บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ความสำคัญและสถานการณ์ของการใช้ปุ๋ย

จากหลักฐานทางโบราณคดีพบว่ามนุษย์เริ่มทำการเพาะปลูกเมื่อประมาณ 10,000-12,000 ปีมาแล้วเพื่อตอบสนองความต้องการอาหารในการดำรงชีพ (สันติภาพ ปัญจพรรค์, 2527) และจากนั้นก็ได้มีการพัฒนารูปแบบและวิธีการในการเพาะปลูกเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน พร้อมๆ กับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของประชากรโลก ทำให้ความต้องการผลิตผลทางการเกษตรเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย แต่จากการใช้พื้นที่ดินในการเพาะปลูกเป็นระยะเวลานาน ทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินอยู่ในสถานะภาพที่ต่ำลงมาก หรือมีปริมาณธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการปลูกพืช การใส่ปุ๋ยเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดินและช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรประเภทของปุ๋ยที่ใช้ได้แก่ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ (เกษมศรี ซับซ้อน, 2541) โดยปุ๋ยที่มีบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มผลผลิตทางเกษตรและใช้กันอย่างแพร่หลายคือปุ๋ยเคมี ซึ่งมีอัตราการใช้เพิ่มมากขึ้นตลอดเวลา

จากรายงานของ Schultz ในปี ค.ศ.1992 (อ้างถึงในปิยะ ดวงพัตรา, 2538) พบว่าปริมาณการผลิตปุ๋ยเคมีของโลกในปี พ.ศ.2533/34 ผลิตได้ทั้งสิ้น 147.9 ล้านเมตริกตัน โดยกลุ่มประเทศต่างๆ ที่พัฒนาแล้วผลิตปุ๋ยเคมีได้สูงที่สุด คือ 98.0 ล้านเมตริกตันของธาตุอาหารหลัก ($N+P_2O_5+K_2O$) กลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาผลิตได้น้อยกว่า คือผลิตได้รวมกัน 49.9 ล้านเมตริกตันของธาตุอาหารหลัก ในปัจจุบันการผลิตปุ๋ยเคมีของประเทศต่างๆ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ยกตัวอย่าง เช่น ในช่วง 10 ปีคือ ระหว่างปี พ.ศ.2523/24 ถึงปี 2533/34 ปริมาณการผลิตปุ๋ยเคมีของโลกในปี พ.ศ.2533/34 เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 23.5

ในช่วงปีเดียวกัน คือในปี พ.ศ.2533/34 มีปริมาณการใช้ปุ๋ยน้อยกว่าการผลิตเล็กน้อยคือมีการใช้ปุ๋ยเคมีรวมทั้งสิ้น 137.5 ล้านเมตริกตัน ของธาตุอาหารหลัก ($N+P_2O_5+K_2O$) เมื่อเทียบกับปริมาณการผลิตทั้งหมด 147.9 ล้านเมตริกตัน โดยมีอัตราการใช้เพิ่มขึ้นต่อปีในช่วงระหว่างปี พ.ศ.2523/24 ถึงปี พ.ศ.2533/34 ร้อยละ 1.4 เมื่อเทียบกับปริมาณการผลิตที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 1.7 ต่อปี ชนิดของปุ๋ยเคมีหรือรูปของธาตุอาหารพืชที่มีการใช้มากที่สุดคือ ไนโตรเจน 77.0 ล้านเมตริกตัน รองลงไปคือฟอสฟอรัส 36.0 ล้านเมตริกตันและโพแทสเซียม 24.5 ล้านเมตริกตันตามลำดับ

จากสถิติการนำเข้าปุ๋ยเคมีของประเทศไทยในช่วงที่ผ่านมาคือในช่วงระหว่างปี พ.ศ.2523-2533 พบว่าปุ๋ยเคมีที่ใช้ภายในประเทศไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 ได้จากการนำเข้าจากต่างประเทศ หรือในทางกลับกัน ประเทศไทยมีการผลิตปุ๋ยเคมี โดยใช้วัตถุดิบภายในประเทศเพียงไม่เกินร้อยละ 5 ปุ๋ยที่มีการนำเข้าส่วนใหญ่ หรือไม่น้อยกว่าร้อยละ 75 ของปุ๋ยเคมีที่มีการใช้ทั้งหมดใน

ปี พ.ศ.2533 ได้แก่ปุ๋ยผสมสูตร 16-20-0, 15-15-15 และปุ๋ยเดี่ยว แอมโมเนียมซัลเฟต (21-0-0) และปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) สำหรับในปี พ.ศ.2539 เท่าที่ได้มีสถิติข้อมูลบันทึกไว้ ประเทศไทยนำเข้าปุ๋ยเคมีทุกชนิดจำนวน 3,567,359 เมตริกตัน และปี พ.ศ.2540 คาดว่าจะมีการใช้ปุ๋ยเคมีประมาณ 4 ล้านเมตริกตัน

เชื่อว่าปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีภายในประเทศจะมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพื่อรองรับการพัฒนาการผลิตทางด้านอุตสาหกรรมเกษตรและอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากการขยายตัวทางเศรษฐกิจและความต้องการผลิตผลพืชที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541)

2. ปัญหาที่เกิดจากการใช้ปุ๋ยเคมี

การใช้ปุ๋ยเคมีหรือปุ๋ยวิทยาศาสตร์ในยุคปัจจุบันนี้ เป็นที่ยอมรับของผู้ประกอบอาชีพทางเกษตรกรรม โดยเฉพาะทางด้านการผลิตพืช แต่ถ้ามีการใส่ปุ๋ยให้กับพืชไม่ถูกต้องย่อมจะทำให้เกิดผลทางลบได้ ซึ่งปัญหาหรือโทษของการใส่ปุ๋ยเคมีที่ไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการก็คือ

2.1 ทำให้ต้นทุนการผลิตทางการเกษตรเพิ่มขึ้น

โดยการใช้ปุ๋ยเคมีในปริมาณที่มากเกินความต้องการของพืช ในขณะที่ปุ๋ยเคมีก็มีราคาแพงและราคาของผลผลิตทางการเกษตรก็ไม่แน่นอน ซึ่งเป็นผลทำให้ต้นทุนในการผลิตของพืชเพิ่มขึ้นโดยไม่มีความจำเป็น

2.2 ทำให้คุณสมบัติทางด้านกายภาพของดินเสื่อมลง

สำหรับปุ๋ยเคมีบางชนิด เช่น ปุ๋ยโซเดียมไนเตรท เมื่อมีการใช้ปุ๋ยชนิดนี้ในปริมาณที่มากๆ และติดต่อกันเป็นเวลานาน ก็จะมีผลทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของดินไม่เหมาะสมต่อการการเจริญของพืชได้ เนื่องจากโซเดียมถูกยึดไว้กับอนุภาคของดินเหนียว จึงเป็นเหตุทำให้สภาพของดินแข็งแน่นทึบซึ่งยากต่อการไถพรวน หรืออีกสาเหตุหนึ่งคืออนุมูลไนเตรทถูกพืชดูดไปใช้ประโยชน์แต่ปริมาณของโซเดียมที่เหลือจะถูกสะสมอยู่ในดิน ทำให้โซเดียมทำปฏิกิริยากับกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) เกิดเป็นสารประกอบโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จึงเป็นผลทำให้ดินแข็งและแน่นทึบได้

2.3 ทำให้คุณสมบัติทางเคมีของดินเปลี่ยนไป

จากผลการทดลองของต่างประเทศ พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต ในอัตราที่สูงประมาณ 400 กิโลกรัมต่อไร่ ติดต่อกันเป็นเวลา 10 ปี จะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินลดลงจาก 5.75 เหลือเป็น 4.80 นั่นคือดินจะมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ดังนั้นการใส่ปุ๋ยเคมีในปริมาณที่มากๆ ย่อมมีผลทำให้คุณสมบัติของดินทางด้านเคมีเปลี่ยนแปลงไปจนอาจทำให้เกิดมีปัญหาทางด้านการเกษตรได้

2.4 ทำให้บทบาทและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินบางชนิดลดลง

การใส่ปุ๋ยเคมีที่ไม่ถูกต้อง อาจจะมีผลทางอ้อมทำให้กิจกรรมบางอย่างของจุลินทรีย์ดินชะงักลงได้ เช่น โครงสร้างของดินแน่นทึบมากเกินไป จนอาจทำให้อากาศและน้ำในดินมีปริมาณน้อยเกินไปไม่เพียงพอต่อขบวนการต่างๆ สำหรับกิจกรรมในดินได้ (เกษมศรี ซับซ้อน, 2541)

3. ความสำคัญของจุลินทรีย์ต่อการปรับปรุงดิน

เนื่องจากปัญหาสำคัญของการใช้ปุ๋ยเคมี คือ มีราคาแพง และหากใช้อย่างไม่ถูกต้องหรือใช้ปริมาณมากเป็นระยะเวลานานก็จะส่งผลเสียต่อคุณภาพของดินได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความสนใจและส่งเสริมให้ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนปุ๋ยเคมีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งปุ๋ยชีวภาพหรือปุ๋ยจุลินทรีย์ ซึ่งนอกจากจะประหยัดต้นทุนการผลิตให้แก่เกษตรกรแล้ว ยังประหยัดแรงงานในการผลิตและช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินให้เป็นไปอย่างยั่งยืนอีกด้วย

3.1 ปุ๋ยชีวภาพ

ปุ๋ยชีวภาพ ตรงกับภาษาอังกฤษว่า biofertlizer หรือ microbial inoculant หมายถึงส่วนผสมที่มีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน จุลินทรีย์ละลายหินฟอสเฟต จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส หรือจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีประโยชน์ต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน ที่เตรียมขึ้นมาเพื่อใส่คลุกลงไปในดินพร้อมกับเมล็ดพืชที่จะปลูก หรือใส่ลงในดินโดยตรงหรือเศษพืชที่ต้องการให้มีการย่อยสลาย โดยมีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์ในอันที่จะเพิ่มธาตุอาหารและเป็นประโยชน์ให้กับพืชได้ นอกจากนี้ปุ๋ยชีวภาพยังครอบคลุมไปถึงปุ๋ยอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยพืชสด ฯลฯ ซึ่งปุ๋ยอินทรีย์เหล่านี้จะปลดปล่อยธาตุอาหารลงสู่ดินและเป็นประโยชน์ต่อพืชเมื่อผ่านกิจกรรมของจุลินทรีย์เสียก่อน (ธงชัย มาลา, 2535)

4. การตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรีย

4.1 ความสำคัญของธาตุไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลัก (macronutrient) ที่มีความสำคัญต่อพืชและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อย่างมาก เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่จะประกอบกันเป็นโปรตีน ช่วยในการเสริมสร้างการเจริญของสิ่งมีชีวิต และเป็นส่วนประกอบขององค์ประกอบที่สำคัญอื่นๆ ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ มีหน้าที่ช่วยเร่งและควบคุมปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตให้ดำเนินไปอย่างปกติ นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในระบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม

คลอโรฟิลล์ เป็นส่วนที่ทำให้ใบไม้มีสีเขียวและมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช นอกจากนั้นสารประกอบที่สำคัญอื่นๆ เช่น วิตามิน (vitamin) และ adenosine triphosphate (ATP) ต่างก็มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย

4.2 แหล่งสะสมของไนโตรเจนบนผิวโลก

ไนโตรเจนบนผิวโลก หมายถึง ไนโตรเจนที่มีอยู่บริเวณเปลือกโลกและในบรรยากาศที่ห่อหุ้มผิวโลกอยู่ ซึ่งมีแหล่งใหญ่ๆ อยู่ 5 แหล่งด้วยกัน คือ

4.2.1 หินกำเนิด (Primary rocks)

ได้แก่ส่วนที่เป็นของแข็งที่หุ้มผิวโลกอยู่ มีไนโตรเจนอยู่มากที่สุด คือ 193 x 10^9 ล้านตัน ไนโตรเจนจำนวนนี้ไม่สามารถที่จะให้ประโยชน์อะไรกับพืชเลย และสามารถที่จะถูกปลดปล่อยออกมาในรูปของก๊าซได้เพียง 5 x 10^6 ตันต่อปี

4.2.2 หินตะกอน (Sedimentary rock)

มีไนโตรเจนสะสมอยู่ประมาณ 0.4 x 10^9 ล้านตัน อยู่ในรูปของสารประกอบแอมโมเนียและไนเตรท

4.2.3 ตะกอนในทะเลลึก (Deep sea sediment)

มีไนโตรเจนอยู่ประมาณ 0.54 x 10^6 ล้านตัน ส่วนมากจะอยู่ในรูปของสารอินทรีย์และแอมโมเนียมที่ยึดติดอยู่กับดินเหนียว

4.2.4 ดินและน้ำ (Soil and water)

มีไนโตรเจนสะสมอยู่ประมาณ 24 x 10^6 ล้านตัน อยู่ในรูปสารประกอบและก๊าซไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ และเป็นส่วนที่พืชจะได้รับประโยชน์โดยตรง

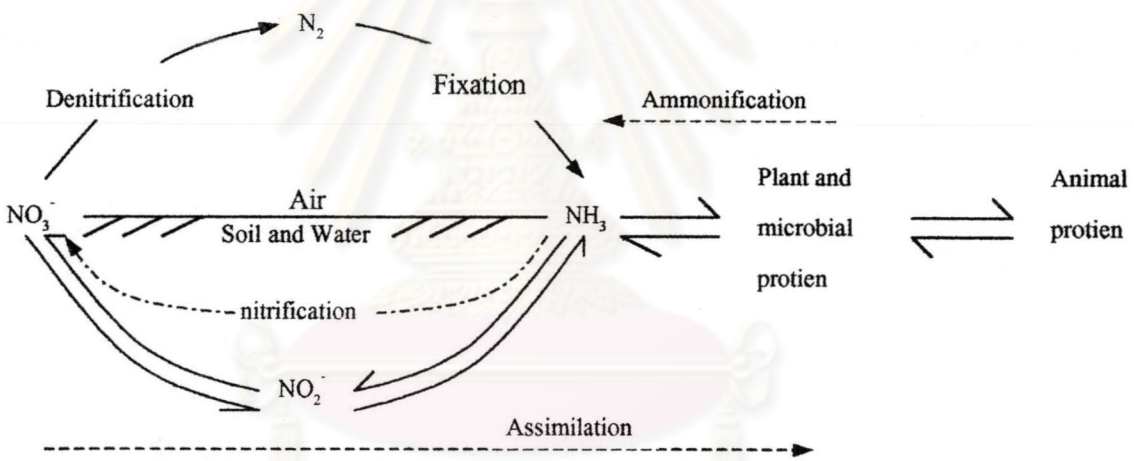
4.2.5 ในอากาศ (Atmosphere)

เป็นแหล่งที่สะสมไนโตรเจนมากเป็นอันดับสองรองจากหินกำเนิด คือ มีถึง 3.9 x 10^9 ล้านตัน อยู่ในรูปของก๊าซสารประกอบชนิดต่างๆ แต่มีมากที่สุดในรูปของก๊าซไนโตรเจน (นันทกร บุญเกิด, 2528)

4.3 วัฏจักรไนโตรเจน

สารอินทรีย์ไนโตรเจนหรือปุ๋ยไนโตรเจนซึ่งอยู่ในดินและน้ำ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีบทบาทต่อการเกษตรมากที่สุด โดยพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงแต่มีปริมาณที่ขีดจำกัด สำหรับก๊าซไนโตรเจนซึ่งมีถึง 79 เปอร์เซนต์ของก๊าซทั้งหมดในบรรยากาศโลกและในดิน สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่สามารถนำไปใช้ได้ แต่พบว่าจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจน (N_2) จากชั้นบรรยากาศให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย (NH_3) ได้ เรียกวิธีการนี้ว่าการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) พืชและจุลินทรีย์สามารถดูดซึม (Assimilation) เอาแอมโมเนียไปใช้

ในการสร้างโปรตีนและการเจริญเติบโตได้ และสัตว์จะสร้างโปรตีนจากพืชและจุลินทรีย์ต่ออีกทอดหนึ่ง นอกจากนี้แอมโมเนียยังเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของสารประกอบไนโตรเจนต่างๆ มีการหมุนเวียนจนทำให้เกิดเป็นวัฏจักรซึ่งประกอบด้วยกระบวนการต่างๆ ที่สำคัญได้แก่ กระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน(Ammonification) คือ เมื่อพืชและสัตว์ตายหรือขับถ่ายของเสียออกมา จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เปลี่ยนสารอินทรีย์ไนโตรเจนกลับมาเป็นสารอนินทรีย์ไนโตรเจนซึ่งได้แก่แอมโมเนียอีกครั้ง กระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) คือ การออกซิไดซ์เปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ (NO_2^-) โดยแบคทีเรียพวก *Nitrosomonas* sp. และออกซิไดซ์ไนไตรท์เป็นไนเตรท (NO_3^-) โดยแบคทีเรียพวก *Nitrobacter* sp. ซึ่งไนเตรทนี้พืชสามารถดูดซึมนำไปใช้ได้ และกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) คือ การเปลี่ยนไนเตรทกลับมาเป็นก๊าซไนโตรเจนสู่ชั้นบรรยากาศอีกครั้ง เป็นการสร้างสมดุลไนโตรเจนในระบบนิเวศน์ ขบวนการทั้งหมดในวัฏจักรไนโตรเจนสามารถสรุปได้ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 วัฏจักรของไนโตรเจน (Postgate,1982)

4.4 กระบวนการตรึงไนโตรเจน

กระบวนการตรึงไนโตรเจน เป็นการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศให้มาอยู่ในรูปสารประกอบ ซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้สามารถจำแนกได้ 2 วิธี คือ การตรึงไนโตรเจนทางเคมีและการตรึงโตรเจนทางชีวภาพ โดยมีสัดส่วนประมาณ 1 : 4 - 1 : 25 (Berns and Hardy, 1975)

4.4.1 กระบวน การตรึงไนโตรเจนทางเคมี (Chemical nitrogen fixation)

เป็นกระบวนการที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยไนโตรเจน ซึ่งในปีหนึ่งๆ จะมีการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธีนี้ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ของการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด (Newton,1996 อ้างถึงใน Newton,1999) ประกอบด้วย 3 วิธีการ คือ

4.4.1.1 การออกซิไดซ์ไนโตรเจนโดยตรง (Direct oxidation of Nitrogen)

มีหลักการ คือ ให้ก๊าซไนโตรเจนกับออกซิเจนรวมตัวกันโดยตรง เป็นการเลียนแบบการตรึงไนโตรเจนโดยปรากฏการณ์ฟ้าแลบในธรรมชาติ ได้มีการทดลองครั้งแรกโดย Davendish ในปี ค.ศ.1766 โดยใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดความร้อนสูง 3,500 องศาเซลเซียส เผาก๊าซไนโตรเจนและออกซิเจนจนได้เป็นก๊าซไนโตรเจนไดออกไซด์ และเมื่อนำก๊าซไนโตรเจนไดออกไซด์มาละลายในน้ำก็จะได้กรดไนตริก ดังสมการ

$$N_2 + O_2 \xrightarrow{3,500\ ^\circ C} 2NO$$

$$2NO + O_2 \xrightarrow{3,500\ ^\circ C} 2NO_2$$

$$3NO_2 + H_2O \longrightarrow 2HNO_3 + NO$$

ปฏิกริยานี้ต้องใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อให้เกิดความร้อนสูงจึงเรียกว่า Arc process ซึ่งวิธีการนี้มีข้อเสีย คือ สิ้นเปลืองพลังงานมากและผลผลิตที่ได้ก็มีปริมาณน้อย

4.4.1.2 กระบวนการไซอะนาไมด์ (Cyanamide Process)

วิธีนี้พบเป็นครั้งแรกโดย Prof. Dr.Adoph Frank และ Dr.Nicodem Caro ที่ประเทศเยอรมันในปี ค.ศ.1897 มีหลักการ คือ เผาปูนขาวที่อุณหภูมิ 1,100 องศาเซลเซียส จนได้แคลเซียมออกไซด์ จากนั้นเผาแคลเซียมออกไซด์กับคาร์บอนจากถ่านหินที่อุณหภูมิ 2,200 องศาเซลเซียสจนได้แคลเซียมคาร์ไบด์ และเผาแคลเซียมคาร์ไบด์กับก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 1,000 องศาเซลเซียส ก็จะได้แคลเซียมไซอะนาไมด์ เป็นลำดับสุดท้าย ดังแสดงในสมการ

$$CaCO_3 \xrightarrow{1,100\ ^\circ C} CaO + CO_2$$

$$CaC + 3C \xrightarrow{2,200\ ^\circ C} CaC_2 + CO$$

$$CaC_2 + N_2 \xrightarrow{1,000\ ^\circ C} CaCN_2 + C$$

ต่อมาได้มีการทดลองใช้แคลเซียมไซอะนาไมด์ที่ผลิตได้โดยวิธีการนี้เป็นปุ๋ยในปี ค.ศ. 1901 และมีโรงงานผลิตปุ๋ยชนิดนี้ขายในปี 1905

4.4.1.3 กระบวนการสังเคราะห์แอมโมเนียของ Haber-Bosch (Haber-Bosch Modification of Direct Synthetic Ammonia Process)

วิธีการนี้ค้นพบโดย Prof.Fritz Haberในเยอรมันในปี ค.ศ. 1905-1908 และปรับปรุงโดย Dr.Carl Bosch มีหลักการคือใช้เชื้อเพลิงจากถ่านหินหรือก๊าซธรรมชาติเผาก๊าซไนโตรเจนและไฮโดรเจนในบรรยากาศ ให้รวมตัวกันเป็นแอมโมเนีย โดยใช้อุณหภูมิสูง 500-700 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 150-200 บรรยากาศโดยมีโลหะเป็นตัวเร่ง ดังสมการ

$$N_2 + 3H_2 \longrightarrow 2NH_3$$

ต่อมาได้มีการปรับปรุงให้ใช้พลังงานน้อยลงและได้ผลผลิตสูงขึ้น วิธีการนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยเคมีจนถึงปัจจุบัน

(สันติภาพ ปัญจพรรค์, 2527)

นอกจากวิธีการทั้ง 3 นี้แล้วการตรึงไนโตรเจนทางเคมีอาจเกิดขึ้นเองจากขบวนการทางธรรมชาติได้ เช่น เกิดจากภูเขาไฟ ฟ้าแลบฟ้าผ่า หรืออาจเกิดจากการสันดาปของเครื่องจักรเครื่องยนต์ต่างๆ ทำให้เกิดหมอกควันที่มีไนตริกออกไซด์เป็นส่วนประกอบ เป็นต้น (Newton, 1999)

4.4.2 กระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Biological nitrogen fixation)

เป็นกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยสิ่งมีชีวิต เกิดขึ้นประมาณ 65 เปอร์เซนต์ของการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด คือประมาณ $175x10^6$ เมตริกตันต่อปี (Newton, 1996 อ้างถึงใน Newton, 1999) โดยสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศได้ ได้แก่ จุลินทรีย์บางชนิดซึ่งเรียกว่ากลุ่มไดอะโซโทรป (diazotroph) โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้ไปเป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่สิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้ การตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพสามารถแบ่งออกตามลักษณะการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนได้ดังนี้

4.4.2.1 การตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์ที่เจริญร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (Symbiotic nitrogen fixer)

เป็นกระบวนการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพาอาศัย โดยสิ่งมีชีวิตสองชนิดอาศัยอยู่ร่วมกันต่างฝ่ายต่างช่วยเหลือให้ประโยชน์แก่กัน ถ้าแยกกันอยู่อย่างอิสระจุลินทรีย์จะไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ตัวอย่างของการตรึงไนโตรเจนแบบนี้ที่รู้จักกันดีได้แก่ การตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว โดยแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ภายในปมรากของพืชตระกูลถั่ว พืชจะสังเคราะห์แสงสร้างคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญให้แบคทีเรีย ส่วนแบคทีเรียจะตรึงไนโตรเจนให้พืชนำไปใช้สร้างกรดอะมิโน โปรตีนและสารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอื่นๆ ที่จำเป็น

4.4.2.2 การตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่อย่างอิสระ (Non Symbiotic nitrogen fixer)

เป็นการตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรียที่ไม่จำเป็นต้องอาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากจุลินทรีย์พวกนี้ไม่ต้องอาศัยคาร์โบไฮเดรตหรือแหล่งพลังงานจากพืช แต่จะอาศัยแหล่งพลังงานจากอินทรียวัตถุที่มีอยู่ในดิน จุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนแบบนี้มีทั้งแบคทีเรียซึ่งเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic bacteria) เช่น *Azotobacter* sp. และแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน(anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium* sp. และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. เป็นต้น

กลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนทั้งแบบที่เจริญอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นและที่เจริญอยู่อย่างอิสระ ประกอบด้วยแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท สามารถพบได้ในแหล่งธรรมชาติต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (ดัดแปลงจาก Sprent, 1979)

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งที่พบและสภาวะแวดล้อม
1. <u>Symbiotic nitrogen fixer</u> **1.1 <u>Bacteria</u>** **Rhizobiaceae** *Rhizobium* sp.	ตรึงไนโตรเจนโดยอยู่ร่วมกับปมรากของพืชตระกูลถั่ว เจริญในที่ที่มีออกซิเจนเล็กน้อย
1.2 <u>Actinomycetes</u> **Frankiaceae** *Frankia* sp.	ตรึงไนโตรเจนโดยอยู่ร่วมกับรากพืชที่ไม่ใช่ตระกูลถั่ว เจริญในที่ที่มีออกซิเจนเล็กน้อย
2. <u>Non- Symbiotic nitrogen fixer</u> **2.1 <u>Bacteria</u>** **2.1.1 <u>Non-photosynthetic,</u>** **Pseudomonadaceae** *Pseudomonas azotogensis*	พบในดิน แหล่งน้ำจืด และแหล่งน้ำเค็ม
Azotobacteraceae	พบในดิน น้ำ ใบ และบริเวณผิวราก ทุกสายพันธุ์จะมีการตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน
Azotobacter sp. *Azomonas* sp.	พบในดินที่มีความเป็นด่าง
Azotococcus sp. *Derxia* sp.	พบในดินที่มีความเป็นกรด
Bacillaceae *Bacillus* sp. *Bacillus polymyxa* *Bacillus megaterium* *Bacillus macerans*	พบเห็นได้ทั่วไป ส่วนมากสามารถตรึงไนโตรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถตรึงไนโตรเจนได้เล็กน้อย

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งที่พบและสภาวะแวดล้อม
Clostridium pasteurianum *Clostridium butyricum* *Clostridium* sp.	พบได้ในดิน น้ำจืด น้ำเค็ม ตะกอน ลำไส้เล็กและอุจจาระของสัตว์ บางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อยหรือไม่มีออกซิเจนได้
Desulfotomaculum sp.	พบที่ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ โดยเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
Enterobacteriaceae *Klebsiella pneumoniae* *Enterobacter aerogines* *Erwinia herbicola* *Citrobacter freundii* *Citrobacter intermedius* *Escherichia coli* *Escherichia intermedia*	พบที่ใบ บริเวณผิวของปมรากพืช อุจจาระและลำไส้ใหญ่ของคน
Spirillaceae *Spirillum lipoferum*	เจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แต่บริเวณที่มีการตรึงไนโตรเจนจะต้องการออกซิเจนในปริมาณน้อย
Uncertain family *Desulfovibrio vulgaris* *Desulfovibrio desulfuricans* *Desulfovibrio gigas*	พบในดินที่เปียกชื้น แหล่งน้ำจืดและน้ำเค็มที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก แต่มีบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้
Methylosinus trichosporium	พบในดิน และน้ำ สามารถใช้มีเธนได้ มีการเจริญและตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน
Thiobacillus ferroxidans	พบในน้ำที่มีความเป็นกรด และมีปริมาณอิออนสูง เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่ตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งที่พบและสภาวะแวดล้อม
2.1.2 <u>Photosynthetic forms</u> **Rhodospirillaceae** *Rhodospirillum rubrum* *Rhodopseudomonas capsulata* *Rhodopseudomonas spheroides*	โดยปกติต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะต้องมีแสงด้วยจึงจะเจริญได้
Chromatiaceae *Chromatium* sp.	พบในดินโคลน ดินที่มีความชื้นแหล่งน้ำจืดและน้ำเค็มที่มีซัลไฟด์เป็นปริมาณมาก สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
Chlorobiaceae *Chlorobium limicola*	พบในดินโคลน ดินที่มีความชื้น แหล่งน้ำจืดและน้ำเค็มที่มีซัลไฟด์เป็นปริมาณมาก สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
2.2 <u>Actinomycetes and associated species</u> *Mycobacterium flavum* *Corybacterium autotrophicum*	พบในดินที่มีความเป็นกรด
2.3 <u>Cyanobacteria</u> *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. *Cylindrosperma* sp. *Scytonema* sp. *Calothrix* sp. *Chlorogloeopsis* sp. *Spirulina* sp.	พบในดิน น้ำ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ สามารถสังเคราะห์แสงได้เอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีทางชีวเคมีโดยจุลินทรีย์

กระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจน (N_2) ที่มีอยู่ในบรรยากาศไปเป็นแอมโมเนีย (NH_3) แต่เนื่องจากก๊าซไนโตรเจนมีพันธะสามจึงมีความเสถียรมาก ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจึงต้องการพลังงานกระตุ้นสูง จึงอาจเป็นสาเหตุให้การตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติได้ยาก ซึ่งสมการการตรึงไนโตรเจนสามารถเขียนได้ดังนี้

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

4.5.1 เอนไซม์ไนโตรจีเนส

สิ่งสำคัญในกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์ คือ มีเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) เป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเรียกไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) เป็น MoFe-protein เพราะมีโมลิบดีนัม (Mo) และเหล็ก (Fe) เป็นส่วนประกอบสำคัญ มีหน้าที่เป็นส่วนที่เกิดกิจกรรมการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจน (N_2) ส่วนที่สองเรียกไดไนโตรจีเนสรีดักเทส (dinitrogenase reductase) เป็น Fe-protein เนื่องจากมีเหล็ก (Fe) เป็นส่วนประกอบสำคัญ ทำหน้าที่ให้อิเลคตรอนแก่ไดไนโตรจีเนสเพื่อใช้ในการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจน ส่วนไดไนโตรจีเนสมีลักษณะเป็น tetramer มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 230 kD ประกอบด้วยหน่วยย่อยอัลฟา 2 หน่วยซึ่งถูก encode โดย *nif D* gene และหน่วยย่อยเบต้าอีก 2 หน่วยซึ่งถูก encode โดย *nif K* gene แต่ส่วนไดไนโตรเจนรีดักเทสมีลักษณะเป็น homodimer มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 kD ประกอบด้วยหน่วยย่อยแกมมา 2 หน่วยซึ่งถูก encode โดย *nif H* gene

เอนไซม์ไนโตรจีเนสแต่ละส่วนจัดเป็นเหล็ก-ซัลเฟอร์โปรตีน (Iron-sulfur protein) 1 หน่วย ซึ่งบางครั้งเรียกว่า non-haem iron protein อยู่ร่วมกันรวมเป็นกลุ่มเหล็ก-ซัลเฟอร์ (Iron-sulphur cluster) แต่ละกลุ่มเหล็ก-ซัลเฟอร์โปรตีนจะกระจายอยู่ทั่วไป แต่บริเวณศูนย์กลางของกลุ่มเหล็ก-ซัลเฟอร์จะนำอิเลคตรอนได้เพียงครั้งละ 1 อิเลคตรอนเท่านั้น

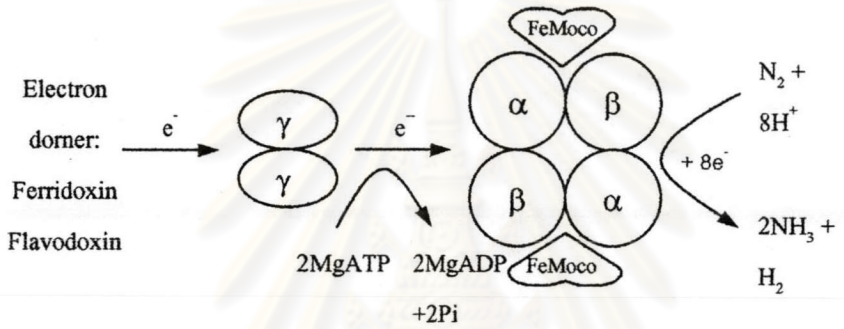
ส่วนไดไนโตรจีเนสอยู่ร่วมกับกลุ่มโลหะ (metal cluster) ที่เรียกว่า iron-molydenum cofactor (FeMoCo) 2 หน่วย เชื่อกันว่าที่ FeMoCo เป็นส่วนที่เกิดการรีดิวซ์ไนโตรเจนจริงๆ

4.5.2 กลไกการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจน (N_2)

ในการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจน เริ่มจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้รับอิเลคตรอนโดยส่วนไดไนโตรจีเนสรีดักเทสรับอิเลคตรอนจากเฟอร์ริดอกซินหรือฟลาโวดอกซิน ซึ่งถูกรีดิวซ์ด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ เมื่อไดไนโตรจีเนสรีดักเทสรับอิเลคตรอนแล้วจะถ่ายทอดให้กับไดไนโตรจีเนสต่อไป โดยในการถ่ายทอดอิเลคตรอนให้กับไดไนโตรจีเนสนี้จะเกิดขึ้นได้ครั้งละ 1 อิเลคตรอน และแต่ละครั้งจะต้องใช้พลังงานจาก MgATP 2 โมเลกุล ซึ่งจะถูกสลายเป็น MgADP

จากนั้นไดไนโตรจีเนสจะรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจน (N_2) เป็นแอมโมเนีย (NH_3) โดยในปฏิกิริยานี้ต้องการอิเลคตรอนทั้งหมด 8 อิเลคตรอน จึงต้องใช้พลังงานทั้งหมด 16 ATP และเนื่องจากมีอิเลคตรอนเหลือจากการรีดิวซ์ไนโตรเจน 2 อิเลคตรอนจึงต้องมีโปรตอนมารับและเกิดก๊าซไฮโดรเจน (H_2) 1 โมเลกุล

เนื่องจากการถ่ายทอดอิเลคตรอนจากไดไนโตรจีเนสรีดักเทสไปยังไดไนโตรจีเนสเกิดขึ้นครั้งละ 1 อิเลคตรอน จึงเชื่อว่าในขั้นตอนนี้จะมี enzyme bound intermediate เกิดขึ้น แต่รายละเอียดของ intermediate เหล่านี้ยังไม่มีการสรุปได้อย่างแน่ชัด โครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและการเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจน แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและการเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจน (Giller และ Wilson, 1991)

นอกจากก๊าซไนโตรเจนและโปรตอนแล้ว เอนไซม์ไนโตรจีเนสยังสามารถรีดิวซ์สารเคมีตัวอื่นๆ ได้อีกด้วย. ได้แก่ N_2, N_3, N_2O, HCN, CH_3CN, CH_2CHCN, C_2H_2 และ $2H^+$ โดยใช้จำนวนอิเลคตรอนต่างๆ กันดังแสดงในตารางที่ 2 และจากสารเคมีที่มารับอิเลคตรอนเหล่านี้พบว่ามีอะเซธิลีนอยู่ด้วยซึ่งจะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นเอธิลีน จึงเป็นสาเหตุให้ค้นพบวิธีที่จะวัดการตรึงไนโตรเจนโดยทางอ้อม เนื่องจากปริมาณอะเซธิลีนที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสมีความสัมพันธ์ปริมาณของก๊าซไนโตรเจนที่ถูกรีดิวซ์ และปริมาณก๊าซอะเซธิลีนและเอธิลีนสามารถวิเคราะห์ได้สะดวกโดยใช้เครื่องมือก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) จึงได้ประยุกต์ใช้เป็นวิธีวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เรียกว่า วิธีอะเซธิลีนรีดักชัน (Acethylene reduction assay)

ตารางที่ 2 แสดงตัวรับอิเลคตรอน ผลที่เกิดขึ้น และจำนวนอิเลคตรอนที่ใช้ในปฏิกิริยาที่กระตุ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Fottrell, 1968; Sprent, 1979)

ตัวรับอิเลคตรอน	ผลที่เกิดขึ้น	จำนวนอิเลคตรอนที่ใช้
N_2	$2NH_3$	6
N_3	$N_2.NH_3$	2
N_2O	N_2H_2O	2
HCN	CH_4NH_3	6
	$CH_3.NH_2$	4
CH_3CN	$C_2H_6.NH_3$	6
CH_3NC	$CH_3NH_2.CH_4$	6
	$C_2H_6.C_2H_4$	8, 10
	$C_3H_8.C_3H_6$	12 , 14
CH_2CHCN	$C_3H_6.NH_3$	6
	C_3H8	8
C_2H_2	C_2H_4	2
$2H^+$	H_2	2

4.6 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

4.6.1 ออกซิเจน

ออกซิเจนมีความสำคัญต่อการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ ทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการหายใจ และสังเคราะห์ ATP เพื่อใช้ในการเจริญ แต่ถ้ามีในปริมาณมากเกินไปก็จะมีผลทำให้การตรึงไนโตรเจนลดลงและหยุดชะงักได้ เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจนอย่างมาก ดังนั้นปริมาณออกซิเจนจะต้องพอเหมาะกับความต้องการของจุลินทรีย์และไม่มากจนมีผลกระทบต่อเอนไซม์ไนโตรจีเนส เช่น แบคทีเรียที่ปมรากพืชตระกูลถั่วต้องการออกซิเจน 0.5 atm เป็นระดับที่พอเหมาะต่อการหายใจและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Burris, 1959 อ้างถึงใน สมศักดิ์ วังใน, 2541)

4.6.2 ปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจน

สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย เกลือไนเตรท หรือสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์โดยถ้ามีสารประกอบไนโตรเจนอยู่ในดินหรืออาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้จุลินทรีย์ไม่ตรึงไนโตรเจนในอากาศ เนื่องจากสารประกอบไนโตรเจนมีผลทำให้แหล่งพลังงาน ATP หรือ NADH ถูกนำไปใช้ในการดูดซึม (assimilation)

แอมโมเนียม (NH_4^+) หรือสารประกอบไนโตรเจนอื่น แทนที่การใช้เพื่อถ่ายทอดอิเลคตรอนให้แก่เอนไซม์ไนโตรจีเนส ทำให้การตรึงไนโตรเจนหยุดชะงักชั่วคราว (temporary inactive) เมื่อสารประกอบไนโตรเจนลดลงก็จะมีการตรึงไนโตรเจนได้ใหม่อีกครั้ง (Laane และคณะ, 1980 อ้างถึงใน Postgate, 1982)

ผลของสารประกอบไนโตรเจนต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจมีผลที่แตกต่างกัน เช่น Neilson และ Nordmand (1975: อ้างถึงใน Postgate, 1982) พบว่าการเพิ่มแอมโมเนียในปริมาณเพียงเล็กน้อยให้กับแบคทีเรีย *Rhodospirillum rubrum* และ *Rhodopseudomonas plalustris* มีผลทำให้การตรึงไนโตรเจนลดลงถึง 90 เปอร์เซ็นต์

4.6.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีเมื่อมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่านั้น ถ้าอุณหภูมิต่ำหรือสูงเกินไปการตรึงไนโตรเจนก็จะลดลงหรือหยุดชะงักได้ เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำมีผลทำให้ปฏิกริยาหรือกระบวนการทางเคมีภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ช้าลงหรือหยุดชะงัก แต่หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสโดยตรง และถ้าอุณหภูมิสูงมากๆ จะมีผลทำให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสเปลี่ยนรูป (denature)ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจแตกต่างกัน เช่น แบคทีเรียสกุล Rhizobium มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการตรึงไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส Dobereiner และ Day (1975) พบว่าที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส *Azospirillum* sp. ไม่มีการตรึงไนโตรเจน

4.6.4 ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์จะสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเท่านั้น โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในความเป็นกรด-ด่างในช่วงที่เป็นกลาง นอกจากนั้นการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสซึ่งเป็นโปรตีน การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างจะมีผลต่อการแตกตัว (ionize) ของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่บนผิวของโปรตีน ซึ่งจะมีผลต่อบริเวณเร่งและโครงสร้างของเอนไซม์ ความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการเกิดกิจกรรมไป โดยความเป็นกรด-ด่างที่มีผลให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดอยู่ในช่วง 6-7.5 (อาภัสสรา ชมิดช์, 2537)

4.6.5 แร่ธาตุอาหาร

แร่ธาตุที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนมีหลายชนิด แต่ธาตุที่สำคัญได้แก่ ธาตุโมลิบดีนัม (Mo) เหล็ก (Fe) แคลเซียม (Ca) และฟอสฟอรัส (P) โดยเฉพาะโมลิบดีนัมและเหล็กเนื่องจากธาตุทั้งสองนี้เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โมลิบดีนัมและเหล็กจึงมีผลต่อการตรึงไนโตรเจนโดยตรงในแง่ของการสังเคราะห์เอนไซม์ นอกจากนั้นเหล็กยังเป็นองค์ประกอบ

ของสารประกอบอื่นๆ ที่จำเป็นในการถ่ายทอดอิเลคตรอนอีกด้วย ธาตุแคลเซียมมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในการรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย ส่วนธาตุฟอสฟอรัสมีความสำคัญเนื่องจากเป็นองค์ประกอบของสารประกอบที่ให้พลังงาน (ATP) และสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดอิเลคตรอน เช่น NADPH และ glucos-6-phosphate dehydrogenase เป็นต้น

4.6.6 ความชื้น

ความชื้นมีผลต่อการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ได้ โดย Moore (1966) พบว่าเมื่อดินมีความชื้นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์จะเกิดการตรึงไนโตรเจนได้สูง แต่ถ้ามีความชื้นต่ำกว่า 40 เปอร์เซนต์หรือมากกว่า 100 เปอร์เซนต์จะทำให้การตรึงไนโตรเจนจะลดลงถึง 1 ใน 3

4.6.7 จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในดิน

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ในกลุ่ม Actinomycetes สามารถสร้างสารทำให้มีผลยับยั้งการเจริญของ *Azotobacter chroococcum* ได้ (Nickell และ Burholder, 1974 อ้างถึงในธงชัย มาลา, 2535) นอกจากนี้ราบางสายพันธุ์ในกลุ่ม *Penicillium*, *Fusarium*, *Mortierella* และ *Cylindrocarpon* และแบคทีเรียจำพวก *Bacillus mesenterious* ก็สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Azotobacter* ได้เช่นเดียวกัน (Allison, 1947; Patel และ Brown, 1969; Virtanen, 1795 อ้างถึงในธงชัย มาลา, 2535)

นอกจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สร้างสารยับยั้งแล้ว ยังมีจุลินทรีย์บางประเภทกลับส่งเสริมการเจริญและการตรึงไนโตรเจนได้ โดย Okuda และคณะ (1960 : อ้างถึงในธงชัย มาลา, 2535) พบว่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย *Azotobacter* จะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ร่วมกับ *Cellulomonas* และการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Pseudomonas* และ *Azotobacter* จะทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงขึ้นจากการใช้เชื้อเดียวถึง 3 เท่า

4.7 รายงานการศึกษา การค้นพบจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนจากแหล่งธรรมชาติและการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน

ในปี ค.ศ. 1888 Beijerink นักวิทยาศาสตร์ชาวดัตช์เป็นบุคคลแรกที่พบว่าแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. ในปมรากถั่วทำให้เกิดการตรึงไนโตรเจนได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1901 Beijerink พบว่าแบคทีเรีย *Azotobacter chroococcum* และ *Azotobacter agilis* สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้โดยไม่ต้องอาศัยปมรากถั่ว การค้นพบนี้ทำให้นักวิจัยในแถบยุโรปบางคนได้นำแบคทีเรีย *Azotobacter* sp. มาทดลองร่วมกับพืชพบว่าสามารถทำให้ผลผลิตของพืชเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

ต่อมาในปี ค.ศ. 1930-1940 ได้เริ่มมีการผลิตจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนเพื่อการค้าขึ้น ได้แก่ แบคทีเรีย *Rhyzobium* sp. ในชื่อทางการค้าว่า Nitragin และแบคทีเรีย *Azotobacter* sp. ในชื่อ Azotogen ซึ่งต่อมาเปลี่ยนชื่อเป็น Azotobacterin การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในการเกษตรนี้ได้

รับความนิยมทั้งในสหรัฐอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย อินเดีย และรัสเซีย ซึ่งต่อมาได้ขยายไปประเทศต่างๆ ทั่วโลก (ธงชัย มาลา, 2535)

หลังจากได้มีการผลิตแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเพื่อการค้าแล้ว ก็ได้มีการแยกหาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนชนิดใหม่ๆ จากแหล่งต่างๆ ตามธรรมชาติของแต่ละพื้นที่ และค้นหาวิธีที่จะทำให้การตรึงไนโตรเจนได้ดีและมากที่สุดเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ดังต่อไปนี้

Breznak และคณะ (1973) ได้ค้นพบว่ามีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในลำไส้ปลวกชนิดต่างๆ ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ต่อมา Eutick และคณะ (1978) ได้แยกและจำแนกแบคทีเรียจากลำไส้ปลวกในประเทศออสเตรเลีย 9 ชนิด พบว่ามีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในปลวก 7 ชนิดมีทั้ง facultative anaerobe และ strict anaerobe และจำแนกแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เป็น *Enterobacter* sp.

Waterbury และคณะ (1983) รายงานว่าในการทดลองแยกแบคทีเรียจากหนอนเรือ (*Teredinid bivales*) 6 สายพันธุ์ พบว่าเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติทั้งตรึงไนโตรเจนย่อยเซลลูโลสได้ และมีความสัมพันธ์กับหนอนเรือแบบพึ่งพาอาศัย

Sengupta และ Chaundhuri (1990) ได้แยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากป่าชายเลนในประเทศอินเดีย พบว่าประกอบด้วย *Azospirilium* sp., *Azotobcater* sp., *Rhizibium* sp., *Clostridium* sp. และ *Klebsiella* sp.

Deluca และคณะ (1996) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของอนินทรีย์ไนโตรเจนจากปุ๋ยคอกและปุ๋ยพืชสด เปรียบเทียบกับผลกระทบจากปุ๋ยเคมีไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย และแอมโมเนียมไนเตรท ต่อจำนวนและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย *Azotobacter* sp. และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่คลุกกับเมล็ดข้าวโพดก่อนปลูก พบว่าผลของการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินลดต่ำลงและมีผลลดจำนวนจุลินทรีย์และกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน

Kanunga และคณะ (1997) ได้ทดสอบผลของตำแหน่งอินทรียวัตถุคือเซลลูโลสและซังข้าวที่ระดับความลึกต่างๆ กัน ในนาข้าวช่วง 4 ฤดู ต่อจำนวนและกิจกรรมของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp. และ Anaerobic nitrogen fixer พบว่าตำแหน่งของอินทรียวัตถุบริเวณผิวหน้าดินให้ผลการตรึงไนโตรเจนได้ดีที่สุดและมีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด

Bhattarai และ Hess (1998) ได้ทดลองใช้แบคทีเรีย *Azospirillum* sp. ที่แยกได้จากรากข้าวสาลีที่ปลูกบนดินภูเขาที่ขาดไนโตรเจนในประเทศเนปาล และทดสอบผลของปุ๋ยไนเตรทต่อการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ พบว่าไนเตรทมีผลทำให้การตรึงไนโตรเจนลดลง แต่เมื่อนำไปใช้ในการปลูกข้าวสาลีพบว่าผลการยับยั้งการตรึงไนโตรเจนจากไนเตรทลดลง และมีจำนวนรากและผลผลิตข้าวสาลีเพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้แบคทีเรีย *Azospirillum* sp. ร่วมกับปุ๋ยเคมีไนโตรเจนเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าวสาลี

Muthukumar และคณะ (2001) ได้ทดลองคลุกเมล็ดพืช neem ด้วยรา arbuscular mycorrhiza ได้แก่ *Glomus intraradices* และ *Glomus geosporum* กับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Azospirillum brasilense* และแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ทั้งแบบแยกคลุกและผสมร่วมกัน หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเมล็ดในวันที่ 60 และ 120 หลังการปลูกพบว่า ความสูงของลำต้น ขนาดของใบ ขนาดของราก และน้ำหนักของพืช ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม และคุณภาพของเมล็ดที่ได้ก็ดีขึ้นด้วยโดยเฉพาะเมื่อคลุกเชื้อรวมกันทั้งหมด

Hoguin และคณะ (2001) รายงานว่าการตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งบนบกและในทะเล แต่การตรึงไนโตรเจนในทะเลเกิดขึ้นได้น้อยเนื่องจากขาดแหล่งพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ ส่วนบริเวณป่าชายเลนและป่าพรุพบว่ามีการตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าเนื่องจากเป็นแหล่งสะสมอินทรียวัตถุต่างๆ

จารุรัตน์ (2541) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากบริเวณผิวใบข้าวจากแหล่งต่างๆ พบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูง 3 สายพันธุ์คือ *Azomonas insignis*, *Azotobacter chroococcum* และ *Azomonas agilis* และศึกษาปัจจัยได้แก่ แหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและอัตราการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า *A. insignis* และ *A. agilis* สามารถตรึงไนโตรเจนและเจริญได้ดีในอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเป็นกรด-ด่าง 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส ส่วนแบคที่เรีย *A. chroococcum* สามารถตรึงไนโตรเจนและเจริญได้ดีในอาหารเหลวที่มีแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40 องศาเซลเซียส

5. การละลายฟอสฟอรัสโดยจุลินทรีย์

5.1 ความสำคัญของธาตุฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่ทีความสำคัญเป็นอันดับสองรองจากไนโตรเจน โดยเป็นองค์ประกอบของ nucleic acid และ nucleoprotein ในพืชและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติหน้าที่ของเซลล์ การสร้างองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ การแบ่งเซลล์และการสืบพันธุ์ เป็นองค์ประกอบสำคัญของสารฟอสเฟตที่ทำหน้าที่รับช่วงถ่ายทอดพลังงานระหว่างสารต่างๆ ของระบบต่างๆ เช่น ระบบการสังเคราะห์แสง และระบบการหายใจของพืชเป็นต้น นอกจากนั้นในพืชไอออนฟอสเฟตอิสระจะอยู่ในน้ำในทางลำเลียงน้ำ (xylem) และอยู่ในน้ำของเซลล์พืช โดยทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างภายในพืชให้คงที่ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541)

5.2 ปริมาณของฟอสฟอรัสในดิน

ในดินมีฟอสฟอรัสต่ำมากเมื่อเทียบกับปริมาณของไนโตรเจนและโพแทสเซียม โดยเฉลี่ยแล้วในดินมีฟอสฟอรัสทั้งหมดเพียง 0.06 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของไนโตรเจนเป็น

0.14 และของโพแทสเซียมเป็น 0.83 เปอร์เซ็นต์ ดินนาในประเทศไทยมีฟอสฟอรัสเฉลี่ย 0.02 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าดินนาของประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคเดียวกันทั้งสิ้น โดยในพม่าพบ 0.082 เปอร์เซ็นต์ มาเลเซียพบ 0.040 เปอร์เซ็นต์ ฟิลิปปินส์พบ 0.059 เปอร์เซ็นต์ และญี่ปุ่นพบ 0.080 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของฟอสฟอรัสในดิน ในแต่ละจุดบนพื้นที่หรือตามแนวความลึก (หรือหน้าตัดดิน) แตกต่างกันไปตามชนิดของวัตถุต้นกำเนิดดิน ความมากน้อยของการชะล้าง และการใช้ที่ดิน ถ้าดินนั้นกำเนิดมาจากวัตถุต้นกำเนิดชนิดเดียวกัน พวกดินเนื้อละเอียด มักมีฟอสฟอรัสมากกว่าดินเนื้อหยาบ ดินที่ถูกใช้มานานหรือถูกชะล้างมากกว่า จะเหลือฟอสฟอรัสอยู่น้อยกว่าดินที่เปิดป่าใหม่ โดยปริมาณฟอสฟอรัสในดินชั้นบนมักน้อยกว่าดินชั้นล่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในชั้นที่มีการชะล้างมากๆ

5.3 แหล่งที่มาของสารประกอบฟอสฟอรัสในดิน

ฟอสฟอรัสจะปรากฏในดินใน 2 รูป คือ อินทรีย์ฟอสเฟตและอนินทรีย์ฟอสเฟต

5.3.1 อินทรีย์ฟอสเฟต ได้แก่

ฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในดิน หรือที่มาจากการสลายตัวของซากพืชซากสัตว์ มีหลายชนิด เช่น phospholypid, nucleic acids, nucleoprotien, lecithin, phosphorelated sugar และ coenzyme แต่ที่มีปริมาณมาก คือ inositol hexaphosphate ซึ่งเป็น phytin ที่พบในรากพืช อินทรีย์ฟอสเฟตที่ปรากฏในดินมีน้อยมาก เนื่องจากสลายตัวได้ง่ายโดยถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ดิน เพื่อให้ได้ฟอสเฟตอิสระที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยทั่วไปพบว่าปริมาณอินทรีย์ฟอสเฟตในดินมีค่าอยู่ระหว่าง 30-50 เปอร์เซนต์ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน

5.3.2 อนินทรีย์ฟอสเฟต สามารถจำแนกตามความเป็นประโยชน์ต่อพืชได้ 3 ประเภทดังนี้

5.3.2.1 สารประกอบฟอสเฟตที่ละลายยาก ได้แก่ แร่ปฐมภูมิที่มีแร่ฟอสเฟตชนิดต่างๆ ที่สำคัญมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ

5.3.2.1.1 แร่ซึ่งมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ ได้แก่

ชื่อแร่	องค์ประกอบทางเคมี
ฟลูออออะพาไทต์	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$
คาร์บอเนตอะพาไทต์	$Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$
ไฮดรอกซีอะพาไทต์	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
ไตรแคลเซียมฟอสเฟต	$Ca_3(PO_4)_2$
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	CaH_2PO_4
โมโนแคลเซียมฟอสเฟต	$Ca(HPO_4)_2$

เป็นการเรียงลำดับจากแร่ที่ละลายได้ยากกว่าลงมาหาง่ายกว่าตามลำดับ จะพบแร่ประเภทนี้ในดินที่เป็นด่าง สารประกอบประเภทแคลเซียมฟอสเฟตทั้ง 3 ได้แก่ ไตรแคลเซียมฟอสเฟต ไดแคลเซียมฟอสเฟต และโมโนแคลเซียมฟอสเฟตจะละลายน้ำได้ง่ายและพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากที่สุด

5.3.2.1.2 แร่ซึ่งมีเหล็กและอะลูมินัมเป็นองค์ประกอบ ได้แก่

ชื่อแร่	องค์ประกอบทางเคมี
วาริสไซต์	$AlPO_4 .2H_2O$
สะเตรนไลต์	$FePO_4.2H_2O$

แร่กลุ่มนี้พบได้ในดินที่เป็นกรดจัดจึงไม่ค่อยมีความสำคัญต่อดินเพาะปลูกทั่วไป เพราะละลายได้ยากกว่าแร่ประเภทแคลเซียม

5.3.2.2สารประกอบฟอสเฟตที่สามารถละลายอย่างช้าๆ (slowly available phosphate) สารประกอบนี้จะแตกตัวให้ฟอสเฟตไอออนได้เร็วพอสมควร ได้แก่

5.3.2.2.1 แคลเซียมฟอสเฟต เหล็กฟอสเฟตหรืออะลูมินัมฟอสเฟตที่ตกตะกอนใหม่ๆ ในดิน

5.3.2.2.2 สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตที่ตกตะกอน โดยการยึดที่ผิวของอนุภาคแคลเซียมคาร์บอเนต เหล็กหรืออะลูมินัมไฮดรอกไซด์ สารประกอบเหล่านี้สามารถแตกตัวออกมาได้ถ้าฟอสเฟตไอออนในสารละลายของดินลดลงเพื่อรักษาสภาวะสมดุลทางเคมีไว้ แต่ในระยะเวลาต่อมาความเป็นประโยชน์ของสารประกอบฟอสเฟตเหล่านี้จะลดลง เนื่องจากสารประกอบนี้มีขนาดผลึกโตขึ้น การละลายออกมาเป็นประโยชน์ต่อพืชได้น้อยลง เกิดการแทรกตัวของเหล็กและอะลูมินัมไฮดรอกไซด์ระหว่างอนุภาคของแคลเซียมคาร์บอเนต และสารประกอบฟอสเฟตเกิดการตกตะกอน ทำให้พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ยากขึ้น

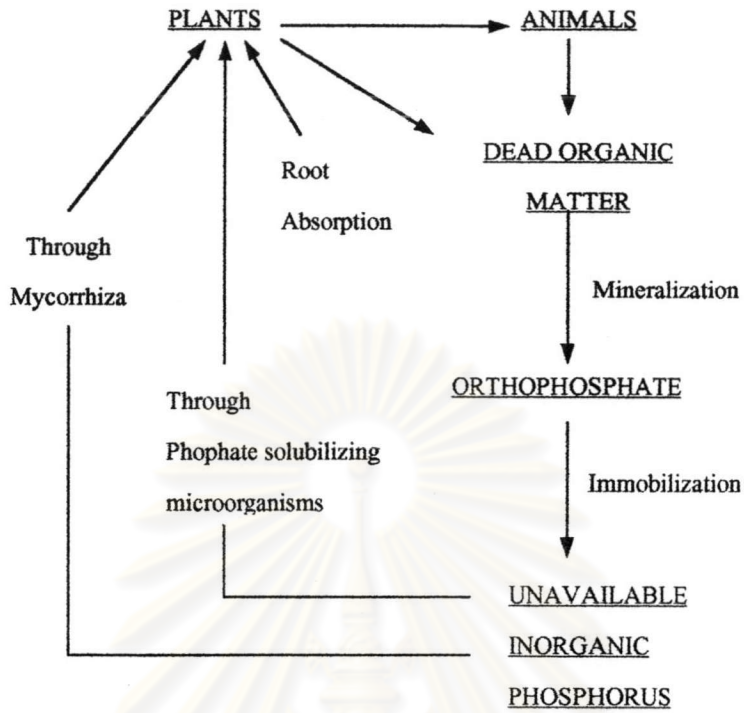
5.3.2.2.3 ฟอสเฟตไอออนในสารละลายดิน เป็นฟอสเฟตรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชมากที่สุด สามารถละลายน้ำได้ดี ได้แก่ ไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟตไอออน ($H_2PO_4^-$) และโมโนไฮโดรเจนออโทฟอสเฟตไอออน (HPO_4^{2-}) ที่อยู่ในสารละลายดิน และเกลือฟอสเฟตซึ่งจะแตกตัวให้ไอออนทั้งสองนี้โดยง่าย ฟอสเฟตไอออนที่อยู่ในสารละลายดินจะง่ายและว่องไวต่อการทำปฏิกิริยากับแคลเซียม เกิดเป็นแคลเซียมฟอสเฟตที่มีการละลายน้ำได้ยากในดินด่าง ทำให้สูญเสียความเป็นประโยชน์ไป ฟอสเฟตไอออนในสารละลายดินนี้จะมีเพียงเล็กน้อย คิดเป็นฟอสฟอรัสได้ประมาณ 0.3-3 ppm เท่านั้นเมื่อเทียบกับฟอสฟอรัสทั้งหมด ซึ่งมีถึง 200-1,500 ppm ในกรณีที่ดินมี pH เป็นกลางจะพบไอออนทั้งสองนี้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่หากดินเป็นกรดจะพบ HPO_4^{2-} ในสัดส่วนที่สูงกว่า ส่วนในสารละลายของดินด่างจะพบ HPO_4^{2-} สูงกว่าอีกชนิดหนึ่งเช่นกัน เมื่อรากพืชดูดฟอสเฟตไอออนจากสารละลายดินไปใช้ ความเข้มข้นของไอออนเหล่านี้ที่บริเวณรอบๆ รากจะลดต่ำลง ฟอสเฟตไอออนจากบริเวณข้างเคียงจะมีการแพร่ไปทดแทน ในขณะเดียวกันสารประกอบฟอสเฟตส่วนที่เป็นของแข็งที่มีการละลายได้บ้างจะปลดปล่อยไอออนออกมาด้วย ดังนั้นพืชจะได้รับฟอสฟอรัสอย่างเพียงพอหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับอัตราการละลายหรือสลายตัวของสารประกอบฟอสเฟตที่เป็นของแข็งที่ละลายยากด้วย

เมื่อมีการใส่ปุ๋ยฟอสเฟตลงในดิน ฟอสเฟตไอออนในสารละลายของดินจะเพิ่มสูงขึ้นมาก ไอออนเหล่านี้บางส่วนจะแปรสภาพไปเป็นสารประกอบที่ละลายได้ยากขึ้น เพื่อรักษาสมดุลทางเคมี เช่น ในการใส่ปุ๋ยฟอสเฟตในรูปของ $Ca(H_2PO_4)2H_2O$ และ $NH_4H_2PO_4$ ลงในดินที่มีแคลเซียม แมกนีเซียมสูงก่อให้เกิดสารประกอบฟอสเฟตในรูปที่ละลายน้ำได้ยากขึ้น คือ อยู่ในรูป hydroxy apatite และ fluoroapatite ที่ตกตะกอน พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าการตรึงฟอสฟอรัส (phosphorus fixation) ในสารละลายของดินนอกจากจะมีฟอสเฟตไอออนแล้วยังมีสารอินทรีย์ฟอสเฟตโมเลกุลเล็กๆ ละลายอยู่บ้าง และพืชสามารถใช้ประโยชน์ได้ด้วย แต่ถือว่ามีความสำคัญน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับฟอสเฟตไอออนจากอนินทรีย์ฟอสเฟต

5.4 วัฏจักรของฟอสฟอรัส

จากที่ได้กล่าวมาแล้ว ฟอสฟอรัสในดินพบได้ 2 รูป คือ สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ซึ่งสารอนินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายหรือละลายช้าและมีประโยชน์ต่อพืชน้อย แต่เนื่องจากฟอสฟอรัสไม่เพียงแต่มีความจำเป็นต่อพืชเท่านั้น ยังมีความจำเป็นต่อขบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในดินด้วย จึงพบว่าจุลินทรีย์ในดินหลายชนิดมีกิจกรรมหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปของฟอสเฟตในดิน ได้แก่ การละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตในดินที่ไม่ละลายให้เป็นอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Phosphate solubilization) เมื่อพืชดูดซึมฟอสเฟตในรูปสารละลายไปใช้ ฟอสเฟตจะเปลี่ยนจากอนินทรีย์ฟอสเฟตเป็นอินทรีย์ฟอสเฟต จากนั้นพืชเป็นอาหารของสัตว์ได้เป็นอินทรีย์ฟอสเฟตในสัตว์ เมื่อพืชและสัตว์ตายจะถูกย่อยสลายเป็นอินทรีย์ฟอสเฟตในดิน ซึ่งพืชสามารถดูดซึมกลับไปใช้ได้อีก และส่วนที่เหลือจะถูกเปลี่ยนเป็นอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปออโทฟอสเฟต (orthophosphate) โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ที่เรียกว่า mineralization ซึ่งอนินทรีย์ฟอสเฟตบางส่วนจะถูกนำไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์กลายเป็นอินทรีย์ฟอสเฟตภายในเซลล์ เรียกกระบวนการนี้ว่า Immobolization นอกจากนี้อนินทรีย์ฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ง่ายส่วนใหญ่จะถูกตรึงด้วยปฏิกริยาทางกายภาพและทางเคมีของดิน กลายเป็นอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ละลายได้ยากอีกครั้ง กิจกรรมและปฏิกิริยาเหล่านี้จะเปลี่ยนรูปฟอสฟอรัสกลับไปกลับมาเป็นวัฏจักรของฟอสฟอรัส ดังรูปที่ 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 วัฏจักรของฟอสฟอรัส (Rao, 1982)

5.5 การละลายฟอสเฟตโดยจุลินทรีย์ (Phosphate solubization)

เนื่องจากสารอนินทรีย์ฟอสเฟตมักจะอยู่ในดินในรูปที่ไม่ละลายหรือละลายได้น้อยมาก จึงไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช แต่พบว่าจุลินทรีย์ในดินบางชนิดสามารถละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตในรูปที่ไม่ละลายนั้นได้ ซึ่งเท่าที่มีการศึกษากันมาพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้มีประมาณ 1 ใน 10 ของจุลินทรีย์ดินทั้งหมด (สมศักดิ์ วังใน, 2528) การละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์นี้เกิดขึ้นโดยการสร้างกรดชนิดต่างๆ ทั้งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ ทำให้อนินทรีย์ฟอสเฟตมีการละลายน้ำได้มากขึ้นและอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช

กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่จุลินทรีย์ดินผลิตขึ้นเป็นกรดประเภทไฮดรอกซี (hydroxy acids) ได้แก่ lactic acid, glycolic acid, citric acid, formic acid และ acetic acid กรดต่างๆ เหล่านี้สามารถละลายสารประกอบฟอสเฟตที่ละลายได้ยาก เช่น ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) และอะพาไทต์ (apatite) ชนิดต่างๆ และเกิดเป็นคีเลต ซึ่งทำให้ฟอสเฟตละลายออกมาในรูปออร์โทฟอสเฟตนอกจากนี้แล้วกรด 2-ketogluconic ยังเป็นกรดที่ทำหน้าที่เป็นสารคีเลต (chelating agent) ได้ด้วย โดยทำปฏิกริยากับเกลือฟอสเฟตของแคลเซียม ทองแดง นิกเกิล แมงกานีส เหล็ก และอะลูมินัม ซึ่งจะมีผลทำให้ฟอสเฟตละลายออกมาได้

ส่วนกรดอนินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น ได้แก่ กรดไนตริกและกรดซัลฟูริกหรือกรดกำมะถันก็เช่นเดียวกัน สามารถละลายหินฟอสเฟตให้อยู่ในรูปของฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ ดังนั้นจึง

มีการพยายามใช้กิจกรรมนี้ให้เป็นประโยชน์ จากกระบวนการที่เรียกว่า "Lipman process" กล่าวคือ มีการเตรียมดินสำหรับปลูกพืชมาหมักกับปุ๋ยคอก ผงกำมะถัน และหินฟอสเฟต แล้วปล่อยให้จุลินทรีย์พวก *Thiobacillus spp.*ที่มีอยู่ในดินนั้นเปลี่ยนผงกำมะถันเป็นกรดกำมะถันเพื่อละลายหินฟอสเฟต ทำให้มีฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น อาจนำดินนี้ไปปลูกพืชหรือใช้เป็นปุ๋ยใส่ลงไปในไร่นาก็ได้ และภายใต้สภาพที่ไม่มีออกซิเจน เช่น ดินน้ำขัง จุลินทรีย์จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ออกมามาก ก๊าซนี้สามารถทำให้ฟอสเฟตละลายออกจากสารประกอบฟอสเฟตที่ละลายน้ำยากได้

จุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้มีทั้งแบคทีเรีย รา และแอกติโนมัยซีท ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการละลายฟอสเฟต (Rao, 1982)

ชนิดของจุลินทรีย์
Bacteria
Bacillus sp.,Bacillus pulvifaciens, Bacillus megaterium
Bacillus circulans, Bacillus subtilis, Bacillus mycoides
Bacillus mesentericus, Bacillus fluorescence, Bacillus circulans
Psuedomonas sp.,Psuedomonas pultida, Psuedomonas liquifaciens,
Psuedomonas calcis, Psuedomonas rathoria
Escherichia freundii, Escherichia intermedia
Xanthomonas spp., *Flavobacterium* spp.
Brevibacterium spp., *Serratia* spp., *Alcaligenes* spp., *Achromobacter* spp.
Aerobacter aerogines, Erwinia spp., *Nitrosomonas* spp., *Thiobacillus thiooxidans*
Fungi
Aspergilus sp., *Aspergilus. niger, Aspergilus flavus, Aspergilus* fumigatus,
Aspergilus terreus, Aspergilus awamori
Penicillium sp., *Penicillium lilacinum, Penicillium digitatum,*
Fusarium sp., *Fusarium oxysporum, Sclerotium rolfsii, Pytium* sp., *Acrothecium* sp.,
Phoma sp., *Mortierella* sp., *Paecilomyces* sp.,
Cladosporium sp., *Rhizoctonia* sp., *Cunninghamella* sp., *Rhodotorula* sp.,
Canida sp., *Schwanniomyces occidentalis, Oideodendron* sp., *Pseudogymnoascus* sp.
Actinomyces
Streptomyces sp.

5.6 รายงานการศึกษาและการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

เนื่องจากปุ๋ยเคมีฟอสเฟตที่ใช้ในทางการเกษตรมีราคาแพง และส่วนใหญ่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ง่าย เมื่อใส่ลงไปในดินจึงถูกตรึงกลายเป็นสารอนินทรีย์ที่ละลายน้ำยากได้ง่าย โดยพบว่าเมื่อใส่ปุ๋ยดับเบิลซูเปอร์ฟอสเฟตซึ่งมีฟอสเฟตที่เป็นประโยชน์ (available P_2O_5) 40 % ลงในดิน พืชจะใช้ประโยชน์ได้เพียง 5-20 % ของฟอสเฟตที่เป็นประโยชน์เท่านั้น (สันติภาพ ปัญจพรรค์, 2527) ในขณะที่หินฟอสเฟตซึ่งเป็นแร่อนินทรีย์ฟอสเฟตพวกแคลเซียมฟอสเฟต เป็นแหล่งฟอสเฟตที่มีราคาถูกและพบได้กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป แม้แต่ในประเทศไทยก็พบได้ในหลายแหล่งทั่วประเทศ แต่มีปริมาณน้อยไม่สามารถจะพัฒนามาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยเคมีฟอสเฟตในโรงงานผลิตปุ๋ยขนาดใหญ่ได้ และจากคุณสมบัติของจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถละลายฟอสเฟตในรูปที่ไม่ละลาย ให้เป็นรูปที่ละลายน้ำและพืชสามารถดูดนำไปใช้ประโยชน์ได้ จึงมีความสนใจนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาใช้ร่วมกับหินฟอสเฟตบดหรือใส่ลงในดินทั่วไปเพื่อเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสเฟตให้กับพืชได้ ซึ่งมีงานวิจัยมากมายที่สนับสนุนแนวความคิดนี้ เช่น

Cooper (1959) รายงานว่าในสหภาพโซเวียตได้มีการผลิตจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตขึ้นในครั้งแรกในปี ค.ศ. 1947 ในชื่อ phosphobacterin และได้มีการใช้อย่างแพร่หลายไปทั่วประเทศในรูปของการคลุกจุลินทรีย์กับเมล็ดพืชก่อนการเพาะปลูกหรือใส่ในดินโดยตรง และต่อมามีการแยก phosphobacterin ได้เป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์เรียกว่า *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* และมีรายงานว่าพืชผักและธัญพืชสามารถได้รับประโยชน์จากเชื้อ phosphobacterin มากที่สุด โดยเพิ่มผลผลิตได้ 0-70 %

Gerretsen (1948) ได้ทำการทดลองใส่เชื้อในดินที่ปลูกพืชหลายชนิดและใช้แหล่งฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำหลายชนิด พบว่าส่วนใหญ่พืชมีการดูดซึมฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น เช่นเดียวกับน้ำหนักแห้งของพืชที่เพิ่มขึ้นด้วย และพบว่า $Ca_3(PO_4)_2$ และ bonemeal เป็นแหล่งฟอสเฟตที่สามารถละลายออกมาได้มากที่สุดเมื่อมีการใส่จุลินทรีย์ย่อยฟอสเฟต

Taha และคณะ (1969) ได้ทดลองแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากดินในประเทศอียิปต์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ คือ aerobic sporeforming bacteria และ Streptomyces โดยชนิดของแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *Bacillus megatherium* ตามด้วย *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus licheniformis* และจากการทดสอบการละลายฟอสเฟตพบว่า การละลายฟอสเฟตมากขึ้นเมื่อ pH ลดต่ำลง และจากเลี้ยงเชื้อ 14 วัน และเก็บตัวอย่างในวันที่ 2, 6, 10 และ 14 มาวัดปริมาณฟอสเฟตในรูปสารละลายและ pH พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันที่ 10 หรือ 14 และ pH ส่วนใหญ่จะมีการลดต่ำลงจนถึงวันที่มีการละลายฟอสเฟตได้สูงสุด และพบว่าที่มี pH ลดต่ำลงได้มากจะมีปริมาณฟอสเฟตในรูปสารละลายมากด้วย และจากการทดลองพบว่า

B. megatherium สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงสุด คือ 63.0 mg P_2O_5/100 ml. ในวันที่ 10 และวัด pH ได้ 4.7 จากการทดลองการสร้างกรดของจุลินทรีย์ พบว่าส่วนใหญ่สร้างกรด lactic และกรดอื่นๆ ได้แก่ succinic malic gluconic malic และ citric

Yahya และ Al-Azawi (1989) ได้ทดลองแยกแบคทีเรียละลายฟอสเฟตจากดินในพื้นที่เกษตรของประเทศอิรัก 52 ตัวอย่าง พบว่ามากกว่า 90 % ของตัวอย่างดินมีแบคทีเรียละลายฟอสเฟต โดยมีจำนวนตั้งแต่ 0.012-28.4 x 10^4 เซลล์ต่อดิน 1 กรัม และจำนวนของแบคทีเรียที่แยกได้ในแต่ละตัวอย่างดิน มีความสัมพันธ์กับการนำไฟฟ้าของดิน ปริมาณฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุของดิน ความชื้น อินทรียวัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน

Gaind และ Gaur (1991) ได้แยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตทนร้อนจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดินบริเวณรากของพืชตะกูลถั่วและไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว ปุ๋ยคอก หินฟอสเฟต และดินที่ผ่านการเติมหินฟอสเฟต และการทดสอบการย่อยฟอสเฟตที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 45 °C พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่และราทั้งหมดละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 °C แบคทีเรียบางส่วนละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดที่ 40 °C และมีจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์สามารถย่อยฟอสเฟตได้ที่ 45 °C ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulants* และ *Aspergillus niger* และผลของการคลุกเชื้อให้กับพืชคือ mungbean พบว่าช่วยให้เกิดปมที่รากพืชมากขึ้น มีปริมาณฟอสเฟตในรูปสารละลาย น้ำหนักรากและหน่อพืช ต้นและผลผลิต การดูดซึมฟอสฟอรัสและไนโตรเจนของพืชดีขึ้น

MBA (1994) แยกแอกติโนมัยซิสที่ย่อยฟอสเฟตได้จาก earthworm ในปุ๋ยคอก ทั้งหมด 21 สายพันธุ์ และพบว่ามีแอกติโนมัยซิท 2 สายพันธุ์ที่นอกจากการละลายฟอสเฟตได้แล้ว ยังสามารถย่อยเซลลูโลสได้อย่างรวดเร็วด้วย โดยมีการสร้างเอนไซม์ hydrolase และในการทดลองคลุกเชื้อในการปลูกถั่วเหลืองลงในดินที่มีความแห้งแล้ง พบว่าทำให้ผลผลิตของพืชเพิ่มขึ้น 43 % ช่วยปรับปรุงคุณภาพของดินดีขึ้น วัดปริมาณฟอสเฟตที่เป็นประโยชน์ในใบพืชได้เพิ่มขึ้น และการตรึงไนโตรเจนในดินเพิ่มขึ้น 45 % หรือ 11 % ขึ้นกับการควบคุม

Johri และคณะ (1999) แยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชที่ปลูกในดินที่เป็นด่าง (pH 8.5-11) ในประเทศอินเดีย ได้แบคทีเรียทั้งหมด 4,800 สายพันธุ์ และพบว่ามี 857 สายพันธุ์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ เมื่อนำแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมาทดสอบเลี้ยงเชื้อที่มี pH 7, 8 และ 9 มีโซเดียมคลอไรด์ 0, 2.5, และ 5% ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ละลายฟอสเฟตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีโซเดียมคลอไรด์ 0-2.5 % ที่ pH 7 มี 18 สายพันธุ์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5 % และแบคทีเรียบางสายพันธุ์ไม่สามารถย่อยฟอสเฟตได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถ้าไม่มีโซเดียมคลอไรด์

นอกจากการใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตชนิดเดียวเพื่อเพิ่มประโยชน์ให้กับพืชแล้ว ยังได้มีการทดลองผสมจุลินทรีย์หลายชนิดเข้าด้วยกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและเป็นประโยชน์ต่อพืชมากขึ้น ดังรายงานต่อไปนี้

Kunda และ Gaur (1980) ได้ทดลองคลุกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้แก่ *Azotobacter chroococcum* และแบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้แก่ *Pseudomonas striata* และ *Bacillus polymyxa* กับเมล็ดพืช และทดสอบผลการใส่และไม่ใส่ปุ๋ยคอกเสริมลงไปในดิน พบว่าเมื่อคลุกแบคทีเรียผสมสองชนิดคือแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและแบคทีเรียละลายฟอสเฟต เมื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียบริเวณรากพืชพบว่ามีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทั้งสองชนิดมากกว่าการคลุกแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว และช่วยให้พืชมีการดูดซึมธาตุอาหารได้มากขึ้น และพบว่าการเพิ่มปุ๋ยคอก 2 % ในดิน มีผลทำให้จำนวนแบคทีเรียและผลผลิตของพืชมากกว่าดินที่ไม่ใส่ปุ๋ย

Toro, Azcon และ Barca (1997) ได้ทดสอบใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตได้แก่ *Enterobacter* sp. และ *Bacillus subtilis* ร่วมกับเชื้อรา Abuscular Mycorrhiza ได้แก่ *Glomus intraradices* ในการปลูกพืชในดินที่มีฟอสเฟตในรูปสารละลายต่ำและมีการเติมหินฟอสเฟต พบว่าการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิดนี้ร่วมกันทำให้น้ำหนักแห้ง การดูดซึมไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของพืชดีขึ้น และมีฟอสเฟตในรูปสารละลายเพิ่มมากขึ้นอย่างน้อย 75 %

ในประเทศไทยได้มีความสนใจศึกษาการใช้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในระยะเวลาที่ไม่นานนัก โดยพบว่ามีรายงานวิจัยบางฉบับที่รายงานผลเกี่ยวกับจุลินทรีย์ชนิดนี้ เช่น

สุนทร มีสวัสดิ์และสมศักดิ์ วังใน (2527) ได้ทดสอบการละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชโดยใช้แบคทีเรีย *Thiobacillus* sp. ที่แยกได้จากดินองครักษ์คลุกเมล็ดข้าวโพดก่อนปลูกลงในดินที่ใช้หินฟอสเฟตจากจังหวัดลำพูนเป็นปุ๋ยฟอสเฟต เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้คลุกเชื้อพบว่า ข้าวโพดที่มีการคลุกเชื้อสามารถดูดฟอสฟอรัสและมีน้ำหนักแห้งสูงกว่าข้าวโพดที่ไม่มีการคลุกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ

ธงชัย มาลาและคณะ (2533) ได้ทดลองแยกแบคทีเรียและราที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตจากดินร้อยเอ็ด บางเลน กำแพงแสน และเสนา พบว่าในดินร้อยเอ็ดมีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมากที่สุด โดยพบว่าปริมาณแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตคิดเป็น 15.25, 13.36, 6.16 และ33 เปอร์เซนต์ของแบคทีเรียทั้งหมดในดินร้อยเอ็ด บางเลน กำแพงแสน และเสนา ตามลำดับ ส่วนปริมาณราที่สามารถละลายฟอสเฟตได้มีค่าเป็น 51.49, 5.34, 29.73 และ 33.37 เปอร์เซนต์ของราทั้งหมดในดินร้อยเอ็ด บางเลน กำแพงแสน และเสนา ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่าที่ระดับความลึกของดินที่แตกต่างกัน จะมีปริมาณจุลินทรีย์ที่ละลายฟอสเฟตได้แตกต่างกัน คือ ในดินชั้นบนจะมีปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตมากกว่าดินชั้นล่าง

ธงชัย มาลาและคณะ (2534) ได้ทดลองใช้ราชนิดต่างๆ ที่สามารถละลายฟอสเฟตร่วมกับหินฟอสเฟตในปริมาณต่างๆ กัน เพื่อเพิ่มผลผลิตของข้าวโพด พบว่าในชุดการทดลองที่มี

การคลุกเมล็ดข้าวโพดด้วยราก่อนการปลูกให้ผลผลิตสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการคลุกรา และชุดการทดลองที่มีการคลุกด้วยราร่วมกับใส่หินฟอสเฟตบดให้ผลผลิตข้าวโพดมากที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย