย์วัตถุนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อคุณสมบัติของดินทั้งคุณสมบัติทางกายภาพทางเคมี และทางชีวภาพของดิน โดยเฉพาะธาตุอาหารของพืชซึ่งจะถูกปลดปล่อยออกมาสะสมอยู่ในดิน หลังจากอินทรีย์วัตถุ เช่น ซากพืช ซากสัตว์ สิ่งปฏิกูลต่างๆสลายตัวโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์และการสลายตัวของปุ๋ยเคมีที่ใส่ลงไปในดินซึ่งสลายตัวออกมาเป็นน้ำตาลกรดอินทรีย์ ไขมัน โปรตีน สารเยื่อใยต่างๆ และธาตุอาหารพืช ธาตุอาหารพืชชนิดที่เป็นประจุบวกจะถูกดูดซับโดยสารอินทรีย์วัตถุที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้ ซึ่งประจุบวกจะถูกแลกเปลี่ยนหรือทดแทนที่โดยประจุบวกด้วยกันเอง อีกประการหนึ่งอินทรีย์วัตถุที่มีคุณสมบัติเป็นกรด หรือด่างซึ่งเกิดขึ้นจาก คาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกปลดปล่อยออกมา เมื่ออินทรีย์วัตถุสลายตัวยังช่วยละลายธาตุอาหารบางอย่างให้เป็นประโยชน์ต่อพืชอีกด้วย

แนวโน้มในการนำอินทรีย์วัตถุเหลือใช้มาทำเป็นปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีนั้นเริ่มมีบทบาทสำคัญมากขึ้น นับตั้งแต่ประเทศไทยมีความตระหนักถึงปัญหาการตกค้างของสารเคมีในดิน และปัญหาสิ่งแวดล้อมอื่นๆ รวมถึงการสร้างแนวความคิดในการทำการเกษตรแบบยั่งยืน อินทรีย์วัตถุเหลือใช้หลายชนิดมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นปุ๋ยได้โดยเป็นแหล่งคาร์บอนและธาตุอาหารให้แก่พืช มีปลดปล่อยธาตุอาหารอย่างช้าๆ ทำให้พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ซึ่งต่างจากปุ๋ยเคมี นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของดินให้ดีขึ้นด้วย กล่าวคือ ช่วยทำให้ดินร่วนซุย และอุ้มน้ำได้ซึ่งจะมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน (28) (29) กล่าวว่า ปุ๋ยอินทรีย์เป็นแหล่งธาตุอาหารประจุลบ คือไนเตรท ฟอสเฟต ซัลเฟต โมลิบเดต และคลอไรด์ ซึ่งจะช่วยดูดซับธาตุอาหารพืชที่มีประจุบวกไว้ให้พืชได้ใช้มากขึ้นไม่ให้ถูกชะล้างไปได้ง่ายๆ นอกจากนั้นยังช่วยทำให้ดินมีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลง pH ของดินได้มากขึ้น อินทรีย์วัตถุมีความสามารถในการป้องกันการตกตะกอนของฟอสเฟต เหล็ก และอลูมินัม ช่วยให้ฟอสเฟตแตกตัวเป็นประโยชน์ต่อพืชมากขึ้น โดยปกติปุ๋ยอินทรีย์วัตถุที่ยังไม่ได้ปรุงแต่งด้วยปุ๋ยเคมีนั้นจะมีธาตุอาหารต่ำมาก ดังนั้นการใช้ปุ๋ยอินทรีย์เพื่อเพิ่มธาตุอาหารโดยตรงต้องใช้ปริมาณมากด้วยเหตุนี้

Copyright by Mahidol University

ควรเน้นการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก เพื่อปรับปรุงโครงสร้างของดินให้เอื้ออำนวยต่อการใช้ประโยชน์ของธาตุอาหารต่างๆในดิน

จากการศึกษาที่ผ่านมา สามารถยืนยันถึงประโยชน์ของอินทรีย์วัตถุเหลือใช้ในแง่ปุ๋ยได้ดังนี้ (30) ได้ทดลองใช้กากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานน้ำอัดลม ฮิวมัสจากโรงงานผงชูรส และกากละหุ่งร่วมกับปุ๋ยเคมี เพื่อปลูกผักกาดขาวปลีในชุดดินราชบุรี สรุปว่าอินทรีย์วัตถุเหลือใช้สามารถนำมาเป็นปุ๋ยอินทรียได้ แต่ความสามารถในการทดแทนปุ๋นเคมีนั้นเปลี่ยนแปลงไปตามปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนและความยากง่ายของการสลายตัวของอินทรีย์วัตถุ ซึ่งในการพิจารณาเลือกใช้อินทรีย์วัสดุเหลือใช้เหล่านี้ร่วมกับปุ๋ยเคมี จำเป็นต้องมีการศึกษาอัตราการใส่ที่เหมาะสมก่อน

(31)ได้นำเอากากตะกอนอ้อยจากโรงงานน้ำตาล กากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานสุราและโรงงานเบียร์ โดยมีไนโตรเจนในอัตรา 200 ppm. มาใช้เป็นปุ๋ยข้าวพบว่ากากตะกอนอ้อย และกากตะกอนสามารถทำให้ผลผลิตข้าวใกล้เคียงกัน

3.6 ปุ๋ยชีวภาพ

ปุ๋ยชีวภาพ หมายถึง วัสดุ หรือผลิตภัณฑ์ ที่มีเชื้อจุลินทรีย์เป็นตัวออกฤทธิ์ในการก่อให้เกิดปฏิกริยาเพื่อการทำให้พืชได้รับธาตุอาหารที่ต้องการ (31) หรือ เรียกว่าปุ๋ยจุลินทรีย์ คือการนำเอาจุลินทรีย์มาใช้ปรับปรุงดินทางชีวภาพ ทางกายภาพ ทางเคมีชีวะ และการย่อยสลายสารอินทรีย์ตลอดจนการปลดปล่อยธาตุอาหารจากพืช จากอินทรีย์วัตถุ และหรือจากอินทรีย์วัตถุ หรือจากจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้กระตุ้นการเจริญเติบโต หรือเพิ่มความต้านทานโรคของพืช ซึ่งจากความหมายของคำว่า ปุ๋ยชีวภาพจะเห็นว่าในดินทั่วๆ ไป ถ้ามีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อยู่แล้วก็หมายความว่าในดินชนิดนั้นๆ จะมีปุ๋ยชีวภาพอยู่บ้างแล้วในปริมาณต่างๆกัน ดินที่มีลักษณะทางชีวภาพที่ดีจึงหมายถึงดินที่ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีประโยชน์ในการปรับปรุงสภาพดิน และสามารถเป็นประโยชน์ในการเพิ่มการเจริญเติบโตให้กับพืชได้

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการทำปุ๋ยชีวภาพ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1. กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ จะเป็นจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดขบวนการทางชีววิทยาในดินที่สามารถจะตรึงแก๊สไนโตรเจนจากอากาศ และมีเอนไซม์ที่จะเปลี่ยนจากสภาพแก๊สให้เป็นปุ๋ยไนโตรเจนให้พืชนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการเพิ่มการเจริญเติบโต และผลผลิต

Copyright by Mahidol University

ได้จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ได้แบ่งออกเป็น 2 พวกคือ พวกที่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกับพืชจึงสามรถตรึงไนโตรเจนได้ จุลินทรีย์พวกนี้ ได้แก่ ไรโซเบียม สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และพวกที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เองโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยอยู่ร่วมกับพืชใดๆ จุลินทรีย์พวกนี้มีชื่อเรียกว่าจุลินทรีย์อิสระ ได้แก่ *Azotobacter* , *Beijerinckia* และ *Azospirillum* เป็นต้น

2. กลุ่มที่ช่วยให้พืชได้รับธาตุอาหารอื่นๆ นอกเหนือไปจากธาตุไนโตรเจน จุลินทรีย์พวกนี้ได้แก่ ไมโคลไรซ่า จุลินทรีย์ย่อยหินฟอสเฟต เป็นต้น (5)

Copyright by Mahidol University

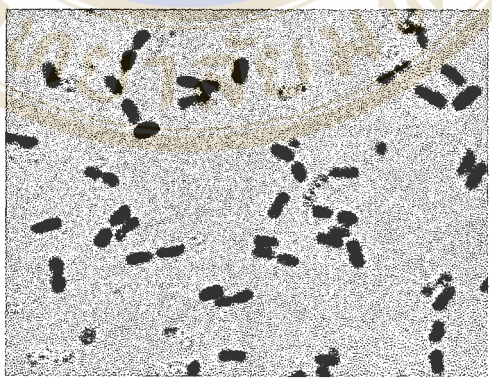
# บทที่ 3
# วิธีการศึกษา

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้วางแผนการดำเนินการวิจัยไว้ดังนี้ คือ นำปุ๋ยหมักกากตะกอนที่ได้จากโรงงานน้ำตาล มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี และธาตุอาหาร จากนั้นนำปุ๋ยหมักกากตะกอนมาผสมกับเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้จะมีอยู่ 4 ตระกูล คือ *Azotobacter, Beijerinckia, Azospirilum*และ *Acetobacter* ทำการหมักรวมกันเป็นเวลา 3 เดือน เสร็จแล้วนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

## 1. อุปกรณ์ในการทดลองและเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

1.1 เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ได้จากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร 4 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ดังนี้

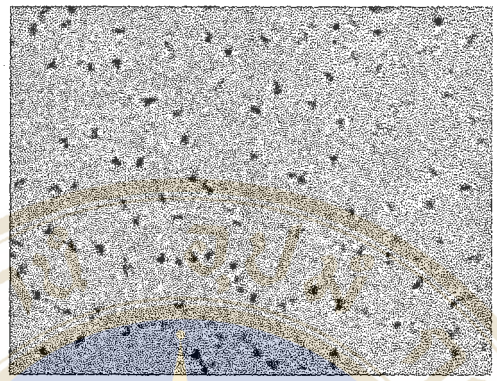
1.1.1 *Azotobacter venilandii* ซึ่งมีรูปร่าง ลักษณะเซลล์ และโคโลนี ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 *Azotobacter venilandii*

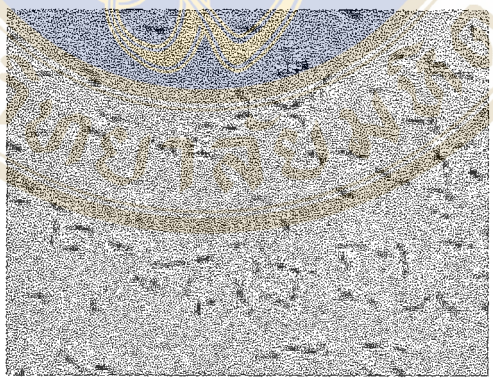
Copyright by Mahidol University

1.1.2 *Beijerinckia indica* ซึ่งมีรูปร่าง ลักษณะเซลล์ และโคโลนี ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 *Beijerinckia indica*

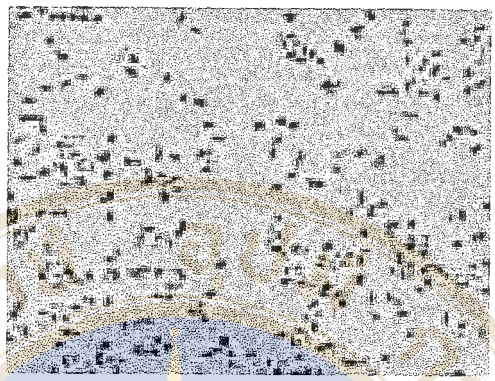
1.1.3 *Azospirillum brasilense* ซึ่งมีรูปร่าง ลักษณะเซลล์ และโคโลนี ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 *Azospirillum brasilense*

Copyright by Mahidol University

1.1.4 *Acetobacter diazotrophicus* ซึ่งมีรูปร่างลักษณะเซลล์และโคโลนี ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 *Acetobacter diazotrophicus*

1.2 สารเคมีและเครื่องแก้วในการวิเคราะห์ทางเคมี

1.3 ถังพลาสติกสำหรับหมักเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับกากตะกอนหมักจากโรงงานน้ำตาล

1.4 ปุ๋ยหมักกากตะกอนบริษัทแผ่นดินทอง

1.5 เครื่อง Spectrophotometer

1.6 เครื่องวัด Gas chromatograph

1.7 เครื่องวิเคราะห์ Nitrogen

1.8 microwave

1.9 Incubator

1.10 Autocave

1.11 pH Meter

1.12 Shaker

1.13 Vortex Genie-2

1.14 ตู้ฆ่าเชื้อ

1.15 เครื่องชั่ง

1.16 กล้องจุลทรรศน์

1.17 ตู้เย็น

Copyright by Mahidol University

**2 การหาค่าความสัมพันธุ์ระหว่างปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับความขุ่น ( Optical density : OD ) ของอาหาร**

โดยเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter venilandii*, *Beijerinckia indica*, *Azospirilum* brasilense และ *Acetobacter diazotrophicus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ แต่ละสายพันธุ์ เก็บตัวอย่างเมื่อ 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 144, 216, 228 ชั่วโมง จนกว่าปริมาณเชื้อเริ่มลดลง นำมาวัดค่าความขุ่นและนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนดังกล่าว ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธี Dilution plate count.

2.1 การวัดอัตราการเจริญของแบคทีเรีย มี 2 วิธีคือ

2.1.1 การหา Optical density ( OD ) โดยนำเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ได้จากการ Streak plate ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตุดูลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ว่ามีลักษณะเซลล์สมบูรณ์หรือไม่ หากสมบูรณ์ก็จะนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว โดยนำลวดเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้แดงและปล่อยให้เย็นในอากาศ หลังจากนั้นนำลวดเขี่ยเชื้อมาแตะที่โคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เสร็จแล้วก็นำลวดเขี่ยเชื้อมาจุ่มในอาหารเหลวที่ปริมาตร 25 มล. ใน Flask ขนาด 250 มล. บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า ( Shager ) ที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที โดยติดตามการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทุกๆ 6 ชั่วโมง ทำการวัดความขุ่น ( Optical density ) ที่ความยาวช่วงคลื่น 600 nm.

2.1.2 ทำ Dilution plate count (32) การนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตวิธีหนึ่ง ที่ใช้เทคนิคการทำให้เชื้อหรือตัวอย่างเจือจางลง (dilution ) ด้วยน้ำหรือน้ำเกลือ 0.85% ( normal saline ) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและทราบปริมาตรที่แน่นอน ( dilution blank ) แต่ที่ดีที่สุดคือ Ringer solution ( 0.1% peptone water ) การทำให้เชื้อเจือจาง ก็เพื่อให้มีการเจริญของโคโลนีเดี่ยวๆของจุลินทรีย์จำนวนที่เหมาะสม ซึ่งความเจือจางที่เหมาะสม ควรเป็นความเจือจางที่มีโคโลนีของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หรือ colony forming unit ( CFU ) โดยปกติจะทำให้เจือจางเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่าเป็นลำดับ ( ten fold serial dilution ) เพื่อให้ง่ายต่อการปฏิบัติ และการคำนวนจำนวนโคโลนีต่อหน่วยนับ ( กรัมหรือมล. )

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างวัสดุ หรือผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone glucose yeast extract agar ( TGY ) หรือที่เรียกว่า plate count agar ( PCA )

Copyright by Mahidol University

3. จานเพาะเชื้อ

4. water blank บรรจุขวดละ 90 มล.

5. ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อ

วิธีปฏิบัติ

การทำความเจือจางของวัสดุหรือเชื้อที่จะตรวจนับ

1. ชั่งวัสดุ 10 กรัม ใส่ลงใน water blank 90 มล. จะได้ความเจือจาง = 1:10 เขย่าให้เข้ากันดี ประมาณ 25 ครั้ง

2. ใช้ปิเปตดูดเชื้อที่ทำให้เจือจาง 1:10 เพื่อทำความเจือจางที่จะนำมาใช้ กรณีการนับจำนวนแบคทีเรียมักใช้ความเจือจาง $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$ ตามลำดับโดยปฏิบัติดังนี้

2.1 ดูดเชื้อที่ความเจือจาง 1:10 จำนวน 1 มล. ใส่ลงใน water blank 9 มล. จะได้ความเจือจางเท่ากับ $1:10^2$ เขย่าให้เข้ากันดี

2.2 ดูดเชื้อที่ความเจือจาง $1:10^2$ จำนวน 1 มล. ใส่ลงใน water blank 9 มล. จะเท่ากับความเจือจาง $1:10^3$

2.3 ดูดเชื้อที่ความเจือจาง $1:10^3$ จำนวน 1 มล. ใส่ลงใน water blank 9 มล. เท่ากับความเจือจาง $1:10^4$

2.4 ดูดเชื้อที่ความเจือจาง $1:10^4$ จำนวน 1 มล. ใส่ลงใน water blank 9 มล. เท่ากับความเจือจาง $1:10^5$

2.5 ในกรณีที่มีอุปกรณ์ไม่เพียงพอ อาจเตรียมเพียง 2 ระดับความเจือจาง ได้แก่ $1:10^3$ และ $1:10^5$ ( 2.1 และ 2.3 )

การเทอาหารใส่ Plate พร้อมเชื้อ

1. หลอมอาหาร TGY แล้ววางไว้ให้เย็นลงประมาณ 45 องศาเซลเซียม

2. ดูดเชื้อที่ความเจือจาง $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$ ความเจือจางละ 1 มล. ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ 2 จานหรือดูดเชื้อที่มีความเจือจาง $1:10^3$ ปริมาณ 0.1 มล. ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ 2 จาน

3. ที่ระดับความเจือจาง $1:10^5$ ปริมาณ 1 มล. จำนวน 2 จาน และปริมาณ 0.1 มล. อีก 2 จาน ซึ่งจะเป็นระดับความเจือจางที่ตรวจนับ $1:10^4$, $1:10^5$ และ $1:10^6$ ตามลำดับ

4. เทอาหารจากข้อ 1. ลงในจานเพาะเชื้อทั้งหมดในข้อ 2. แล้วหมุนจานตามเข็มนาฬิกา 5 รอบ ทวนเข็มนาฬิกา 5 รอบ เคลื่อนจานขึ้นลง 5 เที่ยว และเคลื่อนจานไปซ้าย ขวา อีก 5 เที่ยว ( shake plate ) เพื่อให้เชื้อผสมและกระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ วางไว้จนอาหารเย็นและวุ้นแข็งตัว

Copyright by Mahidol University

5. นำไปบ่มโดยการกลับด้านล่างจานเพาะเชื้อไว้ข้างบน (สำหรับแบคทีเรีย) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-7 วัน

การตรวจผล

1. การนับจำนวนโคโลนี ให้เลือกชุดจานเพาะเชื้อ ที่มีจำนวนโคโลนีเจริญอยู่ประมาณ 30-300 โคโลนี จากความเจือจางเดียว ถ้าทำ 2 จาน ( duplicate ) ในแต่ละความเจือจาง ให้รวมจำนวนโคโลนี ของทั้ง 2 จาน แล้วหารด้วย 2 จะเท่ากับจำนวนเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้ต่อ 1 ความเจือจางต่อจาน

2. คำนวณจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่างวัสดุ 1กรัม หรือ 1มิลลิลิตร ได้ดังนี้

สมมุติว่า จำนวนเฉลี่ยของโคโลนีบักเตรีเท่ากับ 99.9 โคโลนี นับได้จากความเจือจาง $1 : 10^5$

ดังนั้น จำนวนโคโลนีต่อตัวอย่างวัสดุ 1กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร คำนวณ ได้ดังนี้

ตัวอย่าง วัสดุ $1 / 10^5$ กรัม นับแบคทีเรียได้ $= 99.9$ โคโลนี

วัสดุ 1 กรัม นับแบคทีเรียได้ $= 99.9 \times 10^5 / 1$ โคโลนี

$= 9.99 \times 10^6$

3. บันทึกผลลงในรายงาน

**3. การวิเคราะห์คุณสมบัติของปุ๋ยหมักกากตะกอน (ก่อนการทดลอง)**

นำปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาลไปวิเคราะห์หาสมบัติทางเคมีดังนี้

วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติของปุ๋ยหมักกากตะกอน (33) แสดงในภาคผนวก ก

3.1 pH ( ปุ๋ยหมัก : น้ำ = 1 : 2 )

3.2 ความชื้น ( Moisture )

3.3 ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ( Organic matter , O.M. )

3.4 วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน

3.5 วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส

3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียม

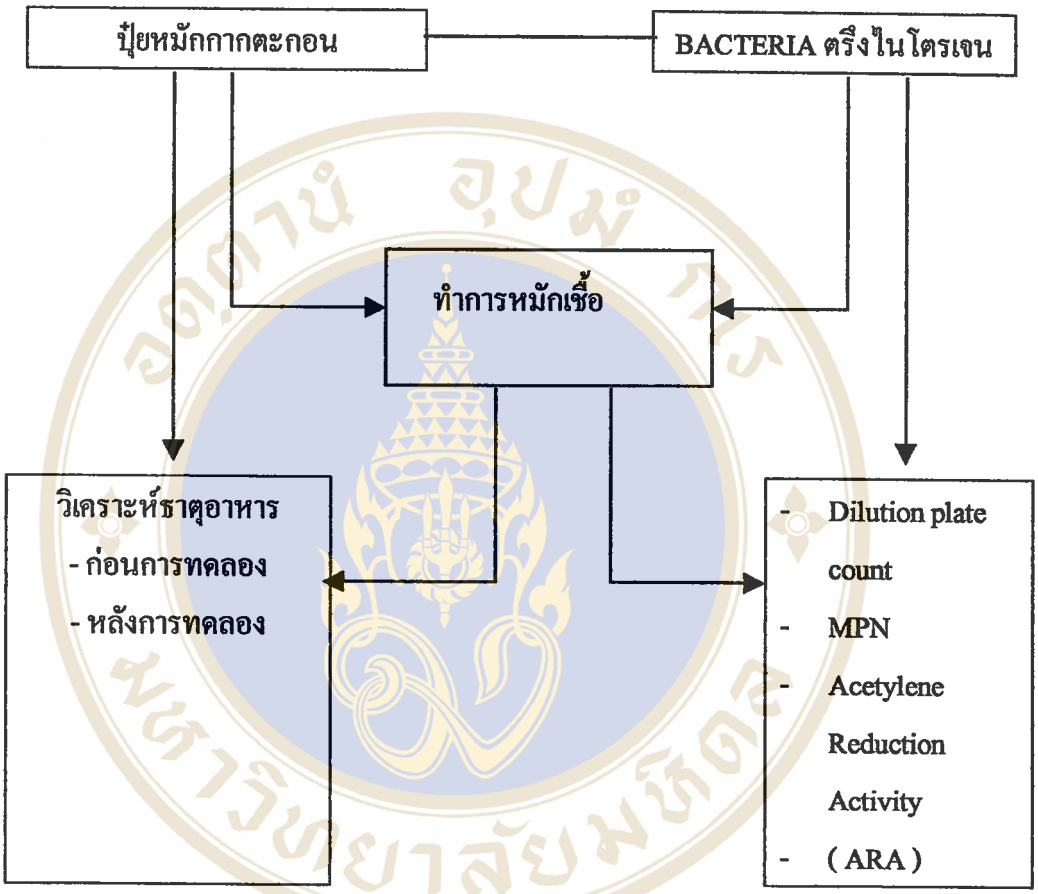
3.7 อุณหภูมิ โดยนำปรอทไปจุ่มในกองปุ๋ยหมัก

3.8 วิเคราะห์ C/N ratio

Copyright by Mahidol University

## 4. ขั้นตอนการปฏิบัติการทดลอง

### 4.1 แนวความคิดในการทดลอง




แผนภาพที่ 5 แนวความคิดในการปฏิบัติการทดลอง

### 4.2 เตรียมเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

4.2.1 การ Streak plate method

นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สกุล คือ *Azotobacter venilandii, Beijerinckia indica, Azospirillum brasilense,* และ *Acetobacter diazotrophicus* มา Streak plate บนผิวอาหาร โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อ ก่อนใช้ต้องเผาลวดเขี่ยเชื้อให้แดง ปล่อยให้เย็นในอากาศหรือนำมาแตะที่ผิวอาหารเพื่อให้ลวดเขี่ยเชื้ออยู่ในอุณหภูมิปกติ นำลวดเขี่ยเชื้อตักเชื้อที่เตรียมไว้มาแตะที่ขอบวุ้นขอบใดขอบหนึ่งของจานเพาะเชื้อ ลากลวดเขี่ยเชื้อเบาๆ โดยให้ด้านแบนของปลายลวดแตะแผ่วๆบนผิววุ้นไป

Copyright by Mahidol University

มา 4-5 เส้น แต่ละเส้นให้ใกล้กันมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ระวังอย่าให้ลวดเขี่ยเชื้อฝังลงไปในวุ้น ปิดฝาจาน เสร็จแล้วเผาลวดเขี่ยเชื้อให้แดงและทำให้เย็นลงโดยทำเหมือนกับวิธีข้างต้นหมุนจานเล็กน้อยให้เหมาะสมและถนัดในการ Streak เปิดฝาจาน Streak ครั้งที่ 2 โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อผ่านเชื้อที่แตะไว้ในครั้งแรกลากไปมาบนผิววุ้น 5-6 เส้น ระวังอย่าให้ลวดเขี่ยเชื้อไปแตะเชื้อที่ได้ Streak ไว้ก่อนมากเกินไป เสร็จแล้วปิดฝาจาน บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยอัตราการเจริญของเชื้อแต่ละสกุลใช้เวลาต่างกันคือ *Azotobacter venilandii* ประมาณ 2-3 วัน *Beijerinckia indica* ประมาณ 5-7 วัน *Azospirillum brasilense* ประมาณ 2-3 วัน และ *Acetobacter diazotrophicus* ประมาณ 4-5 วัน

4.2.2 ขั้นตอนและวิธีการในการย้อมสีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระแบบแกรม

1. Smear เชื้อบน Slide บางๆและลนไฟ 1-2 ครั้ง
2. หยดสี Crystal violet ลงบน Slide ให้ท่วมรอย Smear ของเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1นาที
3. เท Crystal violet ทิ้ง แล้วล้างออกด้วยน้ำ แล้วหยด Iodine ให้ท่วมรอย Smear และทิ้งไว้นาน 1 นาที
4. ล้าง Iodine ออกด้วยน้ำ แล้วล้างอีกครั้งด้วย Alcohol 95% ( ไม่เกิน 20 วินาที ) แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำทันที
5. ย้อมทับอีกครั้งด้วย Safranin-O นาน 1 นาที
6. ล้างด้วยน้ำแล้วทิ้ง Slide ให้แห้ง

4.2.3 ศึกษาและจำแนกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อที่ได้จากการย้อมสี มาศึกษาและจำแนกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า และใช้ร่วมกับ Oil immersion เพื่อสังเกตลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวต่อไป

Copyright by Mahidol University

## 5. การวางแผนการทดลอง

ในการทดลองผู้วิจัยได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มแบบสมบูรณ์ ( Completely Randomized Design ; CRD ) มี 6 Treatment 3 ซ้ำ ดังนี้

5.1 ปุ๋ยหมักกากตะกอนของโรงงานน้ำตาล คือ โรงงานบริษัทแผ่นดินทอง

5.2 เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ในการทดลองมี 6 Treatment ดังนี้

5.2.1 ไม่ใส่เชื้อ ( Control )

5.2.2 *Azotobacter venilandii*

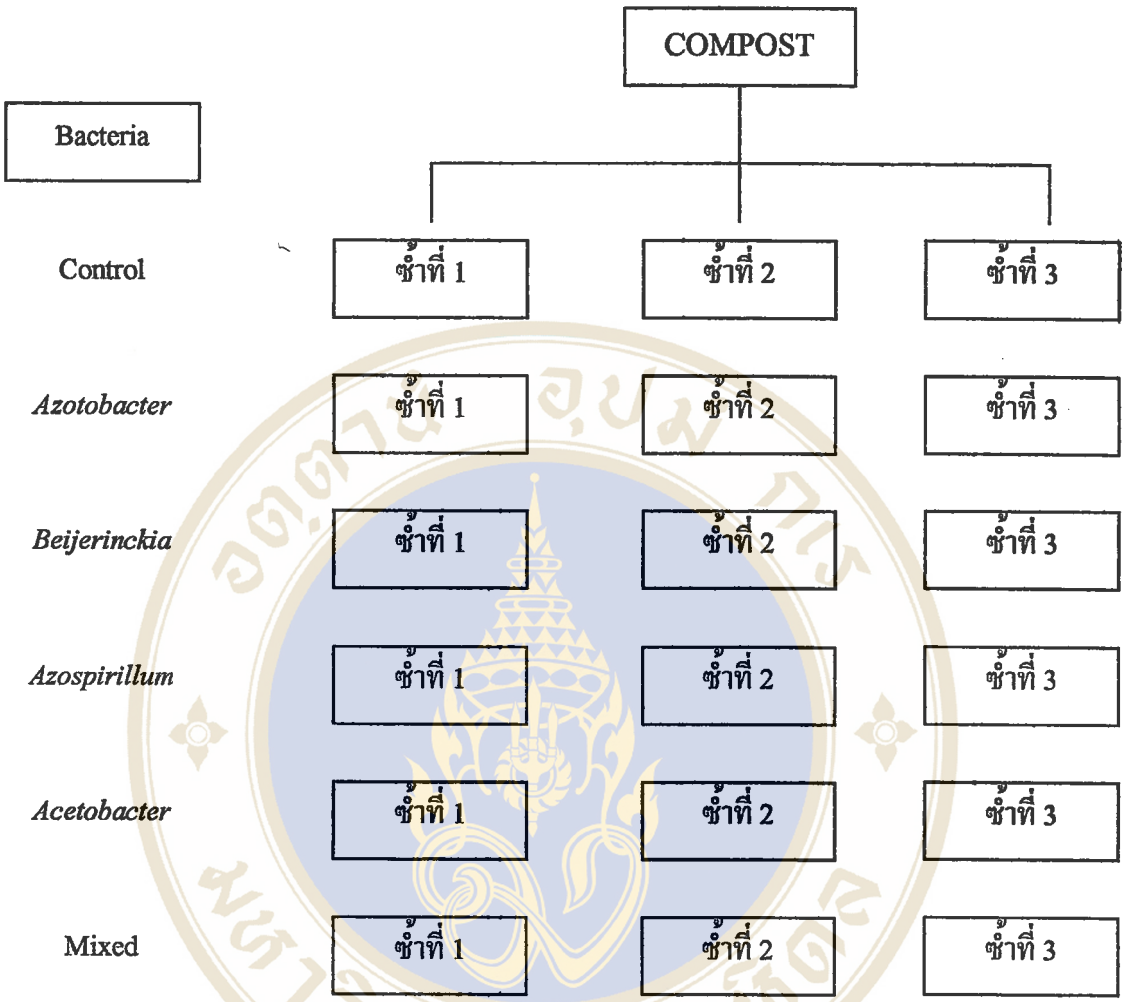
5.2.3 *Beijerinckia indica*

5.2.4 *Azospirillum brasilense*

5.2.5 *Acetobacter diazotrophicus*

5.2.6 เชื้อผสม ( Mixed ) เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ทั้ง 4 สายพันธุ์

Copyright by Mahidol University




แผนภาพที่ 6 แผนการทดลอง

นำปุ๋ยหมักกากตะกอนมาใส่ในถังพลาสติกปริมาณ 5,130 กรัม/ถัง ตามแผนการทดลองแบบ CRD คือ 6 Treatment 3 ซ้ำ ซึ่งปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ใช้คลุกกับปุ๋ยหมักกากตะกอน จะได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เช็คอัตราการเจริญของเชื้อได้ด้วยการนำเอาเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาวัดหาค่า Optical density ( OD.) โดยเมื่อได้ค่าจากการวัด OD. แล้ว ก็จะนำมาเทียบกับกราฟแสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนชนิดต่างๆ ( Standard ) หลังจากนั้นก็จะนำมาคำนวณ หาปริมาณเชื้อที่จะนำไปใช้ในการคลุกกับปุ๋ยหมักกากตะกอน โดยควบคุมความชื้นให้อยู่ที่ระดับ 60%

ปริมาณเชื้อที่คำนวณได้มีดังนี้ โดย Control ปริมาณน้ำที่ใส่ในถังทดลอง 2,870 ml. ปุ๋ยหมักกากตะกอน 5,130 กรัม/ถัง เชื้อ *Azotobacter venilandii* ค่า OD.วัดได้ 0.726 ปริมาณเชื้อที่ใส่ในถังทดลอง 1,560 ml. น้ำ 1,310 ml. ปุ๋ยหมักกากตะกอน 5,130 กรัม/ถัง เชื้อ *Beijerinckia indica*

Copyright by Mahidol University

ค่า OD.วัดได้ 0.845 ปริมาณเชื้อที่ใส่ในถังทดลอง 1,746 ml. น้ำ 1,124 ml. ปุ๋ยหมักกากตะกอน 5,130 กรัม/ถัง เชื้อ *Azospirillum brasilense* ค่า OD.วัดได้ 0.712 ปริมาณเชื้อที่ใส่ในถังทดลอง 1,403 ml. น้ำ 1,467 ml. ปุ๋ยหมักกากตะกอน 5,130 กรัม/ถัง เชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* ค่า OD.วัดได้ 0.721 ปริมาณเชื้อที่ใส่ในถังทดลอง 1,718 ml. น้ำ 1,152 ml. ปุ๋ยหมักกากตะกอน 5,130 กรัม/ถัง

เชื้อผสม ( Mixed ) คือปริมาณเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ใส่ในถังทดลอง อัตราส่วนผสมมีดังนี้

เชื้อ *Azotobacter venilandii* ปริมาณเชื้อที่ใส่ในถังทดลอง 390 ml. *Beijerinckia indica* ปริมาณเชื้อที่ใส่ในถังทดลอง 436.5 ml. *Azospirillum brasilense* ปริมาณเชื้อที่ใส่ในถังทดลอง 350.75 ml. *Acetobacter diazotrophicus* ปริมาณเชื้อที่ใส่ในถังทดลอง 429.5 ml. น้ำ 1,263.25 ml. ปุ๋ยหมักกากตะกอน 5,130 กรัม/ถัง

เก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักกากตะกอนที่ผสมเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เมื่อทำการทดลองอายุ 1, 6, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62, 69 และ 76 วัน จนปริมาณเชื้อลดลง

**6. นับปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน**

6.1 Dilution plate count ( วิธีการทดลองเหมือนกับข้อ 2.1.2 หน้า 26 )

6.2 การทดสอบการตรึงไนโตรเจนของเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอิสระ โดย Acetylene Reduction Activity (ARA)

ขั้นตอนการปฏิบัติ

เตรียมอาหาร N- Free ของเชื้อแต่ละชนิด ซึ่งขาดธาตุไนโตรเจน ใส่อาหาร 30 ml. ใน Flask ขนาด 125 ml. หลังจากปิดจุกสำลี หุ้มแผ่นอลูมินัม แล้วจึงนึ่งฆ่าเชื้อ 30 ml. เสร็จแล้วนำ Flask มาตั้งไว้ให้เย็น แล้วนำเชื้อมาเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ให้เชื้อเจริญเติบโต เชื้อแต่ละชนิดนั้น จะเจริญได้ช้าเร็ว ไม่เท่ากัน คือ *Azotobacter* 3 – 5 วัน หากมีการใช้ Bromthymeol blue 0.5 % ใน อาหารภายใน 3 – 5 วัน อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้ง Flask แสดงว่าเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ส่วน*Beijerinckia* จะใช้เวลานานถึง 7 – 14 วัน สำหรับการเจริญเติบโตเพราะเป็นเชื้อที่เจริญช้ามากและ Colony จะสร้าง Polysaccharide ขึ้นมากจนสังเกตเห็นได้ชัดว่าเซลล์มีลักษณะเหนียว สีขาวข้น การวัดการตรึงไนโตรเจนจึงทำได้ไม่พร้อมกัน เชื้อที่โตเร็วย่อมต้องวัดก่อนเชื้อที่โตช้า แต่เชื้อทุกชนิดต้องเลี้ยงไว้ 17 –24 ชม. แล้วจึงเก็บตัวอย่างแก๊สไปวัดด้วยเครื่อง gas chromatograph เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วทำการวัดการตรึงไนโตรเจนดังนี้

Copyright by Mahidol University

เปลี่ยนจุกจากจุกสำลีเป็นฝาขวดที่มีจุกยางสองขั้นติดอยู่ด้วยโดยก่อนเปลี่ยนควรฆ่าเชื้อด้วยAlcohol 70% ทิ้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อประมาณ 30 นาที แล้วจึงลนไฟที่ปากขวดเพื่อฆ่าเชื้อก่อนเปลี่ยนจุกสำลีด้วยฝาขวดที่ติดจุกยางไว้

เมื่อเปลี่ยนจุก Flask แล้วก็ดูดแก๊สจาก Flask ออก 10 % แล้วใส่แก๊ส Acetylene เข้าไปแทน 10 % เช่นกัน แล้วจับเวลา Inocubate เพื่อให้ Nitrogenase enzyme ทำการ Reduced Acetylene เป็น Ethylene เป็นเวลา 17-24 ชม. แล้วจึงเก็บแก๊สจากขวด Flask ที่ Incubate ไว้ 10 cc. ใส่ใน Suction tube นำไปวัดด้วยเครื่อง Gas Chromatograhp ก็จะได้ผลของ peak ที่เกิดจากแก๊ส Ethylene และ Acetylene ตามลำดับ เอาค่าความสูงของ peak ไปคำนวณเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน

สูตร การคำนวณอัตราการตรึงไนโตรเจน

$$\frac{10^3}{2200} \times \frac{B \times V}{Std.x A x 22.4}$$

A = เวลาที่เก็บ Gas ที่ Incubate

B = ค่า Sample

V = ขึ้นอยู่กับปริมาตรแก๊สที่ฉีดเข้าไปของ Flask ที่ Incubate หน่วยเป็น U mol. / hr. / Flask = 0.00

2200 = ปริมาณ Ethylene ใน Flask ของ Std.

**7. วิเคราะห์หาสมบัติทางเคมี**

วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติของปุ๋ยหมักกากตะกอน (33) แสดงในภาคผนวก ก

7.1 วัด pH

7.2 ปริมาณความชื้น

7.3 อุณหภูมิ

7.4 วิเคราะห์อินทรีย์วัตถุ

7.5 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

7.6 วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด

7.7 วิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด

7.8 คำนวณหาปริมาณ C/N ratio

Copyright by Mahidol University

**8. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล**

8.1 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of variance. ( ANOVA ) ทดสอบความแตกต่างของแบคทีเรียตรึงในโตรเจนระหว่างแต่ละปัจจัย เมื่อพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ระหว่างแต่ละปัจจัยแล้วก็จะนำมาทำการทดสอบด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ( DMRT )

8.2 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี LSD. เปรียบเทียบสมบัติทางเคมีของปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง เพื่อทดสอบความแตกต่างของแบคทีเรียตรึงในโตรเจนในแต่ละปัจจัย

Copyright by Mahidol University

# บทที่ 4

# ผลการทดลองและอภิปรายผล

## 1. ค่าความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อกับความขุ่น

1.1 เชื้อ *Azotobacter venilandii* โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter venilandii* ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดความขุ่นของอาหาร ( Optical density ; OD. ) ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 600 nm. พร้อมทั้งนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี Dilution plate count ทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วนำมาเขียนกราฟค่าความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อกับความขุ่นของอาหาร ผลการศึกษาตามตารางที่ 6 และค่าความสัมพันธ์ของเชื้อและความขุ่นของอาหารตามกราฟที่ 7 ปริมาณของเชื้อจะเพิ่มขึ้นจากเริ่มการทดลองจะเพิ่มขึ้นเป็น $6.03 \times 10^4$ CFU. เมื่อ 6 ชั่วโมง หลังจากเริ่มการทดลอง มีค่าความขุ่น 0.41 / 600 nm. และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง $7.24 \times 10^8$ CFU. เมื่อ 48 ชั่วโมง ค่าความขุ่น 1.21 / 600 nm. ซึ่งมีปริมาณเชื้อมากที่สุด หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะลดลง

1.2 เชื้อ *Beijerinckia indica* โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Beijerinckia indica* ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดความขุ่นของอาหาร ( Optical density ; OD. ) ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 600 nm. พร้อมทั้งนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี Dilution plate count ทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วนำมาเขียนกราฟค่าความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อกับความขุ่นของอาหาร ผลการศึกษาตามตารางที่ 7 และค่าความสัมพันธ์ของเชื้อและความขุ่นของอาหารตามกราฟที่ 8 ปริมาณของเชื้อจะเพิ่มขึ้นจากเริ่มการทดลองจะเพิ่มขึ้นเป็น $3.89 \times 10^3$ CFU. เมื่อ 12 ชั่วโมง หลังจากเริ่มการทดลอง มีค่าความขุ่น 0.28 / 600 nm. และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง $4.47 \times 10^8$ CFU. เมื่อ 168 ชั่วโมง ค่าความขุ่น 1.26 / 600 nm. ซึ่งมีปริมาณเชื้อมากที่สุด หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะลดลง

1.3 เชื้อ *Azospirillum brasilense* โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum brasilense* ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดความขุ่นของอาหาร ( Optical density ; OD. ) ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 600 nm. พร้อมทั้งนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี Dilution plate count ทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วนำมาเขียนกราฟค่าความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อกับความขุ่นของอาหาร ผลการศึกษาตามตารางที่ 8 และค่าความสัมพันธ์ของเชื้อและความขุ่นของอาหารตามกราฟที่ 9 ปริมาณของเชื้อจะเพิ่มขึ้นจากเริ่มการทดลองจะเพิ่มขึ้นเป็น $9.55 \times 10^3$ CFU. เมื่อ 12 ชั่วโมง หลังจากเริ่มการทดลอง

Copyright by Mahidol University

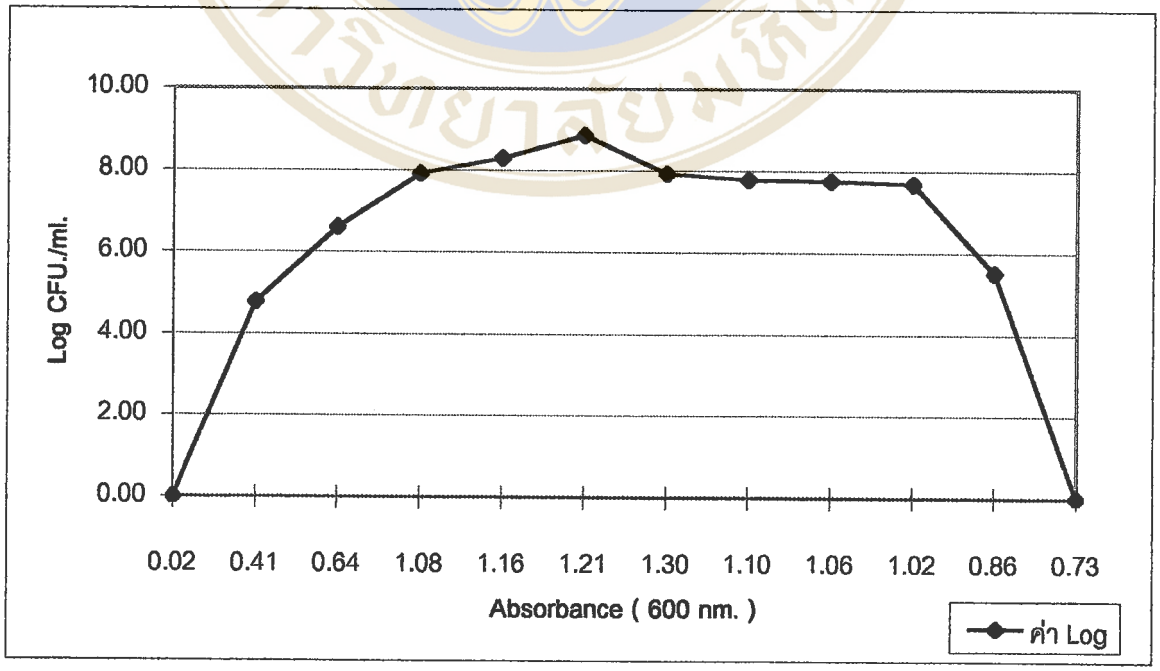
มีค่าความขุ่น 0.36 / 600 nm. และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 7.59 x $10^9$ CFU. เมื่อ 96 ชั่วโมง ค่าความขุ่น 1.20 / 600 nm. ซึ่งมีปริมาณเชื้อมากที่สุด หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะลดลง

1.4 เชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดความขุ่นของอาหาร ( Optical density ; OD. ) ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 600 nm. พร้อมทั้งนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี Dilution plate count ทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วนำมาเขียนกราฟค่าความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อกับความขุ่นของอาหาร ผลการศึกษาตามตารางที่ 9 และค่าความสัมพันธ์ของเชื้อและความขุ่นของอาหารตามกราฟที่ 10 ปริมาณของเชื้อจะเพิ่มขึ้นจากเริ่มการทดลองจะเพิ่มขึ้นเป็น 3.38 x $10^2$ CFU. เมื่อ 12 ชั่วโมง หลังจากเริ่มการทดลอง มีค่าความขุ่น 0.22 / 600 nm. และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 3.31 x $10^9$ CFU. เมื่อ 120 ชั่งโมง ค่าความขุ่น 1.26 / 600 nm. ซึ่งมีปริมาณเชื้อมากที่สุด หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะลดลง

Copyright by Mahidol University

**ตารางที่ 6 ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Azotobacter venilandii* กับความขุ่น**

| เวลา ( ชม. ) | ความขุ่นที่ ( 600 nm. ) | ค่า Log | ปริมาณเชื้อ ( CFU. ) |
|---|---|---|---|
| 0 | 0.02 | 0.00 | 0.00 |
| 6 | 0.41 | 4.78 | $6.03 \times 10^{4}$ |
| 12 | 0.64 | 6.61 | $4.07 \times 10^{6}$ |
| 24 | 1.08 | 7.92 | $8.32 \times 10^{7}$ |
| 36 | 1.16 | 8.29 | $1.95 \times 10^{8}$ |
| 48 | 1.21 | 8.86 | $7.24 \times 10^{8}$ |
| 60 | 1.30 | 7.93 | $8.51 \times 10^{7}$ |
| 72 | 1.10 | 7.79 | $6.17 \times 10^{7}$ |
| 96 | 1.06 | 7.76 | $5.75 \times 10^{7}$ |
| 144 | 1.02 | 7.69 | $4.90 \times 10^{7}$ |
| 216 | 0.86 | 5.52 | $3.31 \times 10^{5}$ |
| 228 | 0.73 | 0.00 | 0.00 |

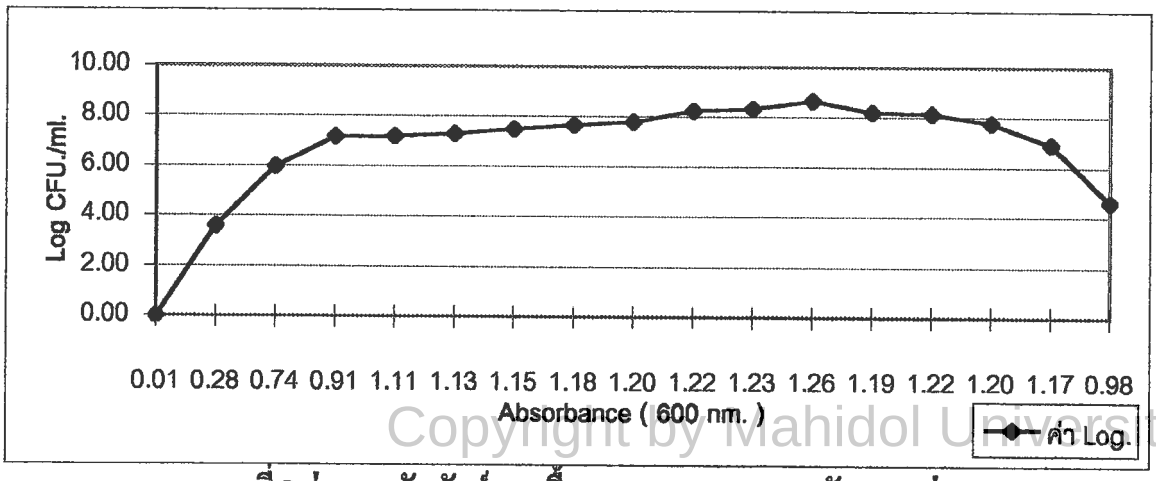



**ภาพที่ 7 ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Azotobacter venilandii* กับความขุ่น**

Copyright by Mahidol University

**ตารางที่ 7 ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Beijerinckia indica* กับความขุ่น**

| เวลา ( ชม. ) | ค่าความขุ่นที่ ( 600 nm. ) | ค่า Log. | ปริมาณเชื้อ ( CFU. ) |
|---|---|---|---|
| 0 | 0.01 | 0.00 | 0.00 |
| 12 | 0.28 | 3.59 | $3.89 \times 10^{3}$ |
| 24 | 0.74 | 5.97 | $9.33 \times 10^{5}$ |
| 48 | 0.91 | 7.18 | $1.51 \times 10^{7}$ |
| 72 | 1.11 | 7.20 | $1.58 \times 10^{7}$ |
| 96 | 1.13 | 7.31 | $2.04 \times 10^{7}$ |
| 108 | 1.15 | 7.49 | $3.09 \times 10^{7}$ |
| 120 | 1.18 | 7.66 | $4.57 \times 10^{7}$ |
| 132 | 1.20 | 7.80 | $6.31 \times 10^{7}$ |
| 144 | 1.22 | 8.24 | $1.74 \times 10^{8}$ |
| 156 | 1.23 | 8.33 | $2.14 \times 10^{8}$ |
| 168 | 1.26 | 8.65 | $4.47 \times 10^{8}$ |
| 180 | 1.19 | 8.21 | $1.62 \times 10^{8}$ |
| 192 | 1.22 | 8.14 | $1.38 \times 10^{8}$ |
| 204 | 1.20 | 7.77 | $5.89 \times 10^{7}$ |
| 216 | 1.17 | 6.92 | $8.32 \times 10^{6}$ |
| 264 | 0.98 | 4.60 | $3.98 \times 10^{4}$ |

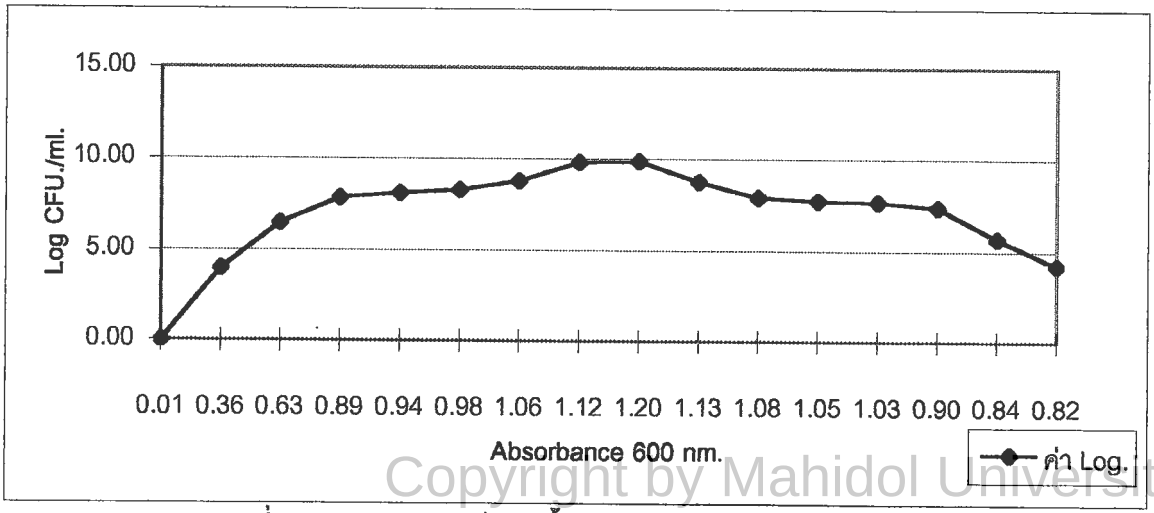



Copyright by Mahidol University

**ภาพที่ 8 ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Beijerinckia indica* กับความขุ่น**

**ตารางที่ 8 ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Azospirillum brasilense* กับความขุ่น**

| เวลา ( ชม. ) | ค่าความขุ่นที่ ( 600 nm. ) | ค่า Log. | ปริมาณเชื้อ ( CFU. ) |
|---|---|---|---|
| 0 | 0.01 | 0.00 | 0.00 |
| 12 | 0.36 | 3.98 | $9.55 \times 10^{3}$ |
| 24 | 0.63 | 6.48 | $3.02 \times 10^{6}$ |
| 36 | 0.89 | 7.88 | $7.59 \times 10^{7}$ |
| 48 | 0.94 | 8.12 | $1.32 \times 10^{8}$ |
| 60 | 0.98 | 8.32 | $2.09 \times 10^{8}$ |
| 72 | 1.06 | 8.81 | $6.46 \times 10^{8}$ |
| 84 | 1.12 | 9.83 | $6.76 \times 10^{9}$ |
| 96 | 1.20 | 9.88 | $7.59 \times 10^{9}$ |
| 108 | 1.13 | 8.79 | $6.17 \times 10^{8}$ |
| 120 | 1.08 | 7.94 | $8.71 \times 10^{7}$ |
| 132 | 1.05 | 7.76 | $5.75 \times 10^{7}$ |
| 144 | 1.03 | 7.69 | $4.90 \times 10^{7}$ |
| 168 | 0.90 | 7.39 | $2.45 \times 10^{7}$ |
| 204 | 0.84 | 5.69 | $4.90 \times 10^{5}$ |
| 324 | 0.82 | 4.23 | $1.70 \times 10^{4}$ |

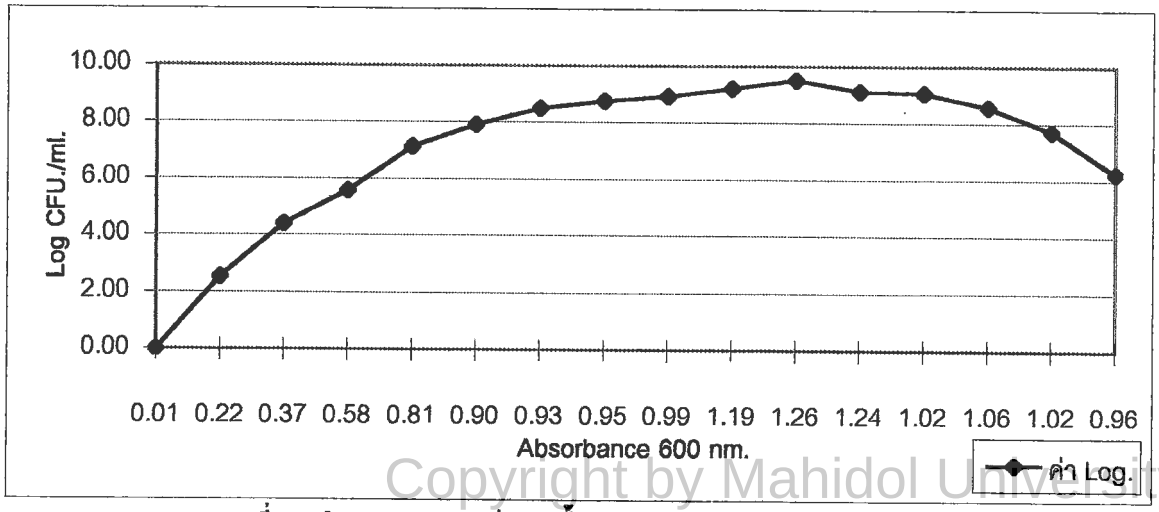



Copyright by Mahidol University

**ภาพที่ 9 ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Azospirillum brasilense* กับความขุ่น**

**ตารางที่ 9 ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* กับความขุ่น**

| เวลา ( ชม. ) | ความขุ่นที่ ( 600 nm. ) | ค่า Log. | ปริมาณเชื้อ ( CFU. ) |
|---|---|---|---|
| 0 | 0.01 | 0.00 | 0.00 |
| 12 | 0.22 | 2.53 | $3.38 \times 10^{2}$ |
| 24 | 0.37 | 4.39 | $2.45 \times 10^{4}$ |
| 36 | 0.58 | 5.58 | $3.80 \times 10^{5}$ |
| 48 | 0.81 | 7.15 | $1.41 \times 10^{7}$ |
| 60 | 0.90 | 7.92 | $8.32 \times 10^{7}$ |
| 72 | 0.93 | 8.49 | $3.09 \times 10^{8}$ |
| 84 | 0.95 | 8.76 | $5.75 \times 10^{8}$ |
| 96 | 0.99 | 8.93 | $8.51 \times 10^{8}$ |
| 108 | 1.19 | 9.21 | $1.62 \times 10^{9}$ |
| 120 | 1.26 | 9.52 | $3.31 \times 10^{9}$ |
| 132 | 1.24 | 9.12 | $1.32 \times 10^{9}$ |
| 144 | 1.02 | 9.06 | $1.15 \times 10^{9}$ |
| 192 | 1.06 | 8.58 | $3.80 \times 10^{8}$ |
| 264 | 1.02 | 7.73 | $5.37 \times 10^{7}$ |
| 336 | 0.96 | 6.24 | $1.74 \times 10^{6}$ |




Copyright by Mahidol University

**ภาพที่ 10 ค่าความสัมพันธ์ของเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* กับความขุ่น**

**2. คุณสมบัติทางกายภาพ**

2.1 อุณหภูมิ ก่อนการทดลองวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 32 องศาเซนเซียส ( ภาคผนวก ค ตารางที่ 23 ) หลังการทดลอง วัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 32 องศาเซนเซียส ( ภาคผนวก ค ตารางที่ 24 )

2.2 ความชื้น ก่อนการทดลอง ความชื้นของปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลอง มีความชื้น 2.53 เปอร์เซ็นต์ ( ภาคผนวก ค ตารางที่ 25 ) หลังการทดลอง ควบคุมความชื้นให้อยู่ในระดับ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยปิดฝาถังพลาสติกหลังจากทำการทดลอง เพื่อควบคุมระดับความชื้นให้คงที่

2.3 pH ผลการวิเคราะห์หาค่า pH ทั้งก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ค่า pH ที่วิเคราะห์ได้จะอยู่ในช่วง 6.5-6.8 ( ภาคผนวก ค ตารางที่ 26 )

จากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น pH ปรากฏว่าตลอดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากปุ๋ยหมักกากตะกอนโรงงานน้ำตาลเป็นปุ๋ยหมักที่สมบูรณ์แล้ว อุณหภูมิจึงไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างทดลองและความชื้นควบคุมให้อยู่ที่ระดับ 60 % ในระหว่างการทดลอง ถังที่ใช้สำหรับหมักเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับปุ๋ยหมักกากตะกอนได้ปฏิบัติการทดลองในโรงเรือน ซึ่งช่วยในการถ่ายเทความร้อน กันแดดกันฝน ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นได้อีกทางหนึ่ง

Copyright by Mahidol University

**3. คุณสมบัติทางเคมี**

3.1 ไนโตรเจน วิเคราะห์หาค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ( Total nitrogen ) ทำการวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

คุณสมบัติของกากตะกอนก่อนการทดลอง วิเคราะห์หาค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ( Total nitrogen ) พบว่ามีค่าปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ยเท่ากับ 110.31 g.N./pot. (ภาคผนวก ค ตารางที่ 27 )

ตารางที่ 10 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด หลังการทดลอง

| สิ่งทดลอง | Total nitrogen | | | รวม | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|
| ปุ๋ยหมักกากตะกอน+ เชื้อ | Treatment 1 | Treatment 2 | Treatment 3 | | g.N./pot. |
| Control | 110.4 | 112.0 | 111.2 | 331.2 | 111.40 d |
| *Azotobacter* | 118.4 | 116.0 | 117.6 | 352.0 | 117.33 b |
| *Beijerinckia* | 123.2 | 124.0 | 119.2 | 366.4 | 122.13 a |
| *Azospirillum* | 113.6 | 115.2 | 116.8 | 345.6 | 115.20 bc |
| *Acetobacter* | 112.8 | 115.2 | 114.4 | 342.4 | 114.13 cd |
| Mixed | 112.0 | 113.6 | 115.2 | 340.8 | 113.60 cd |

cv = 1.4 % ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT.

จากตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่า เชื้อ *Beijerinckia* สามารถเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้กับปุ๋ยหมักกากตะกอนมากกว่า เชื้อ *Azotobacter* และเชื้อ *Azospirillum* ซึ่งให้ปริมาณไนโตรเจนใกล้เคียงกัน ส่วนเชื้อ *Acetobacter* และเชื้อผสม ให้ปริมาณไนโตรเจนในระดับที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ภาคผนวก ง ตารางที่ 32 )

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณไนโตรเจนในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน | ค่าเฉลี่ย g.N./pot. |
|---|---|
| ก่อนการทดลอง | 110.31 |
| หลังการทดลอง | |
| Control | 111.20 |
| *Azotobacter* | 117.33 |
| *Beijerinckia* | 122.33 |
| *Azospirillum* | 115.20 |
| *Acetobacter* | 114.13 |
| Mixed ( เชื้อผสมแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ) | 113.60 |

จากตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % และเชื้อผสม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยที่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแต่ละชนิดและเชื้อผสม มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งทำให้มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น หลังจากที่ผสมกับปุ๋ยหมักกากตะกอน ส่วนในกลุ่มควบคุม ปริมาณไนโตรเจนก่อนและหลังการทดลองไม่แตกต่างกัน (ภาคผนวก ง ตารางที่ 33 )

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนก่อนและสิ้นสุดการทดลองพบว่าทุก Treatment ที่ใส่เชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากระหว่างการศึกษาเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดมีการตรึงไนโตรเจน

เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าใน Treatment ต่างๆ ปริมาณไนโตรเจน เฉลี่ยจากมากไปหาน้อย ดังนี้ *Beijerinckia indica* > *Azotobacter venilandii* > *Azospirillum brasilense* > *Acetobacter diazotrophicus* > Mixed ( เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ) > Control ( ตารางที่ 10 ) ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญของเชื้อในปุ๋ยหมักกากตะกอนมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 20 และแผนภาพที่ 8 ) กล่าวคือ เชื้อ *Beijerinckia indica* เชื้อจะเจริญจากเริ่มต้นการทดลองจนถึงระยะสูงสุดเมื่อ 41 วัน หลังการทดลองอัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ 4.37 x $10^8$ CFU/g. จากนั้นเชื้อจะค่อยๆ ลดลง จนสิ้นสุดการทดลอง เหลืออัตราการเจริญของเชื้อประมาณ 3.24 x $10^3$ CFU/g. เชื้อ *Azotobacter*

Copyright by Mahidol University

*venilandii*ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจากเริ่มทดลองจนถึง 27 วันหลังทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ 3.31 x $10^8$ CFU/g. และจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง เหลือเพียง 1.55 x $10^2$ CFU/g. ตามลำดับ



Copyright by Mahidol University

3.2 ฟอสฟอรัส วิเคราะห์หาค่าปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ( Total phosphorus ) ทำการวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ดังตารางต่อไปนี้

คุณสมบัติของกากตะกอนก่อนการทดลอง วิเคราะห์หาค่าปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ( Total Phosphorus ) พบว่ามีค่าปริมาณฟอสฟอรัสเฉลี่ยเท่ากับ 117.96 g.P./pot. ( ภาคผนวก ค ตารางที่ 28 )

ตารางที่ 12 ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด หลังการทดลอง

| สิ่งทดลอง | Total phosphorus | | | รวม | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|
| ปุ๋ยหมักกากตะกอน+เชื้อ | Treatment 1 | Treatment 2 | Treatment 3 | | g.P./pot. |
| Control | 116.8 | 119.2 | 118.4 | 354.4 | 118.13 a |
| *Azotobacter* | 122.4 | 116.8 | 117.6 | 356.8 | 118.93 a |
| *Beijerinckia* | 120.8 | 119.2 | 117.6 | 357.6 | 119.20 a |
| *Azospirillum* | 116.8 | 117.6 | 119.2 | 353.6 | 117.87 a |
| *Acetobacter* | 118.4 | 119.2 | 118.4 | 356.0 | 118.67 a |
| Mixed | 117.6 | 119.2 | 119.2 | 356.0 | 118.67 a |

cv = 1.4 % ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT.

จากตารางที่ 12 จะเห็นได้ว่าปริมาณฟอสฟอรัสหลังการทดลอง ในกลุ่มทดลองต่างๆมีปริมาณฟอสฟอรัสใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ( ภาคผนวก ง ตารางที่ 34 )

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณฟอสฟอรัสในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน | ค่าเฉลี่ย g.N./pot. |
|---|---|
| ก่อนการทดลอง | 117.96 |
| หลังการทดลอง | |
| Control | 118.13 |
| Azotobacter | 118.93 |
| Beijerinckia | 119.20 |
| Azospirillum | 117.87 |
| Acetobacter | 118.67 |
| Mixed ( เชื้อผสมแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ) | 118.67 |

จากตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์ต่างๆ ไม่มีผลต่อปริมาณฟอสฟอรัส โดยในกลุ่มทดลองต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( ภาคผนวก ง ตารางที่ 35 )

การศึกษาปริมาณฟอสฟอรัส พบว่าหลังจากผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสก่อนและหลังการทดลอง ค่าฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้ไม่เปลี่ยนแปลงมีปริมาณใกล้เคียงกันเป็นเพราะว่า เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟอสฟอรัส ไม่ว่าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะมีปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นหรือลดลง

Copyright by Mahidol University

3.3 โพแทสเซียม วิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด ( Total potassium ) ทำการวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ดังตารางต่อไปนี้

คุณสมบัติของกากตะกอนก่อนการทดลอง วิเคราะห์หาค่าปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด ( Total Potassium ) พบว่ามีค่าปริมาณโพแทสเซียมเฉลี่ยเท่ากับ 86.53 g.K./pot. ( ภาคผนวก ค ตารางที่ 29 )

ตารางที่ 14 ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด หลังการทดลอง

| สิ่งทดลอง | Total potassium | | | รวม | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|
| ปุ๋ยหมักกากตะกอน+เชื้อ | Treatment 1 | Treatment 2 | Treatment 3 | | g.K./pot. |
| Control | 84.8 | 87.2 | 88.0 | 260.0 | 86.67 a |
| *Azotobacter* | 89.6 | 83.2 | 86.4 | 259.2 | 86.40 a |
| *Beijerinckia* | 87.2 | 84.8 | 90.4 | 262.4 | 87.47 a |
| *Azospirillum* | 85.6 | 89.6 | 84.8 | 260.0 | 86.67 a |
| *Acetobacter* | 84.8 | 90.4 | 84.0 | 259.2 | 86.40 a |
| Mixed | 89.6 | 83.2 | 87.2 | 260.0 | 86.67 a |

cv = 3.3 % ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT.

จากตารางที่ 14 จะเห็นได้ว่าปริมาณโพแทสเซียมหลังการทดลอง ในกลุ่มทดลองต่างๆมีปริมาณโพแทสเซียมใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ( ภาคผนวก ง ตารางที่ 36 )

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณโพแทสเซียมในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน | ค่าเฉลี่ย g.N./pot. |
|---|---|
| ก่อนการทดลอง | 86.53 |
| หลังการทดลอง | |
| Control | 86.67 |
| Azotobacter | 86.40 |
| Beijerinckia | 87.47 |
| Azospirillum | 86.67 |
| Acetobacter | 86.40 |
| Mixed ( เชื้อผสมแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ) | 86.67 |

จากตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์ต่างๆ ไม่มีผลต่อปริมาณโพแทสเซียม โดยในกลุ่มทดลองต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( ภาคผนวก ง ตารางที่ 37 )

การศึกษาปริมาณโพแทสเซียม พบว่าหลังการทดลองปริมาณโพแทสเซียมทั้งก่อนและหลังการทดลองค่าโพแทสเซียมที่วิเคราะห์ได้ไม่เปลี่ยนแปลงซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกันเป็นเพราะว่าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 4 สายพันธ์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโพแทสเซียมไม่ว่าเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นหรือลดลง

Copyright by Mahidol University

3.4 อินทรียวัตถุ

วิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์วัตถุ ( Organic matter ) ทำการวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

คุณสมบัติของกากตะกอนก่อนการทดลอง วิเคราะห์หาค่าปริมาณอินทรีย์วัตถุ ( Organic matter ) พบว่ามีค่าปริมาณอินทรีย์วัตถุ เฉลี่ยเท่ากับ 3258.37 g.O.M./pot. ( ภาคผนวก ค ตารางที่ 30 )

ตารางที่ 16 ปริมาณอินทรีย์วัตถุ หลังการทดลอง

| สิ่งทดลอง | Organic matter | | | รวม | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|
| ปุ๋ยหมักกากตะกอน+เชื้อ | Treatment 1 | Treatment 2 | Treatment 3 | | g.O.M/pot. |
| Control | 2896.8 | 3048.0 | 3225.6 | 9170.4 | 3056.80 a |
| *Azotobacter* | 2942.4 | 2969.6 | 3043.2 | 8955.2 | 2985.07 a |
| *Beijerinckia* | 2890.4 | 2729.6 | 2884.0 | 8504.0 | 2834.67 a |
| *Azospirillum* | 2768.0 | 2920.8 | 3043.2 | 8732.0 | 2910.67 a |
| *Acetobacter* | 2734.4 | 3112.8 | 2834.4 | 8681.6 | 2893.87 a |
| Mixed | 2893.6 | 2920.0 | 3014.4 | 8828.0 | 2942.67 a |

cv = 4.4 % ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 % โดยวิธี DMRT.

จากตารางที่ 16 จะเห็นได้ว่าปริมาณอินทรีย์วัตถุ หลังการทดลอง ในสิ่งทดลองมีปริมาณอินทรีย์วัตถุใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ( ภาคผนวก ง ตารางที่ 38 )

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอินทรีย์วัถตุในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและ หลังการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน | ค่าเฉลี่ย g.N./pot. |
|---|---|
| ก่อนการทดลอง | 3258.37 |
| หลังการทดลอง | |
| Control | 3056.80 |
| Azotobacter | 2985.07 |
| Beijerinckia | 2834.67 |
| Azospirillum | 2910.67 |
| Acetobacter | 2893.87 |
| Mixed ( เชื้อผสมแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ) | 2942.67 |

จากตารางที่ 17 จะเห็นได้ว่าปริมาณอินทรีย์วัตถุหลังการทดลอง มีปริมาณลดลงโดยเชื้อ *Beijerinckia, Azospirillum,Acetobacter,*เชื้อผสม ปริมาณอินทรีย์วัตถุ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % และ *Azotobbacter* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วนกลุ่มควบคุม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลอง ( ภาคผนวก ง ตารางที่ 39 )

ก่อนการทดลองมีปริมาณอินทรีย์วัตถุเฉลี่ย 3258.37 g./O.M/pot. หลังการทดลองปรากฏว่า ทุกTreatment จะมีค่าอินทรีย์วัตถุลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปุ๋ยหมักกากตะกอนมีกระบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์อยู่ตลอดเวลาและปริมาณอินทรีย์วัตถุลดลงใน Treatment *Beijerinckia indica* > *Acetobacter diazotrophicus* > *Azospirillum brasilense* > Mixed ( เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ) > *Azotobacter venilandii* > Control ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการตรึงไนโตรเจน ทั้งนี้เนื่องจาก Treatment แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงจะมีการดำเนินกิจกรรมย่อยสลายได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนต่ำ

Copyright by Mahidol University

3.5 C/N ratio วิเคราะห์หาปริมาณ C/N ratio ทำการวิเคราะห์แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

คุณสมบัติของกากตะกอนก่อนการทดลอง วิเคราะห์หาค่าปริมาณ C/N ratio พบว่ามีค่าปริมาณ C/N ratio เฉลี่ยเท่ากับ 11.26 ( ภาคผนวก ค ตารางที่ 31 )

ตารางที่ 18 ปริมาณ C/N ratio หลังการทดลอง

| สิ่งทดลอง | C/N ratio | | | รวม | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|
| ปุ๋ยหมักกากตะกอน+เชื้อ | Treatment 1 | Treatment 2 | Treatment 3 | | |
| Control | 10.93 | 11.09 | 10.99 | 33.01 | 11.00 a |
| *Azotobacter* | 9.47 | 9.16 | 9.29 | 27.92 | 9.31 c |
| *Beijerinckia* | 8.62 | 9.61 | 8.89 | 27.12 | 9.04 c |
| *Azospirillum* | 9.92 | 9.90 | 9.98 | 29.80 | 9.93 b |
| *Acetobacter* | 10.12 | 9.94 | 10.11 | 30.17 | 10.06 b |
| Mixed | 10.30 | 10.01 | 9.99 | 30.30 | 10.10 b |

cv = 2.4 % ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 5 %โดยวิธี DMRT.

จากตารางที่ 18 จะเห็นได้ว่า Control มีปริมาณ C/N ratio มากกว่าเชื้ออื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เชื้อ *Azospirillum, Acetobacter*, และเชื้อผสม มีปริมาณ C/N ratio อยู่ในระดับเดียวกัน มีปริมาณ C/N ratio มากกว่า เชื้อ *Azotobacter* และ *Beijerinckia* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
เชื้อ *Azotobacter* และเชื้อ *Beijerinckia* มีปริมาณ C/N ratio อยู่ในระดับเดียวกัน
( ภาคผนวก ง ตารางที่ 40 )

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ C/N ratio ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน | ค่าเฉลี่ย g.N./pot. |
|---|---|
| ก่อนการทดลอง | 11.26 |
| หลังการทดลอง | |
| Control | 11.00 |
| *Azotobacter* | 9.31 |
| *Beijerinckia* | 9.04 |
| *Azospirillum* | 9.93 |
| *Acetobacter* | 10.06 |
| Mixed ( เชื้อผสมแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ) | 10.10 |

จากตารางที่ 19 ปริมาณ C/N ratio ของเชื้อ *Azotobacter, Beijerinckia, Azospirillum, Acetobacter* และเชื้อผสม มีปริมาณ C/N ratio แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ส่วนในกลุ่มควบคุมปริมาณ C/N ratio ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( ภาคผนวก ง ตารางที่ 41 )

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ C/N ratio ก่อนการทดลองมีค่าเฉลี่ย 11.26 และเมื่อหลังการทดลองปรากฏว่า มีค่า C/N ratio เฉลี่ย 9.04, 9.31, 9.93, 10.06, 10.10และ 11.00 ใน Treatment *Beijerinckia indica, Azotobacter venilandii, Azospirillum brasilense, Acetobacter diazotrophicus* ,Mixed ( เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ )และ Control ตามลำดับ

C/N ratio เป็นการเปรียบเทียบ ค่าอัตราส่วนของ Carbon ต่อ Nitrogen ซึ่ง Carbon จะมีการสลายตัวมากใน Treatment ที่มีการตรึงไนโตรเจนได้สูง ทั้งนี้เพราะเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ นำเอาไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ด้วย

จากการศึกษาของ ประสพ วีระกรพานิช (34) ปุ๋ยหมักที่จะนำไปใส่เป็นปุ๋ยให้กับพืช ต้องมีค่าสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน C/N ratio น้อยกว่า 20:1 ซึ่งทำให้เห็นว่าปุ๋ยหมักกากตะกอนที่นำมาใช้หมักกับเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เป็นปุ๋ยอินทรีย์ที่สมบูรณ์แล้ว สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยที่มีประโยชน์ต่อพืชได้

Copyright by Mahidol University

**4. คุณสมบัติทางชีวภาพ**

**4.1 การเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในปุ๋ยหมักกากตะกอน**

ผลการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter venilandii*, *Beijerinckia indica*, *Azospirillum brasilense* และ *Acetobacter diazotrophicus* ในปุ๋ยหมักกากตะกอน ผลการวิเคราะห์ปรากฏว่า เชื้อ *Beijerinckia indica* สามารถเจริญได้ดีที่สุด และเจริญได้ดีในช่วงระยะ 41 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อ $4.37 \times 10^8$ CFU./g. รองลงมาคือเชื้อ *Azotobacter venilandii* เจริญได้ดีในช่วง ระยะ 27 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ $3.31 \times 10^8$ CFU./g. เชื้อ *Azospirillum brasilense* สามารถเจริญได้ดีในช่วงระยะ 27 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ $1.58 \times 10^8$ CFU./g. และ *Acetobacter diazotrophicus* สามารถเจริญได้ดีในช่วงระยะ 20 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมารณ $1.38 \times 10^8$ CFU./g. ตามลำดับ ดังตารางที่ 20

**การเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (Mixed)**

ผลการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนทั้ง 4 สกุล คือ *Azotobacter venilandii*, *Beijerinckia indica*, *Azospirillum brasilense* และ *Acetobacter diazotrophicus* ซึ่งได้ทำการคลุกเชื้อทั้ง 4 สกุล ไว้ด้วยกัน ผลการทดลองปรากฏว่า เชื้อ *Beijerinckia indica* มีความสามารถในการอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เจริญเหมาะสมได้ดีในช่วงระยะ 41 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อมีประมาณ $6.03 \times 10^7$ CFU./g. รองลงมาคือเชื้อ *Azotobacter venilandii* เจริญได้ดีในช่วงระยะ 27 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อมีประมาณ $3.24 \times 10^7$ CFU./g. CFU เชื้อ *Azospirillum brasilense* สามารถเจริญได้ดีในช่วงระยะ 27 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อมีประมาณ $3.39 \times 10^6$ CFU./g. และเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* สามารถเจริญได้ดีในช่วงระยะ 20 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อมีประมาณ $1.91 \times 10^6$ CFU./g. ตามลำดับ ดังตารางที่ 21

Copyright by Mahidol University

4.2 การทดสอบการตรึงไนโตรเจนของเชื้อจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนโดย Acetylene Reduction Activity ( ARA )

ผลการวิเคราะห์อัตราการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter veriliandii* ,*Beijerinckia indica, Azospirillum brasilense* และ *Acetobacter diazotrophicus* ในปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล

ผลการทดลองการวิเคราะห์ อัตราการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ ทั้ง 4 สกุล คือ *Azotobacter veriliandii* ,*Beijerinckia indica, Azospirillum brasilense, Acetobacter diazotrophicus* และเชื้อผสม (Mixed) ผลการทดลองปรากฏว่า เชื้อ *Beijerinckia indica* มีอัตราการตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุด อัตราการตรึงไนโตรเจนจะอยู่ในช่วง 41 วันแรกของการทดลองสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 51.33 μ mole/g./hr. *Azotobacter venilandii* อัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 27 วันแรกของการทดลองสามารถ ตรึงไนโตรเจนได้ 44.64 μ mole/g./hr. *Azospirillum brasilense* อัตราการตรึงไนโตรเจนจะอยู่ในช่วง 27 วันแรกของการทดลอง ตรึงไนโตรเจนได้ 33.71 μ mole/g./hr. เชื้อผสม ( Mixed ) อัตราการตรึงไนโตรเจนจะอยู่ในช่วง 34 วันแรกของการทดลอง สามารถตรึงไนโตรเจนได้ปริมาณ 32.12 μ mole/g./hr. *Acetobacter diazotrophicus* อัตราการตรึงไนโตรเจนจะอยู่ในช่วง 20 วันแรกของการทดลองสามารถตรึงไนโตรเจนได้ปริมาณ 27.12 μ mole/g./hr. ตามลำดับ ดังตารางที่ 22

จากการทดลองเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน มีชีวิตอยู่ได้ในปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล ในปริมาณที่จะทำเป็นปุ๋ยชีวภาพได้ ในเวลาน้อยกว่า 60 วัน ซึ่งการทดลองนี้มีความแตกต่างจากการทดลองของสมใจและบรรหาญ (35) (36) ซึ่งรายงานว่าเชื้อ *Azotobacter* และเชื้อ *Azospirillum* สามารถเจริญเติบโตในดินพีทได้ถึง 4 เดือน หลังจากใช้เชื้อ และจากรายงานของ บรรหาญ ซึ่งรายงานว่าการใช้วัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ดทำปุ๋ยชีวภาพ นับว่าไม่เหมาะสมที่จะทำเป็นสารพาหะของเชื้อ *Azotobacter* เพราะปริมาณและกิจกรรมของเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็ว เพราะวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ดอาจถูกเชื้อเห็ดนำเอาสารอินทรีย์บางชนิดไปใช้และส่วนในดินพีทนำไปใช้เล็กน้อย เมื่อนำมาทำเป็นสารพาหะจึงสามารถปลดปล่อยสารอินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อเชื้อ Azotobacter จึงทำให้เชื้อยังคงเหลืออยู่ในปริมาณที่สูงในดินพีท

จากการทดลองพบว่า อัตราการตรึงไนโตรเจนของเชื้อสูงและเป็นเวลานานตามลำดับดังนี้ ( ตารางที่ 22 และแผนภาพที่ 13 ) *Beijerinckia indica* > *Azotobacter venilandii* > *Azospirillum brasilense* > Mixed ( เชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ) > *Acetobacter diazotrophicus* > Control ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน (5) ได้รายงานว่า เชื้อ *Beijerinckia indica* และเชื้อ

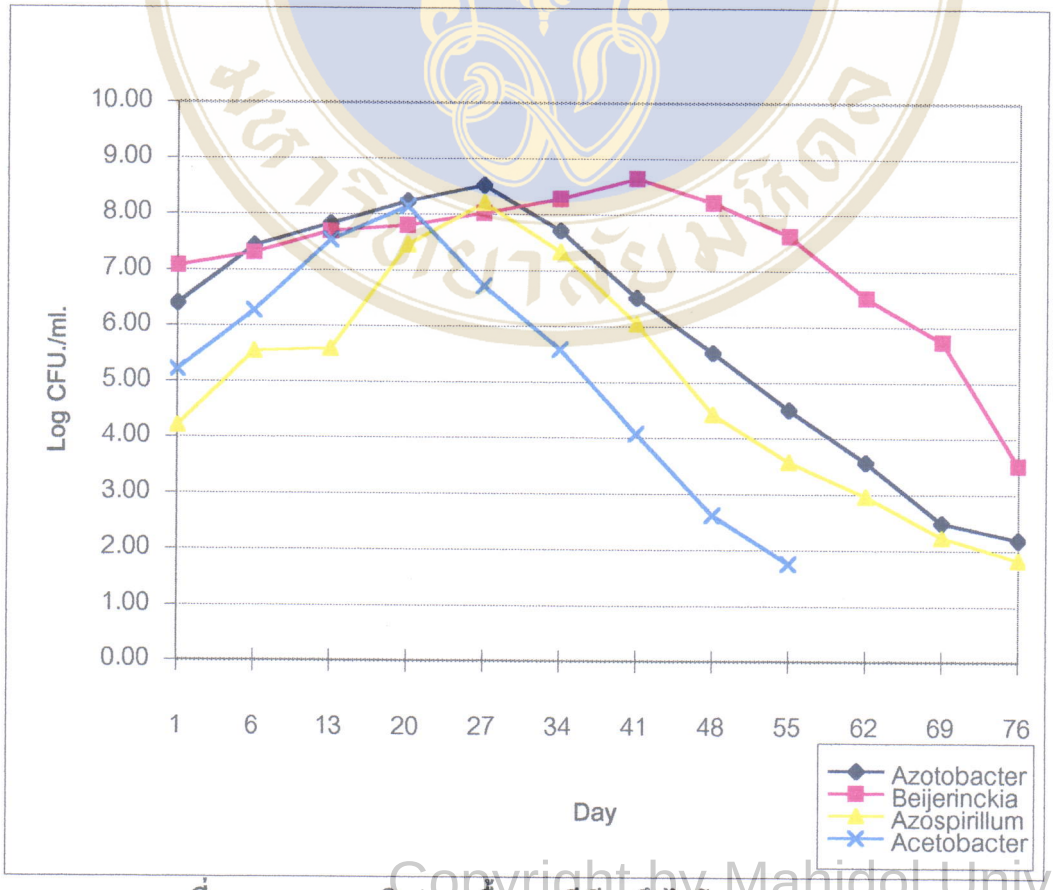
Copyright by Mahidol University

*Azotobacter venilandii* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศและสามารถตรึงไนโตรเจนได้ แม้ว่ามีออกซิเจนอยู่ด้วยก็ตาม ทั้งนี้เพราะเชื้อทั้งสองชนิดมีเมือกคอยป้องกันออกซิเจนที่จะมารบกวนในขบวนการตรึงไนโตรเจน ซึ่งเป็นขบวนการ Reduction ส่วนเชื้อ *Azospirillum brasilense* และ *Acetobacter diazotrophicus* ขบวนการตรึงไนโตรเจนจะเกิดเมื่อมีออกซิเจนน้อยเท่านั้น

Copyright by Mahidol University

**ตารางที่ 20 แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ( หน่วย = log CFU./ml. )**

| Day | *Azotobacter* | *Beijerinckia* | *Azospirillum* | *Acetobacter* |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 6.40 | 7.07 | 4.20 | 5.22 |
| 6 | 7.44 | 7.31 | 5.54 | 6.28 |
| 13 | 7.83 | 7.69 | 5.59 | 7.54 |
| 20 | 8.23 | 7.80 | 7.45 | 8.14 |
| 27 | 8.52 | 8.02 | 8.20 | 6.73 |
| 34 | 7.71 | 8.28 | 7.33 | 5.59 |
| 41 | 6.52 | 8.64 | 6.05 | 4.08 |
| 48 | 5.53 | 8.21 | 4.42 | 2.62 |
| 55 | 4.51 | 7.62 | 3.57 | 1.76 |
| 62 | 3.57 | 6.52 | 2.96 | |
| 69 | 2.49 | 5.73 | 2.23 | |
| 76 | 2.19 | 3.51 | 1.83 | |

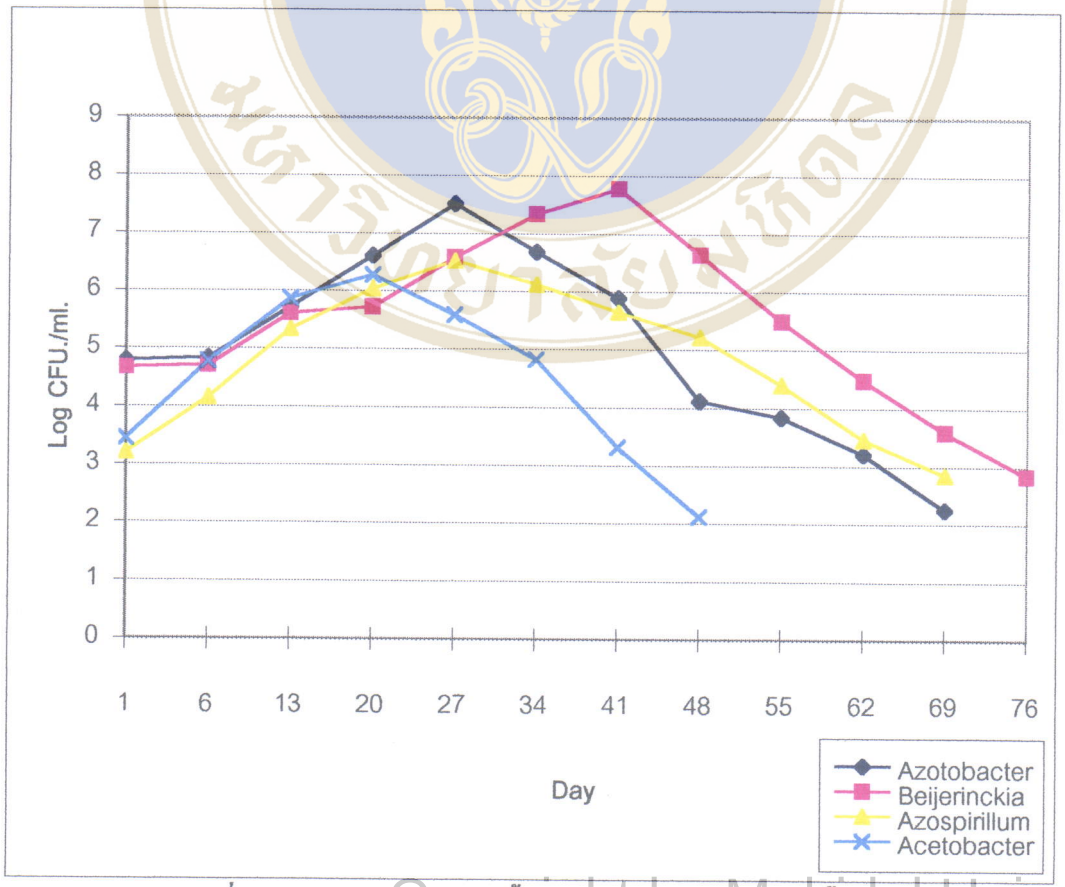



**ภาพที่ 11 แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน**

Copyright by Mahidol University

**ตารางที่ 21 แสดงการเจริญของเชื้อผสม ( หน่วย = log CFU./ml. )**

| Day | *Azotobacter* | *Beijerinckia* | *Azospirillum* | *Acetobacter* |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4.79 | 4.67 | 3.20 | 3.45 |
| 6 | 4.84 | 4.71 | 4.15 | 4.78 |
| 13 | 5.72 | 5.61 | 5.34 | 5.87 |
| 20 | 6.61 | 5.72 | 6.04 | 6.28 |
| 27 | 7.51 | 6.58 | 6.53 | 5.59 |
| 34 | 6.68 | 7.34 | 6.12 | 4.83 |
| 41 | 5.89 | 7.78 | 5.65 | 3.32 |
| 48 | 4.12 | 6.64 | 5.22 | 2.12 |
| 55 | 3.84 | 5.49 | 4.39 | |
| 62 | 3.21 | 4.48 | 3.46 | |
| 69 | 2.25 | 3.59 | 2.85 | |
| 76 | | 2.84 | | |

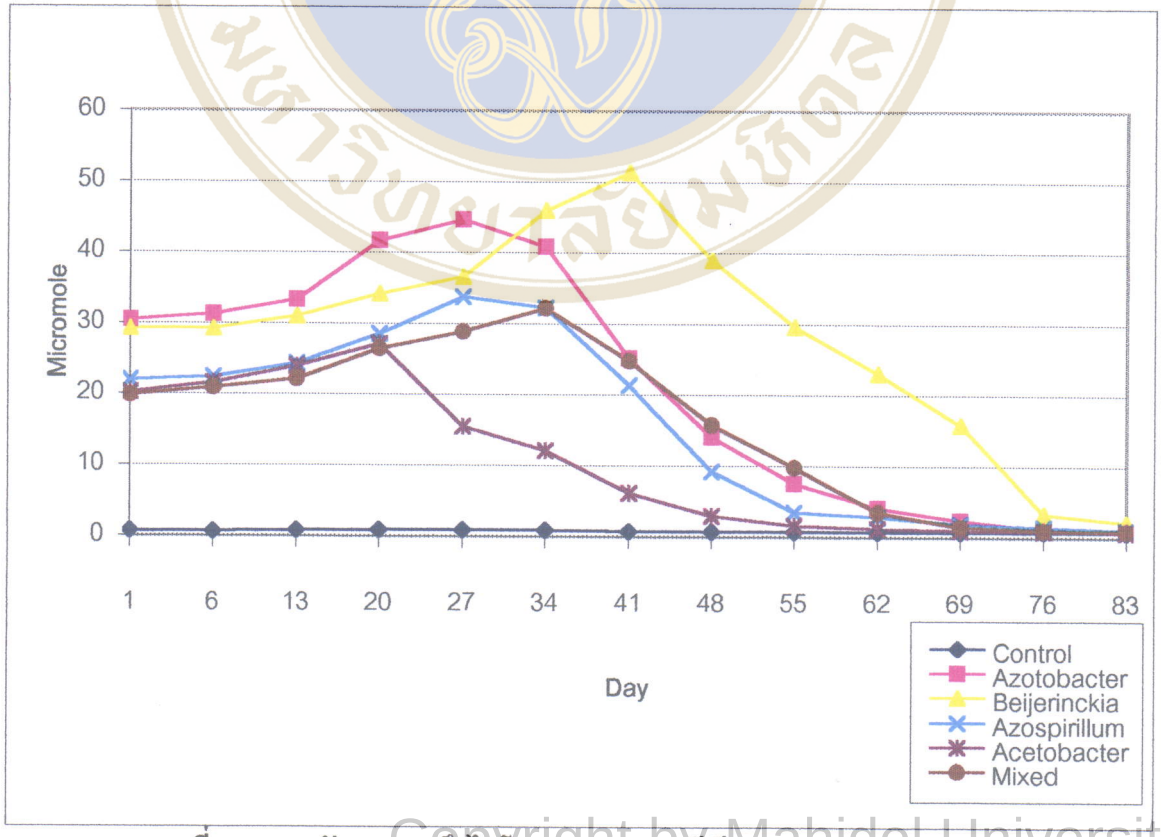



**ภาพที่ 12 แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเชื้อผสม**

Copyright by Mahidol University

**ตารางที่ 22 แสดงอัตราการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย**

| Day | Control | *Azotobacter* | *Beijerinckia* | *Azospirillum* | *Acetobacter* | Mixed |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.73 | 30.41 | 29.19 | 21.99 | 20.20 | 19.87 |
| 6 | 0.67 | 31.27 | 29.21 | 22.40 | 21.57 | 20.94 |
| 13 | 0.82 | 33.29 | 30.91 | 24.32 | 23.89 | 22.14 |
| 20 | 0.91 | 41.68 | 34.11 | 28.53 | 27.12 | 26.39 |
| 27 | 0.89 | 44.64 | 36.55 | 33.71 | 15.47 | 28.82 |
| 34 | 0.91 | 40.84 | 45.87 | 32.23 | 12.11 | 32.12 |
| 41 | 0.78 | 25.14 | 51.33 | 21.35 | 6.08 | 24.73 |
| 48 | 0.75 | 14.04 | 38.98 | 9.21 | 2.98 | 15.81 |
| 55 | 0.78 | 7.49 | 29.60 | 3.44 | 1.55 | 9.71 |
| 62 | 0.72 | 4.10 | 22.99 | 2.85 | 1.18 | 3.50 |
| 69 | 0.79 | 2.36 | 15.78 | 1.90 | 1.01 | 1.44 |
| 76 | 0.84 | 1.13 | 3.21 | 1.43 | 0.93 | 1.01 |
| 83 | 0.75 | 1.02 | 2.10 | 1.07 | 0.78 | 0.94 |




**ภาพที่ 13 แสดงอัตราการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย**

Copyright by Mahidol University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยมหิดล

# บทที่ 5

# สรุปและข้อเสนอแนะ

## 1. สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษา ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยเชื้อแบคทีเรียในปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล สรุปได้ว่า

### 1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

1.1.1 อุณหภูมิ ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในปุ๋ยหมักกากตะกอน

1.1.2 ความชื้น ในระหว่างการทดลองต้องมีการควบคุม ความชื้นให้อยู่ในระดับที่ 60 เปอร์เซนต์

1.1.3 pH ผลการวิเคราะห์ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ค่า pH ที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 6.5-6.8

### 1.2 คุณสมบัติทางเคมี

1.2.1 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ Total Nitrogen ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ผลการวิเคราะห์ Total Nitrogen หลังการทดลอง พบว่าในสิ่งทดลองต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปุ๋ยหมักกากตะกอน+*Beijerinckia* มีปริมาณไนโตรเจนมากที่สุด รองลงมาคือ ปุ๋ยหมักกากตะกอน+ *Azotobacter* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน+*Azospirillum* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน+ *Acetobacter* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน+ เชื้อผสม และ Control ตามลำดับ และได้ทำการเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยการหาค่า Total Nitrogen ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลองผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Azospirillum* ,*Acetobacter* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และMixed ( เชื้อผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ ) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ Control ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Copyright by Mahidol University

1.2.2 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ Total Phosphorus ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ผลการวิเคราะห์ Total Phosphorus หลังการทดลอง พบว่าในสิ่งทดลองต่างๆ คือ Control ปุ๋ยหมักกากตะกอน , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Azotobacter* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Beijerinckia* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Azospirillum* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Acetobacter* และเชื้อ Mixed ปุ๋ยหมักกากตะกอน+ เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าในสิ่งทดลองต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และได้ทำการเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยการหาค่า Total Phosphorus ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า *Azotobacter, Beijerinckia, Azospirillum, Acetobacter*, Mixed ( เชื้อผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ )และ Control ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.2.3 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ Total Potassium ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ผลการวิเคราะห์ Total Potassium หลังการทดลอง พบว่าในสิ่งทดลองต่างๆ คือ Control ปุ๋ยหมักกากตะกอน , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Azotobacter* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Beijerinckia* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Azospirillum* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Acetobacter* และเชื้อ Mixed ปุ๋ยหมักกากตะกอน+ เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าในสิ่งทดลองต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และได้ทำการเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยการหาค่า Total Potassium ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า *Azotobacter, Beijerinckia, Azospirillum, Acetobacter*, Mixed ( เชื้อผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ )และ Control ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.2.4 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ Organic matter ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ผลการวิเคราะห์ Organic matter หลังการทดลองในสิ่งทดลองต่างๆ คือ Control ปุ๋ยหมักกากตะกอน, ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Azotobacter* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Beijerinckia* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Azospirillum* , ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Acetobacter* และเชื้อ Mixed ปุ๋ยหมักกากตะกอน+ เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าในสิ่งทดลองต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และได้ทำการเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยการหาค่า Organic matter ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า *Beijerinckia, Azospirillum ,Acetobacter*, Mixed ( เชื้อผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ ) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ, *Azotobacter* ผลการวิเคราะห์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ Control ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Copyright by Mahidol University

1.2.5 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ C/N ratioในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ผลการวิเคราะห์ C/N ratio หลังการทดลองในสิ่งทดลองต่างๆ คือ Control ปุ๋ยหมักกากตะกอน, ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Azotobacter*, ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Beijerinckia*, ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Azospirillum*, ปุ๋ยหมักกากตะกอน + *Acetobacter* และเชื้อ Mixed ปุ๋ยหมักกากตะกอน+ เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าในสิ่งทดลองต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และได้ทำการเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยการหาค่า C/N ratio ในปุ๋ยหมักกากตะกอนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Azospirillum* ,*Acetobacter*, Mixed ( เชื้อผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ ) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ Control ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.3 คุณสมบัติทางชีวภาพ

1.3.1 ศึกษาการเจริญของปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในปุ๋ยหมักกากตะกอน จากผลการวิเคราะห์พบว่า เชื้อ *Beijerinckia indica* มีความสามารถในการเจริญได้ดีที่สุด โดยเจริญได้ดีในช่วงระยะ 41 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ $4.37 \times 10^8$ CFU./g. สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานถึง 62 วัน รองลงมาคือ เชื้อ *Azotobacter venilandii* เจริญได้ดีในช่วงระยะ 27 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ $3.31 \times 10^8$ CFU./g. สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานถึง 41 วัน เชื้อ *Azospirillum brasilense* เจริญได้ดีในช่วงระยะ 27 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ $1.58 \times 10^8$ CFU./g. สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานถึง 41 วัน และ *Acetobacter diazotrophicus* เจริญได้น้อยที่สุด คือเจริญได้ดีในช่วงระยะ 20 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ $1.38 \times 10^8$ CFU./g. สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานถึง 27 วัน และจากการศึกษาการเจริญของปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ในถัง Mixed เชื้อผสม ทั้ง 4 สายพันธุ์ ผลการวิเคราะห์พบว่า เชื้อ *Beijerinckia indica* มีความสามารถในการอยู่รอด และเจริญได้ดีที่สุด เจริญได้ดีในช่วงระยะ 41 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อประมาณ $6.03 \times 10^7$ CFU./g. รองลงมาคือ *Azotobacter venilandii* เจริญได้ดีในช่วงระยะ 27 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ $3.24 \times 10^7$ CFU./g. เชื้อ *Azospirillum brasilense* สามารถเจริญได้ดีในช่วงระยะ 21 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ $3.39 \times 10^6$ CFU./g. และเชื้อ *Acetobacter diazotrophicus* เจริญได้น้อยที่สุด คือเจริญได้ดีในช่วง 20 วันแรกของการทดลอง อัตราการเจริญของเชื้อมีประมาณ $1.91 \times 10^6$ CFU./g.

Copyright by Mahidol University

1.3.2 ศึกษาการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียในปุ๋ยหมักกากตะกอนจากผล การวิเคราะห์พบว่า *Beijerinckia indica* มีอัตราการตรึงไนโตรเจน ได้สูงที่สุด อัตราการตรึงไนโตรเจนจะอยู่ในช่วง 41 วันแรกของการทดลอง สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 51.33 μ mole/g./hr. รองลงมาคือ *Azotobacter venilandii* อัตราการตรึงไนโตรเจน อยู่ในช่วง 27 วันแรกของการทดลอง สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 44.64 μ mole/g./hr. *Azospirillum brasilense* อัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 21 วันแรกของการทดลอง ตรึงไนโตรเจนได้ 33.71 μ mole/g./hr. เชื้อผสม Mixed อัตราการตรึงไนโตรเจนจะอยู่ในช่วง 34 วันแรกของการทดลอง สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 32.12 μ mole/g./hr. และ *Acetobacter diazotrophicus* ตรึงไนโตรเจนได้น้อยที่สุด อัตราการตรึงไนโตรเจนจะอยู่ในช่วง 20 วันแรกของการทดลอง ตรึงไนโตรเจนได้ 27.12 μ mole/g./hr.

## 2. ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

จากการศึกษาเรื่อง ประสิทธิภาพและสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียในปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล นั้นผู้วิจัยได้มีข้อเสนอแนะดังต่อไปนี้

2.1 ปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล ก่อนนำมาทดลองทุกครั้ง ต้องนำปุ๋ยหมักกากตะกอนมากอง และเกลี่ยผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ผึ่งไว้ในที่ร่มเพื่อให้มีปริมาณความชื้นอยู่ในระดับเดียวกัน

2.2 ระหว่างทำการหมักเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล ต้องควบคุมความชื้นให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม คืออยู่ระหว่าง 60-65 % ทำได้โดยการปิดฝาถังพลาสติก เพื่อกันความชื้นไม่ให้ระเหยออก และเติมน้ำอยู่ตลอดเวลาเมื่อความชื้นลดลง

2.3 การคลุกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับปุ๋ยหมักกากตะกอน ควรมีการคลุกเคล้าให้ทั่วถึง และระหว่างทำการทดลอง ควรมีการพรวนปุ๋ยหมักกากตะกอนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อไม่ให้เชื้อกระจุกอยู่ในจุดๆเดียว และเป็นการช่วยเพิ่มช่องว่างระหว่างดินซึ่งจะช่วยในการควบคุมความชื้นในถังทดลองให้มีความชื้นอยู่ในระดับที่เหมาะสม

2.4 จากข้อสรุปจากการวิจัยในครั้งนี้ จะเห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้สูงในการนำปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล เป็นสารพาหะในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพและสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแต่ละสาย

Copyright by Mahidol University

พันธุ์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำปุ๋ยหมักกากตะกอนจากโรงงานน้ำตาล ไปใช้ในงานเกษตรกรรม และเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยสำหรับผู้ที่สนใจในโอกาสต่อไป

Copyright by Mahidol University

# รายการอ้างอิง

1. สัมฤทธิ์ ชัยวรรณคุปต์. การปรับปรุงดิน และการใช้ปุ๋ยสำหรับพืชเศรษฐกิจในดินไร่. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร; 2541.
2. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย สำนักงานปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม.(2540-2541). โรงงานน้ำตาลในประเทศไทย. กระทรวงอุตสาหกรรม.
3. สถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. โครงการศึกษาผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2541.
4. แผนพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตอ้อยระยะ 5 ปี.(2540-2544).
5. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน.เอกสารวิชาการปุ๋ยชีวภาพ. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดินกองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร; 2539.
6. สุมิตรา ภูวโรดม. ปุ๋ยชีวภาพเพื่อการเกษตร. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง; 2532
7. ยงยุทธ โอสถสภา.หลักการผลิตและการใช้ปุ๋ย.ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2536.
8. สรสิทธิ์ วัชโรทยาน. คู่มือการปรับปรุงดินและการใช้ปุ๋ย.คณะกรรมการจัดกิจกรรมเพื่อเพิ่มกองทุน ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2535.
9. Muraoka et al. Management of crop residues in sugarcane and cotton system in Brazil. In soil organic Matter Management for Sustainable Agriculture; 1994.
10. Paneque,V.M.and M.A. Martinez. Filter cake as a substitute for chemical fertilizers for Sugarcane grown in a yellowish ferralitic soil, Cultivos Tropicales; 1992.
11. I brahim,M.N. Ahmad,and A.Khan. Use of pressmud as a source of phosphorous for crop production. Pakistan Journal of Scientific and industrial Rsearch; 1993.
12. Shannon,E. Salting effects reduced by mill mud, BSES Bulletin; 1994.
13. Deshmukh,V.N,et,al,. Effects of pressmud cake on the availability of nutrients in Black Soil, Journal of Maharashtra Agricultural Universities; 1993.
14. Cairo,C.P.et.al.Effect of filter mud press on the structural properties of a plastuc dark soil. Centro Azucar; 1994.

Copyright by Mahidol University

15. ชัยกฤษ์ สุวรรณรัตน์. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2536.

16. อรรถสิทธิ์ บุญธรรม และคณะ. การเพิ่มจำนวนครั้งและปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนเพื่อเพิ่มผลผลิตอ้อยในเขตน้ำฝน. รายงานผลงานวิจัยอ้อยประจำปี 2537 ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร; 2537.

17. ถวิล ครุฑกุล. การใช้ปุ๋ยกับอ้อย. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 15 โครงการวิจัยและแนะนำทางเทคโนโลยีดินและปุ๋ย ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2533.

18. ปรีชา พราหมมณีย์ และคณะ. การสำรวจการจัดการดิน และการใช้ปุ๋ยของเกษตรกรของไร่อ้อย. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร; 2540.

19. เกษมศรี ซับซ้อน. ปฐพีวิทยา. ศูนย์ฝึกอบรมวิศวกรรมเกษตร บางพูน; 2536.

20. Mishustin,E.N.and V.K.Shil nikova.Biological Fixation of Atmospheric nitrogen. London the macmillan press limited; 1971.

21. Moore,A.W._Nonsymbiotic nitrogen fixation in soil .plant system.Soil Fert; 1966.

22. Bergersen,F.J. The central reaction of Nitrogen fixation. Plant and Soil, Special Volum;_1971.

23. Ard-El-Malek,Y. Free living nitrogen Fixing bacteria in Egyption Soil and their pessible Contribution to Soil Fertility._Plant and Siol. special Volum; 1971.

24. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน. เอกสารวิชาการงานวิจัยชีวภาพ เล่ม 2 . กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร; 2541.

25. Dobereiner , J. Forages grasses and grain crops, p 535-555. In F.J. Bergersen (ed) Methods of evaiuation biolosical nitrogan fixation – john uiley and sons ltd. Chichester, united kingdom; 1980.

26. Shende,S.T.,G.B.Rudrajsha,Rajani Apte and R.S. Rourt. Azotobacter inoculatien Nitrigen economy and respense of sorghum CsH1.In cereal Nitrogenfixation. Proceedings of the working group meeting held at ICRTSAT Center India; 1986.

27. สมศักดิ์ วังใน.จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน.ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2528.

28. พัชรี วีระนนท์. การศึกษาเบื้องต้นในการย่อยสลายเศษปลาเพื่อการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ กรณีศึกษาเศษปลาของโรงงานปลากระป๋อง.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร มหาวิทยาลัยมหิดล; 2538.

Copyright by Mahidol University

29. มณฑา สุริยะไชยปราการ. อิทธิพลของปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยเคมีบางชนิดต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวโพดหวาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2531.

30. สุริยา สาสน์รักกิจ. การประเมินประสิทธิภาพของอินทรีย์วัสดุเหลือใช้บางชนิดในการใช้เป็นปุ๋ยไนโตรเจนในนาข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2531.

31. นันทกร บุญเกิด และบรรหาญ แตงฉ่ำ. สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร; 2536.

32. ภาควิชาจุลชีววิทยา. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2536.

33. กลุ่มงานวิจัยเคมีดิน. วิธีวิเคราะห์ดินและพืช. กองปฐพีวิทยา.กรมวิชาการเกษตร; 2537.

34. ประสพ วีระกรพานิช. อินทรีย์วัตถุและปุ๋ยอินทรีย์. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรปุ๋ยชีวภาพ. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร; 2544.

35. สมใจ ปฏิยุทธ และบรรหาญ แตงฉ่ำ. งานวิจัยปุ๋ยชีวภาพ เล่มที่ 1 เปรียบเทียบการมีชีวิตของเชื้อ *Azospirillum brasilense* ในพีทและอาหารเหลว. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร; 2538.

36. สมใจ ปฏิยุทธ และบรรหาญ แตงฉ่ำ. งานวิจัยปุ๋ยชีวภาพ เล่มที่ 1 เปรียบเทียบการมีชีวิตของเชื้อ *Azotobacter chroococcum* ในพีทและอาหารเหลว. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร; 2538.

Copyright by Mahidol University

# ภาคผนวก ก
# วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดิน

**การวิเคราะห์ไนโตรเจนในดิน** โดยวิธีของ Kjeldahl เป็นวิธี Wet oxidation ทำให้ไนโตรเจนในดินเปลี่ยนมาอยู่ในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$

สารเคมี ( Reagents ) ที่ใช้ประกอบด้วย

1. กรดกำมะถัน ( Sulfuric acid, $H_2SO_4$ ) เข้มข้น 95-97 % sp. gr. 1.84
2. สารผสม Catalyst : $K_2SO_4$ : $CuSO_4$ : Se poder 100 : 10 :1 ( บดให้ละเอียด )
3. Sodium hyroxide NaOH 10 N : ชั่ง NaOH 400 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร เก็บในภาชนะที่มีฝาปิดเพื่อป้องกันไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) เข้าไปได้
4. Boric acid indicator solution 2 % ( pH ประมาณ 5.0 )
   4.1 Mixed indicator : ชั่ง 0.066 กรัม Bromocresol green และ 0.033 กรัม Methl red ใส่ใน Volumetric fiask ขนาด 100 มล. ละลายด้วย Ethanol ทำให้ปริมาตรเป็น 100 มล.
   4.2 ละลายกรด Boric ( $H_3BO_3$ ) 20 กรัม ในน้ำร้อน 700 มล. วางทิ้งไว้ให้เย็น
   4.3 เติม Ethanol 200 มล. และ 20 มล. Mixed indicator และกรด $H_3BO_3$ 700 มล. ลงใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร เติม NaOH 0.05 N ประมาณ 3-4 มล. จนกระทั่ง 1 มล. ของ Boric acid indicater เปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนเมื่อเติมน้ำกลั่น 1 มล.
5. Standard sulfuric 0.02 N. $H_2SO_4$ : เติมกรด $H_2SO_4$ ความเข้มข้น 1N (ampoule) 20 มล. ลงใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นผสมและทำปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการ

1. การย่อย (Digestion)

ชั่งตัวอย่างดินซึ่งร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม. 1.000 กรัมใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 100 ม. ในการบรรจุดินตัวอย่างส่งไปใน flask ต้องระวังอย่าให้ดินหก และเกาะอยู่ที่คอ flask เติมสารผสม catalyst ประมาณ 1 กรัม และตวงกรด $H_2SO_4$ ที่เข้มข้น 5 มล. ลงไป เขย่าเบาๆ เพื่อให้ดินและกรดร่วมเข้าด้วยกัน. ทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมงนำไปวางบนเตา digest ต้มด้วยไฟอ่อนๆ ในระยะแรกแล้วเพิ่มไฟให้แรงขึ้นขณะ digest ควรหมุน flask ไปรอบๆ เป็นครั้งคราว เพื่อช่วยให้มีการคลุกเคล้ากันดีขึ้น เมื่อสีของเหลวใน flask เริ่มใส digest ต่อไปอีก

Copyright by Mahidol University

ประมาณ 30 นาที จึงยก flask ออกจากเตาปล่อย flask ทิ้งไว้ให้เย็น ริมน้ำกลั่นล้างรอบๆ คอ flask ประมาณ 10-15 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วรอจนของเหลวใน flask เย็นเท่าอุณหภูมิของห้อง แล้วถ่ายใส่ volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มล. เขย่าให้สารละลายเข้ากัน การวิเคราะห์นี้ต้องทำ blank determination โดยใช้วิธีการต่าง ๆ เหมือนกันกับที่กล่าวมาแล้วทุกประการ แต่ไม่มีตัวอย่างดินเท่านั้น

2. การกลั่น (Distillation)
   2.1 เปิดเครื่องกลั่นและล้างเครื่องกลั่น 1 ครั้ง โดยการกลั่นน้ำผ่านเครื่องกลั่น
   2.2 รินน้ำยา Boric acid indicator 2 % ประมาณ 5 มล. ใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มล. นำไปวางไว้ในที่รองรับของเครื่องกลั่นโดยให้ปลายก้านอยู่เหนือน้ำยา Boric เล็กน้อย (ไม่ควรเกิน 1 ซม.)
   2.3 Pipette ตัวอย่างสารละลายซึ่งย่อยสลายด้วยกรด $H_2SO_4$ จำนวน 10-20 มล. ลงใน distillation flask เริ่มต้นด้วยตัวอย่าง blank ก่อน
   2.4 เติมสารละลาย 10 N. NaOH 5-10 มล. ใน distillation flask ล้างด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย เพื่อขจัดด่างที่ตกค้างให้ไหลลงไปรวมกับตัวอย่างพืช
   2.5 เริ่มกลั่นและจับ $NH^+_4$ ให้ได้ปริมาตรประมาณ 35 มล. จึงหยุดเครื่องกลั่น
   2.6 เอา Erlenmeryer flask ออก ล้างเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะกลั่นตัวอย่างต่อไป
3. การไตเตรท (Titration)
   น่าสารละลายใน Erlenmeryer flask ของแต่ละตัวอย่างที่จะกลั่นได้ Titrate ด้วย Standard $H_2SO_4$ 0.02 N จนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดง จนบันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ คำนวณหาปริมาณไนไตรเจน

<u>การคำนวณ</u>

$$\% N = \frac{N \times (T-B) \times 140}{10}$$

มล. ตัวอย่าง x น้ำหนักดิน 1 กรัม

N = ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ titrate

T = จำนวน มล. ของกรดที่ใช้ titrate กับตัวอย่าง

B = จำนวน มล. ขงอกรดที่ใช้ titrate กับ blank

Copyright by Mahidol University

หมายเหตุ

ต้องทำ blank titration เนื่องจากสารเคมีบางอย่างอาจจะมีไนโตรเจนอยู่เป็น impurity จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์หาว่ามีอยู่เท่าไรเสียก่อน ค่าของ corrected md (T-B) ได้มาโดยการลบค่า มล. ของ blank ออกจาก มล. ที่ได้จากดินตัวอย่าง

**วิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัส**

**วิธที่นิยมในห้องปฏิบัติการคือการย่อย ( Digestion ) ดินด้วยกรด $HC10_4$ เข้มข้น**

วิธีการ

1. เครื่องมือ เครื่อง Spectrophotometer
2. สารเคมี
   - 2.1 $HC10_4$ 70-72 %
   - 2.2 Free acid molybdovanadate solution
     - 2.2.1 ละลาย ammonium molybdate $( NH_4 )_6 Mo_7 O_{24}. 4H_2O$ 20 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 600 มล.
     - 2.2.2 ละลาย ammonium metavanadate $NH_4 VO_3$ 1 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 600 มล.
     - 2.2.3 เทสารละลาย ammonium molybdate ตามข้อ 2.2.1 ลงในสารละลาย ammonium metavanadate ตามข้อ 2.2.2 แล้วปรับให้เป็น 2 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน
   - 2.3 Standard phosphorus solution
     - 2.3.1 Standard phosphorus solution 100 ppm. เตรียมโดยการชั่ง $KH_2PO_4$ ( อบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ) 0.4393 กรัม ใส่ใน Vol. Flask 1,000 ml. ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล.
     - 2.3.2 Standard phosphorus solution 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm. จากข้อ 2.3.1 และทำให้สารละลายมาตราฐานนี้เป็นกรด โดยใช้อัตราส่วน $HC10_4$ : STD. P SOLn = 1 : 10
3. การเตรียมสารละลายจากตัวอย่างดิน

   ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ Kjeldahl flask เติมกรด $HC10_4$ เข้มข้น 10 มล. Digest จนสารละลายใส จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น ประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง ถ่ายลงใน vol. Flask ขนาด 100 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42

Copyright by Mahidol University

4. วิธีเทียบสี

ดูดสารละลายมาตรฐาน P 0, 5, 10, 15 และ 20 ppm P และสารละลายจากดินตัวอย่างละ 5 มล. ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 50 มล. เติมสารละลาย molybdovanadate 5 มล. เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที นำไปวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ Wavelength 420 nm. อ่านค่า % Transmittance ( % ) หรือ Absorbance A นำค่าที่วัดได้จากน้ำยามาตรฐานไปเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกับ %T หรือ A โดยถ้าเป็น %T ให้ใช้กระดาษ semi-logarithm ถ้าเป็น A ใช้กระดาษกราฟธรรมดา จากนั้นเอาค่าที่อ่านได้ของสารละลายดินมาเทียบ Standard curve

5. วิธีคำนวณ

ppm p = ppm จาก curve x dilution factor

**วิธีวิเคราะห์โพแทสเซียม**

1. สารเคมี

1.1 Perchloric acid ( $HClO_4$ ) , conc.

1.2 Standard K solution, 1000 ppm.

2. วิธีการ

2.1 ชั่งดินแห้ง 1 กรัม ใส่ Test tube ขนาด 100 มล. เติม perchloric acid 8-10 มล. แล้วนำไป digest บน digestion block ซึ่งตั้งอยู่ใน fume hood ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 200 องศาเซนเซียส จนสารละลายใส จึงเอาออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล. กรองและเก็บสารละลายส่วนที่ใสไว้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

2.2 วิเคราะห์ K ในสารละลายด้วย Flame photometer หรือ Atomic absorption Spectrophotometer ที่ wavelenght 768 nm.

2.3 ทำ Standard curve ด้วย เพื่อใช้สำหรับคำนวณหาค่า Tatal K ในดิน

3. การคำนวณ

$$\text{Total K, ppm} = \text{ค่าที่อ่านได้ ( ppm )} \times \frac{\text{ปริมาตรของ solution}}{\text{น้ำหนักดิน}} \times \text{dilution factor}$$

Copyright by Mahidol University

หมายเหตุ

1. ขณะ digest ระวังอย่าให้น้ำยาใน digestion tube แห้ง เพราะจะทำให้ธาตุอาหารบางอย่างสูญหายไป และอาจเกิดการระเบิดขึ้นได้
2. การ diges ด้วยวิธีนี้ สามารถนำไปวิเคราะห์หา Total form ของธาตุอื่น ได้ด้วย เช่น Ca, Mg, Na, P ฯลฯ

**การวิเคราะห์อินทรีย์วัตถุ ( Organic matter ) โดยวิธีของ ( Walkley-Black,1984 )**

1. อุปกรณ์
   - 1.1 เครื่องชั่ง ( Analytical balance )
   - 1.2 Volumetric pipete 10 ml.
   - 1.3 Volumetric flask 100 และ 1,000 ml.
   - 1.4 Erlenmeyer flask 250 ml.
   - 1.5 Buret 25 ml.
   - 1.6 Cylinder 100 ml.
2. สารเคมี
   - 2.1 Standard potassium dicromate solution, 1.0 N ละลาย $K_2Cr_2O_7$ ( GR อบที่ 105 องศาเซนเซียส นาน 12 ชั่วโมง ) 49.04 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เป็นสารละลาย 1 ลิตร ใน Volumetric flask
   - 2.2 Conc. Sulfuric acid ใช้กรด $H_2SO_4$ ( GR ) ที่มีความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 98 % ถ้าดินในตัวอย่างมีคลอไรด์ ( Cl ) อยู่มากเติม $Ag_2SO_4$ ลงไปในกรดอัตรา 15 กรัม ต่อกรด $H_2SO_4$ 1 ลิตร
   - 2.3 Redox indicator ใช้ Barium diphenylamine sulfonate ( BDS ) 0.15 % เตรียมโดยละลาย BDS 0.16 กรัม ในน้ำกลั่น 100 ml. หรืออาจใช้ Diphenylamine 0.42 % เตรียมโดยละลาย Diphenylamine 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 20 ml. และ Conc.$H_2SO_4$ 100 ml.
   - 2.4 Ferrous Ammonium S ulfate ( FAS ) solution, 0.5 N ละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2\ 6H_2O$ ( GR ) 196.1 กรัมในน้ำกลั่น 800 มล. ซึ่งมี Conc. $(NH_4)_2(SO_4)_2$ อยู่ 20 มล. แล้วทำให้เป็นสารละลาย 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นใน Volumetric flask เก็บสารละลายในขวดสีน้ำตาล ( เพื่อกันแสง ) และจะต้องปิดจุกให้แน่นเสมอเมื่อเก็บ
   - 2.5 Conc. Phosphoric acid ( $H_3PO_4$ ) 85 %
   - 2.6 Sodium fluoride ( NaF ) ชนิดผง

Copyright by Mahidol University

3. วิธีการ

3.1 ชั่งดินซึ่งบดและผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.2-0.5 มม. หนัก 0.5-2.0 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. เติม Standard 1.0 N $K_2Cr_2O_7$ ลงไป 10.0 มล. โดยใช้ pipet แกว่ง flask เบาๆ เพื่อให้ดินและสารละลายผสมกัน แล้วเติม Conc. $H_2SO_4$ ลง 20 มล. โดยพยายามล้างเม็ดดินให้ลงไปอยู่ในกรดให้หมด อย่าให้เม็ดดินเหลือเกาะอยู่ตามข้าง flask แกว่ง flask ค่อนข้างแรง ประมาณ 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งดินและสารละลายที่ผสมกันอยู่ ( Mixture ) เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง

3.2 เติมน้ำกลั่นลงไป 100 มล. แล้วเติม Conc. $H_2PO_4$ 10 มล. ( และ NaF 0.2 กรัม ในกรณีที่ใช้ diphenylamine เป็น redox indicator หรือจะไม่ใช้ก็ได้ ) แล้วจึงหยด indicator ลงไป 2-3 หยด แกว่ง flask จนของผสม ( Mixture ) เข้ากันดี สีของ mixture จะเป็นสีม่วงปนน้ำเงินหรือสีม่วงแดง

3.3 Titrate mixture ด้วย FAS 0.5 N soiution จาก Buret สีของ mixture จะเป็นสีม่วงเข้มไปเรื่อยๆ จนกระทั่งถึง end point สีของ mixture จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ค่อยๆ หยด FAS ที่ละหยดจนถึง end point สีของ mixture จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวจัด ( Brilliant green )

3.4 เพื่อให้ได้ end point ที่ถูกต้อง เติม Standard 1.0 N $K_2Cr_3O_7$ ลงไปอีก 0.5 มล. เพื่อให้มี Dicromate เหลือใน solution อีก สีของ mixture จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงปนน้ำเงินหรือม่วงแดงอีกครั้ง แล้วค่อยๆ Titrate ต่อ โดยหยด FAS 0.5 N solution ลงไปทีละหยด จนถึง endpoint อีกครั้งหนึ่ง

3.5 ถ้าหากพบว่า ดินตัวอย่างใดมี dichromate เหลืออยู่ในสารละลาย ( ก่อน Titrate ) น้อยมาก คือ น้อยกว่า 2 มล. ( ตอนแรกเติม 1 N $K_2Cr_3O_7$ 10 มล. และถูก Organic carbon ในดิน reduced ไปมากกว่า 8 มล. ในระหว่าง digestion ) ซึ่ง solution จะเป็นสีเขียวก่อนที่จะ Titrate ทำการวิเคราะห์ใหม่ โดยใช้ดินให้น้อยลงกว่าเดิม

3.6 ทำ Blank ซึ่งไม่มีตัวอย่างดินควบคู่ไปด้วยกับการวิเคราะห์ตัวอย่างดินทุกชุด

3.7 ต้องทำการบันทึกจำนวน มล. ของ FAS solution ที่ใช้ในการ Titrate ทั้งของ Blank และของดินตัวอย่าง เพื่อนำเอาไปคำนวณหาปริมาณ O.C ต่อไป

การคำนวณ

$$\% \text{ Organic matter ( OM. )} = 10.5 \times \frac{B-S}{B} \times \frac{0.67}{G}$$

Copyright by Mahidol University

เมื่อ 10.5 = มล. ของ Standard $K_2Cr_2O_7$ ที่ใช้กับ Blank และกับตัวอย่างดิน

B = มล. ของ FAS solution ที่ใช้ Titrate กับ Blank

S = มล. ของ FAS solution ที่ใช้ Titrate กับตัวอย่างดิน

G = มล. น.น ดินเป็นกรัม

Facter 0.67 คำนวณมาจาก ( 1.0 N. ) x $\frac{12}{4,000}$ x $\frac{1.724}{0.77}$ x 100

เมื่อ 1.0 N. = Normality ของ Standard $K_2Cr_2O_7$ ( ถ้าหาก Normality ของ Standard $K_2Cr_2O_7$ แตกต่างไปจาก 1.0 N. สูตรทุกอันคูณด้วย Normality ของ Standard $K_2Cr_2O_7$

$\frac{12}{4,000}$ = meq weight ของ Carbon

หมายเหตุ

1. การเติม Conc.$H_3PO_4$ และ NaF ก็เพื่อจะทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงสีของ Redox indicator เมื่อถึง End point ได้ชัดเจน
2. ถ้าเตรียม Standard $K_2Cr_2O_7$ solution ครั้งละมากๆ normality ของ Standard $K_2Cr_2O_7$ อาจจะไม่เท่ากับ 1.0 N. จริงๆ ในกรณีเช่นนี้จำเป็นต้องเตรียม Standard 1.0 N. $K_2Cr_2O_7$ ที่แน่นอน โดยชั่ง $K_2Cr_2O_7$ 4.904 กรัม ด้วย Analytical balance แล้วทำเป็น 100 มล. เพื่อเอาไปไตเตรตกับ Fas 0.5 N. Solution แล้วเอา Fas 0.5 N. Solution ไป Titrate กับ Standard $K_2Cr_2O_7$ ที่เตรียมคราวละมากๆ แล้วคำนวณ normality $K_2Cr_2O_7$ ที่เตรียมคราวละมากๆ ได้

   1.724 = $\frac{100}{58}$ ( OM.มีคาร์บอน 58 % )

   0.77 = % recovery ของ OC ในดินโดยวิธีนี้เท่ากับ 77

   % Organic Carbon ( OC. ) = $\frac{\%\ OM.}{1.724}$

   % Organic matter ( OM. ) = % OC. X 1.724

Copyright by Mahidol University

# ภาคผนวก ข
# สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

## 1. สูตรอาหาร *Azotobacter*

สูตรอาหารแข็ง ใส่ Agar 15 g.

สูตรอาหารเหลว ไม่ใส่ Ager และYeast

ทำ Dilution plate count ไม่ใส่ Yeast

| | | |
|---|---|---|
| Sucross | 20 | g. |
| $K_2HPO_4$ | 0.05 | g. |
| $KH_2PO_4$ | 0.15 | g. |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.02 | g. |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 | g. |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.002 | g. |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 0.01 | g. |
| Yeast extract | 0.2 | g. |
| Bromthy-mol blue | 2 | ml. |
| Water | 1,000 | ml. |
| pH | 6.8 | |

## 2. สูตรอาหาร *Beijerinckia*

สูตรอาหารแข็ง ใส่ Agar 15 g.

สูตรอาหารเหลว ไม่ใส่ Ager และYeast

ทำ Dilution plate count ไม่ใส่ Yeast

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 20 | g. |
| $KH_2PO_4$ | 1 | g. |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.5 | g. |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 0.01 | g. |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.02 | g. |
| Yeast extract | 0.05 | g. |

Copyright by Mahidol University

| | | |
|---|---|---|
| Water | 1,000 | ml. |
| pH | 5 | |

**3. สูตรอาหาร *Azospirillum***

สูตรอาหารแข็ง ใส่ Agar 15 g.

สูตรอาหารเหลว ไม่ใส่ Agar และ Yeast

ทำ Dilution plate count ไม่ใส่ Yeast extract

| | | |
|---|---|---|
| Malic acid | 5 | g. |
| $K_2HPO_4$ | 0.1 | g. |
| $KH_2PO_4$ | 0.4 | g. |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 | g. |
| NaCl | 0.1 | g. |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.02 | g. |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 0.01 | g. |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.002 | g. |
| KOH | 4 | g. |
| Yeast extract | 0.2 | g. |
| Bromthy-mol blue | 2 | ml. |
| Weter | 1,000 | ml. |
| pH | 6.8 | |

**4. สูตรอาหาร *Acetobacter***

สูตรอาหารแข็ง ใส่ Agar 15 g.

สูตรอาหารเหลว ไม่ใส่ Agar,Yeast และ เติม N

ทำ Dilution plate count ไม่ใส่ Yeast extract

| | | |
|---|---|---|
| Sucross | 100 | g. |
| $K_2HPO_4$ | 0.2 | g. |
| $KH_2PO_4$ | 0.6 | g. |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 | g. |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.02 | g. |

Copyright by Mahidol University

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.002 | g. |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 0.01 | g. |
| Yeast extract | 0.05 | g. |
| Bromthy-mol blue 0.5 ml. Solution in 0.2 N. KOH | 5 | ml. |
| Water | 1,000 | ml. |
| pH | 6.8 | |

Copyright by Mahidol University

# ภาคผนวก ค

## ผลการทดลอง

1. คุณสมบัติทางกายภาพ

1.1 อุณหภูมิ

ตารางที่ 23 อุณหภูมิก่อนการทดลอง

| อุณหภูมิ ( ครั้ง ) | หน่วย ( องศาเซนเซียส ) |
|---|---|
| 1 | 32.5 |
| 2 | 32 |
| 3 | 32 |
| 4 | 31.5 |
| 5 | 32 |
| Mean | 32 |

ตารางที่ 24 อุณหภูมิหลังการทดลอง

| อุณหภูมิ ( ครั้ง ) | หน่วย ( องศาเซนเซียส ) |
|---|---|
| 1 | 32 |
| 2 | 32.5 |
| 3 | 31.5 |
| 4 | 32 |
| 5 | 32 |
| Mean | 32 |

Copyright by Mahidol University

1.2 ความชื้น

ตารางที่ 25 ความชื้นก่อนการทดลอง

| ความชื้น ( ครั้ง ) | หน่วย ( เปอร์เซนต์ ) |
|---|---|
| 1 | 2.76 |
| 2 | 2.38 |
| 3 | 2.65 |
| 4 | 2.45 |
| 5 | 2.41 |
| Mean | 2.53 |

1.3 pH

ตารางที่ 26 pH ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| pH ( ครั้ง ) | ก่อนการทดลอง | หลังการทดลอง |
|---|---|---|
| 1 | 6.50 | 6.60 |
| 2 | 6.72 | 6.80 |
| 3 | 6.60 | 6.74 |
| 4 | 6.80 | 6.50 |
| 5 | 6.77 | 6.76 |

Copyright by Mahidol University

2. คุณสมบัติทางเคมี

ตารางที่ 27 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ก่อนการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน ( ครั้ง ) | Total nitrogen ( g.N./pot. ) |
|---|---|
| 1 | 109.6 |
| 2 | 112.0 |
| 3 | 110.4 |
| 4 | 108.0 |
| 5 | 108.8 |
| 6 | 110.4 |
| 7 | 108.0 |
| 8 | 108.8 |
| 9 | 109.6 |
| 10 | 112.0 |
| 11 | 110.4 |
| 12 | 109.6 |
| 13 | 112.0 |
| 14 | 110.4 |
| 15 | 112.0 |
| 16 | 111.2 |
| 17 | 112.2 |
| 18 | 111.2 |
| Mean | 110.31 |

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 28 ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ก่อนการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน ( ครั้ง ) | Total phosphorus ( g.P./pot. ) |
|---|---|
| 1 | 118.4 |
| 2 | 118.4 |
| 3 | 116.8 |
| 4 | 118.4 |
| 5 | 120.8 |
| 6 | 120.0 |
| 7 | 117.6 |
| 8 | 116.8 |
| 9 | 118.4 |
| 10 | 118.4 |
| 11 | 115.2 |
| 12 | 116.8 |
| 13 | 115.2 |
| 14 | 117.6 |
| 15 | 119.2 |
| 16 | 116.8 |
| 17 | 119.2 |
| 18 | 119.2 |
| Mean | 117.96 |

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 29 ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด ก่อนการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน ( ครั้ง ) | Total Potassium ( g.K./pot. ) |
|---|---|
| 1 | 84.8 |
| 2 | 84.0 |
| 3 | 88.0 |
| 4 | 84.8 |
| 5 | 87.2 |
| 6 | 84.8 |
| 7 | 89.6 |
| 8 | 87.2 |
| 9 | 86.4 |
| 10 | 84.0 |
| 11 | 84.8 |
| 12 | 88.0 |
| 13 | 85.6 |
| 14 | 88.8 |
| 15 | 84.8 |
| 16 | 89.6 |
| 17 | 87.2 |
| 18 | 88.0 |
| Mean | 86.53 |

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 30 ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ก่อนการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน ( ครั้ง ) | Organic matter ( g.O.M./pot. ) |
|---|---|
| 1 | 2969.6 |
| 2 | 3072.8 |
| 3 | 3208.0 |
| 4 | 3708.0 |
| 5 | 3277.6 |
| 6 | 3213.6 |
| 7 | 3616.8 |
| 8 | 3305.6 |
| 9 | 3129.6 |
| 10 | 3072.0 |
| 11 | 3625.6 |
| 12 | 3079.2 |
| 13 | 3143.2 |
| 14 | 3609.6 |
| 15 | 3391.2 |
| 16 | 2969.6 |
| 17 | 3065.6 |
| 18 | 3193.6 |
| Mean | 3258.37 |

Copyright by Mahidol University

ตารางที่ 31 ปริมาณ C/N ratio ก่อนการทดลอง

| ปุ๋ยหมักกากตะกอน ( ครั้ง ) | C/N ratio |
|---|---|
| 1 | 11.34 |
| 2 | 11.09 |
| 3 | 11.25 |
| 4 | 11.50 |
| 5 | 11.42 |
| 6 | 11.25 |
| 7 | 11.50 |
| 8 | 11.42 |
| 9 | 11.34 |
| 10 | 11.09 |
| 11 | 11.25 |
| 12 | 11.34 |
| 13 | 11.09 |
| 14 | 11.25 |
| 15 | 11.09 |
| 16 | 11.17 |
| 17 | 11.17 |
| 18 | 11.17 |
| Mean | 11.26 |

Copyright by Mahidol University

# ภาคผนวก ง
## สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน ( Analysis of Variance; ANOVA ) ทดสอบความแตกต่างของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแต่ละปัจจัย

**วิเคราะห์ไนโตรเจน**

**ตารางที่ 32 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนในกลุ่มทดลอง**

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 5 | 214.0800000 | 42.8160000 | 16** |
| ERROR | 12 | 30.7200000 | 2.5600000 | |
| TOTAL | 17 | 244.8000000 | | |

cv = 1.4 %

** = significant at 1 % level

| TREATMENT | RANKS | MEANS |
|---|---|---|
| Control | 6 | 111.200 d |
| Azotobacter | 2 | 117.333 b |
| Beijerinckia | 1 | 122.133 a |
| Azospirillum | 3 | 115.200 bc |
| Acetobacter | 4 | 114.133 cd |
| Mixed | 5 | 113.600 cd |
| MEAN | | 115.600 |

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

Copyright by Mahidol University

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี LSD.

ตารางที่ 33 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 6 | 286.0391143 | 47.6731857 | 21.73** |
| ERROR | 14 | 30.7200000 | 2.1942857 | |
| TOTAL | 20 | 316.7591143 | | |

cv = 1.3 %

** = significant at 1 % level

| TREATMENT | MEANS | DIFFERENCE |
|---|---|---|
| T1 ( CONTROL 1) | 110.310 | - |
| T2 ( CONTROL 2) | 111.200 | 0.890 ns |
| T3 AZOTOBACTER | 117.333 | 7.023 ** |
| T4 BEIJERINCKIA | 122.133 | 11.823 ** |
| T5 AZOSPIRILLUM | 115.200 | 4.890 ** |
| T6 ACETOBACTER | 114.133 | 3.823 ** |
| T7 MIXED | 113.600 | 3.290 * |
| MEAN | 114.844 | |

** = significant at 1 % level

* = significant at 5 % level

ns = not significant

| Comparison | S.E.D. | LSD ( 5% ) | LSD( 1% ) |
|---|---|---|---|
| 2-T means | 1.209 | 2.594 | 3.600 |

Copyright by Mahidol University

## วิเคราะห์ฟอสฟอรัส

ตารางที่ 34 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสในกลุ่มทดลอง

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 5 | 3.67333333 | 0.73466667 | <1 |
| ERROR | 12 | 31.70666667 | 2.64222222 | |
| TOTAL | 17 | 35.38000000 | | |

cv = 1.4 %

| TREATMENT | RANKS | MEANS |
|---|---|---|
| Control | 5 | 118.133 a |
| Azotobacter | 2 | 118.933 a |
| Beijerinckia | 1 | 119.200 a |
| Azospirillum | 6 | 117.867 a |
| Acetobacter | 4 | 118.600 a |
| Mixed | 3 | 118.667 a |
| MEAN | | 118.567 |

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

Copyright by Mahidol University

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี LSD.

ตารางที่ 35 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 6 | 4.67916190 | 0.77986032 | <1 |
| ERROR | 14 | 31.57333333 | 2.25523810 | |
| TOTAL | 20 | 36.25249524 | | |

cv = 1.3 %

| TREATMENT | MEANS | DIFFERENCE |
|---|---|---|
| T1 ( CONTROL 1) | 117.960 | - |
| T2 ( CONTROL 2) | 118.133 | 0.173 ns |
| T3 AZOTOBACTER | 118.933 | 0.973 ns |
| T4 BEIJERINCKIA | 119.200 | 1.240 ns |
| T5 AZOSPIRILLUM | 117.867 | -0.093 ns |
| T6 ACETOBACTER | 118.667 | 0.707 ns |
| T7 MIXED | 118.667 | 0.707 ns |
| MEAN | 118.490 | |

ns = not significant

| Comparison | S.E.D. | LSD ( 5% ) | LSD ( 1% ) |
|---|---|---|---|
| 2-T means | 1.226 | 2.630 | 3.650 |

Copyright by Mahidol University

## วิเคราะห์โพแทสเซียม

ตารางที่ 36 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณโพแทสเซียมในกลุ่มทดลอง

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 5 | 2.3111111 | 0.4622222 | <1 |
| ERROR | 12 | 100.2666667 | 8.3555556 | |
| TOTAL | 17 | 102.5777778 | | |

cv = 3.3 %

| TREATMENT | RANKS | MEANS |
|---|---|---|
| Control | 2 | 86.667 a |
| Azotobacter | 3 | 86.400 a |
| Beijerinckia | 1 | 87.467 a |
| Azospirillum | 2 | 86.667 a |
| Acetobacter | 4 | 86.400 a |
| Mixed | 2 | 86.667 a |
| MEAN | | 86.711 |

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

Copyright by Mahidol University

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี LSD.

ตารางที่ 37 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณโพแทสเซียมก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 6 | 2.3954571 | 0.3992429 | <1 |
| ERROR | 14 | 100.2666667 | 7.1619048 | |
| TOTAL | 20 | 102.6621238 | | |

cv = 3.1 %

| TREATMENT | MEANS | DIFFERENCE |
|---|---|---|
| T1 ( CONTROL 1) | 86.530 | - |
| T2 ( CONTROL 2) | 86.667 | 0.137 ns |
| T3 AZOTOBACTER | 86.400 | -0.130 ns |
| T4 BEIJERINCKIA | 87.467 | 0.937 ns |
| T5 AZOSPIRILLUM | 86.667 | 0.137 ns |
| T6 ACETOBACTER | 86.400 | -0.130 ns |
| T7 MIXED | 86.667 | 0.137 ns |
| MEAN | 86.685 | |

ns = not significant

| Comparison | S.E.D. | LSD ( 5% ) | LSD ( 1% ) |
|---|---|---|---|
| 2-T | 2.185 | 4.687 | 6.504 |

Copyright by Mahidol University

## วิเคราะห์อินทรีย์วัตถุ

ตารางที่ 38 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณอินทรีย์วัตถุในกลุ่มทดลอง

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 5 | 89160.2844 | 17832.0569 | 1.07 ns |
| ERROR | 12 | 199175.2533 | 16597.9378 | |
| TOTAL | 17 | 288335.5378 | | |

cv = 4.4 %

ns = not significant

| TREATMENT | RANKS | MEANS |
|---|---|---|
| Control | 1 | 3056.80 a |
| Azotobacter | 2 | 2985.07 a |
| Beijerinckia | 6 | 2834.67 a |
| Azospirillum | 4 | 2910.67 a |
| Acetobacter | 5 | 2893.87 a |
| Mixed | 3 | 2942.67 a |
| MEAN | | 2937.29 |

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

Copyright by Mahidol University

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี LSD.

ตารางที่ 39 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณอินทรีย์วัตถุก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 6 | 354256.7756 | 59042.7959 | 4.15 * |
| ERROR | 14 | 199175.2533 | 14226.8038 | |
| TOTAL | 20 | 553432.0290 | | |

cv = 4.0 %

* = significant at 5 % level

| TREATMENT | MEANS | DIFFERENCE |
|---|---|---|
| T1 ( CONTROL 1) | 3258.37 | - |
| T2 ( CONTROL 2) | 3056.80 | -201.57 ns |
| T3 AZOTOBACTER | 2985.07 | -273.30 * |
| T4 BEIJERINCKIA | 2834.67 | -423.70 ** |
| T5 AZOSPIRILLUM | 2910.67 | -347.70 ** |
| T6 ACETOBACTER | 2893.87 | -364.50 ** |
| T7 MIXED | 2942.67 | -315.70 ** |
| MEAN | 2983.16 | |

** = significant at 1 % level

* = significant at 5 % level

ns = not significant

| Comparison | S.E.D. | LSD ( 5% ) | LSD ( 1% ) |
|---|---|---|---|
| 2-T means | 97.39 | 208.89 | 289.90 |

Copyright by Mahidol University

**วิเคราะห์ C/N ratio**

**ตารางที่ 40 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณ C/N ratio ในกลุ่มทดลอง**

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 5 | 7.12313333 | 1.42462667 | 25.54 ** |
| ERROR | 12 | 0.66946667 | 0.05578889 | |
| TOTAL | 17 | 7.79260000 | | |

cv = 2.4 %

** = significant at 1 % level

| TREATMENT | RANKS | MEANS |
|---|---|---|
| Control | 1 | 11.003 a |
| Azotobacter | 5 | 9.307 c |
| Beijerinckia | 6 | 9.040 c |
| Azospirillum | 4 | 9.933 b |
| Acetobacter | 3 | 10.057 b |
| Mixed | 2 | 10.100 b |
| MEAN | | |

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

Copyright by Mahidol University

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี LSD.

ตารางที่ 41 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบปริมาณ C/N ratio ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| TREATMENT (T) | 6 | 11.83273333 | 1.97212222 | 41.24 ** |
| ERROR | 14 | 0.66946667 | 0.04781905 | |
| TOTAL | 20 | 12.50220000 | | |

cv = 2.2 %

** = significant at 1 % level

| TREATMENT | MEANS | DIFFERENCE |
|---|---|---|
| T1 ( CONTROL 1) | 11.260 | - |
| T2 ( CONTROL 2) | 11.003 | -0.257 ns |
| T3 AZOTOBACTER | 9.307 | -1.953 ** |
| T4 BEIJERINCKIA | 9.040 | -2.220 ** |
| T5 AZOSPIRILLUM | 9.933 | -1.327 ** |
| T6 ACETOBACTER | 10.057 | -1.203 ** |
| T7 MIXED | 10.100 | -1.160 ** |
| MEAN | 10.100 | |

** = significant at 1 % level

ns = not significant

| Comparison | S.E.D. | LSD ( 5% ) | LSD ( 1% ) |
|---|---|---|---|
| 2-T means | 0.179 | 0.383 | 0.531 |

Copyright by Mahidol University

# ประวัติผู้วิจัย

| | |
|---|---|
| ชื่อ | นาย สุธา ไอยราคม |
| วัน เดือน ปีเกิด | 27 กุมภาพันธ์ 2516 |
| สถานที่เกิด | อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช |
| ประวัติการศึกษา | ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง (ปวส.)<br>วิทยาลัยประมงสงขลาดิณสูลานนท์<br>พ.ศ. 2532-2536<br>วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)<br>สถาบันราชภัฏจันทรเกษม<br>พ.ศ. 2536-2538<br>วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)<br>สาขา เทคโนโลยีการวางแผนสิ่งแวดล้อม<br>เพื่อพัฒนาชนบท มหาวิทยาลัยมหิดล<br>พ.ศ. 2540-2544 |
| ที่อยู่ | 39/274 หมู่บ้านอรุณนิเวศน์ ซอย อมรวิวัฒน์<br>ถนน สุขาภิบาล 1 คลองกุ่ม บึงกุ่ม<br>กรุงเทพมหานคร 10230 |

Copyright by Mahidol University

## SUMMARY

**Study on Efficiency of Nitrogen Fixation By Bacteria In Composted Filter Sludge From Sugar Mill.**

This study was the experimental research by using 4 kinds of Bacteria which had ability in fixing Nitrogen viz *Azotobacter venilandii*, *Beijerinckia indica*, *Azospirillum brasilense*, *Acetobacter diazotrophicus*. I had studied the efficiency of Nitrogen fixation by Bacteria in the composted filter sludge from the sugar mill.

**1. Objectives**

1.1 To Study the efficiency of Nitrogen fixation by each kind of Bacteria in the composted filter sludge of the sugar mill

1.2 To study the increase of the quantity and surviving ability of each kind of Nitrogen-fixing Bacteria after it was fermented with the composted filter sludge of the sugar mill

1.3 To increase the value of the composted filter sludge of the sugar mill by making the composted filter sludge as the carrier of Bacteria which could fix Nitrogen

**2 Method of study**

As for the treatments, I had fermented 4 kinds of the Nitrogen-fixing-Bacteria with the composted filter sludge from the sugar mill in order to find the efficiency of Nitrogen fixation by each kind of Bacteria. I had planned the treatments as Completely.

Randomized Design (CRD) by dividing the treatments into 6 treatments 3 Repetitions as fallows;

Treatment 1. Control Composted Filter Sludge

Treatment 2. *Azotobacter venilandii*+Composted Filter Sludge

Treatment 3. *Beijerinckia indica*+Composted Filter Sludge

Treatment 4. *Azospirillum brasilense*+Composted Filter Sludge

Treatment 5. *Acetobacter diazotrophicus*+Composted Filter Sludge

Treatment 6. Mixed Mied among 4 kinds of Bacteria


Copyright by Mahidol University

This treatment would be divided into 2 parts as follows;

Part 1 : To raise 4 kinds of bacteria in the liquid medium in order to be made as the liquid Bacteria for preparing to ferment with the composted filter sludge

Part 2 : To find the total average humidity of the composted filter sludge from the sugar mill by spreading the composted filter sludge on the floor so that the humidity of the composted filter sludge which would be used in the treatment equally had average humidity. The average humidity of the composted filter sludge was 2.53%. After that, 5,130 grams of composted filter sludge would be put in each plastic bin. There were 6 treatments 3 repetitions. The treatments were done as follows; 4 kinds of Bacteria, viz *Azotobacter venilandii*, *Beijerinckia indica*, *Azospirillum brasilense*, *Acetobacter diazotrophicus*, Mixed and Comtrol which derived from raising in the liquid medium or liquid Bacteria would be brought to calculate to find the beginning Bacteria quantity. This could be done by measuring the optical density of 4 kinds of liquid Bacteria, comparing with the graph showing the growth of each kind of Nitrogen-fixing-Bacteria, and calculating to find the beginning Bacteria quantity which would be used in the treatments. The growing rate of each kind of liquid Bacteria was not equal. There fore, it was necessary to find the value of the beginning Bacteria quantity of each kind of Bacteria so that the Bacteria quantity used in the treatments would equally have the beginning rate. As for the treatments 4 kinds of liquid Bacteria would be fermented with the composted filter sludge by having 3 components as follows; liquid Bacteria quantity derived from calculation, fertilised distilled water, and the composted filter sludge.

The quantity of bacteria which were calculated were as follows; Control consisted of 2,870 ml. Of water and 5,130 grams of the composted filter sludge put in the bin. OD. Of *Azotobacter venilandii* was 0.726 . There were 1,560 ml. Of *Azotobacter venilandii*, 1,310 ml. Of water, and 5,130 grams of the composted filter sludge put in the bin. OD of *Beijerinckia indica* was 0.845. There were 1,746 ml. Of the Bacteria, 1,124 ml. Of water, and 5,130 grams of the composted filter sludge put in the bin. OD of *Azospirillum brasilens,* was 0.712. There were 1,403 ml. Of this Bacteria, 1,467 ml. Of water and 5,130 grams of the composted filter sludge put in the bin. OD of *Acetobacter diazotrophicus* was 0.721. There were 1,718 ml. of this Bacteria 1,152 ml. of water, and 5,130 grams of the composted filter sludge put in the bin. Mixed was four kinds of bacteria quantity put in the bin. The mixing ratio was as follows; 390 ml. of *Azotobacter venilandii*, 436.5 ml. of *Beijerinckia indica*, 350.75 ml. of *Azospirillum brasilense*, 429.5 ml. of

Copyright by Mahidol University

*Acetobacter diazotrophicus*, 1,263.25 ml. of water, 5,130 grams of the composted filter sludge per bin.

The example of the composted filter sludge which was fermented with the Nitrogen-fixing-Bacteria would be kept when the treatment of 1,6,13,20,27,34,41,48,55,62,69 and 76 days was done until the Bacteria quantity decreased.

The example of the composted filter sludge which was fermented with the Nitrogen-fixing–Bacteria was brought to anulyse to find various properties which could be divided into 3 cutegorie as follows; Physical properties were temperature and humidity. Chemical properties were Nitrogen, Phosphorus, Potassium, Organic matter, C/N ratio,and pH. And Biological properties were Dilution plate count, Most Probable Number and Acetylene Reduction Activity ( ARA ). After various properties, of the composted filter sludge were analysed, the results of the analysis, viz temperature humidity, Nitrogen, Phosphorus, Potassium, Organic matter, C/N ratio and pH. Would be brought to compure the difference before the treatment and after the treatment. After that the study of the growing rate of each Nitrogen-fixing-Bacteria was conducted Then the study of the rate of Nitrogen fixation by Bacteria from the beginning to the end of the treatment was conducted in order to bring the results to consider the efficiency of Nitrogen fixation by Bacteria in the composted filter sludge from the sugar mill and to khow the suitable time for using the composted filter sludge in the farm in the future

## 3 Summary of treatment results

3.1 Physical

3.1.1 Temperature.Before the treatment and after the treatment, the average temperature was 32 $^{0}$C which did not effect the growing rate of the Nitrogen-fixing-Bacteria in the composted filter sludge.

3.1.2 Humidity. During the treatment, the humidity must be controlled to be 60 %

3.1.3 pH. The result of analysis before the treatment and after the treatment found that pH was between 6.5-6.8

Copyright by Mahidol University

3.2 Chemical properties

3.2.1 The study to compare the quantity of total Nitrogen in the composted filter sludge before the treatment and after the treatment was conducted. The results of analysing total Nitrogen after the treatment found that various things of the treatment had difference at the statistic significance. The composted filter sludge+*Beijerinckia* extremely had Nitrogen quantity. Second were the composted filter sludge+*Azotobacter*, the composted filter sludge+*Azospirillum*, the composted filter sludge+*Acetobacter*, the composted filter sludge+Mixed, and Control respectively. The comparison of the Nitrogen-fixing-Bacteria was done by finding the value of total Nitrogen in the composted filter sludge before the treatment and after the treatment. The result of statistic analysis found that *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter* had difference at the statistic significance. And Mixed ( Mixed of 4 kinds of Bacteria ) had difference at the statistic significance. And Control had no difference at the statistic significance.

3.2.2 The study to compare the quantity of total Phosphorus in the composted filter sludge before the treatment and after the treatment was conducted. The results of analysing total phosphorus after the treatment found that various things of the treatment, viz Control of the composted filter sludge the composted filter sludge+*Azotobacter*, the composted filter sludge+*Beijerinckia*, the composted filter sludge+*Azospirillum*, the composted filter sludge+*Acetobacter*, and Mixed of the composted filter sludge+4 kinds of Bacteria had no difference at the statistic significance. And the comparison of the Nitrogen-fixing-Bacteria was done by finding the value of total Phosphorus in the composted filter sludge before the treatment and after the treatment. The result of statistic analysis found that *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, Mixed ( Mixed of 4 kinds of Bacteria ) and Control had no difference at the statistic significance.

3.2.3 The study to compare the quantity of total Potassium in the composted filter sludge. Before the treatment and after the treatment was conducted. The results of analysing total Potassium after the treatment found that various things of the treatment, viz Control of the composted filter sludge, the composted filter sludge+*Azotobacter*, the composted filter sludge+*Beijerinckia*, the composted filter sludge+*Azospirillum*, the composted filter sludge+*Acetobacter* and Mixed of the composted filter sludge+4 kinds of Bacteria had no difference at the statistic significance. And the comparison of the Nitrogen-fixing-Bacteria was done by finding the value of total Potassim in the composted filter sludge before the treatment and

Copyright by Mahidol University

after the treatment. The result of statistic analysis found that *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, Mixed ( Mixed of 4 kinds of Bacteria ) and Control had no difference at the statistic significance.

3.2.4 The study to compare the quantity of the organic matter in the composted filter sludge before the treatment and after the treatment was conducted. The The results of analysing the organic matter after the treatment found that various thinhs of the treatment,viz Control of the composted filter , sludge the composted filter sludge+ *Azotobacter*, The composted filter sludge +*Beijerinckia* the composted fiter sludge +*Azospirillum*, the composted filter sludge+*Acetobacter* and Mixed of the composted filter sludge+four kinds of Bacteria had no difference at the statistic significance. And the comparison of Nitrogen-fixing Bacteria was do ne by finding the value of the organic matter in the composted filtter sludge before the treatment, and after the treatment. The result of statistic,analysis found that *Beijerinckia*, *Azospirillum*,*Acetobacter*, Mixed ( Mixed of kind of Bacteria ) had difference at the statistic significance. The result of analysis found that *Azotobacter* had difference aat the statistic significence. And Control had no difference at the statistic significience.

3.2.5 The study to compare the quantity of C/N ratio in the composted, filter sludge before the treatment and after the treatment was conducted. The result of analysing C/N ratio after the Treatment found that Ovarious things of the treatment VIZ Control of the composted filter sludge , the composted filter sludge+*Azotobacter*, the composted filter sludge+*Beijerinckia*, the composted filter sludge + *Azospirillum*, the composted filter sludge +*Acetobacter*, and Mixed of the compostd filter sludge+4 kinds of Bacteria had difference at the statistic significance. And the coparison of the Nitrigen-fixing Bacteria was done by finding the value of C/N ratio in the composted filter sludge before the treatment and aftr the treatment. Yhe result of statistic analysis found that *Beijerinckia* ,*Azotobacter*,*Azospirillum*,*Acetobacter*,Mixed (mixed 0f 4 kinds of bacteria) had difference at the statistic significance. And Control had no differnce at the statistic significance.

3.3 Biological properties

3.3.1 The study of growth of the Nitrogen-fixing Bacteria in the composted filter sludge was conducted. The result of analysis found that *Beijerinckia indica* had best-growing-ability during the first 41 days of the treatment.The growing rate of this Bacteria was approx $4.37 \times 10^8$ CFU/g This Bacteria could be kept for 60 days.*Azotobacter venilandii* culd well

Copyright by Mahidol University

grow during the first 27 days of the treatment. The growing rate Bacteria was approx 3.31 $x10^8$ CFU/g . This Bacteria could be kept for 4 1 days. *Azospirillum brasilense* could well grow during the first 27 days of the treatment. The growing rate of this Bacteria was approx 1.58 $x10^8$ CFU/g . This Bacteria could be kept for 41 days.And *Acetobacter diazotrophicus* least grew. This Bacteria could well grow during the first 20 days of the treatment. The growing rate of this Bacteria was approx 1.38 $x10^8$ CFU/g. This Bacteria could be kept for 27 days. And after the study of the growth of the Nitrogen-fixing Bacteria in the bin of Mixed of 4 kinds of Bacteria was conducted, the resuls of analysis found that *Beijerinckia indica* had best-growing and surviring ability. This Bacteria could well grow during the first 41 days of the treatment. The growing rate of this Bacteria was approx 6.03 $x10^7$ CFU/g. *Azotobacter venilandii* could well grow during the first 27 days of the treatment. The growing rate of this Bacteria was approx 3.24 $x10^7$ CFU/g. *Azospirillum brasilense* could well grow in the first 21 days of the treatment. The growing rate of this Bacteria was approx 3.39 $x10^6$ CFU/g. And *Acetobacter diazotrophicus* could least grow. It could well grow in the first 20 days of the treatment. The growing rate of this Bacteria was approx 1.91 $x10^6$ CFU/g.

3.3.2 The study of Nitrogen fixation by Bacteria in the composted filter sludge was conducted. The results of analysis found that *Beijerinckia indica* had the highest rate of Nitrogen fixation. The Ntrogen-fixation-rate was in the first 41 days of the treatment. It could fix Nitrogen by 51.33 μ mole/g./hr. *Azotobacter venilandii* had the Nitrogen-fixing-rate during the first 27 days of the treatment. It could fix Nitrogen by 44.64 μ mole/g./hr. *Azospirillum brasilense* had the Nitrogen-fixing-rate during the first 21 days of the treatment. It could Nitrogen by 33.71 μ mole/g./hr. Mixed had the Nitrogen-fixing-rate during the first 34 days of the treatment. It could fix Nitrogen by 32.12 μ mole/g./hr. And *Acetobacter diazotrophicus* could least fix Nitrogen. The Nitrogen-fixing-rate was in the first 20 days of the treatment. It could fix Nitrogen by 27.12 μ mole/g./hr.

## 4. Recommendations

After studying the efficiency of Nitrogen fixation by Bacteria in the composted filter sludge from the sugar mill, the researcher had the following recommendations,

Copyright by Mahidol University

4.1 Before doing the treatment every time, people had to pile, mix, and dry the composted filter sludge in the shade in order to have the quantity of humidity in the same level.

4.2 While fermenting the Nitrogen-fixing-Bacteria with the composted filter sludge from the sugar mill, people had to control the humidity to be in the suitable level between 60-65 % by closing the lid of the plastic bin in order to prevent the humudity from evaporation. And people had to fill the water at all times when the humidity decreased

4.3 People should thoroughly ferment the Nitrogen-fixing-Bacteria with the composted filter sludge. During the treatment, people should break up the composted filter sludge at all times in order to prevent the Bacteria from clustering in the same place and to help in increase the gap between the soil, which would help control the humidity in the bin to be in the suitable level

4.4 The summary of this research enabled us to know that it was possible from people to use the composted filter sludge from the sugar mill as the carrier from the growth of Nitrogen-fixing-Bacteria. And it made us know the efficiency of Nitrogen fixation by each kind of Bacteria which was useful for people to use the composted filter sludge from the sugar mill in the agriculture. And this could be the guideline from the interested people to do the research in the future .

Copyright by Mahidol University