บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ไนโตรเจน เป็นธาตุอาหารหลัก (macronutrient) ซึ่งมีบทบาทในการเจริญเติบโตของพืชอย่างเห็นได้ชัด เพราะเป็นธาตุที่ช่วยให้พืชทุกชนิดสร้างโปรตีน เพื่อเป็นส่วนประกอบของ protoplasm ไนโตรเจนยังเป็นส่วนประกอบของเอ็นไซม์ซึ่งมีหน้าที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ nucleoprotein เป็นสารประกอบที่อยู่ในโครโมโซม ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในระบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (heredity) chlorophyll เป็นส่วนที่ทำให้ใบพืชเป็นสีเขียวและมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง vitamin adenosine triphosphate (ATP) ฮอร์โมนบางชนิดและสารประกอบอื่น ๆ ธาตุไนโตรเจนในพืชประมาณร้อยละ 70 อยู่ใน chloroplast รากพืชดูดไนโตรเจนจากดินมาใช้ในรูปของเกลือไนเตรต (NO_3^-) และเกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) และส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอดอ่อน ใบและกิ่งก้าน ถ้าขาดพืชจะมีอาการปราศจากสีเขียว โดยเฉพาะที่ใบ ใบของพืชจะเหลืองผิดปกติ พืชบางชนิดมีลำต้นสีเหลือง บางทีก็มีสีชมพูเจือปนอยู่ด้วย ใบล่างของพืชจะมีสีเหลืองปนส้ม ปลายใบและขอบใบจะค่อย ๆ แห้งและลุกลามเข้าไปเรื่อย ๆ จนในที่สุด ใบจะร่วงหล่นออกจากต้นก่อนกำหนดที่ควรจะหล่น ลำต้นผอมสูง กิ่งก้านลีบเล็ก และมีจำนวนน้อย พืชจะไม่เติบโตหรือโตช้ามาก การแตกยอดและกิ่งก้านช้า ผลผลิตต่ำ และคุณภาพไม่พึงปรารถนา

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักอีกธาตุหนึ่ง ซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารอินทรีย์ในพืช เช่น nucleic acid เป็นองค์ประกอบสำคัญของ gene บน chromosome nucleoprotein เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติหน้าที่ของเซลล์ การสร้างองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการสืบพันธุ์ co-enzyme บางชนิดเป็นองค์ประกอบของเมมเบรนในเซลล์ เป็นองค์ประกอบของ ADP ATP และ NADP ซึ่งมีบทบาทในด้านเมทาบอลิซึมของพลังงาน phospholipid และ phytic acid ถ้าพืชขาดจะมีผลต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ ในขั้นแรกอัตราการสังเคราะห์แสงยังเป็นปกติอยู่ แต่อัตราการหายใจลดลงทำให้เกิดการสะสมคาร์โบไฮเดรต หลังจากนั้นพืชจะมีใบสีเขียวเข้ม เกิดการสะสมของรงควัตถุพวก anthocyanin ที่ลำต้น และก้านใบ ทำให้ก้านใบเป็นสีชมพู อาการเริ่มเกิดที่ใบแก่ก่อน ใบจะเป็นจุดแห้งตาย การเจริญเติบโตของพืชหยุดชะงัก ลำต้นแคระแกร็นไม่ออกดอก ไม้เถาอาจพบลำต้นบิดเกลียว เนื้อไม้แข็งเปราะหักง่าย ใบเล็กผิดปกติ สีของใบล่างมักมีสีเหลืองอมสีอื่น (เช่น ข้าวโพดอมสีม่วง) สีของใบบน ใกล้ยอด กับสีของใบล่างต่างกันเด่นชัด ออกดอกช้ากว่าปกติ ดอกอาจเล็ก และเปอร์เซ็นต์ของดอกที่ติดผลต่ำกว่าปกติ พืชแก่ช้า รากผอม บาง สั้น และมีจำนวนจำกัด (สมบุญ, 2544 และยงยุทธ และคณะ, 2541)

เนื่องจากไนโตรเจน และฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลัก ซึ่งพืชต้องการในปริมาณมาก (ตารางที่ 1) แต่เมื่อพิจารณาถึงร้อยละของไนโตรเจน และฟอสฟอรัสของดินบน ในเขตอบอุ่น (ตารางที่ 2) จะเห็นว่ามีค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้บางส่วนอาจอยู่ในรูปของสารประกอบที่พืชใช้ประโยชน์ได้ยาก ต้องสลายตัว หรือเปลี่ยนรูปเสียก่อนจึงจะเป็นประโยชน์ต่อพืช ดินทั่ว ๆ ไปจึงมักจะให้ธาตุทั้งสองนี้ไม่เพียงพอกับความต้องการของพืช ดังนั้นจึงต้องมีการใส่ปุ๋ยลงในดินเพื่อเพิ่มธาตุอาหารให้แก่พืช

ตารางที่ 1 ปริมาณความต้องการธาตุอาหารพืชของพืชต่าง ๆ

Crop	Yield	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Zn
	$t\ ha^{-1}$	$kg\ ha^{-1}$						$g\ ha^{-1}$		
Grains										
Barley (Grain)	2.2	40	8	10	1	2	3	34	30	70
Barley (Straw)	2.5	17	3	30	9	2	5	11	360	60
Wheat (Grain)	2.7	56	13	14	1	7	3	33	100	160
Wheat (Straw)	3.8	22	3	33	7	4	6	11	180	56
Oats (Grain)	2.9	55	10	14	2	3	6	34	134	56
Oats (Straw)	5.0	28	8	75	9	9	10	34	-	330
Maize (Grain)	9.5	150	27	37	2	9	11	66	100	170
Maize (Straw)	11.0	110	19	135	29	22	16	55	1700	359
Hay										
Lucerne	10.0	200	20	170	125	24	21	66	500	470
Coastal Bermuda Grass	20.0	340	35	250	46	27	40	230	-	-
Red Clover	6.0	110	13	95	77	19	8	45	600	400
Timothy	6.0	66	13	90	20	7	6	33	340	220

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Crop	Yield	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Zn
	t ha^{-1}	kg ha^{-1}						g ha^{-1}		
Other Crops										
Sugarbeet	50	20	40	250	300	50	50	-	-	-
Sugarcane	75.0	110	27	250	31	26	26	-	-	-
Tobacco (Leaves)	2.2	83	8	110	83	20	15	33	60	80
Cotton (Seed and Lint)	1.7	45	11	14	2	4	3	66	120	350
Cotton (Stalks, Leaves and Burs)	2.2	39	5	33	31	9	17	-	-	-
Potatoes (Tubers)	27.0	90	15	140	3	7	7	44	100	60
Tomatoes (Fruit)	50.0	130	20	150	8	12	15	80	145	180
Cabbage	50.0	145	18	120	22	9	50	44	110	90

source : (Mengel and Kirkby, 1987)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ดินทางเคมีของดินบนในแถบอบอุ่น

รายการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์
อินทรียวัตถุ (%)	0.40-10.00
ไนโตรเจน (% N)	0.02-0.50
ฟอสฟอรัส (% P_2O_5)	0.02-0.40
โพแทสเซียม (% K_2O)	0.20-4.00
แคลเซียม (% CaO)	0.10-5.00
แมกนีเซียม (% MgO)	0.20-2.50
กำมะถัน (% SO_3)	0.02-0.50
เหล็ก (ppm Fe)*	500-5,000

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รายการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์
แมงกานีส (ppm Mn)	20-1,000
สังกะสี (ppm Zn)	1-25
โบรอน (ppm B)	0.5-15
ทองแดง (ppm Cu)	0.5-15
โมลิบดินัม (ppm Mo)	0.02-0.5
คลอรีน (ppm Cl)	1-100

*1 ppm = 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ที่มา : (ดำริและสุทิน, 2541)

การใช้ปุ๋ยเคมีในการเกษตรของไทยในช่วง 10 ปี ที่ผ่านมา (2529-2538) เพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 10.27 ต่อปี โดยที่ราคาปุ๋ยเคมีในประเทศขึ้นอยู่กับราคาปุ๋ยเคมีในตลาดโลกเป็นสำคัญ อันเนื่องมาจากต้องพึ่งพาการนำเข้าปุ๋ยเคมีจากต่างประเทศ ดังนั้น จึงทำให้เกษตรกรต้องประสบปัญหาปุ๋ยเคมีมีราคาแพง ขาดคุณภาพ และขาดแคลนในช่วงฤดูกาลเพาะปลูก นอกจากนั้นยังมีปัญหาเกี่ยวกับการที่เกษตรกรใช้ปุ๋ยเคมีไม่ถูกต้องและเหมาะสมกับกลุ่มดินและชนิดพืชด้วย จากการประมาณการความต้องการใช้ปุ๋ยเคมีในการผลิตพืชโดยรวมในช่วงปี 2539-2543 พบว่า มีความต้องการใช้ปุ๋ยเคมีเพิ่มขึ้นจาก 3.43-3.45 ล้านตัน ในปี 2539 เป็น 3.99-4.06 ล้านตัน ในปี 2543 หรือมีอัตราเพิ่มโดยเฉลี่ย 3.83-4.19 ต่อปี ส่วนปริมาณความต้องการใช้ปุ๋ยเคมีในการผลิตพืชแต่ละกลุ่มนั้น พืชไร่จะมีความต้องการใช้ปุ๋ยเคมีเพิ่มมากที่สุด คือ มีอัตราเพิ่มโดยเฉลี่ยร้อยละ 8.48 ต่อปี รองลงมาได้แก่ ไม้ผลและไม้ยืนต้น ผัก ไม้ดอกและไม้ประดับ และข้าว โดยมีอัตราเพิ่มโดยเฉลี่ยร้อยละ 5.08 6.51 2.35 และ 1.45 ตามลำดับ ในการผลิตปุ๋ยเคมีมีกระบวนการผลิตที่สิ้นเปลืองพลังงาน ทำให้ต้นทุนสูง การใช้ในปริมาณมากอย่างต่อเนื่องยังอาจจะทำให้ คุณภาพของดินเสื่อมโทรมลงอีกด้วย ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่นำมาใช้ คือ การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ที่สามารถผลิตได้ง่ายเพราะทำจากวัสดุที่หาได้ง่าย เช่น มูลสัตว์ ซากพืช ซากสัตว์ และของเสียที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น ในปุ๋ยอินทรีย์จะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพของดินและมีจุลธาตุอยู่อย่างเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะปุ๋ยมูลสัตว์ อย่างไรก็ตาม ปุ๋ยอินทรีย์มีธาตุอาหารหลักต่ำทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้ทำปุ๋ย (ตารางที่ 3) ทำให้ต้องใส่ในปริมาณสูง จึงต้องมีการปรับปรุงคุณภาพของปุ๋ยอินทรีย์โดยเพิ่มธาตุอาหารหลักโดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพ

ตารางที่ 3 ปริมาณธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์จากวัสดุอินทรีย์

ชนิดของปุ๋ย	ไนโตรเจน (%N)	ฟอสฟอรัส (%P)	โพแทสเซียม (%K)
แหนแดง	3.30	0.57	1.23
กากส่าเหล้า	2.06	0.17	1.03
Filter cake จากโรงงานน้ำตาล	1.01	2.41	0.44
Sludge จากโรงงานสุรา	5.94	0.56	0.50
กากละหุ่งจากโรงงานน้ำมัน	5.26	1.12	0.58
มูลวัว	1.10	0.40	1.60
มูลควาย	0.97	0.60	1.66
มูลสุกร	1.30	2.40	1.00
มูลไก่	2.42	6.29	2.11
มูลเป็ด	1.02	1.84	0.52
มูลค้างคาว	1.54	14.28	0.60
ปุ๋ยหมักฟางข้าว	1.34	0.53	0.97
กากอ้อย	0.62	0.99	0.46
กากเมล็ดนุ่น	4.69	2.28	1.45
กากเมล็ดฝ้าย	6.92	2.96	1.12
กระดูกป่น	3.40	27.14	0.04
ฟางข้าว	0.59	0.08	1.72
แกลบ(15% SiO_2)	0.46	0.26	0.70
ละอองข้าว	2.71	0.68	0.56
ขี้เถ้าแกลบ(85-90 SiO_2%)	0.00	0.15	0.81
ใบเสียว	1.64	0.14	0.43
ใบกระถินณรงค์	1.58	0.10	0.40
ใบกระถินเทพา	1.09	0.03	0.06
ใบยูคาลิปตัส	0.68	0.07	0.03
ผักตบชวา	1.55	0.46	0.49
ใบฉำฉา	2.10	0.09	0.40
โสนแอฟริกัน	1.68	0.15	2.40

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของปุ๋ย	ไนโตรเจน (%N)	ฟอสฟอรัส (%P)	โพแทสเซียม (%K)
โสนอินเดีย	2.25	0.35	3.03
โสนแดง	2.25	0.34	2.34
ไมยราพไร้หนาม	1.04	0.04	1.03
ปอเทือง	1.98	0.30	2.41
ถั่วมะแฮะ	1.42	0.26	0.90
ถั่วพร้า	3.03	0.37	3.12
ถั่วพุ่ม	2.05	0.22	3.20
ถั่วเหลือง	2.71	0.56	2.47
ถั่วเขียว	1.85	0.23	3.00
กระถินยักษ์	3.70	0.24	1.88
ถั่วฮามาต้า	1.06	0.02	0.97
ถั่วลาย	1.60	0.04	1.32
คุดซู่	1.94	0.02	0.97
คาลาโปโกเนียม	1.11	0.03	0.82
ซังข้าวโพด	1.78	0.25	1.53
ต้นข้าวโพด	0.71	0.11	1.38
ต้นมันสำปะหลัง	1.23	0.24	1.23

ที่มา : (ดำริและสุทิน, 2541)

ปุ๋ยอินทรีย์ หมายถึง ปุ๋ยที่ได้มาจากอินทรียสารที่ผลิตขึ้นโดยกรรมวิธีต่าง ๆ และก่อนที่จะนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อพืช จะต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ทางชีวภาพเสียก่อน ปุ๋ยอินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ ปุ๋ยหมัก ได้จากการนำเอาเศษอินทรียสารมากองสะสมกันแล้วปล่อยให้เน่าเปื่อยสลายตัว แปรสภาพเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็ก และมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงสภาพจากเดิมอย่างสิ้นเชิงโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินจนกลายเป็นฮิวมัส (humus) ซึ่งมีคุณสมบัติและบทบาทดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 คุณสมบัติและบทบาทของ humus ในดิน

คุณสมบัติ	ลักษณะ	ผลที่มีต่อดิน
1. สี (Color)	มีสีน้ำตาลเข้มไปจนถึงดำ ดินที่มีอินทรียวัตถุสูงก็มักมีสีคล้ำ	สีที่เข้มขึ้นอาจมีส่วนทำให้อุณหภูมิของดินโดยรวมสูงขึ้น เนื่องจากดินสีคล้ำดูดกลืน (absorb) รักษาความร้อนได้ดีกว่าดินสีจาง
2. การดูดซับน้ำ (Water retention)	มีความสามารถดูดซับน้ำได้ในปริมาณมาก คือ ประมาณ 20 เท่า ของน้ำหนัก ทั้งนี้เนื่องจาก เป็นอนุภาคขนาดเล็กและมีลักษณะเป็นสารคอลลอยด์ จึงมีพื้นที่ผิวในการดูดซับน้ำไว้ได้มากเป็นพิเศษ นอกจากนั้นอนุภาคของอินทรียวัตถุยังประกอบกันเป็นโครงสร้าง มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ มีช่องขนาดเล็กที่ดูดซับน้ำได้ดีอยู่มาก	ช่วยเพิ่มความสามารถในการกักเก็บน้ำของดินทราย หรือดินเนื้อหยาบ
3. การเป็นสารเชื่อมอนุภาคดิน (Combination with clay minerals)	เป็นสารประกอบที่มีประสิทธิภาพสูงในการเกาะยึดหรือรวมตัวกับอนุภาคต่าง ๆ ในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุภาคดินเหนียวหรือเซลล์จุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี การจับตัวกันนี้บางส่วนก็เนื่องมาจากประจุส่วนที่แตกต่างกันระหว่างอินทรียวัตถุกับดินเหนียว หรือเป็นการเกาะยึดระหว่างประจุลบของอนุภาคทั้งสองโดยมี multivalent cation ต่าง ๆ เป็นตัวเชื่อมโยง นอกจากนี้ การสร้างสารเชื่อมโดยจุลินทรีย์ ทำให้ดินเหนียวเกาะยึดกันเป็นเม็ดดิน ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างย่อยที่อาจรวมกลุ่มกันจำนวนมากก่อให้เกิดโครงสร้างของดินที่ดี	สามารถดูดซับน้ำไว้ได้มาก ขณะเดียวกันก็ทำให้ดินมีสภาพร่วนซุย มีการซึมซับน้ำและการระบายอากาศดี

ตารางที่ 4 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ลักษณะ	ผลที่มีต่อดิน
4. Chelation	อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับ Cu^{2+} Mn^{2+} Zn^{2+} และ polyvalent cation อื่น ๆ	เพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารรองให้แก่พืชชั้นสูง
5. การละลายน้ำ (Solubility in water)	โดยปกติส่วนที่ละลายน้ำได้ของอินทรียวัตถุในดินนั้นมีอยู่น้อยมาก ปริมาณที่พบมักจะต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ อินทรียวัตถุส่วนใหญ่เป็นพวกไม่ละลายน้ำ เช่น เซลล์ของจุลินทรีย์ เซลลูโลส (cellulos) ลิกนิน (lignin) ไคติน (chitin) สารฮิวมิก (humic substance) ตลอดจนสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่เกาะยึดกับดินเหนียวหรือทำปฏิกิริยากับ หรือทำกฏิกิริยากับเกลือของ divalent และ trivalent cations ทำให้อยู่ในสภาพไม่ละลาย	การละลายสูญหายไปกับการชะล้างของน้ำนั้นมีเป็นเพียงส่วนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่สูญเสียไปโดยการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์
6. ความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลง pH ของดิน (Buffer action)	อินทรียวัตถุในดินมีประจุเป็นลบเป็นจำนวนมาก และมีความสามารถดูดซับ cation ได้สูง จึงมีผลทำให้ดินที่มีอินทรียวัตถุสูงมีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลง pH ของดินได้ดี หรือมี buffering capacity สูงขึ้น	ไม่ว่าจะมีการเพิ่มสารประกอบที่มีสมบัติเป็นกรดหรือด่างลงไปในดินก็ตาม ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นทันที เพื่อรักษาสมดุลไว้ โอกาสที่กรดหรือด่างจะสะสมอยู่ในสารละลายดิน (soil solution) จึงมีน้อย เป็นเหตุให้ pH ของดินเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยเท่านั้น ถ้าในดินนั้นมีอินทรียวัตถุสะสมอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม
7. Cation Exchange Capacity	สัดส่วนความสามารถในการเป็นกรดทั้งหมดที่แยกได้จาก humus อยู่ในช่วง 300-14,000 cmoles/kg	อินทรียวัตถุสามารถเพิ่มค่า cation exchange capacity (CEC) ของดินต่าง ๆ ได้ 20-70%

ตารางที่ 4 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ลักษณะ	ผลที่มีต่อดิน
8. ความสามารถในการดูดซับ cation และ anion	ความสามารถในการดูดซับไอออนของอินทรียวัตถุในดินนั้นสูงมาก โดยทั่วไป การดูดซับโดยอินทรียวัตถุในดินจะสูงกว่าคอลลอยด์อื่น ๆ ตั้งแต่ 2-30 เท่า	ในดินโดยทั่วไป ปริมาณของ cation ที่ถูกดูดซับโดยอินทรียวัตถุในดินจะอยู่ในช่วงประมาณ 30-90% ของปริมาณที่ดินดูดซับได้ทั้งหมด
9. แหล่งธาตุอาหารพืช (Mineralization)	การย่อยสลายอินทรียวัตถุโดยจุลินทรีย์ ทำให้ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์เหล่านี้ถูกปลดปล่อยออกมาให้พืช สามารถนำไปใช้ได้อีก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CO_2 NH_4^+ NO_3^- PO_4^{3-} และ SO_4^{2-} ซึ่งอินทรียวัตถุในดินจัดว่า เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญมากของธาตุเหล่านี้	การสลายตัวของอินทรียวัตถุในดินยังมีผลโดยทางอ้อมต่อความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชอีกด้วย เพราะกรดอินทรีย์หรือกรดคาร์บอนิกที่เกิดขึ้นจากคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งได้จากการย่อยสลาย ยังสามารถช่วยละลายสารประกอบของธาตุอาหารบางชนิดให้เป็นประโยชน์ต่อพืช
9. แหล่งอาหารของจุลินทรีย์ดิน (Combines with xenobiotics)	สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหาร หรือแหล่งพลังงานสำคัญที่สุดสำหรับจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในดิน ซึ่งเป็นพวก heterotroph ดังนั้น ปริมาณหรือคุณภาพของสารอินทรีย์ จึงมีผลกระทบต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์เหล่านี้โดยตรง เช่น การตรึงไนโตรเจน denitrification การเกิดก๊าซมีเทน (CH_4) และอื่น ๆ โดยปกติแล้วดินที่ใช้ในการเพาะปลูกโดยทั่วไปมีอินทรียวัตถุที่จะเป็นอาหาร หรือให้พลังงานแก่จุลินทรีย์อยู่จำกัดไม่เพียงพอกับความต้องการของจุลินทรีย์	การใส่อินทรียวัตถุลงไปทำให้ประชากรและกิจกรรมของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีผลกระทบต่อเนื่องไปถึงการแปรสภาพของธาตุอาหารพืชที่มีอยู่ในดินด้วย

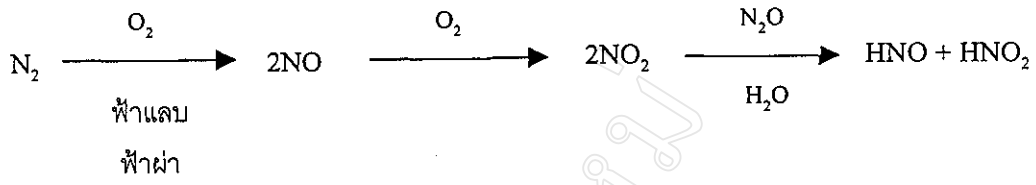
ที่มา : (ยงยุทธและคณะ, 2541 และ Stevenson, 1994)

อย่างไรก็ตาม ปุ๋ยอินทรีย์มีข้อจำกัดในการใช้อยู่บ้าง คือ มีธาตุอาหารต่ำทำให้ต้องใส่ในปริมาณสูง สิ้นเปลืองแรงงาน และค่าใช้จ่ายในการขนย้าย สิ้นเปลืองเนื้อที่เก็บรักษา คุณภาพของปุ๋ยอินทรีย์จากต่างแหล่งที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ บางโอกาสหายากหรือไม่เพียงพอต่อความต้องการ ในบางครั้งอาจทำให้มีราคาแพงเกินไปเพราะต้องใช้ในปริมาณมากจึงจะได้ธาตุอาหารที่เพียงพอ เมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยเคมี ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงคุณภาพของปุ๋ยอินทรีย์โดยเพิ่มธาตุอาหาร โดยเฉพาะธาตุอาหารหลัก ซึ่งอาศัยกระบวนการทางชีวภาพ คือ กระบวนการของจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน (N_2) จากอากาศ และการย่อยสลายหินฟอสเฟตให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์

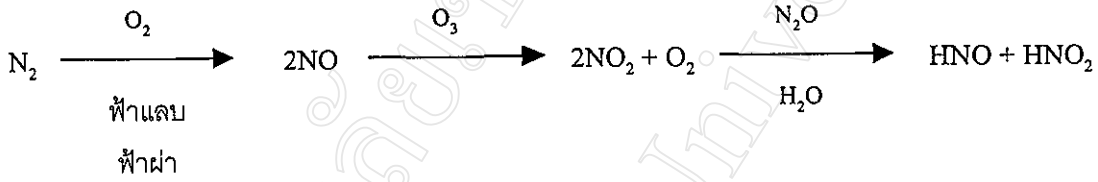
วงจรไนโตรเจน เป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของไนโตรเจนจากองค์ประกอบภายในเนื้อเยื่อพืช โดยสารประกอบเหล่านี้จะถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายภายหลังจากพืชตาย แล้วแปรสภาพต่อไป ซึ่งในที่สุดก็ผันกลับมาอยู่ในสถานะออกซิเดชั่น (oxidation state) เดิม การสูญเสียไนโตรเจนมีหลายทาง คือ พืชและจุลินทรีย์ในดินนำไปใช้ประโยชน์ การชะล้าง (leaching) ไนโตรเจนในดิน โดยเฉพาะในรูปไนเตรต (NO_3^-) และไนไตรต์ (NO_2^-) ซึ่งละลายในน้ำได้ง่าย จะมีการสูญเสียอย่างรวดเร็วมากเมื่อมีฝนตก หรือมีการให้น้ำชลประทาน และการสูญเสียในรูปของก๊าซ (volatilization) ไนโตรเจน ส่วนการได้มาของไนโตรเจนในดินเนื่องจากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยจุลินทรีย์ที่มีภาวะอยู่ร่วมกับพืชบางชนิด และจุลินทรีย์ที่อยู่อย่างอิสระในดินบริเวณรากพืช น้ำฝน และการใส่ปุ๋ย แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญของพืชตามธรรมชาติหากไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมีให้แก่ดินได้มาจากบรรยากาศ เนื่องจากในอากาศโดยทั่วไปมีก๊าซไนโตรเจน (N_2) อยู่ประมาณ 78-80 % (Postgate, 1978) ดังนั้นการได้รับไนโตรเจนลงสู่ดินส่วนใหญ่ได้จากกระบวนการตรึงของจุลินทรีย์ จากรายงานพบว่าจุลินทรีย์อาศัยอยู่อย่างอิสระสามารถเพิ่มไนโตรเจนให้แก่ดินได้ถึง 7.3-9.0 กก./ไร่/ปี (ยงยุทธ และคณะ, 2541)

การตรึงไนโตรเจนเป็นการรีดิวซ์ (reduce) ก๊าซไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นแอมโมเนีย หรือเปลี่ยนไปเป็นรูปสารประกอบไนโตรเจน อาจแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ

1. การตรึงไนโตรเจนทางกายภาพหรือการตรึงที่ไม่เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิต (nonbiological nitrogen fixation) ปัจจุบันการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีนี้ได้นำมาผลิตก๊าซแอมโมเนียในโรงงานอุตสาหกรรม ในกระบวนการนี้ต้องผ่านก๊าซไนโตรเจนและไฮโดรเจนเข้าไปในที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 400-500 องศาเซลเซียส และความดัน 200 บาร์ ส่วนการตรึงไนโตรเจนทางกายภาพที่เกิดตามธรรมชาติ ได้แก่ การเกิดฟ้าแลบ ฟ้าผ่า ทำให้ไอน้ำและออกซิเจนแตกตัวเป็นอะตอมอิสระ (free radicle) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับไนโตรเจนในบรรยากาศอย่างรวดเร็วเกิดสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ กรดไนไตรต์ (HNO_2) และกรดไนตริก (HNO_3) ดังสมการ



ในบรรยากาศมีโอโซนอยู่มาก โอโซนอาจทำให้ปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์แทนออกซิเจนได้ดังนี้



2. การตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (biological N_2-fixation) เป็นการตรึงไนโตรเจนของสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ nitrogenase ได้ เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน อาจแบ่งกลุ่มตามความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดังนี้ (ตารางที่ 5)

2.1 กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (free living nitrogen fixation)

2.2 กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiotic nitrogen fixation)

2.3 กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนแบบมีส่วนร่วม (associative nitrogen fixation)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 5 จุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

1. free-living (non-symbiotic) nitrogen fixation	
1.1 Bacteria	
Aerobe	*Azotobacter, Azotomonas, Bacillus, Beijerinckia*
Anaerobe	*Clostridium, Desulfovibrio*
Photosynthetic	*Chlorobium, Chromatium, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum*
1.2 Blue green algae	
nonheterocyst	*Oscillatoria, Plectonema, Lynbya, Phormidum*
heterocyst	*Anabaena, Calothrix, Nostoc, Gleotrichia, Scytonema, Tolypothrix*
2. Symbiotic nitrogen fixation	
Plant	Microorganism
2.1 Root Nodule	
Legume	*Rhizobium* (bacteria)
Nonlegume	
Casuarina	*Frankia* (Actinomycetes)
Alnus	*Frankia* (Actinomycetes)
Macrozamia	*Nostoc* or *Anabaena* (blue green algae)
Cycas	*Nostoc* (blue green algae)
2.2 Stemnodule	
Aeschynomena	*Azorhizobium* (bacteria)
Neptunia	*Azorhizobium* (bacteria)
Sesbania	*Azorhizobium* (bacteria)
2.3 Leaf nodule	
Psychotria	*Krebsiella* (bacteria)
Ardisia	Bacteria

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางที่ 5 (ต่อ)

3. Associative nitrogen fixation	
Azolla	*Anabaena* (blue green algae)
Sugar cane, grasses	*Azospirillum* (bacteria)
Wheat	*Krebsiella* (bacteria)

ที่มา : สมบุญ (2544)

Azotobacter เป็นแบคทีเรียพวกที่ต้องการออกซิเจน (aerobes) แต่สามารถเจริญได้เมื่อมีระดับออกซิเจนลดลง สามารถใช้น้ำตาล alcohol และเกลือของสารอื่น ๆ ได้ นอกจากใช้ก๊าซ N_2 เป็นแหล่งไนโตรเจนแล้ว ยังสามารถใช้ NO_3^- และ NH_4^+ ตลอดจน amino acid บางชนิดได้ด้วย เมื่อใช้ไนโตรเจนในรูปอื่นที่ไม่ใช้ก๊าซไนโตรเจน สามารถเจริญได้ในที่มี pH 4.8-8.5 แต่ถ้าต้องใช้ไนโตรเจนก๊าซ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 7.0-7.5 ทุก Species ยกเว้น *Azotobacter armeniacus* และ *A. parpali* รีดิวซ์ NO_3^- เป็น NO_2^- ได้ แต่ไม่สามารถรีดิวส์ต่อไปจนกระทั่งเป็นก๊าซ ซึ่งแสดงว่าไม่มีความสามารถในการทำให้เกิดการสูญเสียไนโตรเจนโดยกระบวนการ denitrification ในการตรึงไนโตรเจนแบคทีเรียชนิดนี้ต้องการสภาวะ pH ที่เป็นกลาง แต่ *Azotobacter beijerinckii* ค่อนข้างทนกรดได้ดีกว่า species อื่นๆ คือ มีช่วง pH ที่พบได้อยู่ในช่วง 5.0-10.0 (Tchan, 1953; Jensen and Peterson, 1955 อ้างโดย Krieg and Holt, 1985)

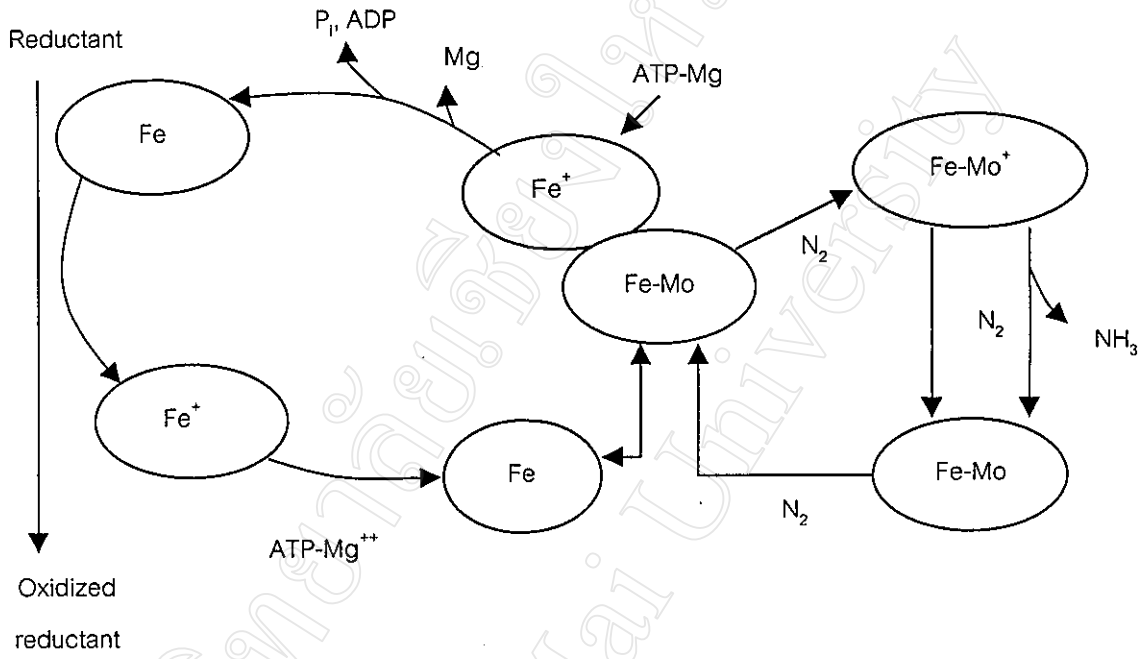
Beijerinckia เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อีกชนิดหนึ่ง แบคทีเรียชนิดนี้เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง หัวและทายเซลล์มีลักษณะกลม โดยทั่วไปอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 0.5-1.5 μm ความยาวเซลล์ 1.7-4.5 μm ภายในเซลล์มีเม็ดของสารประกอบ poly-β-hydroxy butyrate บาง species มี cyst และ capsule ติดสี gram ลบ เคลื่อนที่โดย flagella ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 20-30 องศาเซลเซียส ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH ที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 3.0-10.0 ในอากาศแห้งที่ปราศจากไนโตรเจน เชื้อจะสร้างราเมือก ทุกสายพันธุ์สามารถใช้ glucose fructose และ sucrose ได้ ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี peptone ใช้ glutamate ได้เล็กน้อยหรือใช้ไม่ได้เลย มีความต้องการ Mo ในการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนเหมือนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ชนิดอื่น ๆ แต่ปริมาณที่ต้องการสูงกว่า *Azotobacter* คือ ต้องการ Mo 0.004-0.034 ppm (0.4-3.5 μg/100 มล.) แต่ที่แตกต่างจาก *Azotobacter* คือ สามารถใช้ vanadium แทน molybdenum ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน *Beijerinckia* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 10-13 mgN/g glucose ประสิทธิภาพในการตรึง

ไนโตรเจนผันแปรได้อย่างกว้างขวางขึ้นกับอัตราการเจริญเติบโต อายุของเชื้อและความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรต ความสามารถในการใช้ NO_3^- หรือ NH_4^+ ของ *Beijerinckia* สายพันธุ์ต่าง ๆ แตกต่างกัน ชนิดที่ใช้ NO_3^- หรือ NH_4^+ เป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ ได้แก่ *B. indica* บางสายพันธุ์ (Krieg and Holt, 1932)

Azospirillum สามารถใช้ NO_3^- ได้โดยแบคทีเรียมีเอ็นไซม์ nitrate reductase (Neyra and van Bukum, 1977 อ้างโดย Krieg and Holt, 1984) ทุกสายพันธุ์รีดิวซ์ NO_3^- เป็น NO_2^- โดยกลไกการดูดใช้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic assimilatory pathway) หรือโดยกลไกที่ไม่ต้องมีออกซิเจน (anaerobic dissimilatory หรือ respiratory pathway) ประมาณ 50% ของสายพันธุ์ต่างๆ ของ *Azospirillum* ที่รีดิวส์ NO_3^- ได้ สามารถรีดิวส์ NO_2^- ต่อไปจนกระทั่งกลายเป็น nitrous oxide และก๊าซไนโตเจน (Neyra *et al.*, 1977 อ้างโดย Krieg and Holt, 1984) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี malate เป็นองค์ประกอบและมีความเข้มข้นของ NO_3^- 100 mM สายพันธุ์ของ *Azospirillum brasilense* สามารถทำให้เกิด denitrification สามารถเจริญเติบโตได้โดยไม่ต้องมีออกซิเจนและเมื่อความเข้มข้นของ NO_3^- ลดลงจนถึงระดับ 20 mM พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสแต่การเจริญเติบโตลดลงอย่างมาก (Nelson and Knowles, 1978 อ้างโดย Krieg and Holt, 1984) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NO_3^- - N 10 mM เชื้อแบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนได้เป็นเวลา 30 – 60 นาที โดยไม่ต้องอาศัยออกซิเจน แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Neyra and Ban Berkum, 1977; Scott *et al.*, 1979 อ้างโดย Krieg and Holt, 1984) ในช่วงดังกล่าว NO_2^- ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าว สามารถใช้ NO_2^- เพื่อการเจริญเติบโตต่อไปอีก เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นการตรึงไนโตรเจนจะหยุดชะงัก (Bothe, Stephen and Dobereiner ผลงานที่ไม่ได้ตีพิมพ์ อ้างโดย Krieg and Holt, 1984) เมื่อมี NO_2^- สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Azospirillum* จะเริ่มใช้ NO_2^- ในการเจริญเติบโตและหยุดยั้งการตรึงไนโตรเจน *Azospirillum* สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อมีเกลือของกรดอินทรีย์ เช่น malate succinate lactate หรือ pyruvate (*A. brasilense* บาง species) และยังสามารถใช้ methane methanol หรือ formate เป็นพลังงานได้ด้วย (Sampaio *et al.*, 1981 อ้างโดย Krieg and Holt, 1984) สำหรับ *A. lipoferum* ยังใช้ glucose และ α-ketoglutarate ได้อีกนอกเหนือจาก malate succinate pyruvate lactate และ fructose. (Child and Kurz, 1978 อ้างโดย Krieg and Holt, 1984)

เอ็นไซม์ nitrogenase ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ azofer มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 50,000 ถึง 70,000 และ azofermo มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100,000-300,000 โปรตีนทั้ง 2 ชนิดรวมกันในอัตรา 2 : 1 การทำงานของเอ็นไซม์ nitrogenase ต้องการพลังงานในรูป ATP และตัวให้อิเล็กตรอนจาก reductant และได้พลังงานจาก ATP-Mg-complex ในขณะที่ Azofermo เป็นตัวจับ

ไนโตรเจนจากอากาศและได้รับการส่งผ่าน e^- จาก Azofer ซึ่งก๊าซไนโตรเจนจะถูกรีดิวซ์ จากการซ้ำวงจรนี้เรื่อยๆ ไปทั้ง 2 วงจร จะเกิดก๊าซแอมโมเนียขึ้น (Ljones, 1974) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 วงจรการทำงานของเอ็นไซม์ nitrogenase และการตรึงไนโตรเจน (ที่มา : Taiz and Zeiger, 1998)

ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน ได้แก่

1. ออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน โดยจะเป็นตัวทำลายเอ็นไซม์ nitrogenase ส่วนที่เป็นโปรตีนและเหล็กเป็นผลให้เอ็นไซม์หยุดการทำงานลงอย่างถาวร

2. สารประกอบไนโตรเจน

แบคทีเรียสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปสารประกอบไนโตรเจนได้ง่ายกว่าในรูปของก๊าซทำให้กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนลดลง

3. อัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน (C:N)

แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนสามารถเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนสูง คือ มีสารประกอบคาร์บอนเพียงพอและสารประกอบไนโตรเจนเพียงเล็กน้อย ในสภาวะที่มีสารประกอบไนโตรเจนอย่างเพียงพอและมีสารประกอบ

คาร์บอนจำนวนมาก พวกที่ไม่ตรึงไนโตรเจนจะสามารถเจริญเติบโตได้และให้สารประกอบคาร์บอนอย่างเพียงพอกับแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนเจริญต่อไปได้สำหรับพืชนั้นจะดูดใช้ธาตุอาหารพวกไนโตรเจนทางรากพืช ทำให้เกิดสภาวะขาดไนโตรเจนซึ่งเหมาะสมแก่การเจริญของแบคทีเรีย

4. pH

สถานภาพเป็นกรดและด่างของดิน (pH) มีผลกระทบต่อการตรึงไนโตรเจน จำนวนและการกระจายตัวของแบคทีเรียเป็นอย่างมาก ดินที่มี pH ต่ำ มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนได้

5. อุณหภูมิ

มีผลกระทบต่อกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน ในสภาพอุณหภูมิสูง การตรึงไนโตรเจน จะเกิดขึ้นได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ แต่อย่างไรก็ตาม การตรึงไนโตรเจนจะเกิดได้ดีที่สุดขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

6. ความชื้น

ในดิน เมื่อเพิ่มขึ้นอัตราการตรึงไนโตรเจนจะสูงขึ้น เนื่องจากสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่อยู่ในดินถูกละลายไปเป็นสารโมเลกุลเล็กได้ง่ายขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว ในสภาพที่มีน้ำในดินสูงขึ้นจะทำให้อากาศในดินลดลงปริมาณออกซิเจนในดินลดลง ทำให้มีสภาพเหมาะสมต่อการตรึงไนโตรเจนยิ่งขึ้น

7. ฟอสฟอรัส

เป็นองค์ประกอบของสารที่เป็นตัวถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยังก๊าซไนโตรเจน เช่น NADPH glucose-6-phosphate glucose-6-phosphate dehydrogenase FD-NADP reductase นอกจากนี้ยังเป็นองค์ประกอบของสารที่ให้พลังงาน เช่น ATP และ ADP อีกด้วย

8. โมลิบดินัม

เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเอ็นไซม์ nitrogenase โดยอยู่ในส่วนประกอบที่เรียกว่า Mo-Fe Protein หรือ azofermo

9. เหล็ก

เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเอ็นไซม์ nitrogenase โดยรวมอยู่ทั้งสองส่วนของเอ็นไซม์ที่เรียกว่า azofermo และ azofer แล้วยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารประกอบที่จำเป็นต่อกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เหล็กในรูป Fe^{2+} ยังอาจทำหน้าที่แทนแมกนีเซียมในการกระตุ้นหรือทำให้ปฏิกิริยาการให้พลังงานของ ATP ได้สมบูรณ์ขึ้น (สมศักดิ์, 2541)

การวิเคราะห์โดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) เป็นวิธีการวิเคราะห์การตรึงไนโตรเจนทางอ้อม โดยที่ใช้ acetylene เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Substrate) เมื่อนำก๊าซที่ได้จากการบ่มก๊าซไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปฉีดโดยใช้ Gas chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารผสมที่ระเหยกลายเป็นไอได้ง่าย (volatile compounds) เมื่อสารผสมที่ระเหยกลายเป็นไอได้ง่ายถูกผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่มีตัวแยกเป็นเฟสที่อยู่กับที่ สารผสมดังกล่าวจะถูก แยกออกจากคอลัมน์ในเวลาที่ต่างกัน

จากการศึกษาแบคทีเรียที่ตรึงไนโตเจนได้โดยอิสระในบริเวณรากหญ้าแฝก โดยใช้หญ้าแฝกจากแหล่งต่าง ๆ (ฉัตรสุดา, 2541) พบว่า ดินที่อยู่ติดกับรากและผิวรากมีปริมาณของแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Azotobacter Beijerinckia* และ *Azospirillum* มากกว่าดินที่ไม่ได้ปลูกพืช ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากต้องใช้สารที่พืชปลดปล่อยออกมา (root exudate) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน Abbass และ Okon (1993) ได้ศึกษาเชื้อ *Azotobacter paspali* ต่อ canola (*Brassica campestris*) ข้าวสาลี *(Triticum turgidum*) มะเขือเทศ (*Lycopersicum esculentum*) และทานตะวัน (*Helianthus annus*) จากการทดลองในจานอาหาร ปลูกเชื้อ *A. paspali* ให้แก่เมล็ดพืช หลังจากนั้น 5 วัน จะมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของปลายราก จากการทดลองในกระถาง พบว่าปลูกเชื้อ *A. paspali* เปรียบเทียบกับ *Azospirillum brasilense* และ *Azospirillum lipoferum* หลังจาก 21 วัน พบว่าบริเวณพื้นผิวรากของพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ Boddey และคณะ (1983) ใช้ N^{15} isotope dilution technique ตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนของ *A. paspali* พบว่าตรึงได้ถึง 11% ของไนโตรเจนใน *Paspalum notatum* cv. Batatais ในส่วนของการสนับสนุนการเติบโตของพืชส่วนอื่น ๆ มีมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณในการปลูกเชื้อ ซึ่งให้ผลการทดลองเป็นไปในทางเพิ่มขึ้นและให้ผลคล้ายกับการปลูกด้วยเชื้อด้วย *Azospirillum* ทั้งสองชนิด

Singh และ Bhargava (1994) ได้ทดลองปลูกเชื้อ *Azotobacter chroococcum* ให้กับ oilseed rape (*Brassica napus* cv. ISN. 129) ร่วมกับการใช้ไนโตรเจนในระดับต่าง ๆ พบว่า ผลผลิตเมล็ดและน้ำหนักแห้งทั้งหมดจะเพิ่มมากที่สุดอยู่ในตำรับที่ไม่ได้ใส่ไนโตรเจนเลย พืชจะมีการตอบสนองเมื่อมีการปลูกเชื้อ คือ การแตกกิ่งและฝักมีมากขึ้น ดัชนีพื้นที่ใบสูงขึ้นโดยเฉพาะที่ระยะ pod filling stage และอัตราการเติบโตเร็วขึ้น Nieto และ Frankenberger (1991) ยังพบว่า *A. chroococcum* เมื่อใส่ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน ทำให้ผลผลิตเมล็ดและน้ำหนักแห้งทั้งหมดเพิ่มขึ้นถึง 35-60%

Espiritu และคณะ (1995) ศึกษาเชื้อ *Azotobacter* sp. HIBFA 4b เพื่อปรับปรุงคุณภาพและประสิทธิภาพของปุ๋ยหมัก (ฟางข้าว-มูลไก่, 1:1, w/w) จากการทดลองในกระถาง ใส่ปุ๋ยหมัก (ที่คลุกเชื้อ *Azotobacter* sp.) ให้แก่ข้าวในอัตรา 0.5 t/ha จะทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

(36.71 g/pot) เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับควบคุม (12.88 g/pot) และปุ๋ยหมักที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (16.33 g/pot) แต่ในการใส่ปุ๋ยเคมี (60-30-30) เพียงอย่างเดียวจะให้ผลผลิตมากที่สุด (91.81 g/pot) ส่วนการทดลองในแปลงปลูก ปุ๋ยหมักที่ปลูกเชื้อให้ผลผลิต (4.48 t/ha) เท่ากับการใส่ปุ๋ยเคมีเพียงอย่างเดียว (4.43 T/ha) และปุ๋ยที่ไม่ได้ปลูกเชื้อให้ผลผลิต (2.54 t/ha) เท่ากับ control (2.53 t/ha) จากการทดลองในกระถาง (Toshiomi *et al.*, 1998) พบว่า ปุ๋ยหมักที่ใส่ เชื้อ *Azotobacter* sp. HIBFA 4b ทำให้รากเจริญเติบโต (root volume of 378.48 cm^3/pot) มากกว่า control (187.11 cm^3/pot) และการใส่ปุ๋ยเคมี (196.81 cm^3/pot) ส่วนผลผลิตเมล็ด (25.8 g/pot) ได้เท่ากับการใส่ปุ๋ย 60-30-30 (27.9 g/pot) ในการทดลองในแปลง การใส่ปุ๋ยหมักที่ผสมเชื้อ *Azotobacter* sp. HIBFA 4b ที่อัตรา 500 kg/ha ให้ผลผลิตเมล็ด (3.33 t/ha) เท่ากับการใส่ปุ๋ย 60-30-30 (3.30 t/ha) การใส่ปุ๋ยหมักร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีให้ผลผลิตมากที่สุด (3.60 t/ha)

Lethbridge และ Davidson (1983a) ใส่เชื้อ *Azotobacter Azospirillum Klebsiella* and *Bacillus* spp. ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อผสม ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 1-56 mg N/plant (14-168 μg N/ml) ในการปลูกข้าวสาลีในทรายและดิน 3 ชนิด โดยให้อัตราไนโตรเจนที่แตกต่างกัน พบว่า การตรึงไนโตรเจนสามารถตรึงได้มากเมื่อมีการเติมสารประเภทคาร์โบไฮเดรตลงไป ในการปลูกพืชในทราย โดยใส่เชื้อ *Azotobacter beijerinckii* และ *Azospirillum brasilense* sp. 107 และใส่ glucose และ malate ให้ตามลำดับ พบว่าไนโตรเจนที่ตรึงได้จากอากาศ จะเข้าไปทางรากและเคลื่อนย้ายไปสู่ยอดพืช และยังพบว่าในการปลูกข้าวสาลีและข้าวโพด (Lethbridge and Davidson , 1983b) ในดินทราย พืชสามารถใช้มวลชีวภาพของ *Azospirillum brasilense* sp. 107 เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ดีกว่าจากเมล็ดอย่างเดียว

การปลูก sping wheat (*Tricicum aestuvum* L.) ร่วมกับ *Azospirillum lipoferum* ในดินทราย ดินร่วนปนทราย และดิน peat-clay ภายใต้เรือนกระจกและในแปลงปลูก ในพื้นที่เขตอบอุ่น จากการทดลองเป็นเวลามากกว่า 3 ปี พบว่า ผลผลิตเมล็ดเพิ่มขึ้นถึง 70% ในการปลูกในดินทรายที่มีการใส่ P และ K เพิ่มเติม และเพิ่มขึ้นถึง 32% ในดิน peat-clay ที่มีไนโตรเจนทั้งหมด 0.28% ภายใต้สภาวะเรือนกระจก กิจกรรมของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน สามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมีได้ เนื่องจากพบว่า ปริมาณไนโตรเจนในเมล็ดเพิ่มขึ้นถึง 33% ในการปลูกพืชในดินทรายโดยที่ปราศจากการเพิ่มปุ๋ยเคมี (Mertens and Hess, 1984) จากการวัดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของ spring wheat ที่ระยะเกิดดอกและหัว พบว่า อยู่ในช่วง 50-600 nmol C_2H_4 /g dry root/ h (Kapulnik *et al.*, 1985)

Fages และ Arsac (1991) ทดลองใช้เชื้อ *Azospirillum lipoferum* CRT 1 ที่แยกได้จากรากข้าวโพด ทดสอบกับต้นทานตะวันที่ปลูกในกระถาง พบว่า *Azospirillum lipoferum* จำนวน 2 สายพันธุ์และ *Xanthomonas maltophilia* มีการตอบสนองต่อพืชได้ดีที่สุด ในการใส่เชื้อ *Azospirillum*

ร่วมกับ *Rhizobium* ที่บริเวณปมรากของถั่วเชียวยังทำให้มีการเพิ่มขึ้นของอินทรียวัตถุ ซึ่งเป็นอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย (Gallo and Fabbri, 1991)

โดยทั่วไปในดินมีฟอสฟอรัสต่ำมาก โดยเฉลี่ยแล้วมีอยู่ประมาณ 0.06% (ยงยุทธ และคณะ, 2541) ฟอสฟอรัสเหล่านี้แบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ พวกที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ (organic phosphorus) และพวกที่อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ (inorganic phosphorus, P_i) ปริมาณจะแตกต่างกันไปตามชนิดของวัตถุต้นกำเนิดดิน ความมากน้อยของการชะล้างและการใช้ที่ดิน พืชดูดฟอสฟอรัสส่วนใหญ่ในรูปสารอนินทรีย์พวกไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($H_2PO_4^-$) และไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน (HPO_4^{-2}) ปริมาณไอออนทั้ง 2 ชนิดจะมีมากหรือน้อยขึ้นกับค่าความเป็นกรดเบสของดิน ดินที่มีค่า pH ต่ำกว่า 7 ฟอสฟอรัสมักอยู่ในรูป $H_2PO_4^-$ ถ้าดินที่มีค่า pH สูงมักอยู่ในรูป HPO_4^{-2} ฟอสเฟตไอออนในดินมักจะถูกดูดยึด (adsorb) ในอนุภาคของดินเหนียวทำให้พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้หรืออาจรวมตัวกับธาตุอื่นในดิน ในสภาพดินที่เป็นกรดหรือเบสมากเกินไป ทำให้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ไม่ได้ การใส่ปุ๋ยเคมีที่ละลายง่าย เช่น ปุ๋ย superphosphate พืชนำไปใช้ได้เพียง 10-25% เท่านั้นส่วนหนึ่งที่เหลือจะทำปฏิกิริยากับดินแล้วอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ คือ calcium monohydrogen phosphate ($CaHPO_4$) calcium monohydrogen phosphate dihydrate ($CaHPO_4.2H_2O$) colloidal ferric phosphate and colloidal aluminium phosphate ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะเปลี่ยนอย่างช้าๆ ไปอยู่ในรูปที่ละลายยากมากยิ่งขึ้น ในดินที่เป็นด่างอยู่ในรูป calcium orthophosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) ในดินที่เป็นกรด อยู่ในรูป crystalline ferric phosphate ($FePO_4$ (cr)) และ crystalline aluminium phosphate ($AlPO_4$(cr)) (Lindsay *et al.*, 1962 อ้างโดย Whitelaw *et al.*, 1999)

แร่ apatite ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก เกิดขึ้นจากการเย็นตัวและตกผลึกของ molten magma ซึ่งเป็นสารประกอบในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ ที่มีสารประกอบชนิดอื่นๆ เจือปนอยู่ด้วย เช่น $CaCl_2$ และ CaF_2 แบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด คือ

1. Carbonate apatite $(Ca_3(PO_4)_2)_3.CaCO_3$
2. Fluorapatite $(Ca_3(PO_4)_2)_3.CaF_2$
3. Chloroapatite $(Ca_3(PO_4)_2)_3.CaCl_2$
4. Hydroxy apatite $(Ca_3(PO_4)_2)_3.Ca(OH)_2$
5. Sulfateapatite $(Ca_3(PO_4)_2)_3.CaSO_4$

สินแร่เหล่านี้จะพบอยู่ในสภาพแข็งเป็นหิน (rock phosphate) เป็นก้อนคล้ายกรวด (pebble phosphate) หรือมีสภาพอ่อนนุ่ม (soft phosphate) แต่ที่เรียกหินฟอสเฟตโดยทั่วไปมักไม่จำกัดว่า

สินแร่นั้นจะอยู่ในสภาพไหน การเกิดของแหล่งแร่ฟอสเฟตอาจจะเกิดขึ้นจากกระบวนการใหญ่ 3 กระบวนการ คือ

1. Residual phosphate เป็นแหล่งแร่ที่เกิดขึ้นโดยการผุพังของหินปูน $CaCO_3$ ที่มีฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบ ต่อมา $CaCO_3$ สลายตัวไปหมดแล้วก็จะเหลือไตรแคลเซียมฟอสเฟตตกค้างอยู่เป็นชั้นหนาในดิน
2. Replacement phosphate เป็นแหล่งแร่ฟอสเฟตที่เกิดขึ้นจากการที่หินปูน ($CaCO_3$) ที่อยู่ในทะเลทำปฏิกิริยากับน้ำทะเลที่มีฟอสเฟตในปริมาณมาก แล้วกลายเป็นแคลเซียมฟอสเฟตไอออน เหล่านี้อาจได้จาก guanos (มูลนกทะเลหรือค้างคาวที่ทับถมกันเป็นล้าน ๆ ปี) หรือได้มาจากแหล่งที่เป็นอินทรียวัตถุต่าง ๆ ก็ได้
3. Sedimentary phosphate ฟอสเฟตที่เกิดขึ้นจากการตกตะกอนทับถมของตะกอนในรูปสารประกอบฟอสเฟต (phosphate compound) จนเป็นชั้นหนาและมีการจัดเรียงตัวซับซ้อนอยู่กับชั้นของหินปูนและหินดินดาน ตะกอนในรูปสารประกอบฟอสเฟตนี้นักธรณีวิทยาเชื่อว่ามีกำเนิดมาจากสิ่งที่มีชีวิตเป็นส่วนใหญ่ (organic origin) สิ่งที่มีชีวิตเหล่านี้อาจจะเป็นสัตว์และพืชที่อยู่ในทะเลที่ได้มีการสะสมฟอสฟอรัสจากทะเลไว้มากและต่อมาเมื่อตายไปก็จะตกลงทับถมกันที่ก้นทะเลจนกลายเป็นแหล่งแร่ฟอสเฟตในทะเลไปในที่สุด

ปัจจุบันได้มีการนำหินฟอสเฟตมาใช้เป็นแหล่งฟอสฟอรัสให้แก่พืชเพราะหินฟอสเฟตมี phosphorus pentoxide (P_2O_5) อยู่ถึง 30-40% แต่แท้จริงประโยชน์ที่ได้รับมีน้อยมาก ดังนั้นก่อนนำไปใช้จึงต้องเพิ่มการละลายฟอสฟอรัสโดยบดหินฟอสเฟตให้มีอนุภาคเล็กลงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสเสียก่อน ในปัจจุบันได้มีการนำหินฟอสเฟตมาใช้โดยอาศัยการย่อยสลายของจุลินทรีย์ Illmer และ Schinner (1992) ได้คัดเลือกเชื้อรา *Penicillium* sp. และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จากดินในป่าจำนวน 600 isolates พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการย่อย inorganic phosphates (hydroxylapatite และ calcium hydrogenphosphate dihydrate)

Inorganic phosphate อิสระในสารละลายดิน มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรฟอสฟอรัสซึ่งมีกลไกในการเพิ่มขึ้น 2 ทาง (Illmer and Shinner, 1992) คือ

1. การใช้เอ็นไซม์ในการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ (เช่น phosphomonoesters phosphodiesters รวมกับ phospholipids และกรดนิวคลีอิก และ phosphotriesters) ตลอดจนสารประกอบอนินทรียฟอสเฟต (เช่น pyro- and metaphosphates)

2. การละลายหินฟอสเฟตและสารประกอบอนินทรียฟอสเฟตโดยกลไกที่ไม่ใช้เอ็นไซม์

ปริมาณของเอ็นไซม์ฟอสฟาเทส (phosphatase) ในดินมีอยู่หลายรูป ได้แก่ เอ็นไซม์ที่จับกับ soil colloid และ humic substances เอ็นไซม์ phosphatase อิสระในสารละลายดินที่อยู่กับพืชที่มีชีวิตและตายแล้ว หรือในเซลล์จุลินทรีย์ อาจแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ acid phosphatase และ alkaline phosphatase ซึ่งจะมีบทบาทในดินที่เป็นกรดและด่างตามลำดับ (Krämer and Green, 2000) จากรายงานพบว่า กิจกรรมของ alkaline phosphatase ในดินได้มาจาก จุลินทรีย์ทั้งหมด และกิจกรรมของเอ็นไซม์ phosphatase มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่า pH ของดิน (Weaver *et al.*, 1994) จากการทดสอบจุลินทรีย์สกุล *Enterobacter agglomerans* ให้ย่อย สลาย hydroxyapatite โดยใส่แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้ตรวจสอบพบว่า กิจกรรมของ acid และ alkaline phosphatase enzyme ที่ใส่ glucose และ soluble starch มีมากกว่าการใส่ phytic acid dodecasodium salt และ glycerol-2-phosphate disodium salt (Kim *et al.*, 1998)

กรดอินทรีย์มักพบในดินที่ทำการเกษตร บทบาทยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่ถ้ามีอย่างอุดมสมบูรณ์จะพบว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช กรดอินทรีย์บางชนิดพบว่าเป็นพิษต่อพืช บางชนิดก็มีผลต่อการเติบโตของพืชชั้นสูง เช่น auxins กรดอินทรีย์อาจเพิ่มธาตุอาหารพืชที่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายให้เป็นประโยชน์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัส และอาจเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของธาตุโลหะ ตามปกติความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในดินมักจะต่ำและมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ อย่างไรก็ตาม จะพบว่ามีความเข้มข้นสูงบริเวณที่มีกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตหนาแน่น เช่น บริเวณที่มีการย่อยสลายเศษซากพืช กรดอินทรีย์พบอยู่ในสารที่รากพืชผลิตออกมา (root exudate) ยกตัวอย่าง เช่น citric succinic malic oxalic และ tartaric acids และยังพบว่าจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อราสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ แบคทีเรียส่วนใหญ่สังเคราะห์กรดชนิด simple volatile acids เช่น formic acetic propionic and butyric acids ส่วนเชื้อรามักพบว่าสังเคราะห์ชนิด nonvolatile acids เช่น citric and oxalic acids จากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ (Peleg *et al.*, 1988) กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากหลายกระบวนการ เช่น glycolytic pathway TCA cycle และ glyoxylate pathway กรดอินทรีย์มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม อาหาร และการผลิตยารักษาโรค ซึ่งสิ่งเหล่านี้นับวันจะมีความต้องการมากขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร แต่ปริมาณของกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ในประเทศไทยมีปริมาณต่ำ จึงจำเป็นต้องมีการสั่งเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในทางการค้าได้มีการนำประโยชน์ของเชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* มาผ่านกระบวนการหมักให้ได้กรดอินทรีย์ออกมา

Whitelaw และคณะ (1999) แยก *Penicillium radicum* จากบริเวณรากข้าวสาลี แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี แอมโมเนียมหรือไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อทดสอบการละลาย

ฟอสเฟตในแหล่งต่างๆ คือ $CaHPO_4$ $Ca_3(PO_4)_2$ $FePO_4.4H_2O$ $AlPO_4$ colloidal ferric phosphate และ colloidal aluminium phosphate ในอัตรา 1,000 mg/L จากนั้นวิเคราะห์ titratable acidity pH ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์และ soluble phosphate เมื่อเวลาผ่านไป 20 หรือ 30 วัน พบว่า $Ca_3(PO_4)_2$ (360 mgP/L) และ colloidal aluminium phosphate (207 mgP/L) ในอาหารที่มีแอมโมเนียมจะละลายออกมาได้ค่อนข้างมากกว่าอาหารที่มีไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และยังพบว่า ความเข้มข้นของ soluble phosphate เป็นสัดส่วนโดยตรงกับ titrate acidity และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ (gluconic acid) และ เป็นสัดส่วนผกผันกับ pH ซึ่งกรดอินทรีย์นี้เองที่น่าจะเป็นกลไกสำคัญที่ให้ฟอสเฟตละลายออกมา

Banik และ Dey (1982) แยกจุลินทรีย์จาก alluvial soil บนอาหาร sucrose - $Ca_3(PO_4)_2$ agar ได้ *Aspergillus candidus* *A. fumigatus* *Bacillus firmus* B-7657 *B. firmus* B-765 และ *Streptomyces* sp. จากการทดลองในอาหารเหลวที่ใส่ $Ca_3(PO_4)_2$ 15 mg insoluble-P จุลินทรีย์สามารถละลายได้ 297.0 288.3 49.0 45.8 และ 29.0 µgP ตามลำดับ และยังพบว่า เชื้อที่ผลผลิต oxalic และ tartaric acid อาจผลิตหรือไม่ผลิต citric acid ด้วย สามารถละลาย insoluble inorganic phosphates ได้สูง จากจุลินทรีย์ทั้งหมดดังกล่าว *A. fumigatus* ละลายหินฟอสเฟตได้มากที่สุด (32.5 µg) ในขณะที่ *B. firmus* B-7651 และ *Aspergillus* spp. ทั้ง 2 ชนิด ยังมีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสได้ดีอีกด้วย

Vassilev และคณะ (1995) ศึกษาผลการละลายหินฟอสเฟตโดย *Aspergillus niger* ที่คัดเลือกแล้วว่า ผลิตกรดซิตริก (citric acid) เท่านั้น ในวัสดุจากโรงงานอุตสาหกรรม คือ แกลบ sugar-beet waste และ alperujo (ของเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันมะกอก) พบว่า sugar-beet waste ทำให้เชื้อราเจริญเติบโตและ mineralization ได้ถึง 69% รองลงมาคือ เปลือกข้าว และ alperujo เมื่อเลี้ยงเชื้อราใน sugar-beet waste ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟต (fluorapatite : 12.8 %P) 3.0 g/L ในช่วงเวลาการบ่มเชื้อ 10 วัน ซึ่งเป็นช่วงการเจริญเติบโตของเส้นใยพบว่า pH ลดลงจาก 6.5-7.0 เป็น 3.0-3.5 มีความเป็นกรด (72 mmol/L) และมีปริมาณ insoluble phosphate ละลายมากที่สุด (292 µg/mL) Vassilev และคณะ (1997) พบว่า หลังจากเลี้ยง *Aspergillus niger* 10 วันทำให้หินฟอสเฟตถูกละลายออกมาได้ 1.2-1.6 mg/mL soluble P ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของหินฟอสเฟตที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การปรับปรุงคุณภาพของปุ๋ยอินทรีย์ให้มีธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น โดยศึกษาการเพิ่มธาตุไนโตรเจนโดยการตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศ และการย่อยสลายหินฟอสเฟตเพื่อเพิ่มฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์รวมเข้าด้วยกัน เชื้อดังกล่าวจะต้องไม่เป็นปรปักษ์ (antagonist) ต่อกัน สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในปุ๋ยอินทรีย์และสามารถเพิ่มปริมาณได้เมื่อนำไปใส่ให้กับพืช ซึ่งต้อง

พิจารณาแหล่งอาหารและพลังงานที่มีอยู่ให้เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ การศึกษาครั้งนี้เน้นในเรื่องการเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ปุ๋ยหมัก ซึ่งเป็นแหล่งอินทรียวัตถุที่สำคัญและยังเป็นหลักของการทำเกษตรแบบยั่งยืนอีกด้วย ดังนั้นอาจคาดว่าน่าจะนำประโยชน์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ได้กับปุ๋ยอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ต่อไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University