



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อสารอนินทรีย์ในโตรเจนของพืช
น้ำเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้บำบัดน้ำเสีย

The Assessment of Responsive Efficiency of Aquatic Macrophytes to Inorganic
Nitrogen for the Application in Wastewater Treatments

โดย อรุณทัย จำปีทอง

กันยายน 2554

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อสารอนินทรีย์ในโตรเจนของพืช
น้ำเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้บำบัดน้ำเสีย

The Assessment of Responsive Efficiency of Aquatic Macrophytes to Inorganic
Nitrogen for the Application in Wastewater Treatments

อรุณทัย จำปีทอง

ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การประเมินประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อสารอินทรีย์ในโตรเจนของพืชน้ำเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้บำบัดน้ำเสียได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2552 โดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศา กานตวนิชกูร ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำแนะนำ ปรึกษาด้วยดีตลอดมา

และขอขอบคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่และนักศึกษาห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกในการวิจัยด้วยดีตลอดมา

อรุณทัย จำปีทอง

บทคัดย่อ

การตอบสนองด้านการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยา รวมทั้งการดูดซับไนโตรเจนและการสะสมธาตุอาหารในส่วนต่าง ๆ ของพืชมีการศึกษาในพืชลอยน้ำ 2 ชนิด คือ จอกหูหนู (*Salvinia cucullata* Roxb. ex Bory) และผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica* Forssk.) และพืชใล้น้ำ 2 ชนิด คือ กกรงก (*Cyperus involucratus* Rottb.) และแฝก (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) มีการปลูกพืชแต่ละชนิดในสารละลายที่เตรียมจากสูตรของ Smart and Barko (1985) และมีการให้ไนโตรเจนอนินทรีย์ในรูปแบบที่แตกต่างกัน คือ ไนเตรต (NO_3^-) แอมโมเนียม (NH_4^+) หรือ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นที่เท่ากัน ($500 \mu\text{M}$) และปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกัน จอกหูหนูเป็นพืชที่มีอัตราการเติบโตสัมพัทธ์สูงสุด (Relative Growth Rate, $\text{RGR} = 0.12 \text{ d}^{-1}$) รองลงมาคือ ผักบุ้ง ($0.035 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$) กกรงก ($0.03 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$) และแฝก ($0.02 \pm 0.003 \text{ d}^{-1}$) ตามลำดับ สำหรับอัตราการดูดซับไนโตรเจนพบค่าสูงในพืชลอยน้ำเมื่อเปรียบเทียบกับพืชใล้น้ำ ดังนั้น จอกหูหนูและผักบุ้งจึงถูกคัดเลือกมาใช้ศึกษาต่อถึงความสามารถในการทนต่อแอมโมเนียมความเข้มข้นสูง โดยปลูกพืชดังกล่าวในสารละลายเลี้ยงพืชที่มีแอมโมเนียมความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10 และ 15 mM ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน พบว่าพืชทั้งสองชนิดมีอัตราการเติบโตสูงสุดเมื่อปลูกพืชด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 1 mM ในขณะที่พืชจะมีอัตราการเติบโตลดลงเมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mM โดยพืชจะมีใบขนาดเล็ก มีรากสั้น ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 10 และ 15 mM พืชทั้งสองชนิดนี้พบมีปริมาณธาตุอาหารและโปรตีนที่สูงเมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 1-5 mM ดังนั้น พืชสองชนิดนี้สามารถนำไปใช้เป็นพืชอาหารสัตว์หรือทำเป็นปุ๋ยได้หลังจากการเก็บเกี่ยว ซึ่งข้อมูลจากการศึกษานี้ ทั้งจอกหูหนูและผักบุ้งสามารถนำไปใช้บำบัดน้ำเสียได้ แต่น้ำเสียนั้นควรมีการปนเปื้อนของแอมโมเนียมไม่มากกว่า 5 mM ทั้งนี้เพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับรากพืช และอาจก่อให้เกิดการเน่าของต้นพืชซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการร่วงกลับคืนของสารอาหารที่มีในพืชกลับสู่ระบบบำบัดน้ำได้

คำสำคัญ: พืชน้ำเขตร้อน ไนโตรเจนอนินทรีย์ การดูดซับไนโตรเจน การเป็นพิษจากแอมโมเนียม การบำบัดน้ำเสีย

Abstract

The growth, morphological response, nitrogen uptake and nutrient allocation of two free-floating species (*Salvinia cucullata* Roxb. ex Bory, *Ipomoea aquatica* Forssk.) and two emergent species (*Cyperus involucratus* Rottb., *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) were investigated. Plants of each species were grown on a modified Smart & Barko (1985) medium. Inorganic nitrogen was supplied as nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+) or NH_4NO_3 combined at equimolar concentration (500 μM) in the same condition. *S. cucullata* had the highest growth rate ($\text{RGR} = 0.12 \text{ d}^{-1}$) followed by *I. aquatica* ($0.035 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$), *C. involucratus* ($0.03 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$) and *V. zizanioides* ($0.02 \pm 0.003 \text{ d}^{-1}$), respectively. A high N uptake rate was found in free floating species compared to emergent plants. Thus, *S. cucullata* and *I. aquatica* were selected for further study to assess their tolerance to high ammonium concentrations. The plants were grown with NH_4^+ at concentrations of 0.5, 1, 5, 10 and 15 mM, all other conditions being equal. Both species had the highest growth rate when supplied with NH_4^+ at a concentration of 1 mM, but growth decreased when supplied with NH_4^+ at concentrations of 5, 10 and 15 mM. The plants had small leaves and short roots, particularly when grown with 10 and 15 mM of NH_4^+ . Both species had high mineral and protein contents when grown with in a NH_4^+ concentration ranging from 1-5 mM, so after harvest, that can be used as a feed crop for animals or fertilizers. Based on this study, *S. cucullata* and *I. aquatica* can be used for water treatment, but the NH_4^+ concentration must be less than 5 mM to prevent root and stem damage that causes minerals to be released from the plants and reenter to the water treatment system.

Key words: Tropical aquatic plants, Inorganic nitrogen, N uptake, Ammonium toxicity, Wastewater treatments

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย	32
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการวิจัย	49
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	56
เอกสารอ้างอิง	57
Output ที่ได้จากโครงการวิจัย	62
ภาคผนวก	63

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 ประเภทของพืชน้ำ	3
2.2 การประยุกต์ใช้ <i>Scirpus lacustris</i> ในบึงประดิษฐ์แบบ Free Water Surface System	5
2.3 การประยุกต์ใช้ <i>Phragmites australis</i> ในบึงประดิษฐ์แบบ Sub-Surface Horizontal Water Flow	6
2.4 โครงสร้างภายในส่วนราก ลำต้น และใบของเฟิร์นใบมะขาม (<i>Salvinia natans</i>)	10
2.5 ออกซิเจนที่ถูกปล่อยออกมาจากรากเฟิร์นใบมะขาม (<i>Salvinia natans</i>)	11
2.6 ขั้นตอนการเปลี่ยนไนเตรต (NO_3^-) เป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) และการสังเคราะห์ กรดอะมิโนและโปรตีนที่พบภายในเซลล์พืช	15
2.7 Lipid bilayer ที่เป็นโครงสร้างสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์	15
2.8 โครงสร้างและการขนส่งไอออนโดย channel protein (a) และ carrier protein (b)	16
2.9 การขนส่งไอออนแบบไม่ใช้พลังงาน (passive transport) (a) และแบบใช้พลังงาน (active transport) (b)	17
2.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดไอออนกับความเข้มข้นของ สารละลายไอออนที่เพิ่มขึ้น	19
2.11 อัตราการดูดแอมโมเนียมของพืชที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน	19
2.12 โมเดลแสดงการเข้า-ออกของไอออนที่มีประจุลบ, A^- (a) และไอออนประจุบวก, C^+ (b)	21
4.1 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ หรือ RGR (d^{-1}) (mean $\pm$ SE) ของ จอกหูหนู (<i>Salvinia cucullata</i>), ผักบุ้ง (<i>Ipomoea aquatica</i>), กกร้างกา (<i>Cyperus involucratus</i>) และแฝก (<i>Vetiveria zizanioides</i>) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอนินทรีย์รูปแบบต่างกัน	32

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
4.2 ความยาวราก (a) และ จำนวนราก (b) (mean $\pm$ SE) ของ จอกหูหนู (<i>Salvinia cucullata</i>), ผักบุ้ง (<i>Ipomoea aquatica</i>), กกธัญ (Cyperus involucratus) และแฝก (<i>Vetiveria zizanioides</i>) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอินทรีย์รูปแบบต่างกัน	33
4.3 อัตราการดูดซับแอมโมเนียม ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) และไนเตรต ($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (<i>Salvinia cucullata</i>), ผักบุ้ง (<i>Ipomoea aquatica</i>), กกธัญ (Cyperus involucratus) และแฝก (<i>Vetiveria zizanioides</i>) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอินทรีย์รูปแบบต่างกัน	35
4.4 ปริมาณไนโตรเจนรวม(a,f), ฟอสฟอรัส (b,g), โพแทสเซียม (c,h), แคลเซียม (d,i) และแมกนีเซียม (e,j) ในใบและรากพืช (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (<i>Salvinia cucullata</i>), ผักบุ้ง (<i>Ipomoea aquatica</i>), กกธัญ (Cyperus involucratus) และแฝก (<i>Vetiveria zizanioides</i>) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอินทรีย์รูปแบบต่างกัน	39
4.5 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ หรือ RGR (d^{-1}) (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (<i>Salvinia cucullata</i>) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน	40
4.6 ความยาวราก (a) และจำนวนราก (b) (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (<i>Salvinia cucullata</i>) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน	41
4.7 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ หรือ RGR (a) ความยาวราก (b) จำนวนราก (c) และพื้นที่ใบ (d) (mean $\pm$ SE) ของผักบุ้ง (<i>Ipomoea aquatica</i>) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
4.8 อัตราการดูดซับแอมโมเนียม ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) (a) และปริมาณ แอมโมเนียมในใบ (คอลัมน์สีดำ) และในราก (คอลัมน์สีเทา) ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ plant dw}$) (b) (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (<i>Salvinia cucullata</i>) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียม ความเข้มข้นต่างกัน	43
4.9 อัตราการดูดซับแอมโมเนียม ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) (a) และปริมาณ แอมโมเนียมในใบ (คอลัมน์สีดำ) และในราก (คอลัมน์สีเทา) ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ plant dw}$) (b)(mean $\pm$ SE) ของผักบุ้ง (<i>Ipomoea aquatica</i>) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความ เข้มข้นต่างกัน	44

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ชนิดพืชน้ำที่ใช้ในระบบบึงประดิษฐ์แบบ surface flow system ใน Queensland, Australia	6
2.2 ชนิดพืชน้ำที่ใช้ในระบบบึงประดิษฐ์แบบ sub-surface flow system ในประเทศเขตอบอุ่น	8
2.3 ชนิดพืชน้ำที่ใช้ในระบบบึงประดิษฐ์แบบ sub-surface flow system ในประเทศเขตร้อนหรือกึ่งเขตอบอุ่น	8
2.4 ปริมาณฟอสฟอรัส (P) และ ไนโตรเจน (N) (mg /g dry wt) ในเนื้อเยื่อใบหรือ ลำต้นของพืชที่ถูกนำมาบำบัดน้ำเสียในระบบบึงประดิษฐ์ (treatment) และที่พบ ในแหล่งน้ำธรรมชาติ (control) (Mean±SD)	12
4.1 แสดงผล two-way ANOVA (F-ratios) ของอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ ลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการ ปริมาณคลอโรฟิลล์ อัตราการดูดซับ แอมโมเนียมและไนเตรต และปริมาณธาตุอาหารไนโบและรากของจอกหูหนู (<i>Salvinia cucullata</i>), ผักบุ้ง (<i>Ipomoea aquatica</i>), กกธัญญา (Cyperus involucratus) และแฝก (<i>Vetiveria zizanioides</i>) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอินทรีย์รูปแบบต่างกัน	34
4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี โททอลคลอโรฟิลล์ และอัตราส่วนระหว่าง คลอโรฟิลล์เอต่อบี (mean ± SE) ของจอกหูหนู (<i>S. cucullata</i>) ผักบุ้ง (<i>Ipomoea aquatica</i>) กกธัญญา (<i>Cyperus involucratus</i>) และแฝก (<i>Vetiveria zizanioides</i>) ที่ปลูกด้วยไนโตรเจนรูปแบบที่ต่างกัน	37
4.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของจอกหูหนู (<i>Salvinia cucullata</i>) (mean ± SE) ที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน	45
4.4 ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของผักบุ้ง (<i>Ipomoea aquatica</i>) (mean ± SE) ที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน	45

บทที่ 1

บทนำ

น้ำเสียเป็นปัญหาทางสิ่งแวดล้อมประการหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของมนุษย์ รวมทั้งพืชและสัตว์ที่อาศัยในแหล่งน้ำนั้น ๆ ด้วย ในประเทศกำลังพัฒนาที่มีจำนวนประชากรที่สูงอย่างประเทศไทย การใช้น้ำในการบริโภค อุปโภคในกิจกรรมหรือประกอบกิจการต่าง ๆ นับวันจะยิ่งเพิ่มปัญหามลภาวะทางน้ำมากขึ้น การบำบัดน้ำเสียนั้นมีหลากหลายวิธี ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักเป็นระบบที่สร้างขึ้นเพื่อบำบัดน้ำเสียจากชุมชนที่จัดว่ามีค่าก่อสร้างระบบ ค่าใช้จ่ายที่สูงและการดูแลระบบที่ยุ่งยาก นอกจากนี้ยังมีน้ำเสียที่อาจถูกปล่อยหรือชะล้างจากพื้นที่เกษตรกรรมหรือฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เช่น ฟาร์มสุกร ฟาร์มเลี้ยงปลา เป็นต้น ที่ถูกปล่อยลงสู่แม่น้ำ ลำคลอง หรือแหล่งน้ำธรรมชาติอื่น ๆ โดยมีได้ผ่านระบบบำบัดซึ่งอาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของระบบนิเวศของแหล่งน้ำธรรมชาติ และอาจจะก่อให้เกิดปัญหารุนแรงติดตามมา โดยเฉพาะในกรณีที่น้ำที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาตินั้นมีการปนเปื้อนของสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำนั้น ๆ เช่น การปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงหรือสารโลหะหนัก ปัญหาดังกล่าวอาจกระทบการดำรงชีวิตของมนุษย์ได้เช่นกัน โดยเฉพาะบุคคลที่อาศัยและทำมาหากินจากแหล่งน้ำนั้น ๆ ปัญหาน้ำเสียดังกล่าวล้วนแล้วยังคงเป็นปัญหาที่ยังคงอยู่ควบคู่ไปกับการพัฒนาของประเทศ

การนำพืชน้ำมาบำบัดน้ำเสียเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่เน้นพัฒนาคุณภาพน้ำโดยวิธีชีวบำบัดได้มีการศึกษาและสร้างระบบบึงประดิษฐ์ซึ่งมีอย่างแพร่หลายในต่างประเทศโดยเฉพาะในทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ แต่ก็ยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก ในประเทศไทย ซึ่งการศึกษาวิจัยที่มีส่วนมากในปัจจุบันมักเป็นในเชิงวิศวกรรมการออกแบบระบบโดยใช้พืชน้ำชนิดต่าง ๆ ในการบำบัด การศึกษาวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษาดูผลลัพธ์โดยรวมของระบบว่าสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำได้มากน้อยเพียงใด แต่ไม่ได้ลงศึกษารายละเอียดถึงตัวพืชว่ามีความสามารถในการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมและความสามารถในการทนต่อปัจจัยที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโตอย่างไร การศึกษาและเปรียบเทียบคุณสมบัติและประสิทธิภาพของพืชน้ำที่จะนำไปปลูกและใช้บำบัดจึงจัดว่าสำคัญยิ่งนักเพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะนิสัยของพืช ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและความสามารถของพืชนั้น ๆ ในการดูดซึมสารอาหารตลอดจนสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่ปนเปื้อนมากับน้ำเสีย รวมทั้งการศึกษาถึงการตอบสนองระดับสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของพืชต่อปัจจัยดังกล่าวเพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างใช้พืชบำบัดน้ำเสีย เช่น การตายของต้นพืชหรือการเติบโตที่ผิดปกติ เป็นต้น ตลอดจนการอธิบายกลไกการพัฒนาคุณภาพน้ำโดยต้นพืชนั้น ๆ การศึกษานี้จัดเป็นการศึกษาวิจัยขั้นต้นเพื่อให้ได้ข้อมูลทางด้านพืชแต่ละชนิดว่าเหมาะสมแก่การนำไปใช้กับน้ำเสียประเภทใด เพื่อที่จะเลือกใช้พืชในระบบบำบัดได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด อีกทั้งยังเป็นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับสารอาหารและองค์ประกอบของเนื้อเยื่อพืชหลังจากใช้พืชบำบัดน้ำเสียแล้ว ซึ่งสามารถช่วยในการตัดสินใจในการจัดการกับพืชหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การนำมาใช้เป็นปุ๋ย การใช้เป็นอาหารสัตว์ หรือการใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับลักษณะนิสัยและการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งความสามารถในการทนต่อสภาวะของปัจจัยที่พบในน้ำเสียที่อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตได้
2. เพื่อศึกษาการใช้ อนินทรีย์ในโตรเจนของพืชน้ำ (*Ipomoea aquatica*, *Salvinia cucullata*, *Cyperus involucratus* และ *Vetiveria zizanioides*) และเปรียบเทียบศักยภาพของพืชน้ำชนิดต่าง ๆ ในการลดปริมาณอนินทรีย์ในโตรเจนในน้ำทิ้งจากครัวเรือนก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ
3. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของพืชน้ำแต่ละชนิดต่อการเลือกใช้ในการบำบัดน้ำเสียและการใช้ประโยชน์หลังการเก็บเกี่ยว

บทที่ 2

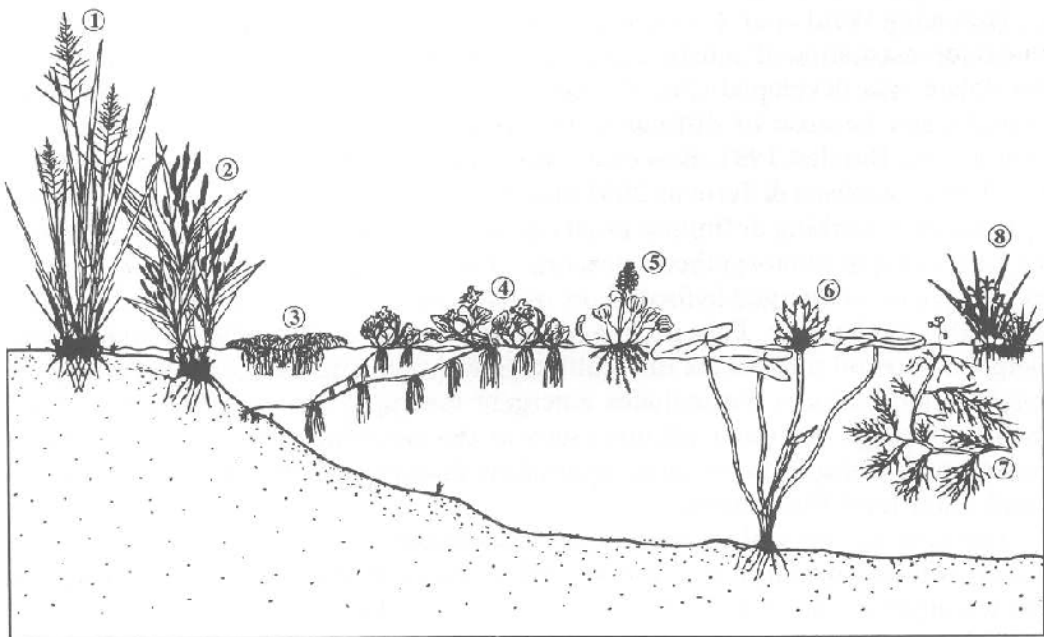
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

พืชน้ำ: ความหมายและการจัดจำแนกชนิด

พรรณไม้น้ำ (aquatic plant, aquatic macrophytes, water plant, wetland plant หรือ hydrophyte) หมายถึง พืชที่ขึ้นอยู่ในน้ำ อาจเป็นพืชที่ลอยอยู่ที่ผิวน้ำ จมอยู่ใต้น้ำ หรือพืชที่ขึ้นตามชายน้ำ ที่ขึ้นแฉะ หรือแม้แต่พืชที่มีระยะหนึ่งของวงจรชีวิตเจริญอยู่ในน้ำ (สุชาติดา, 2542)

พรรณไม้น้ำได้ถูกแบ่งเป็น 4 ประเภทใหญ่ ๆ ตามลักษณะการเจริญเติบโตและลักษณะวิสัยของพืช (ภาพ 1) (Cronk and Fennessy, 2001) ได้แก่

1. พืชโผล่เหนือน้ำ (emergent plants)
2. พืชใต้น้ำ (submerged plants)
3. พืชลอยน้ำ (free-floating plants)
4. พืชใบลอยน้ำ (floating-leaved plants)



ภาพ 2.1 ประเภทของพืชน้ำ (types of aquatic plants)

หมายเหตุ 1, 2 = emergent plants; 3, 4, 5, 8 = free-floating plants;

6 = floating-leaved plants; 7 = submerged plants

(ที่มา: Thomaz, 2004)

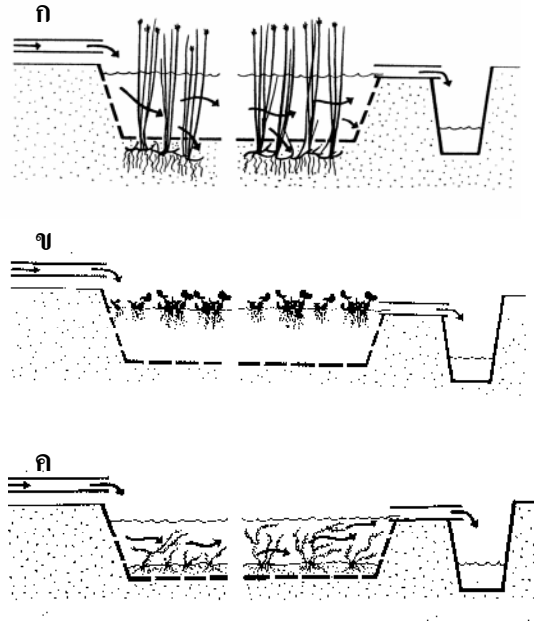
พืชน้ำกับการบำบัดน้ำเสีย

พืชน้ำจัดเป็นผู้ผลิตที่สำคัญของแหล่งน้ำและระบบนิเวศพื้นที่ชุ่มน้ำ (wetland ecosystem) และยังทำหน้าที่เสมือนเป็นไตของพื้นที่ชุ่มน้ำ โดยช่วยดักตะกอน ชะลอความเร็วของกระแสน้ำ เพิ่มปริมาณก๊าซออกซิเจนให้แหล่งน้ำ และช่วยลดปริมาณสารอาหารหรือสารพิษต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนมากับน้ำที่ปล่อยมาจากครัวเรือน โรงงานอุตสาหกรรมหรือแม้แต่พื้นที่เกษตรกรรม การสังเกตจากสภาพธรรมชาติเห็นว่า ในแหล่งน้ำธรรมชาติที่ได้รับน้ำเสียมาจากแหล่งต่าง ๆ ที่อาจมีการปนเปื้อนของสารอาหารและสารเคมีในปริมาณที่สูง ถ้าน้ำดังกล่าวมีการไหลผ่านพื้นที่ชุ่มน้ำมาก่อนน้ำมักจะมีคุณภาพที่ดีขึ้น ดังนั้น ระบบนิเวศพื้นที่ชุ่มน้ำจึงจัดว่ามีบทบาทและความสำคัญในแง่ของการรักษาสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำในธรรมชาติ โดยมีพืชน้ำเป็นตัวทำหน้าที่หลักดังกล่าวข้างต้น ทำให้ระบบนิเวศมีความสมดุลและยังเป็นแหล่งที่จัดว่ามีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์หรือแม้แต่จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายของสารอินทรีย์อีกด้วย (Brix and Schierup, 1989)

จากความสำคัญของระบบนิเวศพื้นที่ชุ่มน้ำดังกล่าว มนุษย์จึงได้ลอกเลียนแบบจากธรรมชาติมาสร้างเป็นระบบบึงประดิษฐ์ (constructed wetland) หรือระบบบำบัดน้ำเสียที่ใช้พืชน้ำเป็นตัวช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดีขึ้น (Cronk and Fennessy, 2001) ระบบบึงประดิษฐ์ที่มนุษย์สร้างขึ้นมานี้มีหลายประเภทขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการบำบัด งบประมาณ ลักษณะพื้นที่ซึ่งล้วนมีผลต่อการตัดสินใจในการออกแบบระบบ โดยทั่วไประบบบึงประดิษฐ์สามารถแบ่งเป็นประเภทใหญ่ ๆ ได้ดังนี้

1. Free water surface systems (FW) เป็นระบบบึงประดิษฐ์แบบเปิดโล่งคล้ายกับพื้นที่ชุ่มน้ำในธรรมชาติทั่วไป โดยปกติจะมีทั้งที่ขุดเป็นบึงที่มีความลึกไม่มากนัก (ประมาณ 20-50 เซนติเมตร) หรืออาจพบที่ขุดเป็นบึงที่มีความลึกถึง 2 เมตร โดยจะมีพลาสติกกรองอยู่รอบบ่อเพื่อป้องกันการซึมผ่านของน้ำเสียสู่ใต้ดิน ในระบบนี้น้ำจะถูกปล่อยเข้ามาขังในระบบแล้วปล่อยให้พืชใช้สารอาหารที่ปนเปื้อนมากับน้ำ ซึ่งน้ำเสียดังกล่าวมักผ่านการบำบัดขั้นต้นมาก่อนแล้ว เช่น มีการตกตะกอน ไชมัน ลดปริมาณสารอินทรีย์ เป็นต้น โดยพืชที่นำมาใช้ในระบบอาจเป็นพืชจมน้ำ (submerged macrophytes) เช่น สาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*), สาหร่ายพวงกะโหลก (*Ceratophyllum demersum*) เป็นต้น ซึ่งระบบที่ใช้พืชจมน้ำต้องเป็นระบบที่ไม่มีปัญหาเรื่องแสงที่ส่องถึงพืชได้ น้ำส่วนพืชลอยน้ำที่นิยมใช้ เช่น ผักตบชวา (*Eichornia crassipes*), แหน (*Lemna* spp.) หรือพืชสกุล จอกหูหนู (*Salvinia*) เป็นต้น ส่วนพืชโคล่พื้นน้ำที่ใช้ในระบบนี้ เช่น reed (*Phragmites australis*), *Phalaris arundinacea*, *Glyceria maxima*, *Typha* spp. และ *Scripus* spp. ซึ่งเป็นพืชที่นิยมใช้กันมากในประเทศแถบทวีปยุโรป ส่วนในประเทศไทยพืชโคล่พื้นน้ำที่ใช้ในระบบนี้ ตัวอย่างเช่น กกกรัง

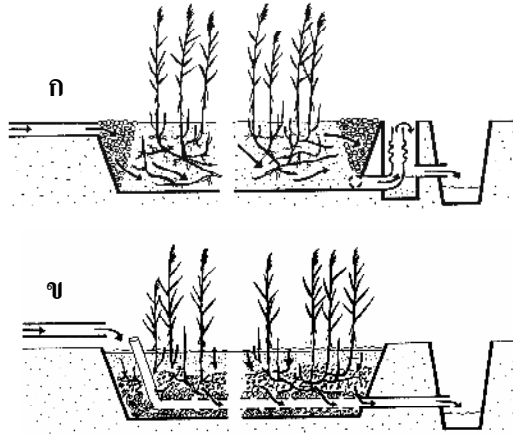
กา (*Cyperus involucretus*) กกจันทบุรี (*Cyperus corymbosus*), แฝก (*Vetiveria zizanioides*), ฐูปฤาษี (*Typha angustifolia*) เป็นต้น



ภาพ 2.2 การประยุกต์ใช้ *Scirpus lacustris* ในบึงประดิษฐ์แบบ Free Water Surface System (ก); ระบบบำบัดน้ำเสียโดยใช้ผักตบชวา (*Eichhornia crassipes*) (ข) และ *Elodea Canadensis* (ค) ในบึงประดิษฐ์แบบ Free Water Surface System (ที่มา: Brix and Schierup, 1989)

2. Sub-surface flow system (SSF) เป็นระบบที่คล้ายแบบแรก แต่จะมีการปล่อยน้ำออกที่ได้ผิวดิน ให้น้ำไหลผ่านวัสดุปลูกที่นิยมใช้ก้อนกรวด ทราบ หรือดิน และผ่านระบบรากพืช ในระบบนี้จะใช้พืชใล่พื้นน้ำเป็นหลักและเป็นระบบที่นิยมใช้กันมากในประเทศแถบทวีปยุโรปที่มีช่วงฤดูหนาวที่หนาวจัดและมีหิมะปกคลุมเป็นระยะเวลายาว แต่พืชใล่พื้นน้ำจะยังมีระบบรากที่ยังสามารถดูดซับสารอาหารจากน้ำที่ปล่อยมายังใต้ดินได้และมีการสะสมอาหารในลำต้นใต้ดินเพื่อใช้ในช่วงระยะเวลาดังกล่าวจนกว่าพืชจะมีการแตกลำต้นเหนือดินในช่วงฤดูใบไม้ผลิของปีถัดไป นอกจากนี้การพักตัวของพืชในช่วงฤดูหนาว เศษลำต้นและใบที่แห้งหล่นทับถมบนดินยังเป็นฉนวนกันความหนาวเย็นที่สำคัญให้กับจุลินทรีย์ที่ช่วยในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์อีกด้วย

นอกจากนี้ ยังมีการพัฒนาระบบขึ้นมาใหม่ โดยมีรากฐานมาจากระบบ sub-surface flow โดยต่างกันคือ ระบบใหม่นี้ จะมีการปล่อยน้ำจากผิวดินแล้วให้น้ำค่อย ๆ ซึมลงสู่ใต้ดินในแนวดิ่ง และภายในระบบจะมีการต่อท่ออากาศใต้ดินเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้กับรากพืช เรียกกระบวนนี้ว่า vertical flow system (VF) ระบบดังกล่าวเป็นการออกแบบเพื่อประหยัดพื้นที่โดยให้น้ำไหลและถูกบำบัดในแนวดิ่ง



ภาพ 2.3 การประยุกต์ใช้ *Phragmites australis* ในบึงประดิษฐ์แบบ Sub-Surface Horizontal Water Flow (ก) และ Vertical Flow System (ข) (ที่มา: Brix and Schierup, 1989)

ระบบบึงประดิษฐ์ที่กล่าวข้างต้น ได้มีการเลือกพืชน้ำมาใช้หลากหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกันตามระบบและเขตภูมิอากาศของโลก ตลอดจนชนิดพืชพันธุ์ที่พบในแต่ละท้องถิ่น ดังสรุปในตาราง 2.1, 2.2 และ 2.3 ตามลำดับ (Cronk and Fennessy, 2001)

ตารางที่ 2.1 ชนิดพืชน้ำที่ใช้ในระบบบึงประดิษฐ์แบบ surface flow system ใน Queensland, Australia

ชื่อวงศ์	ชนิดพืช	ประเภทของพืชน้ำ
Alismataceae	<i>Sagittaria graminea</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Apiaceae	<i>Hydrocotyle bonariensis</i>	พืชใบลอยน้ำ
Amaranthaceae	<i>Alternanthera philoxeroides</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Araceae	<i>Pistia stratiotes</i>	พืชลอยน้ำ
	<i>Colocasia esculenta</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Asteraceae	<i>Eclipta prostrate</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Azollaceae	<i>Azolla</i> sp.	พืชลอยน้ำ
Cannaceae	<i>Canna</i> sp.	พืชใล่พื้นน้ำ
Ceratophyllaceae	<i>Ceratophyllum demersum</i>	พืชจมน้ำ
Convolvulaceae	<i>Ipomoea aquatica</i>	พืชลอยน้ำ
	<i>Ipomoea diamantinensis</i>	

Cyperaceae	<i>Baumea articulate</i> , <i>B. rubiginosa</i> , <i>Bolboschoenus fluviatilis</i> , <i>B. caldwelli</i> ,	พืชโคล่พื้นน้ำทั้งหมด
ชื่อวงศ์	ชนิดพืช	ประเภทของพืชน้ำ
Cyperaceae	<i>Cyperus alopecuroides</i> , <i>C. eragrostis</i> , <i>C. exaltatus</i> , <i>C. papyrus</i> , <i>C. involucratus</i> , <i>Eleocharis acuta</i> , <i>E. dulcis</i> , <i>E. philippinensis</i> , <i>E. sphacelata</i> , <i>Rhynchospora corymbosa</i> , <i>Scirpus</i> sp., <i>Scheonoplectus mucronatus</i> , <i>S. validus</i> , <i>Scleria poiformis</i> , <i>Schoenus apogon</i>	พืชโคล่พื้นน้ำทั้งหมด
Gramineae	<i>Brachiaria mutica</i> , <i>Chinochloa crus-galli</i> <i>E. colona</i>	พืชโคล่พื้นน้ำทั้งหมด
Hydrocharitaceae	<i>Vallisneria gigantea</i>	พืชจมน้ำ
Juncaginaceae	<i>Triglochin procera</i>	พืชจมน้ำ
Juncaceae	<i>Juncus planifolius</i> , <i>J. polyanthemus</i> , <i>J. prismatocarpus</i> , <i>J. Kraussii</i> , <i>J. usitatus</i>	พืชโคล่พื้นน้ำทั้งหมด
Lemnaceae	<i>Lemna</i> spp., <i>Spirodela</i> spp., <i>Wolffia</i> spp.	พืชลอยน้ำ
Limnocharitaceae	<i>Hydrocleys nymphoides</i>	พืชใบลอยน้ำ
Marantaceae	<i>Thalia dealbata</i>	พืชโคล่พื้นน้ำ
Marsileaceae	<i>Marsilea mutica</i> , <i>M. Drummondii</i>	พืชใบลอยน้ำ
Menyanthaceae	<i>Nymphoides indica</i>	พืชใบลอยน้ำ
Myrtaceae	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	ไม้ยืนต้น
Nymphaeaceae	<i>Nymphaea capensis</i> , <i>N. Gigantea</i>	พืชใบลอยน้ำ
Onagraceae	<i>Ludwigia peploides</i> , <i>L. Peruviana</i> <i>L. octovalvis</i>	พืชโคล่พื้นน้ำ
Pakiariaceae	<i>Ceratopteris thalictroides</i>	พืชโคล่พื้นน้ำ
Philydraceae	<i>Philydrum lanuginosum</i>	พืชโคล่พื้นน้ำ
Polygonaceae	<i>Persicaria attenuata</i> , <i>P. Orientale</i> , <i>P. Strigosum</i>	พืชโคล่พื้นน้ำ
Ponteriaceae	<i>Monochoria cyanea</i>	พืชโคล่พื้นน้ำ
Potamogetonaceae	<i>Potamogeton crispus</i> , <i>P. Pectinalis</i>	พืชจมน้ำ
Salvinaceae	<i>Salvinia molesta</i>	พืชลอยน้ำ
Scrophulariaceae	<i>Bacopa monnieri</i>	พืชโคล่พื้นน้ำ
Typhaceae	<i>Typha domingensis</i> , <i>T. orientalis</i>	พืชโคล่พื้นน้ำ

ตารางที่ 2.2 ชนิดพืชที่ใช้ในระบบบึงประดิษฐ์แบบ sub-surface flow system ในประเทศเขตอบอุ่น

ชื่อวงศ์	ชนิดพืช	ประเภทของพืชน้ำ
Alismataceae	<i>Sagittaria, Sagittifolia</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Cyperaceae	<i>Carex</i> spp., <i>Rhynchospora</i> spp., <i>Cyperus</i> spp., <i>Scirpus</i> spp., <i>S. acutus</i> , <i>S. californicus</i> , <i>S. lacustris</i> , <i>Schoenoplectus validus</i> , <i>S. tabernaemontoni</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Gramineae	<i>Glyceria maxima</i> , <i>Panicum</i> spp., <i>Phalaris arundinacea</i> , <i>Phragmites australis</i> , <i>P. Communis</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Iridaceae	<i>Acornus calamus</i> , <i>Iris pseudacorus</i> , <i>I. Versicolor</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Juncaceae	<i>Juncus</i> spp., <i>J. effusus</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Lythraceae	<i>Lythrum</i> spp., <i>L. salicaria</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Onagraceae	<i>Epilobium</i> spp.	พืชใล่พื้นน้ำ
Polygonaceae	<i>Polygonum amphibium</i> , <i>Rumex</i> spp., <i>R. crispus</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Sparganiaceae	<i>Sparganium erectum</i> , <i>S. americanum</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Typhaceae	<i>Typha</i> spp., <i>T. latifolia</i> , <i>T. angustifolia</i> , <i>T. domingensis</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Umbelliferae	<i>Oenanthe</i> spp.	พืชใล่พื้นน้ำ

ตารางที่ 2.3 ชนิดพืชที่ใช้ในระบบบึงประดิษฐ์แบบ sub-surface flow system ในประเทศเขตร้อนหรือกึ่งเขตร้อน

ชื่อวงศ์	ชนิดพืช	ประเภทของพืชน้ำ
Cyperaceae	<i>Carex fascicularis</i> , <i>Cyperus articulatus</i> , <i>C. flabelliformis</i> , <i>C. immensus</i> , <i>C. papyrus</i> , <i>Schoenoplectus validus</i> , <i>Scirpus californicus</i> , <i>S. lacustris</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Gramineae	<i>Miscanthidium violaceum</i> , <i>Paspalum penisetum</i> , <i>Phragmites</i> spp., <i>Vetiveria zizanioides</i> , <i>V. bonariensis</i>	พืชใล่พื้นน้ำ
Typhaceae	<i>Typha</i> spp.	พืชใล่พื้นน้ำ

บทบาทหน้าที่ของพืชน้ำในระบบบึงประดิษฐ์

พืชน้ำจัดเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญในการลดปริมาณสารอาหารที่มีปริมาณสูงในน้ำเสีย เป็นตัวส่งเสริมจุลินทรีย์ให้อยู่ในภาวะที่เอื้อต่อการเปลี่ยนแปลงรูปของสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ต่าง ๆ อีกทั้งยังเป็นแหล่งเพิ่มปริมาณออกซิเจนแก่แหล่งน้ำอีกด้วย ในระบบบึงประดิษฐ์พืชน้ำจึงมีบทบาทหน้าที่สำคัญในการพัฒนาคุณภาพน้ำ โดยสามารถแบ่งลักษณะหน้าที่ของพืชน้ำออกเป็นข้อ ๆ ดังรายละเอียดต่อไปนี้ (Brix and Schierup, 1989; Brix, 1997; Cronk and Fennessy, 2001; Greenway, 2007; Dhote and Dixit, 2009)

1. ตัวกรองทางกายภาพ พืชน้ำสามารถลดความเร็วของกระแสน้ำที่ไหลเข้าสู่ระบบ ซึ่งไปส่งเสริมการตกตะกอนสารที่แขวนลอยมากับน้ำทำให้น้ำใสขึ้น การลดความเร็วของกระแสน้ำยังมีผลทำให้ระยะเวลาที่อยู่ในระบบของน้ำ (retention time) นานขึ้นอีกด้วย ทำให้พืชมีเวลานานพอที่จะดูดซับสารอาหารเข้าไปได้ นอกจากนี้ ในบึงประดิษฐ์ที่ใช้พืชลอยน้ำ เช่น แหน (*Lemna* spp.) การปกคลุมพื้นผิวน้ำของพืช จะไปลดปริมาณแสงที่ส่องลงใต้น้ำ ทำให้สาหร่ายสีเขียวซึ่งเป็นตัวการของน้ำเสียลดปริมาณลงด้วยเช่นกัน

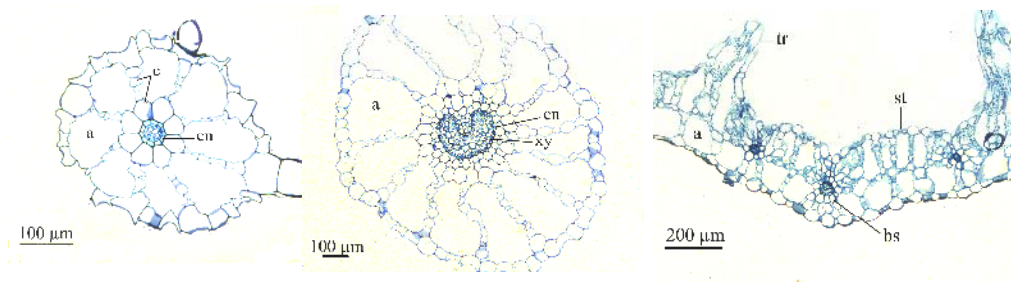
2. เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของน้ำ ในระบบบึงประดิษฐ์แบบ Sub-Surface Horizontal Water Flow ช่องว่างระหว่างอนุภาคดินหรือวัสดุปลูกถือว่ามีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่หรือซึมผ่านของน้ำ ในระบบบึงประดิษฐ์ที่มีการขนไชของรากพืชและลำต้นใต้ดินจะส่งผลให้อนุภาคดินเรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ ไม่อัดกันแน่น ทำให้น้ำซึมผ่านได้เป็นอย่างดี เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการดูดธาตุอาหารโดยรากพืชและยังมีผลดีต่อการหมุนเวียนธาตุอาหารต่าง ๆ โดยจุลินทรีย์ที่อยู่รอบ ๆ รากและลำต้นใต้ดินนั้นด้วย โดยทั่วไป ในระบบบึงประดิษฐ์ในประเทศแถบยุโรป เช่น อังกฤษ ออสเตรเลียและเดนมาร์ก ที่ใช้ *Phragmites australis* ในระบบบำบัด มักมีการเคลื่อนที่ของน้ำในดินที่คงที่คือ มีค่าระหว่าง 10^{-5} - 10^{-6} เมตรต่อวินาที

3. พื้นที่ยึดเกาะสำหรับจุลินทรีย์ ส่วนของลำต้นและใบที่จมน้ำของพืชใล่ล่พื้นน้ำจัดเป็นแหล่งที่อยู่ที่สำคัญของแบคทีเรีย (bacteria) และโปรโตซัว (protozoa) ที่เจริญก่อตัวเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ เคลือบอยู่บนลำต้นหรือใบ ส่วนลำต้นที่อยู่ใต้ดินหรือรากเป็นอีกส่วนหนึ่งที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ในดิน จุลินทรีย์ที่เคลือบอยู่กับส่วนต่าง ๆ ของพืชเหล่านี้ล้วนมีบทบาทสำคัญต่อการหมุนเวียนธาตุอาหารต่าง ๆ โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่มักเป็นธาตุอาหารที่ต้องการกำจัดออกจากน้ำเสีย

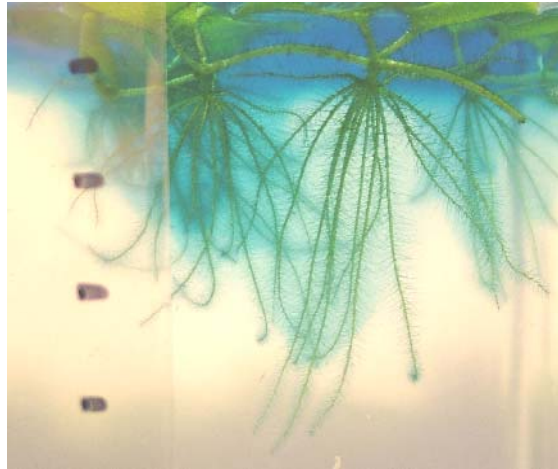
4. เพิ่มออกซิเจนให้แก่ระบบ รากพืชน้ำจัดเป็นแหล่งผลิตก๊าซออกซิเจนที่สำคัญให้แก่แหล่งน้ำและดิน มีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่รอบ ๆ รากพืช โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อการเปลี่ยนรูปสารเคมีในวัฏจักรของสารต่าง ๆ ในพืชลอยน้ำและพืชใล่ล่พื้นน้ำ ออกซิเจนส่วนใหญ่มักได้รับมาจากการแพร่จากบรรยากาศเข้าทางปากใบและลำเลียงไปตามช่องอากาศภายในใบ ลำต้น และลงสู่ราก (รูปที่ 2.4) ก่อนที่จะถูกปล่อยออกจากราก

อีกครั้งหนึ่ง ดังนั้น ในพืชที่มีระบบรากแตกแขนงอย่างหนาแน่น มักมีปริมาณออกซิเจนรอบ ๆ ราก ในปริมาณที่สูงกว่าบริเวณที่ไม่มีรากพืช (รูปที่ 2.5) ซึ่งมีผลดีต่อสิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่รอบ ๆ รากนั้น โดยจะไปกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์เพิ่มขึ้นและส่งเสริมการเจริญของ nitrifying bacteria สำหรับพืชจมน้ำพืชจะช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการหายใจของจุลินทรีย์ขณะที่มีการย่อยสลายสารอินทรีย์และเพิ่มปริมาณก๊าซออกซิเจนให้แก่แหล่งน้ำ ดังนั้น พืชจมน้ำจึงเป็นพืชตัวเลือกหนึ่งที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีค่า BOD ไม่สูงมากนัก

นอกจากนี้ ระบบรากของพืชน้ำในระบบบึงประดิษฐ์ยังมีการหลั่งสารอื่นอีกที่เป็นผลดีแก่ระบบ เช่น ในพืชสกุล *Schoenoplectus* มีการหลั่งสารแอนติไบโอติก (antibiotics) ออกมาด้วย ซึ่งมีผลไปลดปริมาณแบคทีเรียที่ต้องการกำจัดออกจากน้ำเสียได้แก่ Coliform bacteria , *Salmonella* และ *Enterococci* เป็นต้น และยังพบว่ารากของพืชน้ำสามารถหลั่งสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ซึ่งจัดเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ denitrification ซึ่งเป็นกระบวนการที่จำเป็นต่อการลดปริมาณไนเตรตโดยการเปลี่ยนรูปไนเตรตให้เป็นก๊าซไนโตรเจนระเหยออกจากระบบนั่นเอง



รูปที่ 2.4 โครงสร้างภายในส่วนราก ลำต้น และใบของเฟิร์นใบมะขาม (*Salvinia natans*) แสดงช่องว่างสำหรับกักเก็บอากาศที่รับเข้าทางปากใบและปล่อยออกทางราก (a, air space; bs, bundle sheath; c, cortex; en, endodermis; st, stoma; tr, trichome; xy, xylem) (ภาพ: อรุณทัย จำปีทอง)



รูปที่ 2.5 ออกซิเจนที่ถูกปล่อยออกมาจากรากเฟิร์นใบมะขาม (*Salvinia natans*) จากรูปเป็นการทดลองนำพืชมาแช่ในน้ำที่เติม $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ออกซิเจนหมดไปและมี methylene blue เป็น indicator (Armstrong and Armstrong, 1987) เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง พืชซึ่งได้รับออกซิเจนจากบรรยากาศและลำเลียงมาสู่รากโดยผ่านทางช่องอากาศออกซิเจนจะถูกปล่อยออกจากรากสู่ชั้นน้ำโดยรอบ ในสถานะที่มีออกซิเจน methylene blue ที่ผสมอยู่ในน้ำจะเปลี่ยนจากไม่มีสีมาเป็นสีน้ำเงิน ในขณะที่บริเวณอื่นที่ไม่มีรากพืช น้ำยังคงไม่มีสีเหมือนเดิม (ภาพ: อรุณทัย จำปีทอง)

5. คุณค่าอาหาร จัดเป็นหน้าที่หลักของพืชที่ช่วยลดปริมาณสารอาหารที่ปนมากับน้ำเสีย โดยเฉพาะฟอสฟอรัสที่เป็นธาตุอาหารสำคัญที่ไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่ายและก่อให้เกิดภาวะเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำตามมา นอกจากนี้ พืชน้ำยังสามารถลดปริมาณไนโตรเจนได้เป็นอย่างดีอีกด้วย เนื่องจากเป็นธาตุอาหารสำคัญที่พืชใช้ในการเจริญเติบโต ดังนั้น การคัดเลือกชนิดพืชน้ำมาใช้ในระบบบำบัดประติสฐจึงนิยมเลือกใช้พืชที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงและมีการแพร่พันธุ์ที่รวดเร็ว เช่น ผักตบชวา จอกหูหนู จอก หรือ แหน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม อัตราการลดสารอาหารที่ปนมากับน้ำเสียในพืชน้ำแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จากการศึกษาที่ผ่านมาพืชในกลุ่มพืชลอยน้ำอย่างอิสระ (free-floating macrophytes) มักมีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการลดไนโตรเจนที่สูงกว่าพืชใต้น้ำ ส่วนข้อมูลในกลุ่มพืชจมน้ำยังมีการศึกษากันน้อยมาก พืชน้ำนอกจากการนำมาช่วยลดปริมาณสารอาหารแล้ว หลังการเก็บเกี่ยวพืชยังสามารถนำไปใช้ทำปุ๋ยอินทรีย์ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย หรือในพืชบางชนิดเช่นจอกหูหนู (*Salvinia molesta*) ยังสามารถนำไปทำเป็นอาหารสัตว์ เช่น ใช้เลี้ยงสุกร เนื่องจากพบว่าพืชสกุล *Salvinia* สามารถดูดไนโตรเจนอินทรีย์โดยเฉพาะแอมโมเนียม (NH_4^+) ได้เป็นอย่างดี เป็นต้น พืชดังกล่าวหลังจากเก็บเกี่ยวแล้วเมื่อนำมาวิเคราะห์สารอาหารพบว่ามีกรดอะมิโนจำเป็นและโปรตีนในปริมาณที่สูง (Leterme, 2009) เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น ๆ ที่นำมาบำบัดน้ำเสียในระบบบำบัดประติสฐที่พบว่าในเนื้อเยื่อของพืชเหล่านี้มักมีปริมาณ

ฟอสฟอรัสและไนโตรเจนที่สูงมากขึ้นเมื่อเทียบกับต้นที่เจริญเติบโตอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ (ตารางที่ 2.4) (Greenway, 2007)

ตารางที่ 2.4 ปริมาณฟอสฟอรัส (P) และ ไนโตรเจน (N) (mg /g dry wt) ในเนื้อเยื่อใบหรือลำต้นของพืชที่ถูกนำมาบำบัดน้ำเสียในระบบบึงประดิษฐ์ (treatment) และที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติ (control) (Mean±SD)

Species	Type	Treatment		Control	
		P	N	P	N
<i>Phragmites australis</i>	E	2.0±0.6	20.4±8.0	1.4±0.6	12.0±7.3
<i>Typha domingensis</i>	E	2.3±1.0	15.8±6.0	1.5±0.9	9.2±6.2
<i>Baumea articulata</i>	E	3.7±1.9	13.1±4.2	2.4±0.7	12.6±2.4
<i>Schoenoplectus validus</i>	E	2.6±1.2	14.6±5.0	0.8±0.5	10.5±5.0
<i>Eleocharis sphacelata</i>	E	2.7±1.1	15.8±4.0	1.3±0.6	11.3±5.6
<i>Ludwigia peploides</i>	FF	5.4±1.8	36.9±10.2	3.1±1.0	27.0±10.2
<i>Persicaria orientalis</i>	E	4.4±1.3	33.2±10.1	1.4±0.6	13.5±3.3
<i>Nymphoides indica</i>	FL	6.6±2.0	25.8±11.0	2.5±0.6	22.1±3.6
<i>Nymphaea gigantea</i>	FL	4.2±2.0	28.0±10.0	2.2±0.5	22.0±8.0
<i>Paspalum distichum</i>	FF	2.8±1.2	12.5±3.0	0.9±0.4	11.0±2.6
<i>Marsilea mutica</i>	FL	8.0±1.6	28.8±3.0	2.2±0.5	14.7±3.4

หมายเหตุ: E, Emergent macrophytes; FF, Free-floating macrophytes; FL, Floating-leaves macrophytes

(ที่มา: Greenway, 2007)

6. ฉนวนธรรมชาติ บึงประดิษฐ์ที่ใช้ในประเทศเขตอบอุ่น (temperate) พืชใล่ล่พื้นน้ำจัดเป็นพืชที่นิยมนำมาใช้บำบัดน้ำเสียเนื่องจากพืชดังกล่าวมีลำต้นทั้งที่อยู่ใต้ดินและเหนือดิน ลำต้นใต้ดินของพืชเหล่านี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ถึงแม้ว่าลำต้นเหนือดินจะเหี่ยวแห้งไปในช่วงฤดูหนาวที่มักมีอากาศหนาวเย็นและถูกปกคลุมไปด้วยหิมะติดต่อกันเป็นระยะเวลายาวนาน ในช่วงเวลาดังกล่าวส่วนของลำต้นเหนือดินที่เหี่ยวแห้งจะปกคลุมพื้นดินซึ่งจะทำหน้าที่เสมือนเป็นฉนวนกันความเย็นให้แก่พื้นดิน ทำให้ได้พื้นดินลงไปมีอุณหภูมิไม่เย็นจัด ลำต้นใต้ดินจึงยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้โดยอาศัยอาหารที่ส่วนใหญ่สะสมอยู่ในรูปของแป้งและมีอัตราการหายใจที่ต่ำลง จนเข้าสู่ฤดูใบไม้ผลิที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้น และหิมะละลายไป ลำต้นใต้ดินจะเริ่มมีกิจกรรมมากขึ้นไม่ว่าจะเป็นอัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้น การแตกยอดอ่อน และเจริญเป็นส่วนของลำต้นเหนือดินที่มีการแตกตาใบ พืชจะเริ่มสร้าง

อาหารได้อีกครั้งและเก็บสะสมไว้ที่ลำต้นใต้ดิน นอกจากนี้ พืชยังมีการกักเก็บอากาศไว้ภายในลำต้นอีกด้วยเนื่องจากมีช่องว่างอากาศ (air space) ตลอดทั่วลำต้น พบว่าพืชเหล่านี้เมื่อเข้าสู่ฤดูร้อน การสะสมของเศษซากพืชที่ร่วงหล่นและทับถมกันมากขึ้นยังเป็นฉนวนกันความร้อนแก่พื้นดินอีกเช่นกัน ดังนั้น ไม่ว่าจะเข้าสู่ฤดูหนาวที่เย็นจัดหรือฤดูร้อนก็ตาม ฉนวนธรรมชาติที่เกิดจากการทับถมของเศษซากพืช จะช่วยรักษาสภาพของบึงประดิษฐ์ไว้ได้ ทำให้ไม่ต้องเสียเวลาในการรื้อถอนและสร้างระบบใหม่ทุกปี

7. บทบาทหน้าที่อื่น ๆ พืชน้ำในระบบบึงประดิษฐ์ นอกเหนือจากทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดน้ำเสียดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังเป็นระบบนิเวศที่เอื้อต่อสิ่งมีชีวิตอื่นอีกด้วย เช่น เป็นแหล่งอาหาร ที่อยู่อาศัย ที่วางไข่ที่สำคัญของสัตว์นานาชนิดเช่น นก เป็นต้น ปัจจุบัน ได้มีการนำเอาพืชที่ให้ดอกสวยงามเช่น *Iris pseudacorus* มาใช้ในระบบบึงประดิษฐ์ด้วยเพื่อใช้เป็นแหล่งพักผ่อนหย่อนใจของมนุษย์ อย่างในประเทศไทยหลังจากเหตุการณ์สึนามิ ประเทศไทยได้รับความร่วมมือทางด้านวิชาการและทุนจากประเทศเดนมาร์ก มาช่วยพัฒนาและจัดตั้งระบบบึงประดิษฐ์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่มาจากชุมชนที่ได้รับผลกระทบจากเหตุการณ์สึนามิได้แก่ พื้นที่ชุมชนบ้านพรุเดียว จังหวัดพังงา หมู่เกาะพีพี จังหวัดกระบี่ และเทศบาลเมืองป่าตอง จังหวัดภูเก็ต มีการเลือกใช้พุทธรักษาและธรรมรักษา ซึ่งเป็นพืชที่มีดอกสีส้มสวยงามและยังสามารถลดปริมาณฟอสฟอรัสและไนโตรเจนได้เป็นอย่างดี โดยมีการออกแบบบึงประดิษฐ์ให้มีลักษณะเป็นสวนหย่อมเพื่อใช้เป็นแหล่งพักผ่อนหย่อนใจของบุคคลในชุมชนนั้นด้วย (Brix et al. 2007; Konnerup et al., 2009; Konnerup and Brix, 2010)

ไนโตรเจนในแหล่งน้ำ

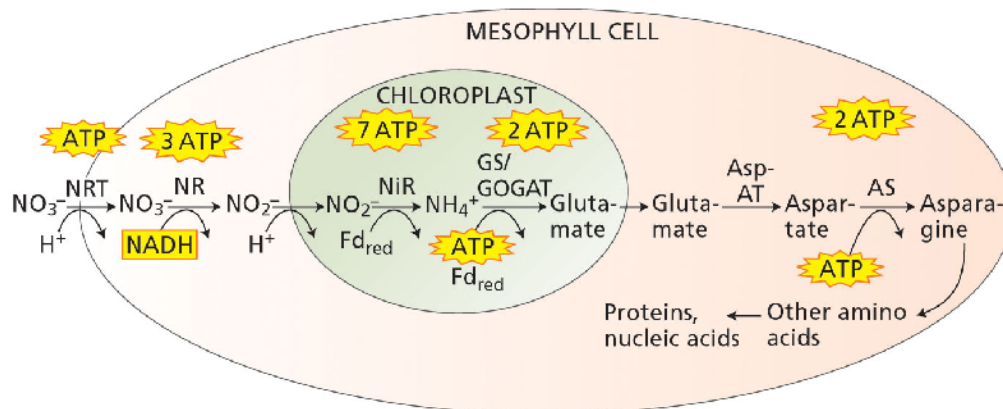
ไนโตรเจนที่พบในแหล่งน้ำส่วนใหญ่เป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen) พบในรูปของไนเตรต (NO_3^-) และแอมโมเนียม (NH_4^+) ในแหล่งน้ำธรรมชาติน้ำฝนจัดเป็นแหล่งที่มาของไนเตรตที่สำคัญ นอกจากนี้ ยังรวมถึงน้ำชะหน้าดินที่ไหลลงสู่แหล่งน้ำด้วย ส่วนแอมโมเนียมมักมีแหล่งสำคัญมาจากซากพืชซากสัตว์ที่มีการทับถมและเน่าเปื่อยในแหล่งน้ำนั้น ๆ และยังสามารถเป็นแหล่งที่มาของไนเตรตอีกทางหนึ่งด้วย ทั้งนี้บริเวณนั้นต้องอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน (oxic condition) อย่างไรก็ตาม ปริมาณออกซิเจนของแหล่งน้ำในเขตร้อน มักมีปริมาณจำกัด (limiting factor) โดยเฉพาะในระบบน้ำนิ่ง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการก่อชั้นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ที่ผิวน้ำ แผ่นฟิล์มดังกล่าวจัดเป็นสิ่งที่กีดกันการแพร่ของก๊าซออกซิเจนจากบรรยากาศลงสู่แหล่งน้ำซึ่งปกติมีอัตราการแพร่ที่ต่ำอยู่แล้ว (10^{-4} เท่า) เมื่อเทียบกับการแพร่ของออกซิเจนในอากาศทั่วไป แต่ชั้นแผ่นฟิล์มดังกล่าวสามารถถูกทำลายไปได้โดยแรงพัดของลมลงที่ผิวน้ำนั้น ๆ หรือการเคลื่อนที่ของน้ำโดยแรงกระแทกอื่น ๆ นอกจากนี้ อุณหภูมิที่สูงเกือบตลอดทั้งปีของแหล่งน้ำเขตร้อนยังมีผลทำให้ความสามารถในการละลายของก๊าซออกซิเจนในแหล่งน้ำน้อยลงด้วย จึงเป็นเหตุส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ denitrification ซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนไนเตรต (NO_3^-) เป็นไนไตรต์ (NO_2^-) และก๊าซไนโตรเจน (N_2) กลับคืนสู่บรรยากาศในที่สุด (Horne and Goldman, 1994)

การเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรจนถึงทุกวันนี้ ส่งผลให้มีการก่อตั้งบ้านเรือนกันมากขึ้น รวมทั้งการเพิ่มพื้นที่ทำกินโดยเฉพาะพื้นที่เกษตรกรรม การเพิ่มขึ้นของจำนวนครัวเรือนดังกล่าว ล้วนมีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่ปล่อยสู่แหล่งน้ำ โดยเฉพาะแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้นในช่วง 1-5 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงเมื่อเทียบกับปริมาณที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติ นอกจากนี้ ในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณสูง ยังเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่ปล่อยไนโตรเจนทั้งไนเตรตและแอมโมเนียมปริมาณมากลงสู่แหล่งน้ำอีกด้วย การได้รับไนโตรเจนจากทั้งครัวเรือนและพื้นที่เกษตรกรรมดังกล่าวสามารถทำให้แหล่งน้ำแต่ละที่มีไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งรูปแบบและความเข้มข้น ซึ่งล้วนแต่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการกระจายของพืชน้ำ (Jackson *et al.*, 2001; Jampeetong and Brix 2009a; Jampeetong and Brix 2009b)

การใช้ไนโตรเจนของพืชน้ำ

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญอันดับ 4 ที่พืชใช้ในการเจริญเติบโต โดยพืชน้ำจะดูดไนโตรเจนในแหล่งน้ำไปใช้ในรูปของสารละลายไอออน 2 ชนิดคือไนเตรตไอออน (NO_3^-) และแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) (Taiz and Zeiger, 2002)

ในกรณีที่พืชเลือกใช้ในเตรต (NO_3^-) หลังจากการขนส่งไนเตรตเข้าสู่เซลล์แล้ว พืชจะเก็บไว้ใน vacuole จากนั้น พืชจะเปลี่ยนไนเตรต (NO_3^-) ไปเป็นไนไตรต (NO_2^-) โดยอาศัยเอนไซม์ nitrate reductase จากนั้นไนไตรต (NO_2^-) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) โดยอาศัยเอนไซม์ nitrite reductase สำหรับพืชที่เลือกใช้อมโมเนียม (NH_4^+) จะไม่มีกระบวนการดังกล่าว แอมโมเนียมจะสามารถเข้าสู่กระบวนการสร้างกรดอะมิโนโดยเฉพาะ glutamine และ asparagines และสังเคราะห์เป็นโปรตีนต่อไป (ภาพ 2.6)

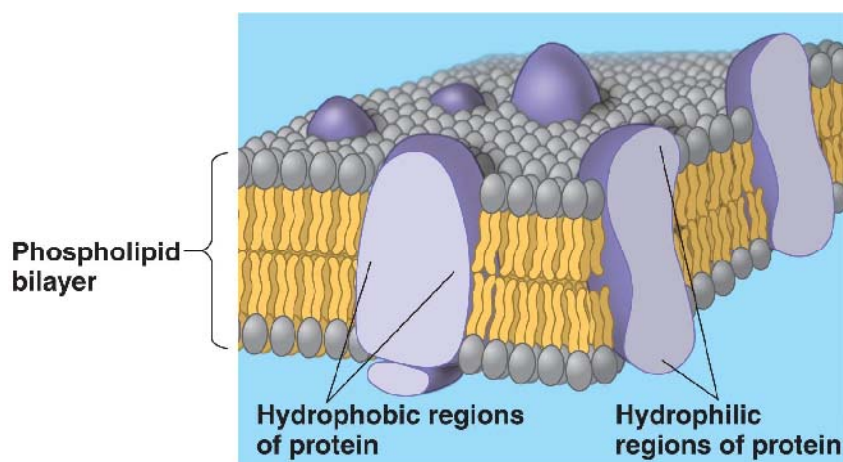


PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 12.19 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

ภาพ 2.6 ขั้นตอนการเปลี่ยนไนเตรต (NO_3^-) เป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) และการสังเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนที่พบภายในเซลล์พืช (ที่มา: Taiz and Zeiger, 2002)

ในการขนส่งไอออนทั้งสองชนิด (NH_4^+ , NO_3^-) เข้า-ออกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่า การขนส่ง NH_4^+ เข้าสู่เซลล์เป็นไปได้ง่ายกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ NO_3^- ทั้งนี้ เนื่องจากภายในเซลล์มีความต่างศักย์เป็นลบคือ ตั้งแต่ -50 ถึง -140 mV และอาจสูงถึง -200 mV ได้ (Hirsch, 1998; Palmgren, 2001; Szczerba, 2006) ดังนั้น ไอออนที่มีประจุบวกอย่างแอมโมเนียมจึงสามารถเคลื่อนย้ายเข้าไปได้อย่างไม่สูญเสียพลังงาน ตรงกันข้ามกับการขนส่งไนเตรตเข้าสู่เซลล์ ซึ่งต้องอาศัยพลังงาน ในการขนส่งไนโตรเจน รวมทั้งธาตุอาหารต่าง ๆ ที่อยู่ในรูปของไอออน จะมีกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

- 1. Passive transport** เป็นการขนส่งไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยไม่ต้องใช้พลังงาน โดยไอออนจะเคลื่อนย้ายจากด้านที่มี electropotential สูงไปยังต่ำ ซึ่งมี 2 วิธีคือ



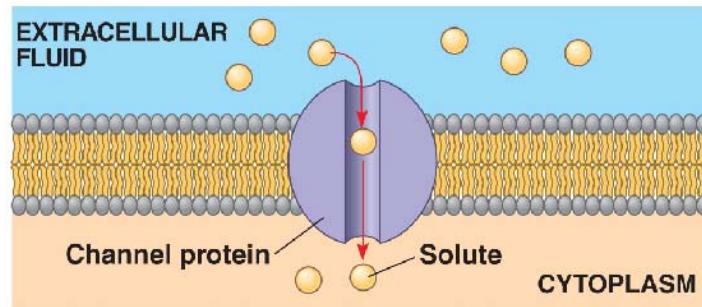
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc. publishing as Pearson Benjamin Cummings.

ภาพ 2.7 Lipid bilayer ที่เป็นโครงสร้างสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์

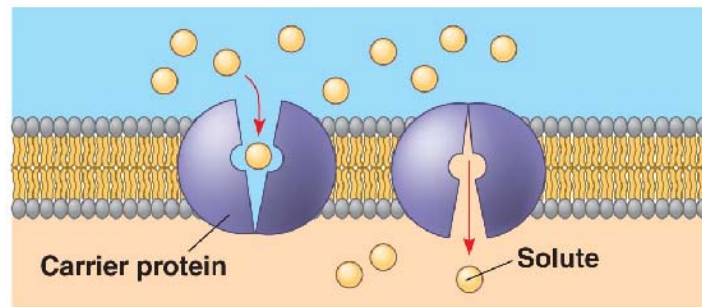
(ที่มา: Campbell et al., 2008)

1.1 Simple diffusion เป็นการแพร่ของตัวถูกละลายผ่าน lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะเคลื่อนจากบริเวณที่มี electropotential สูงไปยังต่ำ

1.2 Facilitated diffusion เป็นการแพร่ของไอออนผ่าน protein ที่แทรกอยู่ในชั้นของ lipid bilayer ซึ่งมีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ channel protein และ carrier protein



(a) A channel protein



(b) A carrier protein

Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings

ภาพ 2.8 โครงสร้างและการขนส่งไอออนโดย channel protein (a) และ carrier protein (b)

(ที่มา: Campbell et al., 2008)

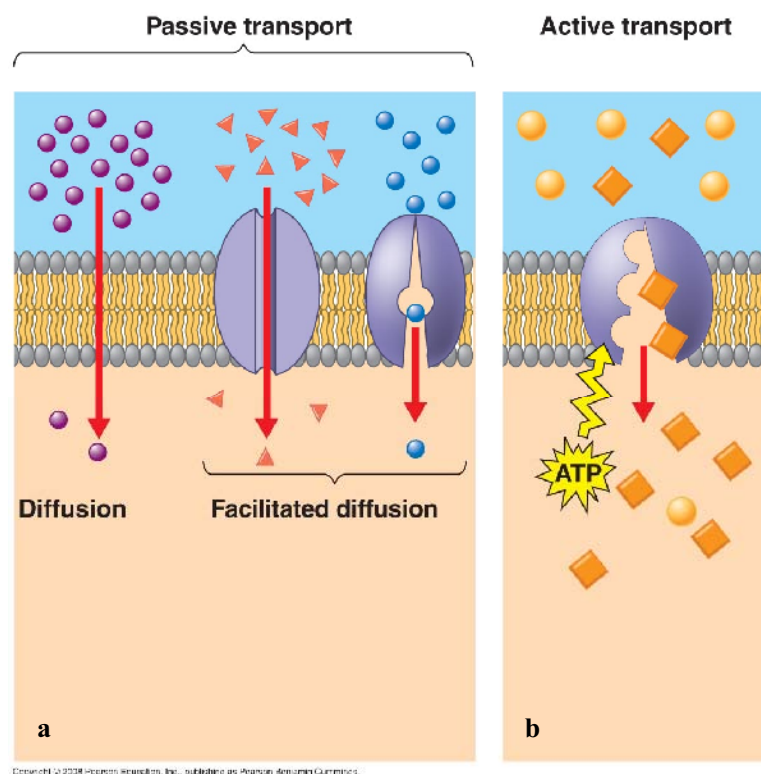
ปกติ protein ที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) จะทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการเข้า-ออกของไอออน, โมเลกุลที่ไม่มีประจุ (uncharged molecules) ส่วนน้ำสามารถผ่าน hydrophilic region protein ได้ protein ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเข้า-ออกของไอออนและสารต่างๆ เหล่านี้มี 3 ชนิดคือ

1. Channel protein เป็น protein ที่มีช่องว่างระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ทำหน้าที่นำไอออนหรือสารอินทรีย์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบ down electropotential gradient (ภาพ 2.8 a)

2. Carrier protein เป็น protein ที่ทำหน้าที่นำไอออนหรือตัวถูกละลายที่มีขนาดเล็กเข้าสู่เซลล์โดยการจับกับระหว่างไอออนที่ผิวด้านหนึ่งแล้วนำไปปล่อยยังที่ผิวด้านหนึ่ง (ภาพ 2.8 b)

3. ATPase เป็น carrier protein ที่จัดเป็นเอนไซม์ ทำหน้าที่กระตุ้น hydrolysis ATP แล้วได้พลังงานออกมา (176 kcal) พลังงานที่ปลดปล่อยออกมาจะถูกนำไปใช้เคลื่อนย้าย H^+ จากด้านหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ไปยังอีกด้านหนึ่ง โดย จะเคลื่อนที่จากด้านที่มี H^+ น้อยยังด้านที่มี H^+ มาก การเคลื่อนย้าย H^+ จะทำให้เกิดพลังงานที่สามารถนำไปใช้ในการขนส่งไอออนอื่น ๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบ against electropotential gradients (active transport)

2. Active transport เป็นการขนส่งไอออนผ่าน carrier protein ในเยื่อหุ้มเซลล์แบบใช้พลังงาน โดยไอออนจะเคลื่อนย้ายจากบริเวณที่มี electropotential ต่ำไปหาสูง (against electropotential) โดยอาศัยพลังงานมาที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม



ภาพ 2.9 การขนส่งไอออนแบบไม่ใช้พลังงาน (passive transport) (a) และแบบใช้พลังงาน (active transport) (b) (ที่มา: Campbell et al., 2008)

ในการพิจารณาว่าไอออนจะขนส่งแบบ passive หรือ active transport ให้พิจารณาจาก Nernst equation โดยจะขึ้นกับค่า electrochemical gradient ($\Delta\mu$)

$$\Delta\mu = \Delta(RT \ln C) + \Delta(ZF\Psi)$$

$$\Delta\Psi = \frac{2.3}{zF} \frac{RT}{\log \frac{C_i}{C_o}}$$

เมื่อ $\Delta\mu$ = total chemical-potential difference (electrochemical gradient) (จูล โมล⁻¹)
 $\Delta\Psi$ = electropotential charge difference (โวลท์)
 R = gas constant (8.314 จูล โมล⁻¹ เคลวิน⁻¹)
 T = absolute temperature (เคลวิน)
 Z = จำนวนประจุของไอออน
 F = Faraday's constant (96,400 จูล โวลท์⁻¹ โมล⁻¹)
 C_i = ความเข้มข้นของไอออนด้านในเยื่อหุ้มเซลล์
 C_o = ความเข้มข้นของไอออนด้านนอกเยื่อหุ้มเซลล์
 2.3 = ค่าคงที่สำหรับเปลี่ยน natural log (ln) เป็น log₁₀

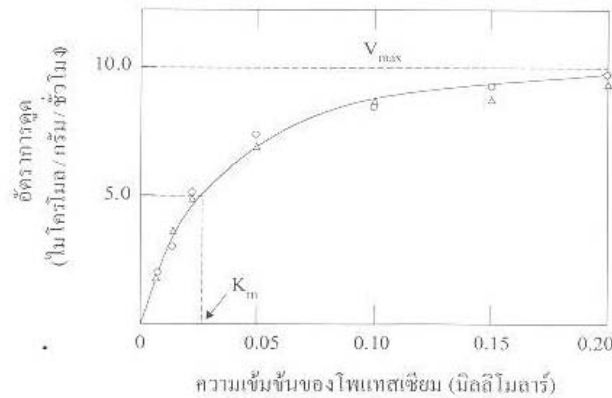
ถ้า $\Delta\mu < 0$ แสดงว่าไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยอิสระโดย passive transport

ถ้า $\Delta\mu > 0$ แสดงว่าต้องใช้พลังงานในการนำไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดย active transport

การที่พืชจะขนส่งไอออนโดยวิธีใดนั้นขึ้นกับ electropotential gradient ของไอออนนั้น ๆ นั่นคือ ค่า total chemical-potential difference ของไอออนทั้ง 2 ด้านของเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์มีไอออนมากกว่าด้านใน ไอออนจะเคลื่อนย้ายผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดย passive transport แต่ปกติความเข้มข้นของไอออนของธาตุอาหารต่าง ๆ ภายในดินจะน้อยกว่าในเซลล์พืช ดังนั้นการเคลื่อนย้ายไอออนเข้าสู่เซลล์พืชจึงต้องอาศัยพลังงาน โดยวิธี active transport

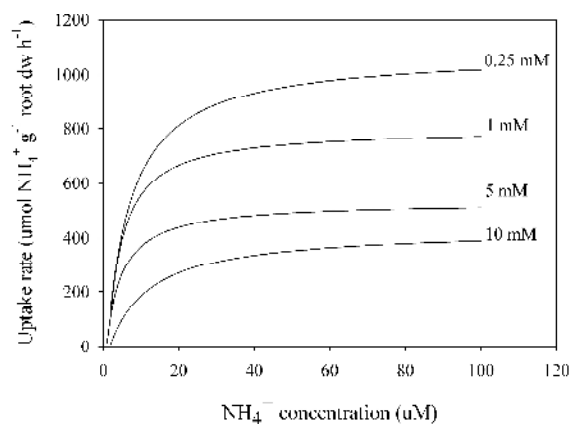
ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดไอออนไนโตรเจนอนินทรีย์และธาตุอาหารต่าง ๆ

การดูดไอออนของธาตุอาหารต่าง ๆ ของพืช จัดว่ามีความซับซ้อนพอสมควร แม้ในพืชชนิดเดียวกันเอง เมื่อได้รับปัจจัยที่แตกต่างกันก็ส่งผลให้พืชชนิดนั้นมีอัตราการดูดของไอออนที่ต่างกันออกไปด้วย การวัดค่าการดูดไอออนโดยส่วนใหญ่จะวัดอัตราการดูดไอออนนั้น (v) เทียบกับค่าความเข้มข้นของไอออนนั้นในสารละลายที่เพิ่มขึ้น (ภาพ 2.10)



ภาพ 2.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการดูดไอออนกับความเข้มข้นของสารละลายไอออนที่เพิ่มขึ้น (ที่มา: ปรับปรุงจาก Epstein *et al.* 1963)

จากภาพ 2.10 เป็นกราฟแสดงสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายภายนอกซึ่งอยู่ในช่วง 0.002-0.02 mM K^+ (เตรียมโดย KCl หรือ KSO_4) และอัตราการดูดโปแตสเซียมโดยรากบาร์เลย์ ในช่วงความเข้มข้นของสารละลายที่ต่ำ พืชจะมีอัตราการดูดที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อความเข้มข้นของสารละลายมากขึ้น อัตราการดูดของพืชจะช้าลงจนกระทั่งคงที่ อาจเรียกว่าถึงจุดอิ่มตัวและ protein carrier ทุกตัวรับภาระเต็มที่แล้ว ค่าอัตราการดูดที่จุดอิ่มตัวนี้ จะถือว่าเป็นค่าการดูดสูงสุด (V_{max}) ของพืชชนิดนี้ในสภาวะหนึ่ง ๆ เมื่อปัจจัยหรือสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนไป ค่า V_{max} อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ เช่น ในการศึกษาของ Jampeetong and Brix (2009b) พบว่า *Salvinia natans* ที่ถูกเลี้ยงด้วยแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้นต่างกัน (0.25, 1, 5 และ 10 mM) เป็นเวลา 2 อาทิตย์ สามารถส่งผลให้ *Salvinia natans* มีค่า V_{max} ต่างกัน เป็นต้น (ภาพ 2.11)



ภาพ 2.11 อัตราการดูดแอมโมเนียมของพืชที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.25, 1, 5 และ 10 mM)

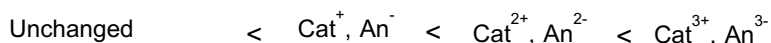
ส่วนค่า K_m หรือเรียกว่า ค่าคงตัวเพื่อความสะดวก ซึ่งเป็นค่าบ่งบอกความเข้มข้นของสารละลาย ณ จุดที่เกิดอัตราการดูดไอออนเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่า V_{max} ค่า k_m นี้จะมีประโยชน์ในแง่ที่ใช้บ่งบอกความสัมพันธ์หรือความเฉพาะเจาะจงของไอออนกับ carrier protein โดยถ้าค่า K_m ต่ำ แสดงว่าไอออนมีความสัมพันธ์กับ carrier protein สูง (high affinity) แต่ถ้าค่า K_m สูง แสดงว่าไอออนมีความสัมพันธ์กับ carrier protein ต่ำ (low affinity)

ค่าการดูดไอออนจะมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ พอสรุปได้ดังนี้ (Marschner, 1995)

1. ปัจจัยทางกายภาพ (physical factors) ได้แก่

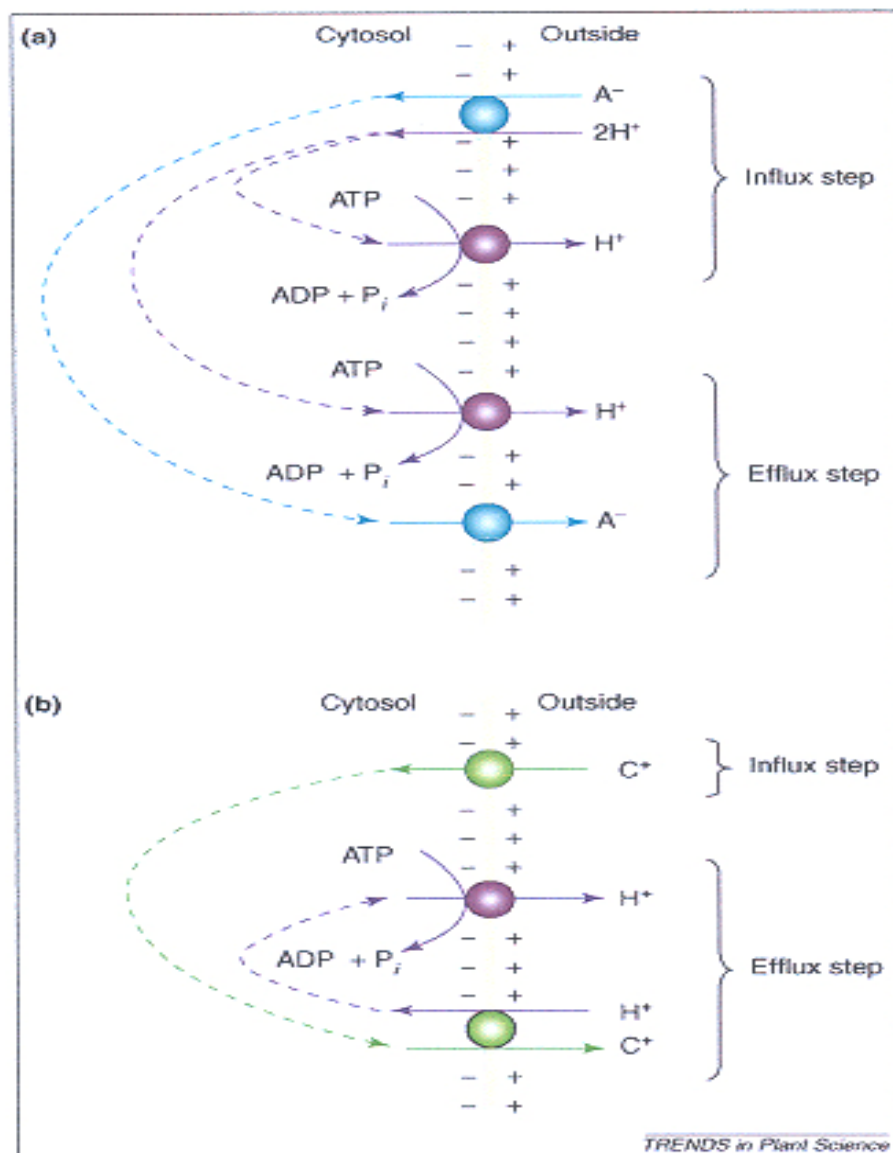
1.1 ปริมาณน้ำในดิน การนำเข้าของธาตุอาหารจะเข้าไปในรูปของไอออนที่ละลายอยู่ในน้ำ ถ้าปริมาณน้ำในดินน้อย ก็อาจส่งผลให้ปริมาณไอออนที่ละลายน้ำน้อยลงและเกิดการขนส่งไอออนสู่รากลดลงด้วย

1.2 ขนาดของไอออน ซึ่งมักจะสัมพันธ์กับค่าประจุ นั่นคือ กรณีที่เป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุ (uncharged molecules) เช่น สารละลายกลูโคสหรือซูโครส เป็นต้น จะมีขนาดเล็กกว่าไอออนที่มีประจุ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างไอออนที่มีประจุ ไอออนจะมีขนาดเพิ่มขึ้นตามค่าประจุที่เพิ่มขึ้น ดังนี้



1.3 การแข่งขันระหว่างไอออน มักเกิดขึ้นในกรณีที่ไอออนนั้นมีประจุที่เหมือนกันและไอออนทั้งสองชนิดมีความเฉพาะเจาะจงกับ carrier protein เดียวกันด้วยค่าที่เท่ากัน ไอออนคู่หนึ่งก็จะแก่งแย่งกันเพื่อเข้าครอบครอง carrier protein นั้น ๆ เช่น $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ หรือ NH_4^+/K^+ เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม ไอออนบางชนิดมีการเคลื่อนย้ายเยื่อหุ้มเซลล์ควบคู่ไปกับไอออนชนิดอื่น โดยส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในกรณีที่ไอออนมีประจุต่างขั้วกันแต่มีจำนวนประจุเท่ากันเช่น H^+/NO_3^- เรียกลักษณะการเคลื่อนที่ไอออนแบบนี้ว่า symport หรือ co-transport ในทางตรงกันข้ามประจุบางชนิดอาจจะเคลื่อนย้ายสวนทางกันซึ่งมักจะเกิดขึ้นในกรณีที่ประจุขั้วเดียวกันเช่น H^+/K^+ เรียกลักษณะการเคลื่อนที่ไอออนแบบนี้ว่า antiport หรือ counter transport (ภาพ 2.12)



ภาพ 2.12 โมเดลแสดงการเข้า-ออกของไอออนที่มีประจุลบ, A^- (a) และไอออนประจุบวก, C^+ (b) (ที่มา: Britto and Kronzucker, 2006)

1.4 ความเข้มข้นของไอออน ความเข้มข้นของไอออนทั้งด้านในและด้านนอกเซลล์นอกจากจะเป็นกำหนดว่าพืชจะมีการดูดไอออนแบบ passive หรือ active transport แล้ว ความเข้มข้นของไอออนในสารละลายในดินยังมีผลต่อความเฉพาะเจาะจงของไอออนกับ carrier protein อีกด้วย นั่นคือ โดยปกติที่ความเข้มข้นของไอออนต่ำกว่า 1 mM พืชจะมีการขนย้ายไอออนด้วยระบบที่เรียกว่า high affinity transport system (HATS) ซึ่งเป็นการขนส่งไอออนแบบที่ไอออนมีความสัมพันธ์กับ carrier protein สูง ซึ่งค่า V_{max} ที่วัดได้เทียบกับค่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะแสดงออกด้วยกราฟ saturated curve ส่วนความเข้มข้นของไอออนที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 mM ขึ้นไปส่วนใหญ่การขนส่งไอออนจะใช้ระบบที่เรียกว่า low affinity transport system (LATS) ซึ่งไอออนจะมีความเฉพาะเจาะจงกับ carrier protein ต่ำ

1.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) การแตกตัวของ H^+ ในสภาวะกรดหรือ OH^- ในสภาวะด่างล้วนมีผลต่อการดูดไอออนเข้าสู่เซลล์พืช โดยเกิดการแก่งแย่งแข่งขันกันระหว่าง H^+ กับไอออนที่มีประจุ +1 เช่นกันเช่น H^+/K^+ หรือ H^+/NH_4^+ ส่วนในกรณีที่เป็นด่าง OH^- จะแก่งแย่งแข่งขันกันกับไอออนที่มีประจุ -1 เช่น OH^-/NO_3^- เป็นต้น

1.6 ปัจจัยอื่น ๆ เช่น แสง อุณหภูมิ ออกซิเจน เป็นต้น ซึ่งมีผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหายใจของพืช ในการดูดไอออนของพืชส่วนใหญ่จะอาศัยพลังงาน (active transport) ซึ่งมาจากกระบวนการหายใจ ดังนั้น ถ้ามีปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ก็ย่อมส่งผลทางอ้อมต่อการผลิตพลังงาน เนื่องจากสารตั้งต้นของกระบวนการหายใจนั้นมาจากการสังเคราะห์เป็นหลัก ส่วนอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ และออกซิเจนมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยเหล่านี้ย่อมส่งผลต่อการดูดไอออนของพืช

2. ปัจจัยทางสรีรวิทยาของพืช (physiological factors) เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวพืชเอง ยกตัวอย่างเช่นอายุพืช เมื่อพืชเริ่มออกจากเมล็ด อัตราการดูดไอออนของธาตุอาหารจะเพิ่มขึ้นตามอายุจนมาถึงระยะหนึ่งเริ่มคงที่และอาจลดลงในพืชที่แก่มาก หรือความต้องการธาตุของต้นพืช (shoot demand) จะสัมพันธ์กับสถานะของธาตุอาหารที่ถูกเก็บสะสมภายในพืช เป็นต้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของพืชน้ำที่ผ่านมา พบว่าพืชน้ำมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และมีความต้องการธาตุอาหารในปริมาณที่แตกต่างกันด้วย ในกลุ่มพืชลอยน้ำ (free-floating plants) เช่น จอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) แหนเป็ดเล็ก (*Lemna perpusilla*) เป็นต้น พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงและสามารถดูดธาตุอาหารในแหล่งน้ำไปใช้ในอัตราที่สูงเช่นกัน (Cedergreen and Madsen, 2002; Jampeetong and Brix 2009a) ในขณะที่พืชใต้น้ำ (emergent plants) นั้นมีอัตราการเจริญเติบโตและการใช้ธาตุอาหารที่ต่ำกว่า (Brix and Schierup, 1989; Tylova-Munzarova *et al.*, 2005) จากลักษณะการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้ธาตุอาหารที่พบในแหล่งน้ำของพืชแต่ละกลุ่มที่ต่างกันนี้ ทำให้พืชเหล่านี้ถูกนำมาปลูก เพื่อใช้ลดปริมาณสารอาหารที่มีปริมาณมากเกินไปในแหล่งน้ำโดยเฉพาะน้ำเสียจากครัวเรือนหรือชุมชน รวมทั้งน้ำเสียที่ถูกปล่อยออกมาจากพื้นที่เกษตรกรรมต่าง ๆ เช่น ฟาร์มเลี้ยงหมูหรือบ่อเลี้ยงปลาซึ่งมีการปนเปื้อนสูงของแอมโมเนียม (จงจิตต์และพงษ์ศิริ, 2545; ชูลีพร, 2549) จัดได้ว่าเป็นการพัฒนาคุณภาพของน้ำโดยชีววิธีและยังช่วยลดค่าใช้จ่ายลงอย่างมาก

การนำพืชน้ำมาใช้บำบัดน้ำเสีย ปัจจุบันเป็นที่แพร่หลายในประเทศแถบทวีปยุโรปและอเมริกา โดยเฉพาะพืชลอยน้ำ (free-floating plants) ได้ถูกนำมาใช้ในระบบบึงประดิษฐ์ (constructed wetlands) เนื่องด้วยมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและสามารถลดปริมาณไนโตรเจนในโตรเจน ตลอดจนสารโลหะหนักที่ปนเปื้อนมาจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมเช่น *Lemna* และ *Azolla* (Vermaat and Hanif, 1998; Nahlik and Mitsch, 2006), ผักตบชวา (*Eichornia crassipes*) (Brix and Schierup, 1989; Costa *et al.*, 2000; Maine, 2006) และจอก (*Pistia atratiotes*) (Aoi and Hayashi, 1996; Nahlik and Mitsch, 2006) นอกจากนี้พืชใต้น้ำ (emergent plants) นอกจากจะถูกนำมาศึกษาการเจริญเติบโตและการดูดสารอาหาร ยังมีการศึกษาถึงการปล่อยก๊าซออกซิเจนสู่แหล่งน้ำและระดับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายในที่พืชปรับตัวในภาวะที่ขาดออกซิเจนที่อาจพบในน้ำเสียได้ ซึ่งปัจจัยและการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถส่งผลถึงการอยู่รอดของพืชและการใช้ในโตรเจนได้ (Armstrong, 1991; Brix, 1997) และเนื่องจากความสามารถในการทนแล้งและความหนาแน่นได้ดีกว่าพืชลอยน้ำ (free-floating plants) ดังนั้นพืชใต้น้ำจึงเป็นที่สนใจและถูกนำมาใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียกันมากในประเทศในแถบยุโรปเหนือและอเมริกา (Cronk and Fennessy, 2001)

ประเทศไทยจัดได้ว่ามีความหลากหลายของพืชน้ำสูง อีกทั้งพืชน้ำแต่ละชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงและสามารถกระจายตัวอย่างกว้างขวาง พืชน้ำทั้งหลายนั้นมีทั้งที่ยังไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์ และบางชนิดก็จัดเป็นพืชเศรษฐกิจ เช่น กระเจ็ด หญ้าแฝก หรือแม้แต่พืชประดับในตู้ปลาต่าง ๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการใช้ไม้ประดับตู้ปลาเช่น ดาวกระจาย (*Synnema triflorum*) มาใช้ควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงปลาซึ่งมีของเสียที่เป็นแอมโมเนียที่สูง

(ซูลีพร, 2549) หรือการใช้บัวสาหร่าย (*Cabomba caroliniana*) ซึ่งสามารถพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติมาใช้บำบัดน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาดุกเพียน (ชนาธิป และ อัครวิทย์, 2547) พบว่า พืชเหล่านี้สามารถพัฒนาคุณภาพของน้ำได้ดี อย่างไรก็ตามการใช้พืชบำบัดน้ำเสียในปัจจุบันยังไม่เป็นที่แพร่หลายกันมากนักและยังคงขาดแคลนข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับชนิดของไม้น้ำที่มีความสามารถในการพัฒนาคุณภาพน้ำเสียให้เป็นน้ำดีได้อยู่อีกมาก โดยเฉพาะการศึกษาชีววิทยาของพืชน้ำไม่ว่าจะเป็นลักษณะนิสัยการเจริญเติบโต ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ช่วงความทนต่อปัจจัยต่าง ๆ ตลอดจนการตอบสนองหรือการแสดงอาการต่อปัจจัยที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโต ในการศึกษาครั้งนี้ นักวิจัยได้เลือกศึกษาในหย้าคาและเดือย ซึ่งเป็นพืชที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้หลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากประเทศไทยซึ่งจัดอยู่ในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น การบำบัดน้ำด้วยพืชยังมีข้อเสีย นั่นคือหลังจากที่พืชตายไป การเน่าเปื่อยของเนื้อเยื่อพืชโดย กระบวนการย่อยสลาย จะส่งผลให้เกิดการย้อนกลับของสารอาหารเหล่านั้นลงสู่ระบบบำบัดน้ำอีก ดังนั้น การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวโดยการนำพืชไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงเมื่อมีการนำไม้น้ำมาใช้ ซึ่งนอกจากจะเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าวแล้ว ยังเป็นการใช้พืชให้เกิดประโยชน์สูงสุดอีกด้วย

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 ผลของรูปแบบไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโต อัตราการดูดซับไนโตรเจน และปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) กกกรังกา (*Cyperus involucratus*) และ แฝก (*Vetiveria zizanioides*)

เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบการเจริญเติบโต รวมทั้งอัตราการดูดซับไนโตรเจนและปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อของพืชทั้ง 4 ชนิด เมื่อได้รับไนโตรเจนอินทรีย์รูปแบบต่างกัน เพื่อคัดเลือกพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งที่มีแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก

1.1 การเตรียมพืชทดลอง

รวบรวมต้นของกกกรังกาและแฝก โดยพืชแต่ละชนิดต้องมาจากแหล่งธรรมชาติเดียวกัน คัดเลือกต้นอ่อนที่สมบูรณ์ของพืชแต่ละชนิดที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ก่อนเริ่มทำการทดลอง นำต้นพืชแต่ละชนิด ๑ ละ 30 ต้นไปแช่น้ำหนักสด และวัดความสูง บันทึกข้อมูล แยกพืชชนิดละ 10 ต้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 ° C จนแห้งสนิท ชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วนำไปคำนวณหาค่า dw / fw ratio ส่วนพืชที่เหลือนำไปทำการทดลองโดยปลูกในสารละลายเลี้ยงพืช

1.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของพืช

พืชที่คัดเลือกแล้วแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ๑ ละ 10 ต้น นำไปปลูกภายในเรือนเพาะชำ โดยปลูกลงในสารละลายเลี้ยงพืชที่ดัดแปลงสูตรจาก Smart & Barko (1985) โดยจัดให้สารละลายดังกล่าวมีรูปแบบ

ไนโตรเจนอินทรีย์ที่แตกต่างกันคือ แอมโมเนียม (NH_4^+) ไนเตรต (NO_3^-) และ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน (500 μM) ปรับ pH เป็น 6.7-7.0 ด้วย HCl หรือ NaOH ทำการเปลี่ยนสารละลายเลี้ยงพืชทุก ๑ 3 วัน ตลอดระยะเวลาที่ปลูก

หลังจากปลูกพืชเป็นเวลา 45 วัน นำพืชมาวัดความสูง และจดบันทึกลักษณะทางสัณฐานบางประการเช่น ความยาวราก ขนาดใบ จำนวนหน่อที่แตกใหม่ เป็นต้น จากนั้นล้างรากพืชให้สะอาดด้วยน้ำกรอง ชั่งน้ำให้แห้งด้วยกระดาษชั่งแล้วแยกส่วนลำต้นและรากออกจากกัน ก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -50 องศา ก่อนนำไปทำเป็นตัวอย่างแห้งด้วยเครื่อง freeze drier (รุ่น Alpha 1-4 LD plus) เมื่อตัวอย่างแห้งสนิทแล้ว นำมาวัดน้ำหนักแห้ง จากน้ำหนักสดเริ่มต้นที่วัดได้ นำมาแปลค่าเป็นน้ำหนักแห้ง โดยเทียบกับค่า dw / fw ratio จากนั้นนำค่าน้ำหนักแห้งของพืชก่อนและหลังทำการทดลองมาคำนวณหาค่า Relative Growth Rate (RGR , $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$) โดยสูตร

$$\text{RGR} = (\ln W_2 - \ln W_1) / t_2 - t_1$$

เมื่อ W_1 , W_2 คือค่าน้ำหนักแห้งของพืชก่อนและหลังการทดลอง และ

t_1 , t_2 คือเวลาที่เริ่มต้นและเสร็จสิ้นการทดลอง (วัน)

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ (chlorophyll)

หลังจากได้ตัวอย่างแห้งโดยวิธี freeze dry แล้ว ใบพืชของแต่ละ treatment จะถูกนำมาวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) คลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll b) และ total chlorophyll a+b โดยใช้วิธีของ Lichtenthaler (1987) โดยการนำใบพืชมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำตัวอย่างประมาณ 8-10 mg ใส่ในหลอดทดลอง แล้วสกัด pigment ด้วย 96 % ethanol ปริมาตร 8 ml แช่ไว้ที่อุณหภูมิห้องและเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลาย pigment ที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-VIS spectrophotometer (ยี่ห้อ Lambda 25 รุ่น Lambda 25 1.23, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 648.6 และ 664.2 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) คลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll b) และ total chlorophyll a+b โดยใช้สูตร

$$\text{Chlorophyll } a = (13.36A_{664.2} - 5.19A_{648.6}) \times 8 / DW \quad \text{มีหน่วยเป็น } \text{mg g}^{-1} \text{ dw}$$

$$\text{Chlorophyll } b = (27.43A_{648.6} - 8.12A_{664.2}) \times 8 / DW \quad \text{มีหน่วยเป็น } \text{mg g}^{-1} \text{ dw}$$

$$\text{Chlorophyll } a+b = (5.24 A_{664.2} + 22.24 A_{648.6}) \times 8 / DW \quad \text{มีหน่วยเป็น } \text{mg g}^{-1} \text{ dw}$$

เมื่อ $A_{648.6}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 648.6 nm

$A_{664.2}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 664.2 nm

DW = น้ำหนักแห้งของใบพืชที่นำมาสกัด pigment (mg)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อพืช

จากตัวอย่างแห้งของพืชทั้งส่วนลำต้น ใบและราก นำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Ca, Mg, K, P และ total N โดยนำตัวอย่างแห้งจำนวน 80-100 mg มาบดให้ละเอียด นำไปย่อยด้วยกรดผสม (ระหว่าง conc. H_2SO_4 1 ลิตร และ K_2SO_4 100 กรัม และ selenium 1 กรัม) จำนวน 7 ml ในเตาย่อยที่อุณหภูมิ 100-330°C ต้มตัวอย่างจนกระทั่งจนเป็นสารละลายใส ทั้งสารละลายใสให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรโดยถ่ายใส่ volumetric flask 100 ml นำสารละลายใสที่ย่อยได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารดังต่อไปนี้

1.4.1 Total N โดยดูดสารละลายใสที่ย่อยได้จำนวน 25 ml ใส่ลงในหลอดกลั่นไนโตรเจน แล้วเติม NaOH 40% จำนวน 20 ml ตวง boric acid-indicator solution (2% H_3BO_3) จำนวน 15 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 ml เพื่อรองรับสารที่กลั่นได้ ทำการกลั่นจนได้สารละลายมีปริมาตรประมาณ 100 ml จากนั้นนำสารละลายที่กลั่นได้มาไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน sulfuric acid 0.05 N จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวใสเป็นสีม่วงแดง บันทึกปริมาตรของสารละลาย

มาตรฐาน sulfuric acid ที่ใช้ในการไตเตรตและนำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\text{Total N (\%)} = \frac{(\text{Vs}-\text{Vb}) \times \text{N} \times 14 \times \text{Va} \times 100}{1000 \times \text{Vd} \times \text{w}}$$

เมื่อ Vs = ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง

Vb = ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรตblank

Vd = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

Va = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อย

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์

- 1.4.2 ฟอสฟอรัส (P) โดยดูดสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างพืชจำนวน 5 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่จำนวน 25 ml เติมนixed reagent 5 ml (ammonium vanadate 1.25 g ในน้ำกลั่นอุ่น 200 ml เติมน HNO_3 ลงไป 158.42 ml เขย่าให้เข้ากัน + ammonium molybdate tetrahydrate 25 g ในน้ำอุ่น 300 ml) จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 25 ml ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 20 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยspectrophotometer (HITACHI, Model U-1100Part No. 118-0102, Japan) ที่ความยาวคลื่นแสง 470 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสจากสูตร

$$\text{Total P (\%)} = \frac{\text{C} \times \text{Vf} \times \text{Vd} \times 100}{\text{Va} \times \text{W} \times 10^6}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้น Pในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve -P

(ppm)

Vf = ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์

Vd = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อย

Va = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์

- 1.4.3 โพแทสเซียม (K) โดยดูดสารละลายที่ย่อยได้จำนวน 1 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่จำนวน 25 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 25 ml ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง Atomic Absorption Spectrometer (PER KIN ELMER

Model 3100, Germany) ที่ความยาวคลื่นแสง 766.5 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณโปแตสเซียมจากสูตร

$$\text{Total K (\%)} = \frac{C \times V_f \times V_d \times 100}{V_a \times W \times 10^6}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้น K ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve -K

(ppm)

V_f = ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์

V_d = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อย

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์

- 1.4.4 แคลเซียม (Ca) โดยดูดสารละลายที่ย่อยได้จำนวน 1 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 25 ml ด้วย Lanthanum chloride 0.2 % เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย Atomic Absorption Spectrometer (PER KIN ELMER Model 3100, Germany) ที่ความยาวคลื่นแสง 422.7 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณแคลเซียมจากสูตร

$$\text{Total Ca(\%)} = \frac{C \times V_f \times V_d \times 100}{V_a \times W \times 10^6}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้น P ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve -K

(ppm)

V_f = ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์

V_d = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อย

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์

- 1.4.5 แมกนีเซียม (Mg) โดยดูดสารละลายที่ย่อยได้จำนวน 1 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 25 ml ด้วย lanthanum chloride 0.2 % เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านค่าด้วย Atomic Absorption Spectrometer (PER KIN ELMER Model 3100, Germany) ที่ความยาวคลื่นแสง 285.2 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณแมกนีเซียมจากสูตร

$$\text{Total Ca (\%)} = \frac{C \times V_f \times V_d \times 100}{V_a \times W \times 10^6}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้น P ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve -Mg
(ppm)

V_f = ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์

V_d = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อย

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์

หมายเหตุ ปริมาณธาตุอาหารที่คำนวณได้จากสูตรข้างต้น มีหน่วยเป็น % แต่ในรายงานผลการวิจัยได้มีการแปลงหน่วยให้เป็น $\text{mg g}^{-1} \text{ dw}$

1.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองทั้งหมดที่ได้ นำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี oneway analysis of variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม Statgraphics Plus ver. 4.1 (manugistics, Inc., MD, USA.)

การทดลองที่ 2 ผลของระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมต่อการเจริญเติบโตของพืช การดูดซับแอมโมเนียมและปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อพืช

เป็นการศึกษาเพื่อหาระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่พืชยังเจริญเติบโตได้ดี แม้ว่าพืชจะได้รับในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าในระดับที่พบในธรรมชาติ และดูผลของระดับความเข้มข้นที่สูงของแอมโมเนียมต่อการดูดซับแอมโมเนียมโดยรากพืช และปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อพืช

2.1 การเตรียมพืชทดลอง

จากการทดลองที่ 1 ทำให้ทราบชนิดพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อได้รับแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก ซึ่งในที่นี้คือ จอกหูหนู และ ผักบุ้ง นำพืชชนิดดังกล่าวที่มีขนาดใกล้เคียงกัน มาชั่งน้ำหนักสดและวัดความสูง บันทึกข้อมูล นำพืชจำนวน 10 ต้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C จนแห้งสนิท ชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วนำไปคำนวณหาค่า dw / fw ratio ส่วนพืชที่เหลือนำไปทำการทดลองโดยปลูกในสารละลายเลี้ยงพืช

2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของพืช

นำพืชแต่ละชนิดไปปลูกภายในเรือนเพาะชำ โดยปลูกลงในสารละลายเลี้ยงพืชที่ดัดแปลงสูตรจาก Smart & Barko (1985) โดยจัดให้สารละลายดังกล่าวมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่ต่างกัน คือ 0.5, 1, 5, 10 และ 15 mM โดยทำการปลูกและบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.3 การวัดอัตราการดูดแอมโมเนียม (NH_4^+ uptake rate)

หลังจากปลูกพืชเป็นเวลา 45 วัน พืชในแต่ละกลุ่มการทดลอง (treatment) จำนวนกลุ่มละ 5 ต้น นำมาทดลองหาค่าอัตราการดูดแอมโมเนียม ก่อนการทดลองนำพืชไปแช่ในสารละลายเลี้ยงพืชที่ปราศจากแอมโมเนียม เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำพืชที่เตรียมไว้ย้ายมาใส่ในภาชนะแก้วที่มีสารละลายเลี้ยงพืชและแอมโมเนียม ความเข้มข้น $500\ \mu\text{M}$ ปริมาตร 500 ml ทุก 1 ชั่วโมง ตวงตัวอย่างน้ำจำนวน 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง ทำการ dilute โดยการเติมน้ำกลั่นลงไป 4 ml เติม salicylate / citrate reagent และ sodium dichoroisocyanurate reagent จำนวนอย่างละ 0.5 ml นำไปปั่นด้วย vortex เพื่อให้สารละลายข้างต้นทำปฏิกิริยากับน้ำตัวอย่างอย่างทั่วถึง นำสารละลายตั้งทิ้งไว้ $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ภายใต้สภาวะปราศจากแสงจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรือน้ำเงิน จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-VIS spectrophotometer (ยี่ห้อ Lambda 25 รุ่น Lambda 25 1.23, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 690 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณแอมโมเนียม โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เมื่อได้ปริมาณแอมโมเนียมในน้ำตัวอย่างที่ตวงมาทุกชั่วโมงแล้ว นำมาสร้างกราฟแสดงการลดลงของปริมาณแอมโมเนียมในแต่ละชั่วโมง (depletion curve) จากกราฟที่ได้นำมาเข้าสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า slope สูงสุด จากนั้นนำค่า slope, ปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการทดลอง, น้ำหนักแห้งของรากมา

คำนวณหาค่าอัตราการดูดแอมโมเนียมโดยเทียบกับเวลาเป็น 1 ชั่วโมง ค่าอัตราการดูดแอมโมเนียมมีหน่วยเป็น $\mu\text{mol h}^{-1} \text{ g root dw}^{-1}$

2.4 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ (chlorophyll)

หลังจากได้ตัวอย่างแห้งโดยวิธี freeze dry แล้ว ใบพืชของแต่ละ treatment จะถูกนำมาวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) คลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll b) และ total chlorophyll a+b โดยใช้วิธีของ Lichtenthaler (1987) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.5 การหาปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อพืช

จากตัวอย่างแห้งของพืชทั้งส่วนลำต้นและราก นำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Ca, Mg, K, P และ total N เช่นเดียวกับที่กล่าวในการทดลองที่ 1

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองทั้งหมดที่ได้ นำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี oneway analysis of variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม Statgraphics Plus ver. 4.1 (manugistics, Inc., MD, USA.)

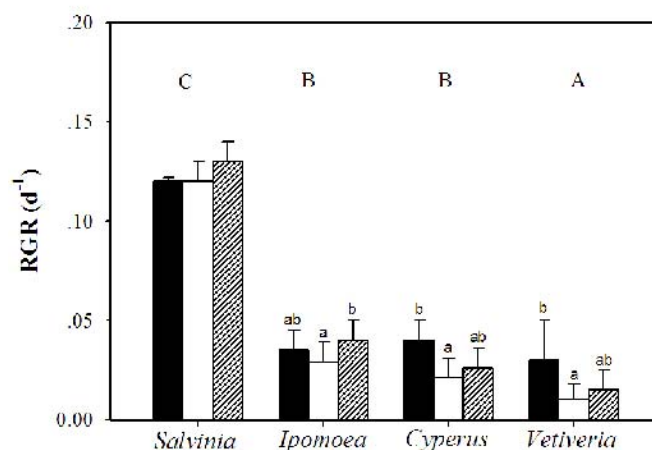
บทที่ 4

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 ผลของรูปแบบไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโต อัตราการดูดซับไนโตรเจน และปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) กกธัญ (*Cyperus involucratus*) และ แผลก (*Vetiveria zizanioides*)

1.1 ผลต่อการเจริญเติบโต

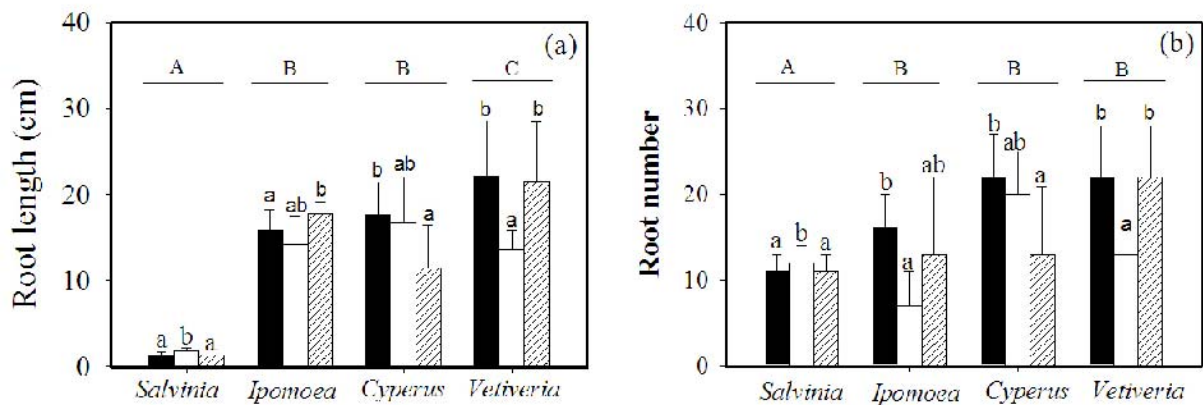
จากการปลูกพืชทั้ง 4 ชนิดในสารละลายเลี้ยงพืชที่มีรูปแบบไนโตรเจนอินทรีย์ที่แตกต่างกัน (NH_4^+ , NO_3^- , NH_4NO_3) แต่ปริมาณความเข้มข้นที่เท่ากัน ($500\mu\text{M}$) โดยปลูกจอกหูหนูและผักบุ้งเป็นเวลา 30 วันและปลูกกกธัญและแผลก เป็นเวลา 45 วัน พบว่า ทั้งรูปแบบของไนโตรเจนอินทรีย์และชนิดพืชมีผลให้อัตราการเติบโต (Relative Growth Rate, RGR) มีความแตกต่างกัน (ภาพ 4.1, ตาราง 4.1) อัตราการเติบโต (RGR) โดยเฉลี่ยพบค่ามากที่สุดในการจอกหูหนู ($0.12 \pm 0.003 \text{ d}^{-1}$) ซึ่งมีค่ามากกว่าผักบุ้ง, กกธัญ และแผลก เท่ากับ 4, 4 และ 7 เท่า ตามลำดับ โดยพืชทั้ง 4 ชนิดตอบสนองดีต่อแอมโมเนียม (NH_4^+) และแอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) ในกกธัญและแผลกพบว่า เมื่อได้รับแอมโมเนียมเป็นหลัก จะมีอัตราการเติบโต เพิ่มขึ้น (ภาพ 4.1) โดยในกกธัญมีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นคิดเป็น 43 % เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยไนเตรด (NO_3^-) ส่วนแผลกมีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้น 82% เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมเป็นหลัก



ภาพ 4.1 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ หรือ RGR (d^{-1}) (mean $\pm$ SE) ของ จอกหูหนู (*Salvinia cucullata*), ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*), กกธัญ (*Cyperus involucratus*) และแผลก (*Vetiveria zizanioides*) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอินทรีย์รูปแบบต่างกัน (■ NH_4^+ , □ NO_3^- , ▨ NH_4NO_3) ตัวอักษร a, b แสดงความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ในพืชชนิดเดียวกัน ส่วนตัวอักษร A, B, C แสดงความแตกต่างโดยรวมระหว่างชนิดพืชโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.2 ผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยา

ทั้งความยาวรากและจำนวนรากมีความแตกต่างกัน โดยเป็นผลมาจากชนิดพืชและรูปแบบไนโตรเจนอินทรีย์ที่พืชได้รับ (ตารางที่ 4.1, ภาพ 4.2 a, b) แฝกเป็นพืชที่มีความยาวของรากมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ กกรงกา, ผักบุ้ง และจอกหูหนู ตามลำดับ (ภาพ 4.2 a) การเพิ่มจำนวนหน่อใหม่ของพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยที่รูปแบบไนโตรเจนไม่ได้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของหน่อดังกล่าว พืชทั้ง 4 ชนิดนี้ พบว่า ผักบุ้ง และ กกรงกา เป็นพืชที่มีการเพิ่มจำนวนหน่อใหม่ได้เร็วกว่าแฝก



ภาพ 4.2 ความยาวราก (a) และ จำนวนราก (b) (mean $\pm$ SE) ของ จอกหูหนู (*Salvinia cucullata*), ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*), กกรงกา (*Cyperus involucratus*) และแฝก (*Vetiveria zizanioides*) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอินทรีย์รูปแบบต่างกัน (■ NH_4^+ , □ NO_3^- , ▨ NH_4NO_3) ตัวอักษร a, b แสดงความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ในพืชชนิดเดียวกัน ส่วนตัวอักษร A, B, C แสดงความแตกต่างโดยรวมระหว่างชนิดพืชโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ

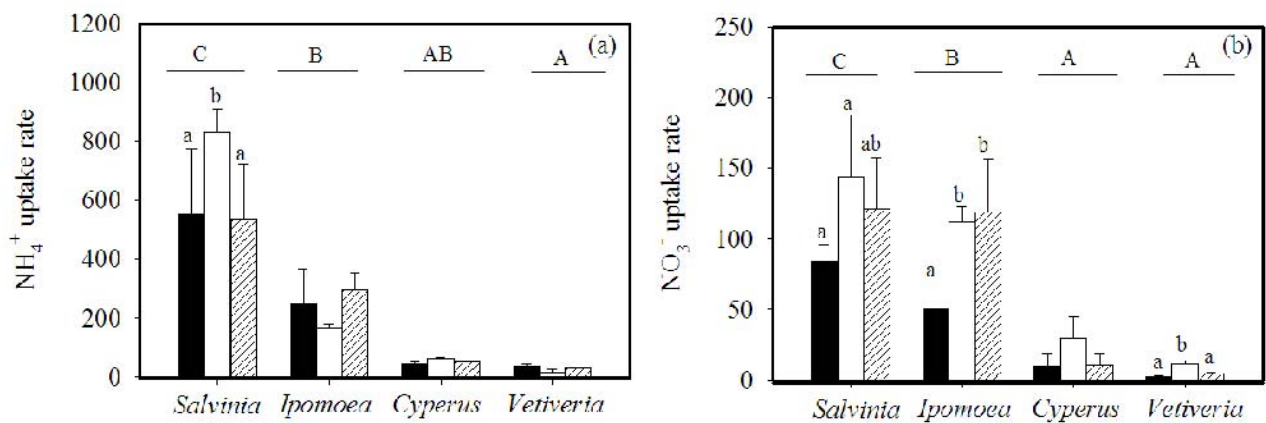
ตาราง 4.1 แสดงผล two-way ANOVA (F-ratios) ของอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ ลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการ ปริมาณคลอโรฟิลล์ อัตราการดูดซับแอมโมเนียมและไนเตรต และปริมาณธาตุอาหารไนโบและรากของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*), ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*), กกธัญญา (Cyperus involucreatus) และ แฝก (*Vetiveria zizanioides*) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอินทรีย์รูปแบบต่างกัน

	Main effect		Interaction
	Plant species	N-source	Plant species x N-source
RGR (d^{-1})	311.8 ***	0.85	1.42
Root number	14.4 ***	3.22*	2.42*
Root length (cm)	68.0 ***	2.5	3.25**
New shoots	80.6***	0.5	1.45
NH ₄ ⁺ uptake rate ($\mu\text{mol h}^{-1}$ root DW ⁻¹)	114.0 ***	2.89*	3.17*
NO ₃ ⁻ uptake rate ($\mu\text{mol h}^{-1}$ root DW ⁻¹)	55.8***	8.92***	2.43*
Chl <i>a</i> (mg g ⁻¹ DW)	27.3 ***	3.10	5.61 *
Chl <i>b</i> (mg g ⁻¹ DW)	47.2 ***	3.86*	4.04 *
Total Chl <i>a+b</i> (mg g ⁻¹ DW)	34.4 ***	3.43*	5.09***
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i> ratio	2.53	0.74	5.30***
Total N (mg g ⁻¹ DW)			
leaves	30.2 ***	0.51	0.62
roots	49.3 ***	1.81	0.36
P (mg g ⁻¹ DW)			
leaves	207.8 ***	1.05	2.66*
roots	33.8 ***	1.42	1.61
K (mg g ⁻¹ DW)			
leaves	22.4 ***	0.38	0.83
roots	173.8 ***	6.63**	4.70 **
Ca (mg g ⁻¹ DW)			
leaves	78.4 ***	1.09	4.05 **
roots	38.0 ***	0.35	1.64
Mg (mg g ⁻¹ dw)			
leaves	117.8 ***	2.80*	11.57 ***
roots	16.1 ***	1.63	0.49

*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, p < 0.001

1.3 ผลต่อการดูดซับไนโตรเจน (N uptake)

อัตราการดูดซับไนโตรเจนมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดพืช และรูปแบบไนโตรเจนมีผลต่อการดูดซับไนโตรเจนดังกล่าวด้วย โดยทั่วไปพบว่า พืชมีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมที่สูงกว่าไนเตรต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 4.3 a, b) ในพืช 4 ชนิดนี้ จอกหูหนูเป็นพืชที่มีอัตราการดูดซับไนโตรเจนทั้งแอมโมเนียมและไนเตรตที่สูงกว่าพืชชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมา ได้แก่ ผักบุ้ง กวักงา และแฝก ตามลำดับ (ภาพ 4.3 a, b) สำหรับการดูดซับแอมโมเนียม พบว่า ในจอกหูหนูที่ปลูกด้วยไนเตรตจะมีค่าอัตราการดูดซับแอมโมเนียมสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมหรือแอมโมเนียมไนเตรต สำหรับการดูดซับไนเตรตนั้น พบว่าทั้งชนิดพืชและรูปแบบไนโตรเจนล้วนมีผลต่ออัตราการดูดซับไนเตรต (ตาราง 4.1) พืชทั้ง 4 ชนิดจะมีอัตราการดูดซับไนเตรตที่สูงเมื่อปลูกพืชดังกล่าวในสารละลายอาหารที่มีไนเตรตเป็นไนโตรเจนหลัก ในขณะที่พืชที่ได้รับแอมโมเนียมเป็นไนโตรเจนหลักจะมีอัตราการดูดซับไนเตรตที่ต่ำมาก



ภาพ 4.3 อัตราการดูดซับแอมโมเนียม ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) และไนเตรต ($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*), ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*), กวักงา (*Cyperus involucreatus*) และแฝก (*Vetiveria zizanioides*) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอนินทรีย์รูปแบบต่างๆ ($\square \text{NH}_4^+$, $\square \text{NO}_3^-$, $\square \text{NH}_4\text{NO}_3$) ตัวอักษร a, b แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดพืชในพืชชนิดเดียวกัน ส่วนตัวอักษร A, B, C แสดงความแตกต่างโดยรวมระหว่างชนิดพืชโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.4 ผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ (chlorophyll contents)

ปริมาณคลอโรฟิลล์ ทั้งคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และโททอลคลอโรฟิลล์ มีค่าแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดพืชและรูปแบบไนโตรเจนที่พืชได้รับ (ตาราง 4.1) ปริมาณคลอโรฟิลล์พบมากที่สุดในพื้นที่ปลูก พบมากรองลงมา ได้แก่ ในจอกหูหนู กวักน้ำ และผัก ตามลำดับ (ตาราง 4.2) โดยพบว่า ส่วนใหญ่พืชที่ได้รับแอมโมเนียมเป็นไนโตรเจนหลักจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าพืชที่ปลูกด้วยไนเตรต

ตารางที่ 4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี โททอลคลอโรฟิลล์ และอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อบี (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (*S. cucullata*) ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) กกิ้งกา (*Cyperus involucratus*) และแฝก (*Vetiveria zizanioides*) ที่ปลูกด้วยไนโตรเจนรูปแบบที่ต่างกัน (NH_4^+ , NO_3^- , NH_4NO_3) ตัวอักษร a, b, c, d, e แสดงความแตกต่างระหว่างวิธีดินันต์

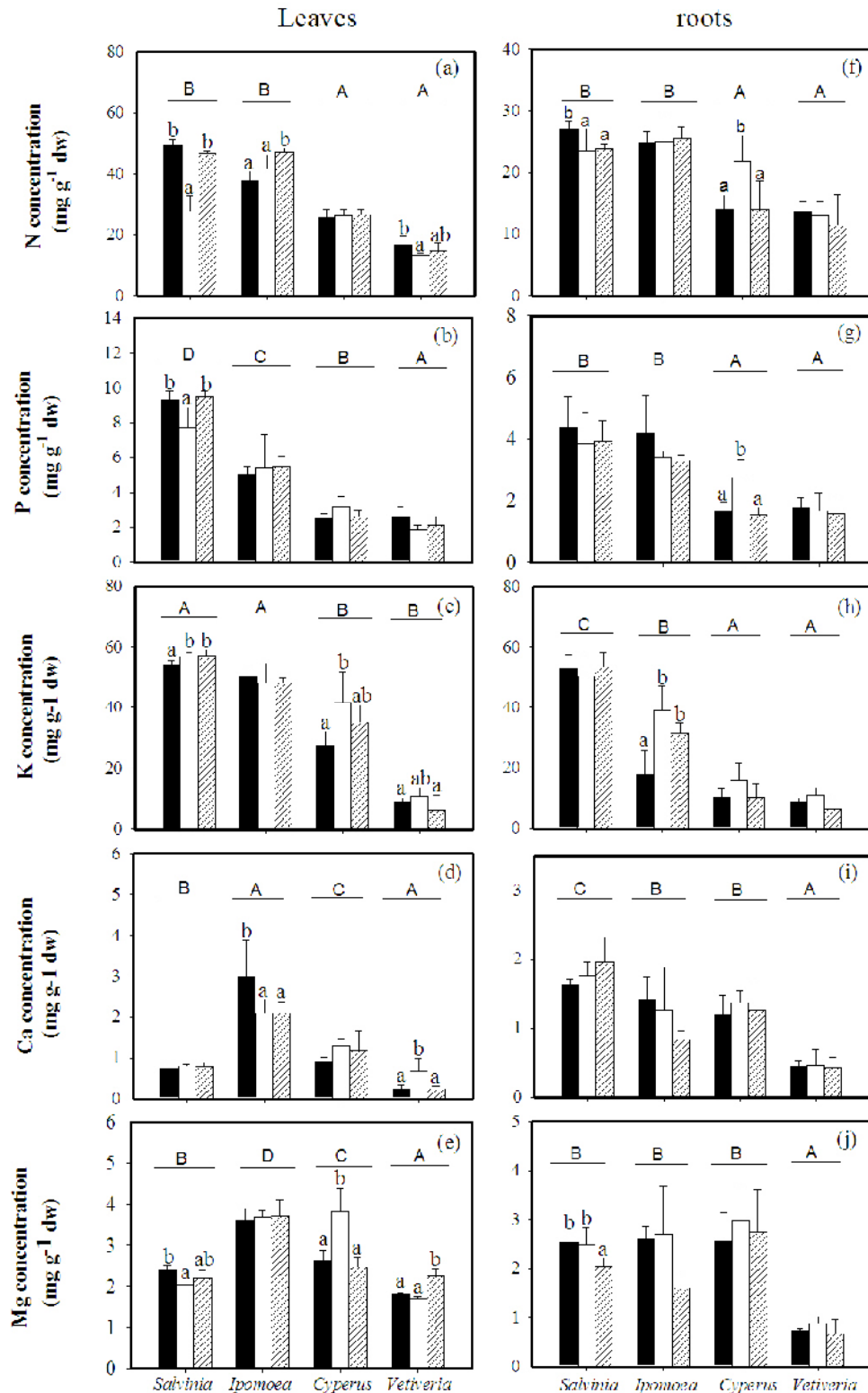
	S. cucullata			I. aquatica			C. involucratus			V. zizanioides			F-ratio
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ NO ₃	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ NO ₃	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ NO ₃	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ NO ₃	
1. Chl a	9.0±0.5 ^e	6.4±0.5 ^{bcde}	6.9±1.9 ^{cde}	7.1±1.1 ^{de}	8.1±2.5 ^{de}	12.7±2.4 ^f	7.3±2.2 ^e	5.5±1.5 ^{abcd}	4.3±2.1 ^{abc}	4.1±0.8 ^{ab}	2.5±1.4 ^a	3.6±1.2 ^a	9.08***
2. Chl b	4.7±5.2 ^c	4.4±0.5 ^c	3.9±1.0 ^{bc}	4.9±0.6 ^c	4.6±1.3 ^c	6.7±1.0 ^d	3.9±1.1 ^{bc}	2.6±0.6 ^{ab}	2.5±0.6 ^a	2.4±0.3 ^a	1.2±0.7 ^a	1.9±0.4 ^a	12.1***
3. Total Chl	14.2±0.6 ^c	10.8±1.0 ^{bc}	10.8±3.0 ^{bc}	12.0±1.7 ^c	12.7±3.8 ^c	19.5±3.3 ^d	12.4 ±2.1 ^c	8.2±2.1 ^{ab}	6.8±2.7 ^a	6.5±1.1 ^a	4.8±2.0 ^a	5.5±1.6 ^a	10.5***
4. Chl a/b	2.0±0.1 ^{abc}	1.5±0.1 ^a	1.8±0.2 ^{ab}	1.5±0.1 ^a	1.7±0.1 ^{ab}	1.9±0.2 ^{abc}	2.3±0.7 ^c	2.1±0.1 ^{bc}	1.6±0.4 ^{ab}	1.7±0.2 ^{ab}	1.8±0.7 ^{abc}	1.8±0.3 ^{abc}	3.7***
ratio													

***, p <0.001

1.5 ผลต่อปริมาณธาตุอาหาร

โดยทั่วไป ปริมาณธาตุอาหารต่าง (N, P, K, Ca และ Mg) ทั้งในเนื้อเยื่อใบและรากของพืชทั้ง 4 ชนิดนี้ มีความแตกต่างกัน (ภาพ 4.4) จากการศึกษา พบว่า ปริมาณของไนโตรเจนรวมและฟอสฟอรัสในใบและปริมาณโปแตสเซียมในรากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยเป็นผลมาจากทั้งชนิดพืชและรูปแบบไนโตรเจนที่พืชได้รับ (ตาราง 4.1) แยกจัดเป็นพืชที่มีปริมาณธาตุอาหารต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อพืช ทั้งในใบและรากน้อยกว่าพืชชนิดอื่น ๆ สำหรับปริมาณไนโตรเจนรวม พบว่า พืชทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณไนโตรเจนรวมในใบมากกว่าในราก ปริมาณไนโตรเจนรวมพบมากในจอกหูหนูและผักบุ้ง โดยเฉพาะพบในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมหรือแอมโมเนียมไนเตรต สำหรับในจอกหูหนู พบปริมาณไนโตรเจนรวมในใบที่สูงในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมหรือแอมโมเนียมไนเตรตซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยไนเตรต ในขณะที่ปริมาณไนโตรเจนรวมในรากมีปริมาณสูงสุดในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมเพียงอย่างเดียวและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมไนเตรตหรือไนเตรตเพียงอย่างเดียว

สำหรับปริมาณฟอสฟอรัส พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสในใบของจอกหูหนูที่ปลูกด้วยไนเตรตมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตรงกันข้ามกับกกรงกาทา ที่พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสในรากมีค่ามากในพืชที่ปลูกด้วยไนเตรตและมีความแตกต่างจากพืชที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมหรือแอมโมเนียมไนเตรตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณธาตุอาหารอื่น ๆ (K, Ca, Mg) พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อพืชได้รับไนโตรเจนรูปแบบต่างกัน นั่นคือ ในกกรงกาทาที่ปลูกด้วยไนเตรตเพียงอย่างเดียว มีผลทำให้พืชมีปริมาณแมกนีเซียมในใบเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณแคลเซียมในใบของผักเพิ่มขึ้นเช่นกันในพืชที่ปลูกด้วยไนเตรต ในขณะที่ปริมาณโปแตสเซียมและแมกนีเซียมในใบของผักเพิ่มขึ้นเมื่อปลูกพืชในแอมโมเนียมและแอมโมเนียมไนเตรต ตามลำดับ สำหรับในผักบุ้งที่ปลูกในแอมโมเนียมจะมีปริมาณแคลเซียมสูงในใบ ซึ่งแตกต่างจากพืชที่ปลูกด้วยไนเตรตหรือแอมโมเนียมไนเตรตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



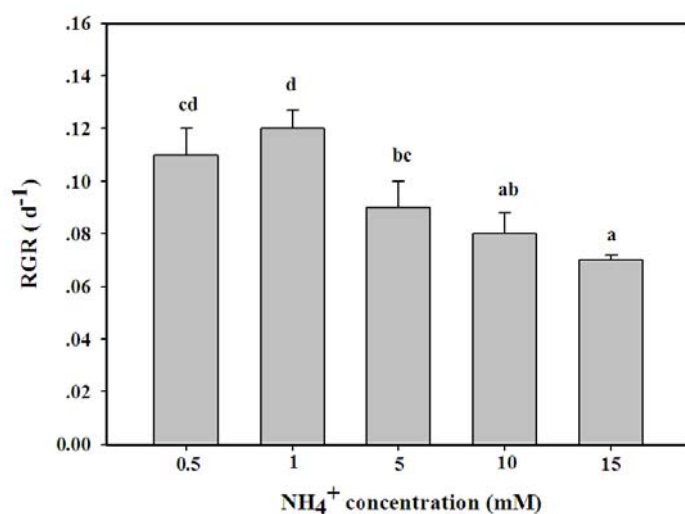
ภาพ 4.4 ปริมาณไนโตรเจนรวม(a,f), ฟอสฟอรัส (b,g), โพแทสเซียม (c,h), แคลเซียม (d,i) และแมกนีเซียม (e,j) ในใบและรากพืช (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*), ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*), กกธัญญา (Cyperus involucreatus) และผัก (Vetiveria zizanioides) เมื่อปลูกด้วยไนโตรเจนอินทรีย์รูปแบบต่างกัน (■ NH_4^+ , □ NO_3^- , ▨ NH_4NO_3) ตัวอักษร a, b ระหว่างทริตเมนต์แสดงความแตกต่างในพืชชนิดเดียวกัน ส่วนตัวอักษร A, B, C, D แสดงความแตกต่างโดยรวมระหว่างชนิดพืชโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองที่ 2 ผลของระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมต่อการเจริญเติบโตของพืช การดูดซับแอมโมเนียมและปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อพืช

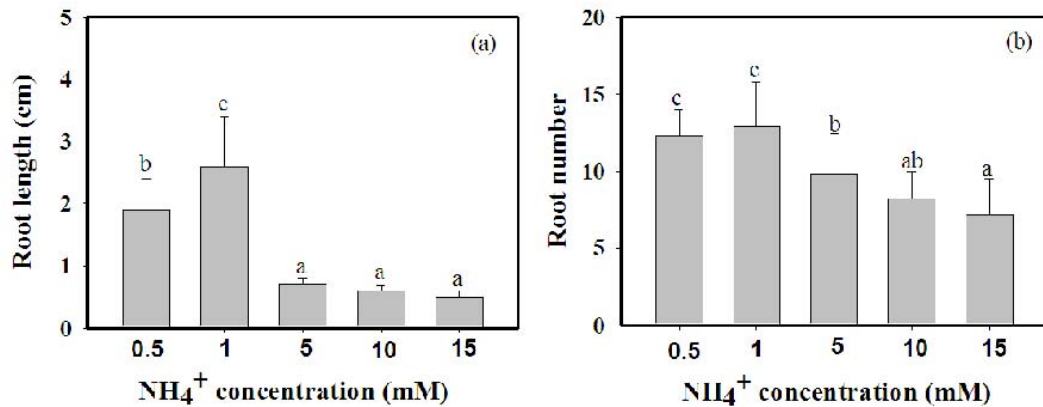
จากการทดลองที่ 1 ทำให้ทราบว่าจอกหูหนูและผักบุ้งเป็นพืชที่เติบโตได้ดีเมื่อได้รับแอมโมเนียมเป็นไนโตรเจนหลัก ดังนั้นจึงเลือกเอาพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ มาศึกษาต่อในการทดลองที่ 2

2.1 ผลต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยา

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่ใช้ปลูกพืชมีผลต่อการเจริญเติบโตของจอกหูหนูและผักบุ้ง นั่นคือ ในจอกหูหนู สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 0.5 และ 1 mM แต่เมื่อปลูกด้วยความเข้มข้นที่สูงขึ้น คือ 5, 10 และ 15 mM พืชจะมีอัตราการเติบโต (Relative Growth Rate, RGR) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 4.5) ที่ความเข้มข้นดังกล่าวส่งผลให้พืชมีรากที่สั้นลงและมีจำนวนรากน้อยด้วยเมื่อเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 0.5 และ 1 mM (ภาพ 4.6)

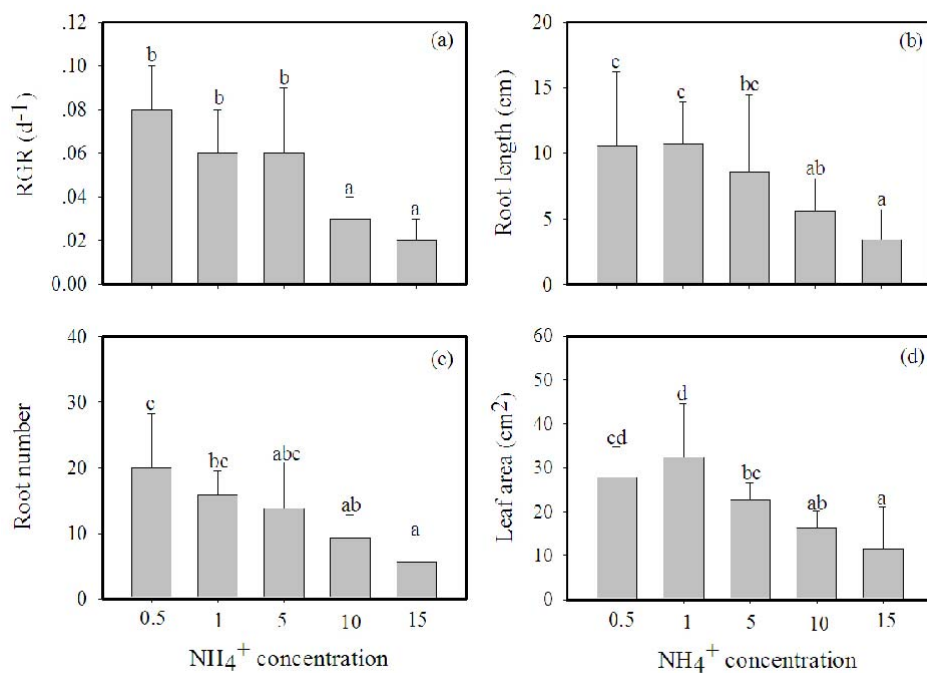


ภาพ 4.5 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ หรือ RGR (d^{-1}) (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) ตัวอักษร a, b, c, d แสดงความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพ 4.6 ความยาวราก (a) และจำนวนราก (b) (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) ตัวอักษร a, b, c, d แสดงความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับในผักบุ้ง พบว่า พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่กว้างกว่าจอกหูหนู คือ 0.5, 1 และ 5 mM NH_4^+ แต่อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ของผักบุ้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อพืชได้รับแอมโมเนียมที่ความเข้มข้น 10 และ 15 mM (ภาพ 4.7 a) พืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นที่สูงนี้ (10 และ 15 mM NH_4^+) มีผลกระทบต่อรากเช่นเดียวกับที่พบในจอกหูหนู นั่นคือ พืชจะมีรากสั้นและมีจำนวนรากน้อย โดยเฉพาะที่แอมโมเนียมความเข้มข้น 15 mM พบมีพืชบางต้นตาย หรือบางต้นมีรากเน่า รวมถึงพบอาการเน่าที่โคนต้นลามขึ้นมาจนถึงกลางต้นด้วย นอกจากนี้ ยังพบว่าใบของพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นสูงจะมีใบขนาดเล็กลง พืชบางต้นการหลุดร่วงของใบ ซึ่งโดยปกติจะพบอาการดังกล่าวในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นที่ 0.5, 1 และ 5 mM

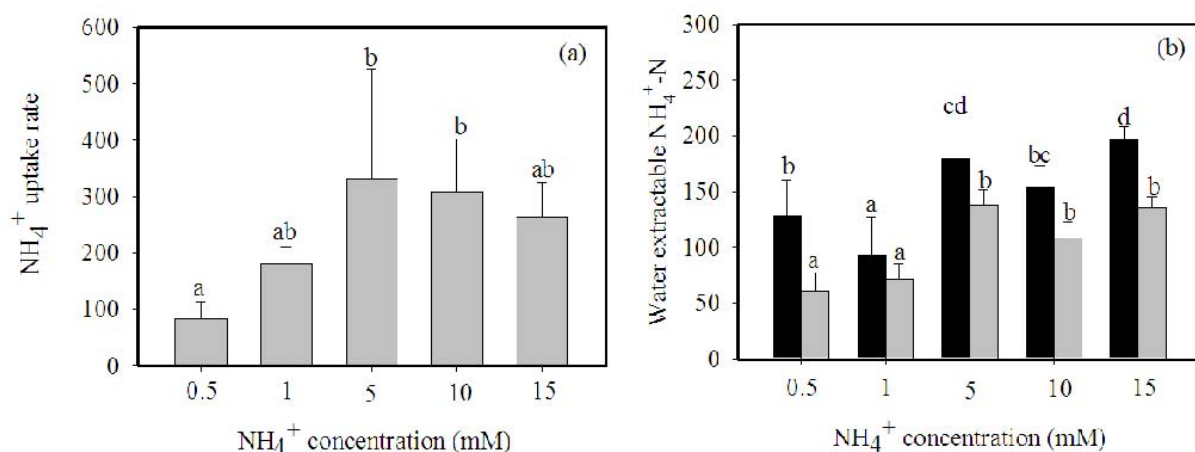


ภาพ 4.7 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ หรือ RGR (a) ความยาวราก (b) จำนวนราก (c) และพื้นที่ใบ (d) (mean $\pm$ SE) ของผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) ตัวอักษร a, b, c, d แสดงความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.2 ผลต่ออัตราการดูดซับแอมโมเนียม (NH_4^+ uptake)

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่ใช้ปลูกพืชมีผลต่ออัตราการดูดซับแอมโมเนียมของจอกหูหนู และผักบุ้ง โดยในจอกหูหนูพบว่า พืชยังคงมีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับแอมโมเนียมความเข้มข้นสูงขึ้น คือ 5, 10 และ 15 mM (ภาพ 4.8a)

ตรงกันข้ามกับในผักบุ้ง ที่พบว่า พืชมีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมลดลงถึง 50 % ในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นที่ 5, 10 และ 15 mM และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 0.5 และ 1 mM (ภาพ 4.9 a)

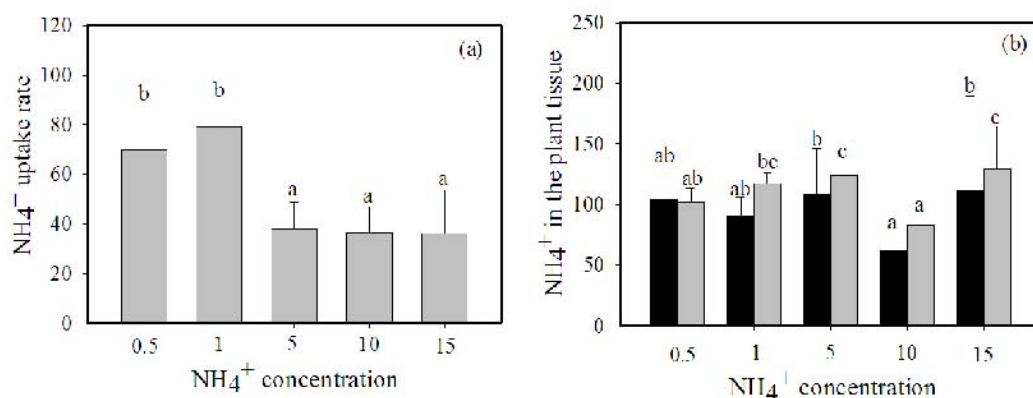


ภาพ 4.8 อัตราการดูดซับแอมโมเนียม ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) (a) และปริมาณแอมโมเนียมในใบ (คอลัมน์สีดำ) และในราก (คอลัมน์สีเทา) ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ plant dw}$) (b) (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) ตัวอักษร a, b, c, d แสดงความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.4 ผลต่อปริมาณแอมโมเนียมในเนื้อเยื่อพืช

จากการวัดปริมาณแอมโมเนียมที่สะสมในเนื้อเยื่อโดยวิธีสกัดด้วยน้ำร้อน (hot water extraction) พบว่า ในจอกหูหนูจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนียมในเนื้อเยื่อพืชทั้งในใบและรากเมื่อพืชได้รับแอมโมเนียมความเข้มข้นตั้งแต่ 5 mM ขึ้นไปและมีความแตกต่างจากพืชที่ได้รับแอมโมเนียมความเข้มข้น 0.5 และ 1 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 4.8 b)

สำหรับในผักบุ้ง พบว่า พืชมีปริมาณแอมโมเนียมในเนื้อเยื่อใบและรากต่ำสุด เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 10 mM และมีความแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่พืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 15 mM นั้น มีปริมาณแอมโมเนียมในเนื้อเยื่อพืชไม่แตกต่างจากพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 1 และ 5 mM (ภาพ 4.9 b)



ภาพ 4.9 อัตราการดูดซับแอมโมเนียม ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) (a) และปริมาณแอมโมเนียมในใบ (คอลัมน์สีดำ) และในราก (คอลัมน์สีเทา) ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ plant dw}$) (b) (mean $\pm$ SE) ของผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) ตัวอักษร a, b, c, d แสดงความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.5 ผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) และแคโรทีนอยด์ (carotenoids)

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่ใช้ปลูกพืชมีผลกระทบต่อปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของจอกหูหนูและผักบุ้ง ในจอกหูหนูที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมที่สูงจะมีปริมาณของคลอโรฟิลล์ทั้ง เอ และ บี ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจะเห็นได้อย่างชัดเจนในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นที่ 10 และ 15 mM ในทำนองเดียวกับปริมาณแคโรทีนอยด์ที่มีปริมาณลดลงเมื่อพืชได้รับแอมโมเนียมความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นที่ 10 และ 15 mM ที่มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ตาราง 4.3)

สำหรับปริมาณคลอโรฟิลล์ในผักบุ้ง พบว่า ทั้งคลอโรฟิลล์ เอ และ บี ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นตั้งแต่ 5 mM ขึ้นไป ในขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นที่ 0.5 และ 1 mM

ตาราง 4.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) (mean $\pm$ SE) ที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) ตัวอักษร a, b, c, d, e แสดงความแตกต่างระหว่างทรีดเมนต์

	0.5 mM	1 mM	5mM	10 mM	15 mM	F-ratio
1. Chl a (mg g ⁻¹ dw)	8.38 $\pm$ 1.36 ^d	6.53 $\pm$ 0.64 ^c	5.14 $\pm$ 1.54 ^b	3.79 $\pm$ 1.07 ^a	3.02 $\pm$ 0.56 ^a	34.5***
2. Chl b (mg g ⁻¹ dw)	3.42 $\pm$ 0.6 ^c	2.53 $\pm$ 0.26 ^b	2.21 $\pm$ 0.61 ^b	1.73 $\pm$ 0.41 ^a	1.53 $\pm$ 0.34 ^a	22.9***
3. total Chl a+b	11.8 $\pm$ 1.9 ^d	9.1 $\pm$ 0.9 ^c	7.4 $\pm$ 2.1 ^b	5.6 $\pm$ 1.5 ^a	4.6 $\pm$ 0.5 ^a	31.3***
4. Ca/ Cb	2.5 $\pm$ 0.1 ^d	2.6 $\pm$ 0.1 ^{cd}	2.3 $\pm$ 0.2 ^{bc}	2.2 $\pm$ 0.2 ^b	2.0 $\pm$ 0.2 ^a	19.1***
5. Carotenoids (mg g ⁻¹ dw)	1.4 $\pm$ 0.3 ^c	1.0 $\pm$ 0.1 ^b	1.0 $\pm$ 0.3 ^b	0.8 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.6 $\pm$ 0.1 ^a	12.3***

*** (P<0.001)

ตาราง 4.4 ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) (mean $\pm$ SE) ที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) ตัวอักษร a, b, c, d, e แสดงความแตกต่างระหว่างทรีดเมนต์

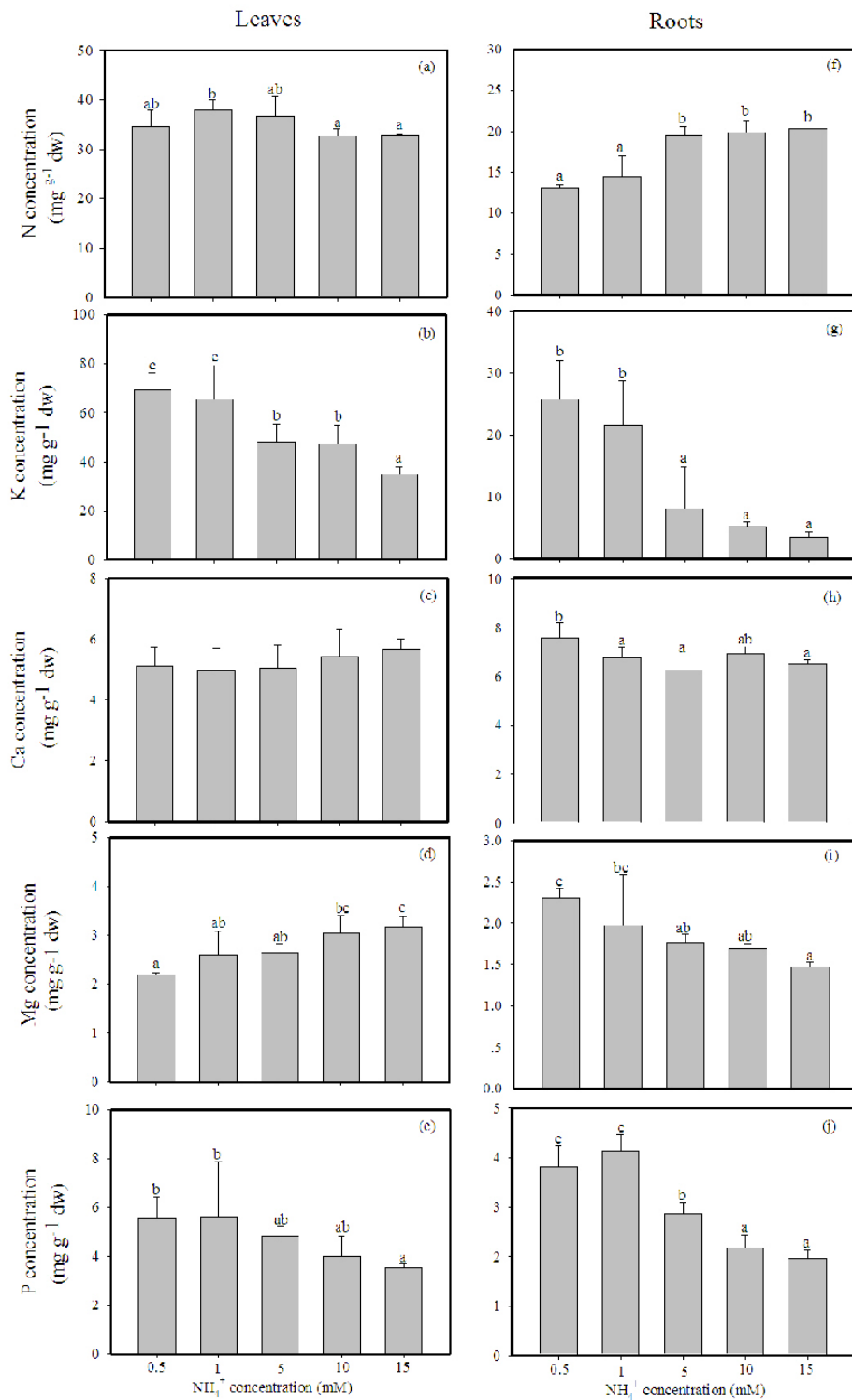
	NH ₄ ⁺ concentrations					F-ratio
	0.5 mM	1 mM	5 mM	10 mM	15 mM	
1. Chl a (mg g ⁻¹ dw)	12.6 $\pm$ 2.2 ^b	13.2 $\pm$ 1.9 ^b	11.1 $\pm$ 1.7 ^{ab}	9.7 $\pm$ 2.1 ^a	9.2 $\pm$ 2.0 ^a	5.98**
2. Chl b (mg g ⁻¹ dw)	5.4 $\pm$ 1.1 ^b	5.4 $\pm$ 0.8 ^b	4.5 $\pm$ 0.6 ^{ab}	4.0 $\pm$ 0.7 ^a	3.9 $\pm$ 0.9 ^a	5.62**
3. total Chl a+b	18.0 $\pm$ 3.3 ^b	18.5 $\pm$ 2.6 ^b	15.6 $\pm$ 2.3 ^{ab}	13.7 $\pm$ 2.8 ^a	13.1 $\pm$ 2.8 ^a	5.94**
4. Ca/ Cb	2.4 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	3.57
5. Carotenoids (mg g ⁻¹ dw)	1.9 $\pm$ 0.3 ^{ab}	2.1 $\pm$ 0.3 ^b	2.0 $\pm$ 0.3 ^b	1.6 $\pm$ 0.4 ^a	1.6 $\pm$ 0.3 ^a	1.2*

* (P<0.05), ** (P<0.01)

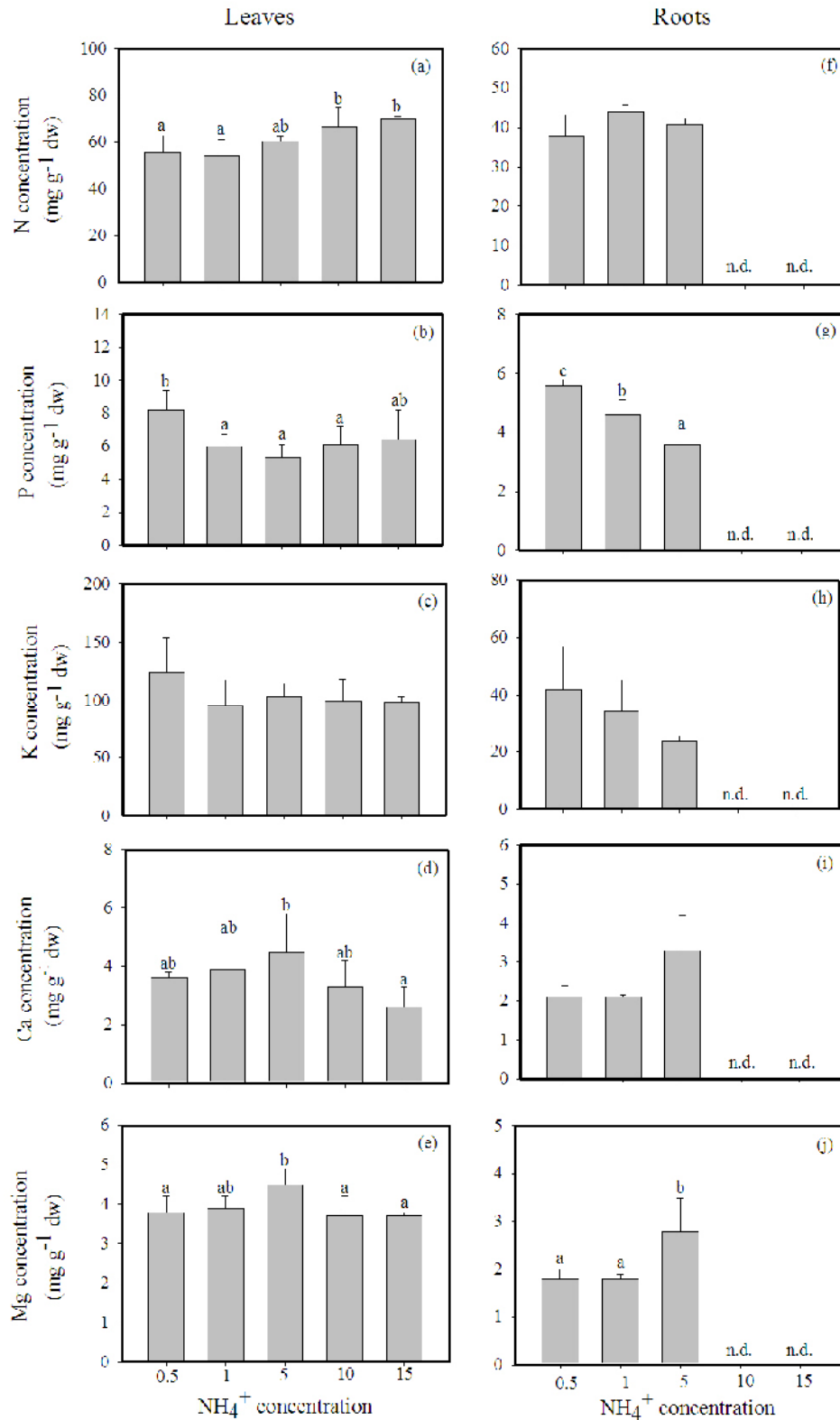
2.6 ผลต่อปริมาณธาตุอาหาร

โดยส่วนใหญ่ปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อของจอกหูหนูจะได้รับผลกระทบเมื่อพืชได้รับแอมโมเนียมเพิ่มขึ้น (ภาพ 4.10) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณไนโตรเจนรวมในใบได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ปริมาณไนโตรเจนรวมในรากเพิ่มขึ้นซึ่งสังเกตได้อย่างชัดเจนในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 10 และ 15 mM เช่นเดียวกับปริมาณโปแตสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียมในรากที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพืชได้รับแอมโมเนียมในความเข้มข้นดังกล่าว แต่ในใบพบว่าปริมาณธาตุอาหารเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

สำหรับปริมาณธาตุอาหารในผักบุ้งเมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นพบว่า มีปริมาณของไนโตรเจนรวมในส่วนใบเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 10 และ 15 mM สำหรับปริมาณฟอสฟอรัสทั้งในใบและในรากนั้นมีปริมาณลดลง ปริมาณฟอสฟอรัสในรากพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นที่ 1 และ 5 mM มีปริมาณลดลงคิดเป็นร้อยละ 18 และ 36 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างจากพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้น 0.5 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่โปแตสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียมได้รับผลกระทบเพียงเล็กน้อย และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพ 4.10 ปริมาณไนโตรเจนรวม (a,f), ฟอสฟอรัส (b,g), โพแทสเซียม (c,h), แคลเซียม (d,i) และ แมกนีเซียม (e,j) ในใบและรากพืช (mean $\pm$ SE) ของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) ตัวอักษร a, b, c แสดงความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพ 4.11 ปริมาณไนโตรเจนรวม (a,f), ฟอสฟอรัส (b,g), โพแทสเซียม (c,h), แคลเซียม (d,i) และแมกนีเซียม (e,j) ในใบและรากพืช (mean $\pm$ SE) ของผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) ตัวอักษร a, b, c แสดงความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (n.d. = not determined)

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 ผลของรูปแบบไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโต อัตราการดูดซับไนโตรเจน และปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อของจอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) กกธัญ (*Cyperus involucratus*) และ แฝก (*Vetiveria zizanioides*)

จากการศึกษาที่พบว่า พืชแต่ละชนิดมีอัตราการเติบโต (RGR) ที่แตกต่างกันค่อนข้างชัดเจน โดยที่รูปแบบของไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของพืชเพียงเล็กน้อย จากการศึกษาจะเห็นว่ากลุ่มพืชลอยน้ำ (จอกหูหนู และ ผักบุ้ง) จะมีอัตราการเติบโตที่เร็วกว่าพืช โผล่เหนือน้ำ (กกธัญ และ แฝก) ในสภาพธรรมชาติ พืชลอยน้ำ จะได้รับธาตุอาหารต่าง ๆ โดยตรงจากแหล่งน้ำโดยการดูดซับผ่านทางรากและพืชบางชนิดยังสามารถดูดซับธาตุอาหารผ่านทางผิวใบด้านล่างได้อีกด้วย (Cedergreen and Madsen, 2002; Fang, 2007) พืชสกุล *Salvinia* ซึ่งรวมถึง จอกหูหนู (*Salvinia cucullata*) ด้วย จะมีอัตราการเติบโตที่จัดว่าเร็วมาก ($0.1-0.4\text{ d}^{-1}$) และยังมีอัตราการแพร่พันธุ์โดยเกิดจากการแตกหักของกิ่งที่อยู่ในอัตราที่สูงอีกด้วย จึงส่งผลให้พืช เหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวในเวลาอันรวดเร็ว (2-4 วัน) และเกิดการแพร่กระจายไปตาม แหล่งน้ำต่าง ๆ ทั่วโลก (Zutshi et al., 1971; McFarland et al., 2004) มีการศึกษาการใช้ ไนโตรเจนซึ่งจัดเป็นธาตุอาหารสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชสกุล *Salvinia* โดยศึกษาใน *Salvinia natans* ซึ่งเป็นพืชที่พบการกระจายตัวในเขตร้อนและพบในประเทศไทยด้วยเช่นกัน พบว่าพืชชนิดนี้มีอัตราการเติบโตสูงสุดเมื่อปลูกในสารละลายที่มีแอมโมเนียมเป็นไนโตรเจนหลัก (Jampeetong and Brix, 2009a) แต่ในการศึกษาที่พบว่ารูปแบบไนโตรเจนไม่มีผลต่อการอัตรา เติบโตของจอกหูหนูเลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการศึกษาใน *Salvinia natans* สภาวะต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น อุณหภูมิ แสง หรือความชื้น ถูกควบคุมภายใน growth chamber ในขณะที่การทดลองใน จอกหูหนูนั้น ทำการทดลองเลี้ยงพืชในเรือนเพาะชำ ซึ่งไม่สามารถควบคุมปัจจัยดังกล่าวให้คงที่ได้ จึงทำให้ผลที่ได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การทดลองพืชในเรือนเพาะชำดังกล่าว เราจะได้สภาวะที่ ใกล้เคียงกับสภาพอากาศจริง ๆ ซึ่งพืชอาจต้องเผชิญเมื่อนำพืชไปใช้บำบัดน้ำเสียในระบบบึง ประดิษฐ์จริงในธรรมชาติ

จากการศึกษารั้วนี้ จะเห็นได้ว่าพืชทั้ง 4 ชนิด คือ จอกหูหนู ผักบุ้ง กกธัญและแฝก มีแนวโน้มที่จะตอบสนองดีต่อไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมมากกว่าไนเตรต โดยเฉพาะในกกธัญ กาและแฝกที่มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับแอมโมเนียมเป็นไนโตรเจนหลัก เช่นเดียวกับการศึกษาโดย Tylova-Munzarova et al. (2005) ที่พบว่า *Glyceria maxima* ที่ปลูกด้วย แอมโมเนียมมีอัตราการเติบโตที่สูงขึ้น และยังพบในพืชน้ำชนิดอื่น ๆ อีกที่ตอบสนองดีต่อ แอมโมเนียม ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการเลือกใช้แอมโมเนียม พืชจะเสียพลังงานในการดูดซับรวมทั้ง การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียมน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรเลือกใช้ไนเตรต (Miller and Cramer,

2005; Fang et al., 2007; Jampeetong and Brix, 2009a; Konnerup and Brix, 2010) นอกจากนี้ การศึกษาของ Sorrell and Orr (1993) แสดงให้เห็นเช่นกันว่าในกกธรีงกา (*C. involucratus*) จะมี อัตราการดูดซับไนโตรเจนสูงขึ้น โดยสังเกตจากอัตราการแลกเปลี่ยนประจุ H^+ ที่สูงขึ้น เมื่อพืชได้รับ แอมโมเนียมเป็นไนโตรเจนหลัก และยังพบลักษณะเช่นเดียวกันในพืชชนิดอื่น ๆ อีก เช่น *Carex rostrata*, *Typha latifolia* และ *Phragmites australis* (Conlin and Crowder, 1989) สำหรับใน *Salvinia natans* พบมีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมที่สูงมาก ($679 \pm 97 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root dw h}^{-1}$) เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการดูดซับไนเตรต ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการเติบโตและการแพร่พันธุ์ของ พืชเมื่อได้รับแอมโมเนียมเป็นไนโตรเจนหลัก (Jampeetong and Brix 2009a) แต่สำหรับในแฝกนั้น ซึ่งมีการตอบสนองต่อแอมโมเนียมได้ดีกว่าไนเตรต แต่แฝกเป็นพืชที่มีอัตราการเติบโตที่ค่อนข้างต่ำกว่าพืชชนิดอื่น ๆ และยังมีอัตราการดูดซับไนโตรเจนทั้งแอมโมเนียมและไนเตรตที่ต่ำมาก ถึงแม้ว่า พืชจะมีระบบรากที่หนาแน่นและยาว แต่ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น แฝกจึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ดูดซับสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับน้ำเสีย แต่เหมาะสมที่นำไปใช้ยึดดินไม่ให้เกิดการพังทลาย มากกว่า

สำหรับการดูดซับไนโตรเจนซึ่งพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดซับมากน้อยต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชเองและยังขึ้นอยู่กับรูปแบบไนโตรเจนที่พืชได้รับด้วย โดยทั่วไป พืชจะมี อัตราการดูดซับแอมโมเนียมเร็วกว่าไนเตรต และยังพบว่าพืชลอยน้ำมีอัตราการดูดซับทั้ง แอมโมเนียมและไนเตรตเร็วกว่าพืชใล้น้ำอีกด้วย ทั้งนี้เหมือนว่าอัตราการดูดซับไนโตรเจน จะมากหรือน้อยขึ้นกับอัตราการเติบโตของพืชเป็นหลักด้วย ยกตัวอย่างเช่น จอกหูหนู ซึ่งเป็นพืช ลอยน้ำที่มีอัตราการเติบโตที่เร็วและยังมีการแพร่พันธุ์ที่สูงอีกด้วย ความต้องการไนโตรเจนซึ่งเป็น ธาตุอาหารสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชจะเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้พืชต้องเพิ่มการนำเข้าของ ไนโตรเจน ทำให้ค่าอัตราการดูดซับไนโตรเจนเพิ่มขึ้นนั่นเอง ดังจะเห็นว่าอัตราการดูดซับไนโตรเจน โดยจอกหูหนูที่ศึกษานี้จัดว่าสูงมากไม่ว่าจะเป็นแอมโมเนียมหรือไนเตรต โดยเฉพาะการดูดซับ แอมโมเนียมที่จัดว่าสูงมาก คือ มีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ $640.0 \pm 161 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root dw h}^{-1}$ ซึ่งมี ค่าใกล้เคียงกับค่าการดูดซับแอมโมเนียมของ *Salvinia natans* ซึ่งมีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ $679 \pm 97 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root dw h}^{-1}$ (Jampeetong and Brix, 2009a) ถ้านำมาเปรียบเทียบกับค่าอัตราการ ดูดซับไนโตรเจนโดยพืชใล้น้ำ จะเห็นได้ว่ามีค่าที่ค่อนข้างต่ำมาก ทั้ง ๆ ที่พืชในกลุ่มดังกล่าว มีรากที่ยาวกว่า และจำนวนมากกว่า และเป็นที่รู้กันดีว่ารากเป็นส่วนสำคัญของพืชที่ทำหน้าที่ดูดซับ ธาตุอาหารต่าง ๆ แต่พืชใล้น้ำจะมีส่วนของรากที่แก่ที่มีผนังที่หนาซึ่งเกิดจากการสะสม ของสารจำพวกลิกนินและแทนนิน จัดเป็นสิ่งที่กีดกันการนำเข้าของน้ำและธาตุอาหารต่าง ๆ จึงส่งผล โดยตรงต่อค่าอัตราการดูดซับไนโตรเจน ในขณะที่พืชลอยน้ำเช่น จอกหูหนู ทุกส่วนของรากแทบจะ ไม่มีการพอกของผนังหนาเลย และรากมีขนาดเล็กจึงมีพื้นที่ผิวมากกว่า (Jampeetong and Brix , 2009c) จึงทำให้พืชสามารถดูดซับไนโตรเจนได้ในปริมาณที่มากและเร็วกว่า นั่นเอง นอกจากนี้ การ คำนวณค่าอัตราการดูดซับไนโตรเจนของพืช จะคำนวณโดยเทียบกับน้ำหนักรากเป็นหลัก พืชใล้น้ำ ส่วนใหญ่จะมีรากปริมาณหรือน้ำหนักมากกว่าพืชลอยน้ำ ดังนั้นจึงส่งผลให้ค่าที่ได้จากการ

ค่านวณนั้นมีค่าต่ำ เนื่องจากตัวหารคือ น้ำหนักราก มีค่ามาก นั่นเอง (Romero et al., 1999; lamchaturapatr, 2007)

สำหรับการดูดซับไนเตรต จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับชนิดพืชและรูปแบบไนโตรเจนด้วย นั่นคือ พืชที่ปลูกด้วยไนเตรตเพียงอย่างเดียวจะมีค่าอัตราการดูดซับไนเตรตที่สูง และมีความแตกต่างจากทริตเมนต์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยโปรตีนที่ผนังเซลล์ของรากที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าไปในเตตรจะสามารรถถูกกระตุ้นโดยปริมาณไนเตรตที่อยู่รอบ ๆ รากนั้น ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่พบทั่วไปในพืชชนิดอื่น ๆ ด้วย (Crawford et al., 1986; Gojon et al., 1994; Cedergreen and Madsen, 2002; Jampeetong and Brix, 2009a; Konnerup and Brix, 2010) นอกจากนี้ ยังขึ้นกับการเกิดกระบวนการเปลี่ยนรูปไนเตรตที่เกิดขึ้นภายในรากอีกด้วย ซึ่งในการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่ากระบวนการดังกล่าวจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับเอนไซม์ที่เรียกว่า nitrate reductase ที่สามารรถถูกชักนำให้สร้างขึ้นโดยมีไนเตรตจากภายนอกเป็นตัวกระตุ้น อย่างไรก็ตาม ปริมาณหรือกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว ที่พบในพืชน้ำโดยส่วนใหญ่จะมีค่าที่ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับพืชบก (Cedergreen and Madsen, 2003) การศึกษาโดย Jampeetong and Brix (2009a) แสดงให้เห็นว่า *Salvinia natans* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้ น้อยกว่า $4 \mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{dw h}^{-1}$ โดยที่พืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมแทบไม่มีเอนไซม์ดังกล่าวเกิดขึ้นเลย และมีอัตราการดูดไนเตรตที่ต่ำมาก เมื่อเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยไนเตรตเป็นหลักซึ่งมีค่าอัตราการดูดไนเตรตที่สูงสุด อย่างไรก็ตาม ปริมาณเอนไซม์นี้ที่พบในพืชโผล่เหนือน้ำจะมีมากในใบมากกว่าในราก (Tylova-Munzarova et al., 2006) จากการศึกษาโดย Konnerup and Brix (2010) แสดงให้เห็นว่า ในพุทธรักษา (*Canna indica*) มีปริมาณของเอนไซม์ nitrate reductase มากที่ใบและยังพบว่าอัตราการดูดไนเตรตไม่ได้ขึ้นกับรูปแบบไนโตรเจนอีกด้วย ซึ่งจากการศึกษานี้ได้เสนอแนะว่าการเปลี่ยนรูปของไนเตรตบริเวณใบนั้นจัดเป็นข้อได้เปรียบของพืชเนื่องจากในกระบวนการดังกล่าวต้องการโครงสร้างของคาร์บอนมาพร้อมด้วย ซึ่งโครงสร้างคาร์บอนนี้ได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่เกิดขึ้นที่ใบนั่นเอง อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาไม่ได้วัดปริมาณของเอนไซม์ดังกล่าว แต่คาดเดาว่าพืชโผล่เหนือน้ำน่าจะมีปริมาณเอนไซม์ nitrate reductase เกิดมากที่ใบ ในขณะที่พืชลอยน้ำจะมีปริมาณเอนไซม์นี้มากที่รากดังเช่นการศึกษาที่ผ่านมา (Cedergreen and Madsen, 2003; Jampeetong and Brix, 2009; Konnerup and Brix, 2010)

รูปแบบไนโตรเจนที่พืชเลือกใช้ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารอื่น ๆ อีกด้วย นั่นคือ พืชมักจะได้รับธาตุอาหารที่มีประจุบวก (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) ลดลง เมื่อพืชนั้นได้รับแอมโมเนียมเป็นไนโตรเจนหลัก ในขณะที่ปริมาณฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืชจะเพิ่มขึ้นเมื่อพืชนั้นได้รับแอมโมเนียมเป็นไนโตรเจนหลักเช่นกัน (Tylova-Munzarova et al., 2005; Dan and Brix, 2009) ดังเช่นใน *Salvinia natans* ที่มีปริมาณ K^+ , Ca^{2+} และ Mg^{2+} ในรากลดลง เมื่อปลูกพืชด้วยแอมโมเนียม (Jampeetong and Brix, 2009a) และจากการศึกษาในพืชชนิดเดียวกันนี้ยังพบอีกว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่ใช้ปลูกพืชยังส่งผลต่อปริมาณธาตุอาหารดังกล่าวอีกด้วย โดยเฉพาะส่งผลต่อปริมาณ K^+ ในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นสาเหตุทำให้พืชขาดแคลนธาตุอาหารที่จำเป็นซึ่งอาจ

เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดอาการความเป็นพิษจากแอมโมเนียม หรือที่เรียกว่า NH_4^+ toxicity ได้ (Jampeetong and Brix, 2009b) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ารูปแบบไนโตรเจน โดยเฉพาะแอมโมเนียมมีผลต่อปริมาณธาตุอาหารอื่นในเนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิดน้อยมาก ซึ่งคล้ายกับการศึกษาในพุทธรักษา (*Canna indica*) และ *Sesbania sesban* ที่มีการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารอื่นน้อยมากหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อพืชได้รับไนโตรเจนรูปแบบต่างกัน (Dan and Brix, 2009; Konnerup and Brix, 2010) การทราบถึงปริมาณธาตุอาหารในพืชแต่ละชนิดหลังจากที่ปลูกพืชในสภาวะต่าง ๆ ที่อาจเจอในน้ำเสียนี้ จะมีประโยชน์ในแง่การนำไปใช้เป็นแนวทางในการจัดการพืชหลังจากการเก็บเกี่ยวพืช เช่น มีการนำเอา *Salvinia molesta* ซึ่งมีการสะสมของโปรตีนและธาตุอาหารอื่น ๆ ปริมาณมากไปใช้เลี้ยงสุกร เป็นต้น Leterme *et al.* (2009)

การทดลองที่ 2 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมต่อการเจริญเติบโตของพืช การดูดซับแอมโมเนียมและปริมาณธาตุอาหารในเนื้อเยื่อพืช

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมมีผลต่ออัตราการเติบโตของพืชทั้งจอกหูหนู (*S. cucullata*) และ ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) โดยแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีผลไปลดอัตราการเติบโตของพืช ในจอกหูหนูพบว่า พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสารละลายที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมสูงถึง 1 mM โดยพืชไม่ได้รับผลกระทบจากแอมโมเนียม ซึ่งต่างจากผักบุ้งที่สามารถเจริญเติบโตในน้ำที่มีแอมโมเนียมความเข้มข้นสูงถึง 5 mM อย่างไรก็ตาม ผักบุ้งมีอัตราการเติบโตที่ต่ำกว่าจอกหูหนูเมื่อได้รับแอมโมเนียมในความเข้มข้นเดียวกัน ระดับความเข้มข้นที่ 1-5 mM จัดเป็นระดับที่พบได้ทั่วไปในน้ำเสียที่อาจมาจากครัวเรือน หรือน้ำเสียที่ถูกปล่อยมาจากพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณสูงหรือจากฟาร์มปศุสัตว์ที่มักมีการปนเปื้อนของแอมโมเนียมในปริมาณที่สูง การที่พืชทั้งสองชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมสูงถึง 5 mM นี้ ทำให้สามารถนำพืชทั้งสองนี้ไปปลูกในน้ำเสียที่ต้องการลดปริมาณไนโตรเจนลงได้ พืชน้ำชนิดอื่นที่จัดว่าเป็นพืชที่สามารถทนต่อแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้นสูงและถูกนำมาใช้บำบัดน้ำเสียในบึงประดิษฐ์ เช่น *Azolla* spp. (Kitoh et al. 1993), พืชวงศ์แหน ได้แก่ สกุล *Wolffia*, พืช *Lemna* และสกุล *Spirodela* (Caicedo et al., 2000; Monselise and Kost, 1993) และ พืชสกุล *Salvinia* อย่างไรก็ตาม พืชเหล่านี้ เมื่อได้รับแอมโมเนียมในความเข้มข้นที่สูงกว่า 5 mM ขึ้นไป มักจะมีอัตราการเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ พืชยังแสดงอาการความเป็นพิษจากแอมโมเนียมอีกด้วย โดยมีอาการใบเหลือง มีจำนวนรากน้อยลง และรากมีขนาดสั้น มีการแตกหน่อ น้อยลง และใบขนาดเล็กลง ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ชัดในพืชที่ปลูกด้วยแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้น 15 mM นอกจากนี้ ยังพบอาการรากเน่า ส่วนโคนของลำต้นที่แช่อยู่ในน้ำนั้นเริ่มเน่า อาการดังกล่าวพบในการศึกษาที่ผ่านมาด้วย (Jampeetong and Brix, 2009b; Litav and Lehrer, 1978)

การบำบัดน้ำเสียด้วยระบบบึงประดิษฐ์โดยมีพืชน้ำเป็นตัวช่วยลดปริมาณสารอาหาร โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่ปนเปื้อนมาในปริมาณที่สูงและก่อให้เกิดภาวะน้ำเสื่อมโทรมตามมานั้นประสิทธิภาพของพืชในการลดปริมาณไนโตรเจนในน้ำจะดีมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับอัตราการดูดซับไนโตรเจนของพืชแต่ละชนิด จากการทดลองที่ 1 ที่พบว่าทั้งจอกหูหนูและผักบุ้งมีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมได้เร็วกว่าในตรรกೆಯที่มีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการทดลองนี้พบว่า พืชทั้งสองชนิดแนวโน้มของการดูดซับแอมโมเนียมในทิศทางที่แตกต่างกัน นั่นคือ ในจอกหูหนูจะมีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมที่สูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียม ในขณะที่อัตราการดูดซับแอมโมเนียมในผักบุ้งลดลงเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมสูงขึ้น โดยทั่วไปพืชที่เจริญเติบโตในแหล่งที่มีแอมโมเนียมสูงนั้น มักจะมีกลไกการป้องกันตัวเองจากการได้รับแอมโมเนียมที่มากเกินไปโดยการเปลี่ยนรูปไปเป็น glutamate ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนตัวอื่นต่อไปได้ นอกจากนี้ยังพบว่า

ในพืชบางชนิด เช่น ข้าว (*Oryza sativa*) จะมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับค่าความต่างของประจุ (polarization) ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ที่ส่งผลให้การขนส่งประจุแอมโมเนียมเข้าสู่เซลล์ รากลดลง นั่นคือ เมื่อรากพืชได้รับแอมโมเนียมเข้าไปในเซลล์จะมีผลทำให้ค่าความต่างของประจุ ลดลงเรื่อย ๆ การลดลงของค่าความต่างของประจุนี้ทำให้การขนส่งประจุแอมโมเนียมเข้าสู่เซลล์ ราก ยากขึ้น ผลที่เกิดขึ้นคือ พืชจะมีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมลดลง นั่นเอง พืชที่มีกลไกดังกล่าวมัก เป็นพืชที่สามารถทนต่อแอมโมเนียมความเข้มข้นสูงได้ ในผักบุ้งจะเห็นได้ว่า พืชมีอัตราการดูดซับ แอมโมเนียมลดลงเช่นกัน ซึ่งพืชอาจมีกลไกดังกล่าวข้างต้นในกรณีที่ยังไม่ถูกทำลาย ซึ่งพบใน พืชที่ปลูกในแอมโมเนียมในช่วงความเข้มข้น 1-5 mM แต่ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น (10, 15 mM) การ ลดลงของอัตราการดูดซับแอมโมเนียมน่าจะเกิดจากการที่พืชมีรากจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และรากบางส่วนเกิดการเน่าเปื่อย ซึ่งรากจัดเป็นส่วนสำคัญต่อการดูดซับแร่ธาตุต่าง ๆ รวมทั้ง แอมโมเนียมด้วย นอกจากนี้ จากการศึกษาโดย Britto et al.(2001) ได้มีการเสนอข้อสันนิษฐาน เพิ่มเติมจากการศึกษาที่ผ่านมาอีกว่า อาการการเป็นพิษของแอมโมเนียมที่เกิดขึ้นในพืชนั้น ส่วน หนึ่งมาจากกระบวนการที่เรียกว่า futile cycling กล่าวคือ เมื่อพืชได้รับประจุแอมโมเนียมเข้าสู่เซลล์ ราก จะมีการสะสมประจุดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น หลังจากนั้นประจุที่สะสมไว้ภายในเซลล์เหล่านั้นจะถูก ขับออกจากเซลล์ ทำให้ค่าความต่างของประจุระหว่างภายในและภายนอกเซลล์เพิ่มมากขึ้น ประจุ แอมโมเนียมที่อยู่ภายนอกเซลล์จึงเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้ง่ายและเข้าไปได้ในปริมาณมากขึ้น ประจุที่ เข้าไปในเซลล์ก็จะเกิดการสะสมเช่นเดิม และมีการขับออกจากเซลล์อีกครั้งแต่จะมีปริมาณที่เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ประจุแอมโมเนียมภายนอกเซลล์เคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์แต่ในปริมาณที่มากกว่าเดิม เหตุการณ์การเคลื่อนย้ายของประจุแอมโมเนียมเข้าและออกจากเซลล์โดยมีการเพิ่มปริมาณประจุ ขึ้นเรื่อย ๆ นี้ จะเป็นกระบวนการที่พืชต้องสูญเสียพลังงานมาก (อัตราการหายใจเพิ่มขึ้นถึง 40 %) ดังนั้น ในพืชบางที่อ่อนไหวต่อแอมโมเนียมจะไม่สามารถหลีกเลี่ยงเหตุการณ์ดังกล่าวได้ ส่งผลให้ พืชมีการเจริญเติบโตลดลง โดยเฉพาะในส่วนรากที่ได้รับผลกระทบโดยตรงและส่งผลต่อให้ส่วนอื่น ของพืช เช่น ลำต้นและใบ ต่อไป โดยพืชที่มีอาการเป็นพิษที่เกิดจากการได้รับแอมโมเนียมสูง เกินไปจะมีใบเหลือง และมีการเติบโตของใบลดลงเช่นกัน ซึ่งพบในการศึกษารั้งนี้เช่นกัน สำหรับ ในจอกหูหนูนั้น พบว่าพืชมีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอมโมเนียม ซึ่งต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่า *Salvinia natans* มีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมลดลงเมื่อ ปลูกพืชในสารละลายที่มีแอมโมเนียมความเข้มข้นตั้งแต่ 10 mM ขึ้นไป ซึ่งในการศึกษานั้นแสดงให้เห็นว่า *S. natans* จัดเป็นพืชที่สามารถทนต่อแอมโมเนียมความเข้มข้นสูงถึง 5 mM โดยที่อาการ เป็นพิษที่เกิดจากแอมโมเนียมนั้นน้อยมาก ดังนั้น *S. natans* จึงถูกเสนอให้เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ สามารถนำมาใช้บำบัดน้ำเสียจากครัวเรือนหรือแม้แต่ น้ำเสียที่มาจากพื้นที่เกษตรกรรม ที่มักมีการ ปนเปื้อนของแอมโมเนียมอยู่ในช่วง 1-5 mM (Jampeetong and Brix, 2009b) เช่นเดียวกับพืชสกุล *Salvinia* ชนิดอื่น เช่น *S. molesta* ที่ถูกนำไปใช้บำบัดน้ำเสียที่แตกต่างกัน รวมทั้งการดูดซับโลหะ หนักด้วย (Olguin et al., 2003; Mohah, 2006; Eugenia, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับจอกหูหนู จะ เห็นว่า พืชชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสารละลายที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมถึง 1 mM

ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมเพิ่มขึ้นมากกว่า 5 mM ขึ้นไป พืชจะมีการเจริญเติบโตลดลง แต่ยังคงมีค่าการดูดซับแอมโมเนียมที่สูง ดังนั้น จอกหูหนูน่าจะเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่อาจนำมาใช้ในบึงประดิษฐ์ได้ โดยน้ำเสียต้องไม่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมมากเกินไปกว่า 5 mM ซึ่งอาจก่อผลเสียแก่พืชได้

โดยปกติพืชที่ได้รับแอมโมเนียมในปริมาณที่สูงมักจะมีปริมาณธาตุอาหารอื่นต่ำโดยเฉพาะธาตุอาหารที่มีประจุบวก ได้แก่ โพแทสเซียม (K^+), แคลเซียม (Ca^{2+}), แมกนีเซียม (Mg^{2+}) โดยเฉพาะโพแทสเซียมที่มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการศึกษาที่พบว่าในจอกหูหนูมีปริมาณโพแทสเซียมที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดจนโดยเฉพาะในส่วนของราก ซึ่งได้ผลคล้ายกันกับการศึกษาใน *Salvinia natans* และพืชน้ำชนิดอื่น ๆ (Jampeetong and Brix, 2009b; Dan and Brix, 2009; Konnerup and Brix, 2010) ในผักบุ้ง เนื่องจากพืชที่ปลูกในสารละลายที่มีแอมโมเนียมตั้งแต่ 10 mM ขึ้นไป ส่วนของรากพืชมีอาการเปื่อยยุ่ยและนำไปเป็นจำนวนมาก ซึ่งปริมาณที่เหลืออยู่ไม่เพียงพอแก่การวิเคราะห์ธาตุอาหาร แต่การคาดคะเนจากปริมาณธาตุอาหารในพืชที่ปลูกในสารละลายที่มีแอมโมเนียมสูงขึ้นมาถึง 5 mM พบว่าพืชมีปริมาณโพแทสเซียมลดลงตามลำดับ ดังนั้น ในพืชที่ได้รับแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นสูงนั้นจึงน่าจะมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญดังที่พบในจอกหูหนูหรือพืชน้ำชนิดอื่นเช่นกัน สำหรับปริมาณไนโตรเจนรวมในเนื้อเยื่อใบและรากนั้น พบว่า ในจอกหูหนูมีปริมาณไนโตรเจนรวมในใบลดลงเล็กน้อย ในขณะที่ส่วนรากมีปริมาณไนโตรเจนรวมเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณไนโตรเจนรวมในผักบุ้งนั้นมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นทั้งในรากและใบ ดังนั้น พืชทั้งสองชนิดนี้จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์อื่น ๆ ต่อไปได้หลังจากที่ได้เก็บเกี่ยวพืชนั้น ๆ แล้ว เช่น นำไปทำเป็นปุ๋ยหมักหรือนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ เช่นเดียวกับการนำเอา *S. molesta* ไปใช้เลี้ยงสุกร (Leterme, 2009; Somkol, 2009) หรือนำผักบุ้งไปใช้เลี้ยงกระต่าย เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่สูง เป็นต้น (Somkol, 2009)

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาทั้ง 2 การทดลอง สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. พืชทั้ง 4 ชนิด มีแนวโน้มการตอบสนองด้านการเจริญเติบโตที่ดี เมื่อได้รับไนโตรเจนอินทรีย์ในรูปของแอมโมเนียม โดยพืชลอยน้ำมีอัตราการเติบโตที่สูงกว่าพืชใต้น้ำ
2. พืชทั้ง 4 ชนิดมีอัตราการดูดซับแอมโมเนียมที่สูงกว่าในเตรตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจอกหูหนูมีอัตราการดูดซับทั้งแอมโมเนียมและไนเตรตสูงสุด รองลงมาคือ ผักบุ้ง กวักกา และแฟก ตามลำดับ
3. เมื่อปลูกจอกหูหนูและผักบุ้งในแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้นต่างกัน พบว่า พืชทั้งสองชนิดมีอัตราการเติบโตสูงสุด เมื่อปลูกด้วยแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้น 1 mM แต่เมื่อปลูกพืชดังกล่าวด้วยแอมโมเนียมที่มีความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mM พบว่าพืชทั้งสองชนิดจะมีอัตราการเติบโตลดลง พืชมีใบที่มีขนาดเล็ก รากสั้นและมีน้ำหนักรากน้อย พืชจะแสดงอาการอย่างชัดเจนเมื่อได้รับแอมโมเนียมความเข้มข้น 10 และ 15 mM
4. ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมในช่วง 1-5 mM พืชจะมีปริมาณไนโตรเจนรวมและธาตุอาหารหลักอื่นในปริมาณที่สูง ดังนั้น จอกหูหนูและผักบุ้งสามารถนำไปใช้เป็นพืชอาหารสัตว์หรือทำเป็นปุ๋ยได้หลังจากการเก็บเกี่ยว ซึ่งข้อมูลจากการศึกษานี้ พืชทั้งสองชนิดนี้สามารถนำไปใช้บำบัดน้ำเสียได้ แต่น้ำเสียนั้นควรมีการปนเปื้อนของแอมโมเนียมไม่มากกว่า 5 mM เช่น น้ำเสียจากครัวเรือนหรือพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณที่สูง แต่ในกรณีที่เป็นน้ำเสียที่มาจากฟาร์มสุกรที่อาจพบการปนเปื้อนของแอมโมเนียมสูงกว่า 10 mM นั้น อาจต้องมีการเจือจางน้ำเสียนั้น ๆ ก่อนนำเข้าสู่ระบบบำบัด ทั้งนี้เพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับรากพืช และอาจก่อให้เกิดการเน่าของต้นพืชซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการรบกวนการดูดซับสารอาหารที่มีในพืชกลับสู่ระบบบำบัดน้ำได้

เอกสารอ้างอิง

- จงจิตต์ วัฒนะวีระชัย และ พงษ์ศิริ ริยะภาส, 2545. การลดปริมาณแอมโมเนียจากน้ำเสียฟาร์มสุกรด้วยบ่อสาหร่าย (Ammumia removal from pig farm wastewater by algae pond). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 49 หน้า.
- ชนาธิป คำชมพู่ และ อัครวิทย์ หมื่นจิณะ. 2547. การควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงปลาโดยใช้บัวสาหร่าย (Water quality control in fish pond by using fanwort). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 45 หน้า.
- ชูลีพร วีระขจรศักดิ์. 2549. การควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงปลาโดยใช้ต้นดาวกระจาย. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 49 หน้า.
- สุชาติ ศรีเพ็ญ. 2542. พรรณไม้น้ำในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ ฯ.
- Aoi, T., Hayashi, T., 1996. Nutrient removal by water lettuce (*Pistia stratiotes*). Water Science Technology 34: 407-412.
- Armstrong, W., Justin, S.H.F.W., Beckett, P.M., Lythe, S. 1991. Root adaptation to soil waterlogging. Aquatic Botany 39: 57-73.
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M. and Kronzucker, H.J. 2001. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 98, 4255-4258.
- Britto, D.T. and Kronzucker, H.J. 2006. Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. Trends Plant Sci. 11, 529-534.
- Brix, H. 1997. Do macrophytes play a roles in constructed treatment wetlands? *Water Science and Technology* 35 (5): 11-17.
- Brix, H. and Schierup, H.-H. 1989. The use of aquatic macrophytes in water-pollution control. *Ambio* 18 (2): 100-107.
- Caicedo, J.R., van der Steen, N.P., Arce, O. and Gijzen, H.J. 2000. Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). Water Res. 34, 3829-3835.
- Cedergreen, N., Madsen, T.V. 2002. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. New Phytol. 155, 285-292.
- Cedergreen, N., Madsen, T.V. 2003. Nitrate reductase activity in roots and shoots of aquatic macrophytes. Aquat. Bot. 76, 203-212.
- Chapman, H.D. and Pratt, P.F. 1978. Methods of analysis for soils, plants and waters. Division of Agriculture Sciences. University of California. U.S.A.

- Conlin TSS, Crowder A.A. 1989. Location of radial oxygen loss and zones of potential iron uptake in a grass and two nongrass emergent species. *Canadian J. Bot.* 67, 717-722.
- Costa, R.H.R., Bavaresco, A.S.L., Medri, W., Philippi, L.S. 2000. Tertiary treatment of piggery wastes in water hyacinth ponds. *Water Science and Technology* 42: 211-214.
- Cronk, J.K and Fennessy, M.S. 2001. *Wetland Plants: Biology and Ecology*. CRC Press. New York. Pp. 3-15.
- Dan, T.H. and Brix, H. 2009. Growth responses of the perennial legume *Sesbania sesban* to NH_4^+ and NO_3^- nutrition and effects on root nodulation. *Aquat. Bot.* 91, 238-244.
- Dhote, S and Dixit, S. 2009. Water quality improvement through macrophytes - a review. *Environmental Monitoring and Assessment* 152: 149-153.
- Eugenia, O., Gloria, S.-G. and Teresa, P.-P. 2007. Assessment of the phytoremediation potential of *Salvinia minima* Baker compared to *Spirodela polyrrhiza* in high-strength organic wastewater. *Water, Air, Soil Pollut.* 181, 135-147.
- Campbell et al., 2008. *Biology*. 8th edition. Pearson Education Inc. U.S.A.
- Epstein, E., D.W. Rain and O.E. Elzam. 1963. Resolution of dual mechanisms of potassium by plant tissue. *Science* 136: 1051-1052.
- Fang, Y.Y., Babourina, O., Rengel, Z., Yang, X.E., Pu, P.M. 2007. Ammonium and nitrate uptake by the floating plant *Landoltia punctata*. *Ann. Bot.* 99, 365-370.
- Gojon, A., Plassard, C., Bussi, C. 1994. Root/shoot distribution of NO_3^- assimilation in herbaceous and woody species. In: Roy, J., Garnier, E. (Eds.), *A Whole Plant Perspective on Carbon-Nitrogen Interactions*. SPB Academic Publishing, Hague, pp. 131-148.
- Crawford, N.M., Campbell, W.H., Davis, R.W. 1986. Nitrate reductase from squash-cDNA cloning and nitrate regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8073-8076.
- Greenway, M. 2007. The role of macrophytes in nutrient removal using constructed wetlands. In: Shree, N. and Rudra, D.T., eds. *Environmental Bioremediation Technologies*. New York. Pp. 331-351.
- Hanlon, E.A., Gonzales, J.G. and Bartos, J.M. 1994. Soil testing laboratory chemical procedures and training manual. Circular 812, Institute Food and agricultural Science, University of Florida, Gainesville, FL.
- Horne, A., Goldman, C.R. 1994. *Limnology*. McGraw-Hill, Inc., Singapore.
- Iamchaturapatr, J., Yi, S. and Rhee, J. 2007. Nutrient removals by 21 aquatic plants for vertical free surface-flow (VFS) constructed wetland. *Ecol. Eng.* 29, 287-293.

- Jackson, 2001. Water in the changing world. *Ecological Society of America* 9: 1-17.
- Jampeetong, A., Brix, H. 2009a. Nitrogen nutrition of *Salvinia natans*: Effect of inorganic nitrogen form on growth, morphology, nitrate reductase activity and uptake kinetics of ammonium and nitrate. *Aquatic Botany* 90: 67-73.
- Jampeetong, A. and Brix, H. 2009b. Effects of NH_4^+ concentration on growth, morphology and NH_4^+ uptake kinetics of *Salvinia natans*. *Ecological Engineering* 35: 695-702.
- Jampeetong, A., Brix, H. 2009c. Oxygen stress in *Salvinia natans*: Interactive effects of oxygen availability and nitrogen source. *Environ. Exp. Bot.* 66, 153-159.
- Hirsch, R.E. et al. 1998. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280: 918-921.
- Kitoh, S, Shiomi, N, Uheda, E. 1993. The growth and nitrogen fixation of *Azolla filiculoides* Lam. in polluted water. *Aquat Bot* 46: 129-139.
- Konnerup, D. Koottatep T. and Brix, H. 2009. Treatment of domestic wastewater in tropical, subsurface flow constructed wetlands planted with *Canna* and *Heliconia*. *Ecological Engineering* 35: 248-257.
- Konnerup, D., Brix, H. 2010. Nitrogen nutrition of *Canna indica*: Effects of ammonium versus nitrate on growth, biomass allocation, photosynthesis, nitrate reductase activity and N uptake rates. *Aquat. Bot.* 92, 142-148.
- Leterme *et al.* 2009. Nutritional value of aquatic ferns (*Azolla filiculoides* Lam. and *Salvinia molesta* Mitchell) in pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 149: 135-148.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Litav, M. and Lehrer, Y. 1978. The effects of ammonium in water on *Potamogeton lucens*. *Aquat. Bot.* 5, 127-138.
- Maine, M.A., Sune, N., Hadad, H., Sanchez, G., Bonetto, C. 2006. Nutrient and metal removal in a constructed wetland for wastewater treatment from a metallurgic industry. *Ecological Engineering* 26: 341-347.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of Higher plants. 2nd edition. Academic press. New York.
- McFarland, D.G., Nelson, L.S., Grodowitz, M.J., Smart, R.M., Owens, C.S. 2004. *Salvinia molesta* D.S. Mitchell (Giant *Salvinia*) in the United States: A review of species ecology and approaches to management. Environmental laboratory ERDC/EL SR-04-2, US

- Army Corps of Engineer, Engineer Research and Development Center, Washington, D. C. pp. 1-33.
- Miller, A., and Cramer, M. 2005. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274, 1–36.
- Mohan, B.S. 2006. Phytotoxicity of cadmium on the physiological dynamics of *Salvinia natans* L. grown in macrophyte ponds. *J. Environ. Biol.* 27, 701-704.
- Monselise, E.B.-I. and Kost, D. 1993. Different ammonium-ion uptake, metabolism and detoxification efficiencies in two Lemnaceae. *Planta* 189, 167-173.
- Nahlik, A.M., Mitsch, W.J. 2006. Tropical treatment wetlands dominated by free-floating macrophytes for water quality improvement in Costa Rica. *Ecological Engineering* 28: 246-257.
- Olguin, E.J., Rodriguez, D., Sanchez, G., Hernandez, E. and Ramirez, M.E. 2003. Productivity, protein content and nutrient removal from anaerobic effluents of coffee wastewater in *Salvinia minima* ponds, under subtropical condition. *Acta Biotechnol.* 23. 259-270.
- Palmgren, M.G. 2001. Plant plasma membrane H⁺ ATPase: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Plant.Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 52: 817-845.
- Romero, J.A., Brix, H., Comin, F.A., 1999. Interactive effects of N and P on growth, nutrient allocation and NH₄⁺ uptake kinetics by *Phragmites australis*. *Aqua. Bot.* 64, 369-380.
- Smart R.M. and Barko J.W. 1985. Laboratory culture of submerged freshwater macrophytes on natural sediments. *Aquatic Botany* 21: 251-263.
- Somkol, P. 2009. Water spinach (*Ipomoea aquatica*) as a feed resource for growing rabbits. *Revista Computadorizada de Produccion Porcina* 16, 91-99.
- Sorrell, B. and Brix, H. 1993. H⁺ uptake and nutrient uptake by roots of emergent hydrophytes, *Cyperus involucratus* Rottb., *Eleocharis sphacelata* R.Br. and *Juncus ingens* N.A. Wakef. *New Phytol.* 125, 85-92.
- Szczerba, M.W. et al., 2006. Rapid, futile K⁺ cycling and pool-size dynamics define low-affinity potassium transport in barley. *Plant physiol.* 141. 1494-1507.
- Taiz, L. and Zeiger, E., 2002, *Plant Physiology*, 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. U.S.A.
- Thomaz *et al.* 2004. Aquatic macrophytes: Diversity, biomass and decomposition. The upper Parana and its floodplain: Physical aspects, ecology and conservation. Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands. Pp. 331-352.

- Tylova-Munzarova, E., Lorenzen, B., Brix, H., Votrubova, O. 2005. The effects of NH_4^+ and NO_3^- on growth, resource allocation and nitrogen uptake kinetics of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *Aquat. Bot.* 81, 326-342.
- Vermaat, J.E., Hanif, M.K. 1998. Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the waterfern *Azolla filiculoides* on different types of waste water. *Water Research* 32: 2569-2576.
- Zutshi, D.P., Vass, K.K. 1971. Ecology and production of *Salvinia natans* Hoffm; in Kashmir. *Hydrobiologia* 38, 303-320.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 Jampeetong, A.*, Brix, H. and Kantawanichkul, S. Effects of inorganic nitrogen forms on growth, morphology, nitrogen uptake capacity and nutrient allocation of four tropical aquatic macrophytes (*Salvinia cucullata*, *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides*).

Submitted to Aquatic Botany (under revised)

1.2 Jampeetong, A.* and Kantawanichkul. Responses of *Salvinia natans* to high NH_4^+ concentrations in the laboratory scale.

Submitted to Ecotoxicology and Environmental Safety (under review)

1.3 Jampeetong, A.* and Whangchai, N. Effects of ammonium concentration on water spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk.): responses of growth, morphology, uptake rate and nutrients allocation.

Submitted to Maejo International Science and Technology (under reviewed)

ภาคผนวก

Effects of inorganic nitrogen forms on growth, morphology, nitrogen uptake capacity and nutrient allocation of four tropical aquatic macrophytes (*Salvinia cucullata*, *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides*)

Arunothai Jampeetong^{a*}, Hans Brix^b and Suwasa Kantawanichkul^c

^a Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Meuang, Chiang Mai 50202, Thailand

^b Department of Biological Sciences, Plant Biology, Aarhus University, Ole Worms Allé 1, 8000 Aarhus C, Denmark

^c Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author. Tel.: +66 53 943346-51; fax: +66 53 892259.

E-mail address: ajampeetong@yahoo.com (A. Jampeetong).

Abstract

This study assesses the growth and morphological responses, nitrogen uptake and nutrient allocation in four aquatic macrophytes when supplied with different inorganic nitrogen treatments 1) NH_4^+ , 2) NO_3^- , or 3) both NH_4^+ and NO_3^- . Two free-floating species (*Salvinia cucullata* Roxb. ex Bory and *Ipomoea aquatica* Forssk.) and two emergent species (*Cyperus involucratus* Rottb. and *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) were grown with the different N treatments in equimolar concentrations (500 μM). Overall, the plants responded well to NH_4^+ . Growth was highest in *S. cucullata* ($0.12 \pm 0.003 \text{ d}^{-1}$) followed by *I. aquatica* ($0.035 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$), *C. involucratus* ($0.03 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$) and *V. zizanioides* ($0.02 \pm 0.003 \text{ d}^{-1}$). The NH_4^+ uptake rate was significantly higher than the NO_3^- uptake rate. Free-floating species had a higher nitrogen uptake rate than emergent ones. Our results show that N-uptake rate depends on plant species and its corresponding growth rate, most clearly demonstrated in *S. cucullata* which had the highest growth rate and also a high uptake rate. All species had a high NO_3^- uptake rate when the plants were supplied with only NO_3^- . It seems that the NO_3^- transporters in the plasma membrane of the root cell and nitrate reductase activity (NRA) were induced by external NO_3^- . Analysis of mineral contents in the plant tissue of each species varied depending on the N treatment between leaves and roots, and the specific mineral tested. The results of growth and N-uptake of the four species in this study suggest that *S. cucullata* and *I. aquatica*, which are free-floating macrophytes, can be used to remove N from domestic or agricultural wastewater. Additionally, biomass rich in N is generated making it a good post-harvest fertilizer or animal feed.

Key Words: constructed wetland, *Cyperus involucratus*, *Ipomoea. aquatica*, N-uptake, *Salvinia cucullata*, *Vetiveria zizanioides*

1. Introduction

The capacity of aquatic macrophytes to remove and assimilate excess nutrients in constructed wetlands (CWs) has resulted in the use of CWs for treating a variety of wastewater types. Ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) are major forms of inorganic nitrogen found in wastewater runoff from households and farmlands that degrade the water quality. Plants have an important role in CWs for removing nutrients. The ability to take up nitrogen, a vital nutrient for plant growth, is different among plant species. Free-floating macrophytes directly obtain nitrogen and other nutrients through their roots from the water column. Many species of these plants such as *Eichornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Lemna* spp., *Salvinia* spp. etc. have been used in free water surface systems. In contrast, subsurface flow system and vertical flow system are dominated by emergent macrophytes, which obtain nutrients from sediment via roots (Brix and Schierup, 1989; Ran et al., 2004; Jamchaturapatr et al., 2007; Kantawanichkul et al., 2009).

Plant selection for water treatment is an equally important component of CW system design, especially selecting suitable plants for different types of wastewater. Various nitrogen forms have different effects on growth and nitrogen uptake of plants, but few studies have been conducted. Several studies have shown that aquatic macrophytes grow well in the water column or sediment where NH_4^+ is the main nitrogen source probably because less energy is needed for NH_4^+ uptake and assimilation (Room and Thomas, 1986; Petrucio and Esteves, 2000; Fang et al., 2007; Jampeetong and Brix, 2009a; Konnerup and Brix, 2010). The ecophysiology of tropical aquatic macrophyte is not well understood. However, many tropical plants have been used in water treatment (Boonsong and Chansiri, 2008; Kantawanichkul et al., 2009; Konnerup et al., 2009). The potential of

the aquatic macrophytes to grow and take up nitrogen in tropical climates has not been intensively studied, but it is an important criterion used in plant selection for tropical CWs.

Salvinia cucullata and *Ipomoea aquatica* are free-floating macrophytes. Many species of *Salvinia* have a high growth rate and high dispersal rate and have consequently been distributed around the world. A study by Jampeetong and Brix (2009a) showed that *Salvinia natans* has an increased growth rate when plants are supplied with NH_4^+ . This species grows well in the water column with an NH_4^+ concentration up to 5 mM, which is approximately the level commonly found in domestic wastewater (Jampeetong and Brix, 2009b). Similarly, *I. aquatica* can be found in water bodies with high N and P concentrations. The evidences showed that *I. aquatica* can remove nutrients and also some heavy metals in the water treatment systems (Göthberg et al., 2002; Lin et al., 2002; Li et al. 2007; Weerasinghe et al., 2008). Moreover, this species is an edible plant, so after harvesting it can be used to feed animals because of its high total N and crude protein (Somkol, 2009). However, the responses of *S. cucullata* and *I. aquatica* to various forms of N are unknown. Emergent macrophytes like *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides* have been used in tropical CWs (Kantawanichkul et al., 2009; Xiao et al., 2009). *Cyperus involucratus* has been used in tropical CWs because of its ability to grow in eutrophic conditions. *Vetiveria. zizanioides* has been used for protecting against soil erosion and also in water treatment systems in Southeast Asia, because it is tolerant to various conditions and can be harvested and used for many proposes. However, information concerning nitrogen uptake and mineral allocation of these species is limited.

Here, we assess the growth and morphological responses of four selected tropical aquatic macrophytes to different forms of inorganic nitrogen. We also evaluate nitrogen uptake and nutrient allocation in the plant tissue when the plants are supplied with NH_4^+ , NO_3^- , and combined NH_4NO_3 treatment. The results from this study will be useful when selecting aquatic macrophytes to be used in tropical constructed wetlands.

2. Materials and Methods

2.1 Plant materials and growth conditions

Plants with similar weights and/or height (depending on the species) (*Salvinia cucullata* Roxb. ex Bory, *Ipomoea aquatica* Forssk., *Cyperus involucratus* Rottb. and *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) were selected and cultivated in hydroponic culture in the greenhouse at the Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand at a temperature range of 32–35 °C during the day and 22–25 °C at night. The light regime was approximately 80% of full sun and the light:dark cycle was 14:10 h. The growth medium was a full-strength standard nitrogen-free nutrient solution (Smart and Barko, 1985) to which a commercial N and P free nutrient solution for aquarium plants (Tropica Master Grow, Tropica Aquacare, Aarhus, Denmark) was added until the following concentrations were reached (μM): K^+ 21, Mg^{2+} 16.7, S^{2-} 32.8, B^{3+} 0.4, Cu^{2+} 0.1, Fe^{2+} 1.3, Mn^{2+} 0.8, Mo 0.02 and Zn^{2+} 0.03. Phosphorus was added in the form of KH_2PO_4 (100 μM). The pH of the growth medium was adjusted to 7.0.

Nitrogen was applied as NH_4^+ and/or NO_3^- in equimolar concentrations (500 μM) to create the following three treatments: (i) 500 μM NH_4^+ (ii) 500 μM NO_3^- , and (iii) 250 μM NH_4NO_3 . Ten replicates of *I. aquatica*, *C. involucratus* and *V. zizanioides* and five replicates of *S. cucullata* were used for each treatment. The initial fresh weights of all experimental plants were measured and the fresh and dry weights of ten uniform sized

plants were measured to estimate dry weight and fresh weight ratio. Fronds from *Salvinia* stock cultures (approximately 2 g) and *I. aquatica* (approximately 10 g and 30 cm tall) were placed in 5-L containers and *C. involucratus* (approximately 7 g and 15 cm tall) and *V. zizanioides* (approximately 6 g and 20 cm tall) were placed in 1-L containers. All treatments were arranged in a randomized complete block design in the greenhouse. In order to avoid depletion of nutrients the growth medium was replaced every two days.

2.2 Growth study

After four weeks for *I. aquatica* and *S. cucullata* and six weeks for *C. involucratus* and *V. zizanioides*, all plants were harvested, cleaned, and their morphological characteristics recorded. Plants were then separated into shoots and roots, freeze dried and weighed. The relative growth rate (d^{-1}) for each treatment was calculated using the formula: $RGR = \ln W_2 - \ln W_1 / (t_2 - t_1)$, where W_1 and W_2 are the initial and final dry weights (g), and t_1 and t_2 are initial and final time (days).

2.3 N uptake rate

After growth experiment, both the NO_3^- and NH_4^+ uptake rates were determined. Plants of uniform size ($n=4$) from each treatment were pre-incubated for 18 h in a container with a N-free growth medium for NH_4^+ and NO_3^- under the same conditions as the growth study. After pre-incubation, *I. aquatica*, *C. involucratus*, and *V. zizanioides* were placed in 240 ml vessels with 500 μM NO_3^- or NH_4^+ , *S. cucullata* was placed in a 300 ml beaker. NO_3^- and NH_4^+ uptake was estimated based on N depletion (Konnerup and Brix, 2010). The NH_4^+ concentration in all samples was analysed using a modified salicylate method (Quikchem Method no. 10-107-06-3-B; Lachat Instruments, Milwaukee, WI, USA). The NO_3^- concentration was analysed from the absorbance at 202 nm and 250 nm

(Cedergreen and Madsen, 2003). After the uptake experiment (6 hours), all plants were separated into shoots and roots, freeze dried and weighed. The N uptake rate was calculated from a depletion curve with linear regression analyses and related to volume and root dry weight (DW).

2.4 Chlorophyll content

The contents of Chl *a*, Chl *b* and total Chl *a+b* in the leaves of each plants were analysed according to Lichtenthaler (1987). Freeze dried leaves from each plant were cut into small pieces and weighed into 5–10 mg samples. Pigments were extracted with 8 ml of 96% ethanol in the dark at room temperature. After 24 hours, the absorbance of the extracts was measured at 648.6 nm and 664.2 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Lambda 25 version 2.85.04, USA).

2.5 Mineral elements

The concentration of total N, phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca) and magnesium (Mg) in the plant tissue was analysed in subsamples (150–180 mg) of finely ground freeze dried plant material. The samples were digested by mixing with 7 ml of an acid solution (concentrate H₂SO₄ 1 L., K₂SO₄ 100 g and selenium 1 g) at a temperature range of 100–330 °C. Total N was analysed by the Kjeldahl method (Hanlon et al. 1994) and the concentrations of P, K, Ca and Mg were analyzed according to Chapman and Pratt (1978).

2.6 Statistics

All statistics were carried out using the software Statgraphics Plus ver. 4.1 (Manugistics, Inc., MD, USA). Data were tested for normal distribution and homogeneity of variance

using Cochran's C-test. If necessary, data were log-transformed to ensure homogeneity of variance. The data was tested by both one way and two-way analysis of variance (ANOVA). Differences between treatments were identified by the Tukey HSD's test at a 5% significance level.

3. Results

3.1 Growth study

The relative growth rate (RGR) of plants varied between species and was affected by N-source (Fig. 1a, Table 1). On average, *Salvinia cucullata* had a relative growth rate ($0.12 \pm 0.003 \text{ d}^{-1}$) that was 4, 4 and 7 times higher than the RGR of *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides*, respectively. Increase in RGR when supplied with NH_4^+ was found in both *C. involucratus* and *V. zizanioides* (Fig. 1a). There were 43% and 82% increases in the RGRs of NH_4^+ fed plants compared to NO_3^- fed plants in *C. involucratus* and *V. zizanioides*, respectively.

3.2 Morphological characteristics

Both root length and root number was affected by plant species and N source and a significant interaction was observed (Table 1, Fig. 1b,1c). The longest roots were found in *V. zizanioides*, followed by *C. involucratus*, *I. aquatica* and *S. cucullata*, (Fig.1b). New shoot production was different among plant species and was independent of N source. The data show that *I. aquatica* and *C. involucratus* produced new shoots faster than *V. zizanioides*.

3.3 Chlorophyll content

Both plant species and N source interactively affected Chl *a*, Chl *b* and total Chl *a+b* (Table 1). Average chlorophyll content was highest in *I. aquatica*, followed by *S. cucullata*, *C. involucratus* and *V. zizanioides* (Table 2). It was obvious that the chlorophyll contents of plants fed on NH_4^+ was significantly greater than for plants supplied with NO_3^- , except *I. aquatica* that the chlorophyll contents was high in NH_4NO_3 treatment.

3.4 N- uptake

Nitrogen uptake differed among plant species. Generally, all species had higher uptake rates for NH_4^+ than for NO_3^- (Fig.1d, 1e). *Salvinia cucullata* had the highest rates of both NH_4^+ and NO_3^- uptake and significantly differed from other species. The NO_3^- uptake was affected by both plant species and N-source and a significant interaction was observed (Table 1). For all species, the NO_3^- uptake rate was high in plants supplied with only NO_3^- either by itself or in the combined NH_4NO_3 treatment.

3.5 Mineral elements

Most mineral contents (N, P, Ca, K, Mg) both in leaves and roots differed among the four investigated species (Fig. 2). The concentration of N and P in leaves and K content in roots were significantly affected by both plant species and N-source and a significant interaction was observed (Table 1). The lowest mineral contents was found in *V. zizanioides*; both in its leaves and in its roots. The N concentration of each species was higher in the leaves than in the roots. In *S. cucullata*'s leaves the N concentration was high in both NH_4^+ and NH_4NO_3 fed plants and it was significantly different from NO_3^- fed plants, whereas the N concentration in the roots of *S. cucullata* was significantly high only in the NH_4^+ treatment. The P concentration in the leaves of *S. cucullata* were

significantly lower in NO_3^- fed plants than in NH_4^+ fed plants. The P content in the roots of *C. involucratus* was high in NO_3^- fed plants and it was significantly different from other treatments. Other cation minerals were only slightly affected by N sources in all four species investigated. In *C. involucratus* fed with NO_3^- we found increased Mg concentration in its leaves. We also found a high concentration of Ca in the leaves of *V. zizanioides* grown on NO_3^- . *I. aquatica* fed with NH_4^+ had high concentrations of Ca in their leaves, which were significantly different from the plants fed with either NO_3^- or NH_4NO_3 .

4. Discussion

The relative growth rate (RGR) of free-floating plants was higher than emergent plants. In nature, free-floating plants obtain nutrients from the water column through its roots. Some species can also absorb nutrients through the underside of their leaves (Cedergreen and Madsen, 2002; Fang et al., 2007). In *S. cucullata*, most mature leaves were raised up above the water surface, so nutrient uptake via leaves of this species is small compared to root absorption. Generally, *Salvinia* spp. has both a high growth rate ($0.1\text{--}0.4\text{ d}^{-1}$) and a high dispersal rate (double its mats in 2–4 days) compared to other aquatic plants (McFarland et al., 2004). The present study showed growth of *S. cucullata* ranged from $0.12\text{--}0.13\text{ d}^{-1}$ and RGR was unaffected by the N source, unlike *S. natans* and *S. molesta* which had a higher growth rate when NH_4^+ was the main N source (Jampeetong and Brix, 2009a; McFarland et al., 2004). Its high growth rate makes *Salvinia cucullata* good candidate for treating various types of nitrogen rich wastewaters like other species of *Salvinia* (Olguin et al., 2003; Henry-Silva and Camargo, 2006; Eugenia et al., 2007). Nitrogen preferences of aquatic macrophytes are still not well documented. In this study, most species tended to respond better to NH_4^+ compared to NO_3^- , especially *C.*

involucratus and *V. Zizanioides*, which had an increased RGR when grown with NH_4^+ . Similar to the study by Tylova-Munzarova et al. (2005), *Glyceria maxima* had an increased growth rate when supplied with NH_4^+ . There are many aquatic species that prefer NH_4^+ as a main N-source, possibly because of the low energy used for its uptake and assimilation (Miller and Cramer, 2005; Fang et al., 2007; Jampeetong and Brix, 2009a; Konnerup and Brix, 2010). The study of Sorrell and Orr (1993) showed that *C. involucratus* had a high H^+ exchange rate and a high N-uptake rate when NH_4^+ was a nitrogen source. This result is found in other plants including *Carex rostrata*, *Typha latifolia* and *Phragmites australis* (Conlin and Crowder, 1989). *Vetiveria zizanioides* also responded to NH_4^+ better than NO_3^- . This plant has a deep root system with dense lateral roots, but a low growth rate and low N-uptake rate compared to other species in this study. Thus, it is suggested that this species is more suitable for soil stabilization than for N removal in wastewater treatment systems.

The free-floating macrophytes had a higher N-uptake rate than the rates found in emergent macrophytes. The N-uptake rate depends on plant species and its growth rate. *Salvinia cucullata* had a very high growth rate, so the plant probably increases its demand for N by increasing the capacity of N-uptake. *Salvinia cucullata* had the highest uptake rate for both NH_4^+ and NO_3^- . The average rate was $640.0 \pm 161 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$ and was similar to *S. natans*, which had an average uptake rate of $679 \pm 97 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$ (Jampeetong and Brix, 2009a). The N uptake capacity of the emergent macrophytes is low even though the plants have either more roots or greater root length than free-floating macrophytes. Roots are important for nutrient uptake in emergent macrophytes, in which the uptake rate can be low or non-existent in old roots which have thick epidermal and hypodermal lignification, and suberization (Sorrell et al., 1993). In

contrast to *Salvinia* roots which have less or no lignified epidermis and a hypodermis that can absorb nutrients directly from the water column through all part of the roots (Jampeetong and Brix, 2009c). Besides plant species and growth rate affecting N uptake, external N supplies can also influence NO_3^- uptake. Most species significantly increased NO_3^- uptake rate when external NO_3^- was present, similar to other studies (Crawford et al., 1986; Gojon et al., 1994; Cedergreen and Madsen, 2002; Jampeetong and Brix, 2009a; Konnerup and Brix, 2010). Several studies indicated that NO_3^- transporters in the plasma membrane of the root cells and nitrate reductase were induced by external NO_3^- to different degrees, depending on plant species. High nitrate reductase activity was found in roots of most free floating species (Cedergreen and Madsen, 2003). In contrast, the NRA in emergent macrophytes was higher in the leaves than in the roots (Munzarova et al., 2006). A study by Konnerup and Brix (2010) showed that *Canna indica* had high NRA in the leaves and NO_3^- uptake was not significantly affected by the type of N-source. This data suggests that NO_3^- reduction and assimilation occurs in the leaves because of the energetic advantage of reducing NO_3^- in photosynthetic tissue.

Concentration of mineral cations (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) were generally low in the plants fed with NH_4^+ (Tylova- Munzarova et al., 2005; Dan and Brix, 2009). *Salvinia natans* had low mineral cation concentrations in plant tissue, especially in the roots when the plants were grown on a NH_4^+ culture. (Jampeetong and Brix, 2009a). However, the present study showed that the N- source only slightly affects mineral concentration in the plant tissue of most plant species. Similar results were found for *Canna indica* and *Sesbania sesban* which have been used in tropical CWs, and had a small changes in mineral concentration in plant tissue when the plants were supplied with different N-sources (Dan and Brix, 2009; Konnerup and Brix, 2010). Because of high mineral and protein contents

as well as a fast growth rate, *S. cucullata* and *I. aquatica* are ideal for use as feed crops for animals or fertilizers (Leterme et al., 2009; Somlöl, 2009)

In conclusion, the growth of four aquatic macrophytes is different among species and some species are affected by different N-sources. *S. cucullata* had the highest RGR and N-uptake. NH_4^+ is the preferred N-form, all species had a higher NH_4^+ uptake rate than NO_3^- . All species tended to have a high NO_3^- uptake rate when plants were supplied with NO_3^- alone. The results of growth and N-uptake of the four species in this study suggest that *S. cucullata* and *I. aquatica*, which are free-floating macrophytes, can be used to remove N from domestic or agricultural wastewater. Additionally, biomass rich in N is generated making it a good post-harvest fertilizer or animal feed.

Acknowledgements

The study was funded by The Thailand Research Fund and Commission on Higher Education, Project No. MRG5280224.

References

- Boonsong, K., Chansiri, M., 2008. Domestic wastewater treatment using vetiver grass cultivated with floating platform technique. Assumption University J. Technol. 12, 73-80.
- Brix, H., Schierup, H.-H., 1989. The use of aquatic macrophytes in water-pollution control. Ambio 18, 100-107.
- Chapman, H.D., Pratt, P.F. 1978. Methods of analysis for soils, plants and waters. Division of Agriculture Sciences. University of California. U.S.A.

- Cedergreen, N., Madsen, T.V., 2002. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. *New Phytol.* 155, 285-292.
- Cedergreen, N., Madsen, T.V., 2003. Nitrate reductase activity in roots and shoots of aquatic macrophytes. *Aquat. Bot.* 76, 203–212.
- Conlin TSS, Crowder A.A., 1989. Location of radial oxygen loss and zones of potential iron uptake in a grass and two nongrass emergent species. *Canadian J. Bot.* 67, 717-722.
- Crawford, N.M., Campbell, W.H., Davis, R.W., 1986. Nitrate reductase from squash-cDNA cloning and nitrate regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8073-8076.
- Dan, T.H., Brix, H., 2009. Growth responses of the perennial legume *Sesbania sesban* to NH_4^+ and NO_3^- nutrition and effects on root nodulation. *Aquat. Bot.* 91, 238-244.
- Eugenia, O., Gloria, S.-G., Teresa, P.-P., 2007. Assessment of the phytoremediation potential of *Salvinia minima* Baker compared to *Spirodela polyrrhiza* in high-strength organic wastewater. *Water, Air, Soil Pollut.* 181, 135-147.
- Fang, Y.Y., Babourina, O., Rengel, Z., Yang, X.E., Pu, P.M., 2007. Ammonium and nitrate uptake by the floating plant *Landoltia punctata*. *Ann. Bot.* 99, 365-370.
- Gojon, A., Plassard, C., Bussi, C., 1994. Root/shoot distribution of NO_3^- assimilation in herbaceous and woody species. In: Roy, J., Garnier, E. (Eds.), *A Whole Plant Perspective on Carbon–Nitrogen Interactions*. SPB Academic Publishing, Hague, pp. 131–148.
- Göthberg, A., Greger, M., Bengtsson, B.-E., 2002. Accumulation of heavy metals in water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated in the Bangkok region, Thailand. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1934-1939.

- Hanlon, E.A., Gonzales, J.G., Bartos, J.M., 1994. Soil testing laboratory chemical procedures and training manual. Circular 812, Institute Food and agricultural Science, University of Florida, Gainesville, FL.
- Henry-Silva, G.G., Camargo, A.F.M., 2006. Efficiency of aquatic macrophytes to treat Nile tilapia pond effluents. *Sci. Agric.* 63, 433-438.
- Iamchaturapatr, J., Yi, S., Rhee, J., 2007. Nutrient removals by 21 aquatic plants for vertical free surface-flow (VFS) constructed wetland. *Ecol. Eng.* 29, 287-293.
- Jampeetong, A., Brix, H., 2009a. Nitrogen nutrition of *Salvinia natans*: Effect of inorganic nitrogen form on growth, morphology, nitrate reductase activity and uptake kinetics of ammonium and nitrate. *Aquat. Bot.* 90, 67-73.
- Jampeetong, A., Brix, H., 2009b. Effects of NH_4^+ concentration on growth, morphology and NH_4^+ uptake kinetics of *Salvinia natans*. *Ecol. Eng.* 35, 695-702.
- Jampeetong A., Brix, H., 2009c. Oxygen stress in *Salvinia natans*: Interactive effects of oxygen availability and nitrogen source. *Environ. Exp. Bot.* 66, 153- 159.
- Kantawanichkul, S., Kladprasert, S., Brix, H., 2009. Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucratus*. *Ecol. Eng.* 35, 238-247.
- Konnerup, D., Koottatep, T., Brix, H., 2009. Treatment of domestic wastewater in tropical, subsurface flow constructed wetlands planted with *Canna* and *Heliconia*. *Ecol. Eng.* 35, 248-257.
- Konnerup, D., Brix, H., 2010. Nitrogen nutrition of *Canna indica*: Effects of ammonium versus nitrate on growth, biomass allocation, photosynthesis, nitrate reductase activity and N uptake rates. *Aquat. Bot.* 92, 142-148.
- Leterme et al., 2009. Nutritional value of aquatic ferns (*Azolla filiculoides* Lam. and *Salvinia molesta* Mitchell) in pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 149, 135-148.

- Li, M., Wu, Y.-J., Yu, Z.-L., Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., 2007. Nitrogen removal from eutrophic water by floating-bed-grown water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk.) with ion implantation. *Water Res.* 41, 3152-3158.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148, 350–382.
- Lin, Y.F., Jing, S.R., Lee, D.Y., Wang, T.W., 2002. Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system. *Aquaculture* 209, 169-184.
- McFarland, D.G., Nelson, L.S., Grodowitz, M.J., Smart, R.M., Owens, C.S., 2004. *Salvinia molesta* D.S. Mitchell (Giant *Salvinia*) in the United States: A review of species ecology and approaches to management. Environmental laboratory ERDC/EL SR-04-2, US Army Corps of Engineer, Engineer Research and Development Center, Washington, D. C. pp. 1-33.
- Miller, A., Cramer, M., 2005. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274, 1–36. Germany.
- Munzarova, E., Lorenzen, B., Brix, H., Vojtiskova, L., Votrubova, O., 2006. Effect of NH_4^+ / NO_3^- availability on nitrate reductase activity and nitrogen accumulation in wetland helophytes *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *Environ. Exp. Bot.* 55, 49–60.
- Olguin, E.J., Rodriguez, D., Sanchez, G., Hernandez, E., Ramirez, M.E., 2003. Productivity, protein content and nutrient removal from anaerobic effluents of coffee wastewater in *Salvinia minima* ponds, under subtropical condition. *Acta Biotechnol.* 23, 259-270.
- Ran, N., Agami, M., Oron, G., 2004. A pilot study of constructed wetlands using duckweed (*Lemna gibba* L.) for treatment of domestic primary effluent in Israel. *Water Res.* 38, 2241-2248.

- Petrucio, M.M., Esteves, F.A., 2000. Influence of photoperiod on the uptake of nitrogen and phosphorus in the water by *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata*. Rev. Bras. Biol. 60, 373-379.
- Room, P.M., Thomas, P.A., 1986. Nitrogen, phosphorus and potassium in *Salvinia molesta* Mitchell in the field: effects of weather, insect damage, fertilizers and age. Aquat. Bot. 24, 213-232.
- Smart, R.M., Barko, J.W., 1985. Laboratory culture of submerged freshwater macrophytes on natural sediments. Aquat. Bot. 21, 251–263.
- Somkol, P. 2009. Water spinach (*Ipomoea aquatica*) as a feed resource for growing rabbits. Revista Computadorizada de Produccion Porcina. 16, 91-99.
- Sorrell, B.K., Brix, H., Orr, P.T., 1993. Oxygen exchange by entire root systems of *Cyperus involocratus* and *Eleocharis sphacelata*. J. Aquat. Plant Manage. 31, 24-28.
- Sorrell, B.K., Orr, P.T., 1993. H⁺ uptake and nutrient uptake by roots of emergent hydrophytes, *Cyperus involocratus* Rottb., *Eleocharis sphacelata* R.Br. and *Juncus ingens* N.A. Wakef. New Phytol. 125, 85-92.
- Tylova-Munzarova, E., Lorenzen, B., Brix, H., Votrubova, O., 2005. The effects of NH₄⁺ and NO₃⁻ on growth, resource allocation and nitrogen uptake kinetics of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. Aquat. Bot. 81, 326-342.
- Weerasinghe, A., Ariyawansa, S., Weerasooriya, R., 2008. Phyto-remediation potential of *Ipomoea aquatica* for Cr(VI) mitigation. Chemosphere 70, 521-524.
- Xiao W., Bao-ping, H., Ying-zheng, S., Zong-qiang, P., 2009. Advanced wastewater treatment by integrated vertical flow constructed wetland with *Vetiveria zizanioides* in north China. Procedia Earth and Planetary Science 1, 1258–1262.

Legends to figure

Fig. 1 a: Relative growth rate, b: root length, c: root number, d: NH_4^+ uptake rate ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) and e: NO_3^- uptake rate ($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ root DW h}^{-1}$) (mean $\pm$ SE) of *Salvinia cucullata*, *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides* supplied with different N sources ( NH_4^+ ,  NO_3^- ,  NH_4NO_3). Different letters above the columns indicate significant differences between the treatments within each species and different capital letters over the horizontal bars indicate significant differences between the plant species.

Fig. 2 Effects of N-sources on the concentrations of total N (a,f), P (b,g), K (c,h), Ca (d,i) and Mg (e,j) in leaves and roots (mean $\pm$ SE) of *Salvinia cucullata*, *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides* grown on different N-sources( NH_4^+ ,  NO_3^- ,  NH_4NO_3). Different letters above the columns indicate significant differences between the treatments within each species and different capital letters over the horizontal bars indicate significant differences between the plant species.

Table 1 Results of a two-way ANOVA (F-ratios) of growth, morphological characteristics, chlorophyll concentrations, N-uptake rate and mineral concentrations of *Salvinia cucullata*, *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides* grown with different N-sources (500 μM NH_4^+ , 500 μM NO_3^- and 250 μM NH_4NO_3).

	Main effect		Interaction
	Plant species	N-source	Plant species x N-source
RGR (d^{-1})	311.8 ***	0.85	1.42
Root number	14.4 ***	3.22*	2.42*
Root length (cm)	68.0 ***	2.5	3.25**
New shoots	80.6***	0.5	1.45
NH_4^+ uptake rate ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{root DW h}^{-1}$)	114.0 ***	2.89*	3.17*
NO_3^- uptake rate ($\mu\text{mol NO}_3^- \text{g}^{-1} \text{root DW h}^{-1}$)	55.8***	8.92***	2.43*
Chl <i>a</i> ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$)	27.3 ***	3.10	5.61 *
Chl <i>b</i> ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$)	47.2 ***	3.86*	4.04 *
Total Chl <i>a+b</i> ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$)	34.4 ***	3.43*	5.09***
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i> ratio	2.53	0.74	5.30***
Total N ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$)			
leaves	30.2 ***	0.51	0.62
roots	49.3 ***	1.81	0.36
P ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$)			
leaves	207.8 ***	1.05	2.66*
roots	33.8 ***	1.42	1.61
K ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$)			
leaves	22.4 ***	0.38	0.83
roots	173.8 ***	6.63**	4.70 **
Ca ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$)			
leaves	78.4 ***	1.09	4.05 **
roots	38.0 ***	0.35	1.64
Mg ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$)			
leaves	117.8 ***	2.80*	11.57 ***
roots	16.1 ***	1.63	0.49

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Table 2 Chlorophyll contents of *Salvinia cucullata*, *Ipomoea aquatica*, *Cyperus involucratus* and *Vetiveria zizanioides* (mean±SE) grown with different N-sources (500 µM NH₄⁺, 500 µM NO₃⁻ and 250 µM NH₄NO₃). The letter superscripts between columns indicate significant differences between treatments.

	<i>S. cucullata</i>			<i>I. aquatica</i>			<i>Cyperus involucratus</i>			<i>Vetiveria zizanioides</i>			<i>F-ratio</i>
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ NO ₃	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ NO ₃	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ NO ₃	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ NO ₃	
1. Chl <i>a</i> (mg g ⁻¹ DW)	9.0±0.5 ^e	6.4±0.5 ^{bcde}	6.9±1.9 ^{cde}	7.1±1.1 ^{de}	8.1±2.5 ^{de}	12.7±2.4 ^f	7.3±2.2 ^e	5.5±1.5 ^{abcd}	4.3±2.1 ^{abc}	4.1±0.8 ^{ab}	2.5±1.4 ^a	3.6±1.2 ^a	9.08***
2. Chl <i>b</i> (mg g ⁻¹ DW)	4.7±5.2 ^c	4.4±0.5 ^c	3.9±1.0 ^{bc}	4.9±0.6 ^c	4.6±1.3 ^c	6.7±1.0 ^d	3.9±1.1 ^{bc}	2.6±0.6 ^{ab}	2.5±0.6 ^a	2.4±0.3 ^a	1.2±0.7 ^a	1.9±0.4 ^a	12.1***
3. Total Chl (mg g ⁻¹ DW)	14.2±0.6 ^c	10.8±1.0 ^{bc}	10.8±3.0 ^{bc}	12.0±1.7 ^c	12.7±3.8 ^c	19.5±3.3 ^d	12.4 ±2.1 ^c	8.2±2.1 ^{ab}	6.8±2.7 ^a	6.5±1.1 ^a	4.8±2.0 ^a	5.5±1.6 ^a	10.5***
4. Chl <i>a/b</i> ratio	2.0±0.1 ^{abc}	1.5±0.1 ^a	1.8±0.2 ^{ab}	1.5±0.1 ^a	1.7±0.1 ^{ab}	1.9±0.2 ^{abc}	2.3±0.7 ^c	2.1±0.1 ^{bc}	1.6±0.4 ^{ab}	1.7±0.2 ^{ab}	1.8±0.7 ^{abc}	1.8±0.3 ^{abc}	3.7***

***, p <0.001

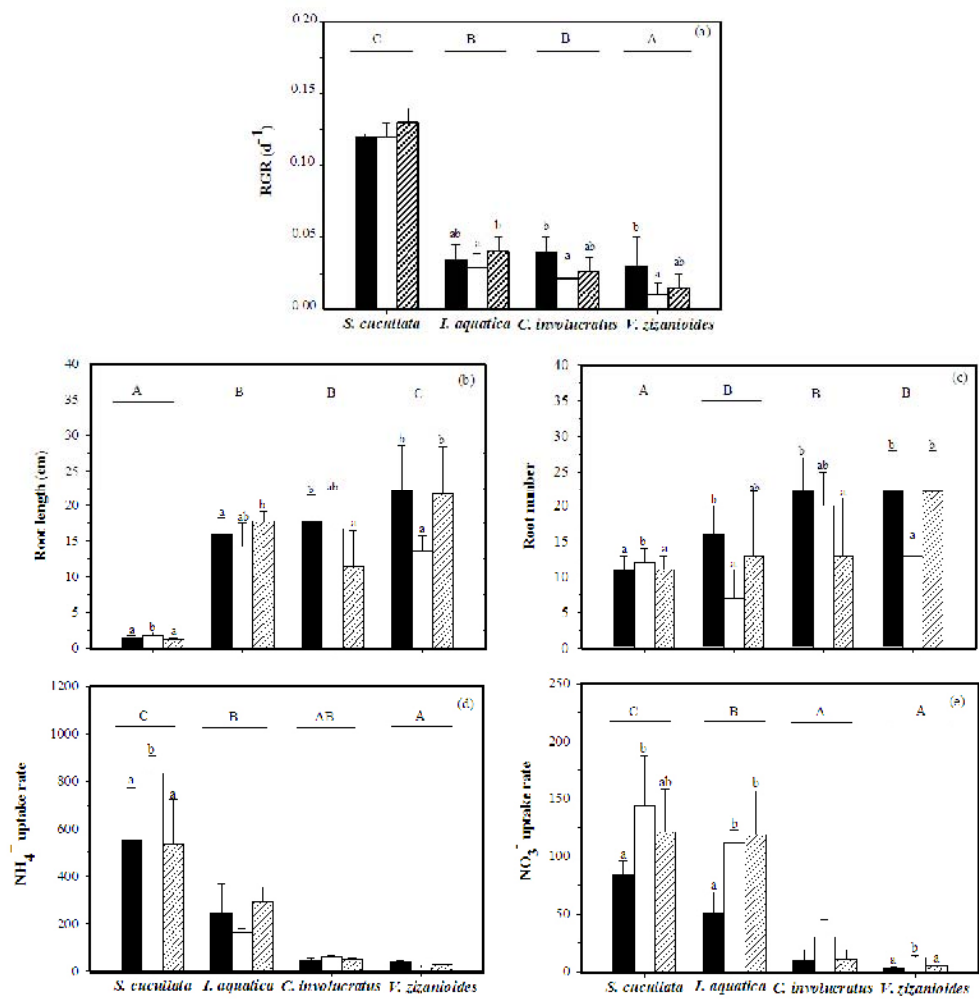


Fig. 1

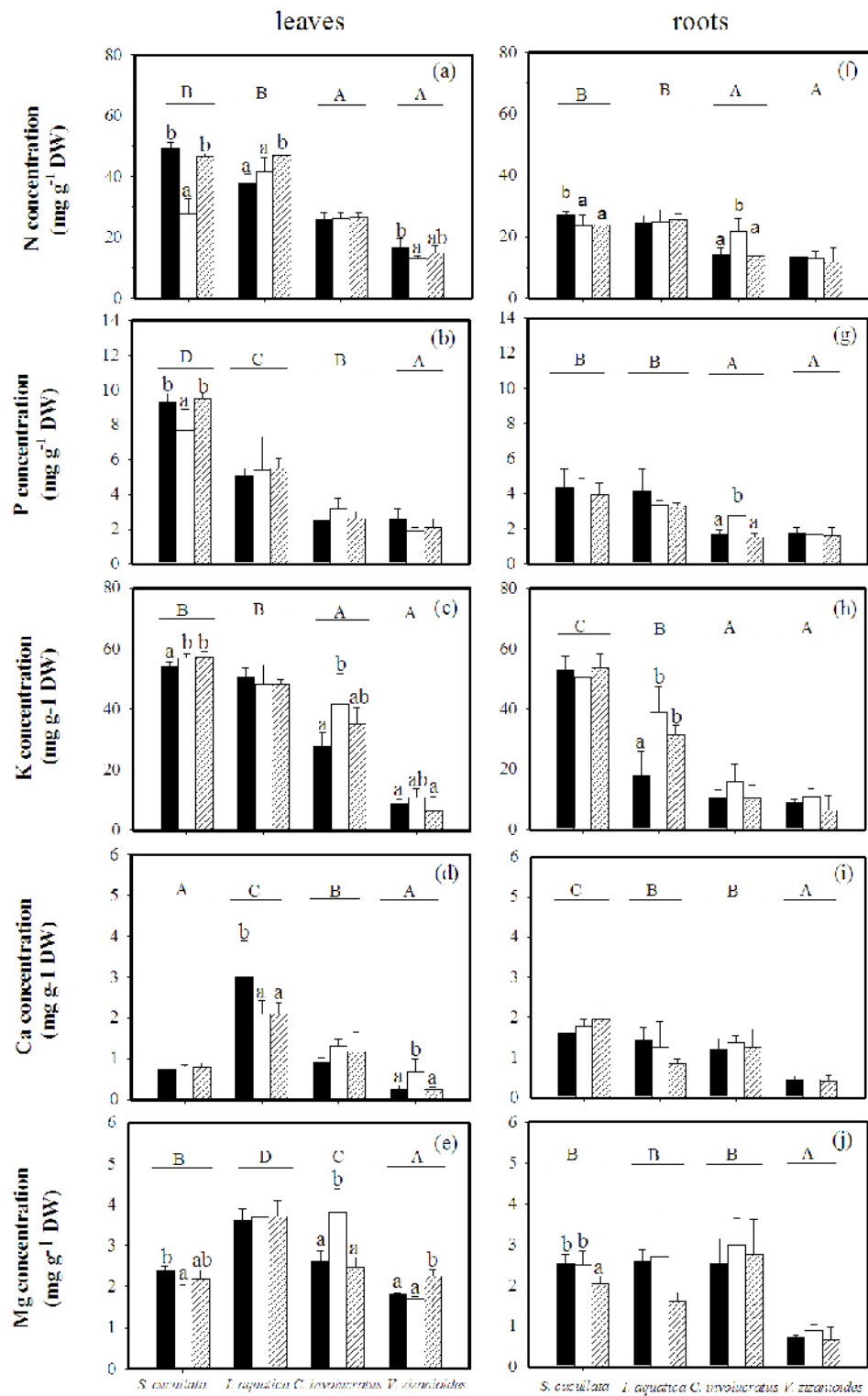


Fig. 2

**Effects of ammonium concentration on water spinach
(*Ipomoea aquatica* Forssk.): responses of growth, morphology,
uptake rate and nutrients allocation**

Arunothai Jampeetong^{a*} and Niwooti Whangchai^b

^a Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Meuang, Chiang
Mai 50202, Thailand

^b Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Sansai,
Chiang Mai, 50290, Thailand

*Corresponding author. Tel.: +66 53 943346-51; fax: +66 53 892259.

E-mail address: ajampeetong@yahoo.com (A. Jampeetong).

Abstract

The effects of external NH_4^+ concentration on growth, morphology, NH_4^+ uptake and minerals allocation in *Ipomoea aquatica* were investigated under greenhouse condition. Similar sized plant were grown on full strength Smart and Barko (1985) growth medium with different levels of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (0.5, 1, 5, 10 and 15 mM) for four weeks. Relative growth rate was high in plants fed with NH_4^+ at concentrations of 0.5, 1 and 5 mM, but at higher concentration the growth of the plants were stunted with few and short roots, old leaves were lost and growth of new ones was suppressed. Submerged stems and roots were damaged especially in plants supplied with 15 mM NH_4^+ . The NH_4^+ uptake rate tended to decrease with increasing NH_4^+ supply. It may be that roots and stems were damaged due to the influence of nutrient uptake. However, we found only small changes in mineral concentration in the tissue of both leaves and roots. We suggest that *I. aquatica* can be used for water treatment but the NH_4^+ concentration must be less than 5 mM to prevent root and stem damage that cause mineral released from the plants and returned to the water treatment system.

Key words: *Ipomoea aquatica*, NH_4^+ uptake, NH_4^+ toxicity, water spinach, water treatment

1. Introduction

Growing human populations, agricultural activities and industrialization cause degradation of the environment. Water bodies are the main targets for disposing pollutants both directly and indirectly. High nutrient loading from inland to lakes and rivers leads to wide spread eutrophication and water purification technologies that remove pollutants are costly. Therefore, eco-friendly and cheaper ecological methods are interesting alternatives for treating water. Many species of aquatic macrophytes have been used in constructed wetlands (CWs) to remove high amount of nutrients and heavy metals from wastewater [1-5]. Inorganic nitrogen in polluted water is commonly discharged from households, agricultural fertilizers and animal waste from farms [6]. Generally, inorganic nitrogen is an important nutrient for enhancing growth of aquatic macrophytes which mostly are fast-growing. Previous studies have shown that most aquatic macrophytes prefer NH_4^+ over NO_3^- [7-11]. However, excess N can cause water pollution, particularly in lotic systems.

Recently, use of CW technologies is increasing because they are cheap and energy-efficient. The performance of CWs is usually based on its design, water retention time, dimension and substrate used [12,3]. Plant selection for use in constructed wetlands is equally important, but few plants have been evaluated [13]. Among aquatic macrophyte growth forms, submerged macrophytes are sensitive to light intensity in the water column. In the case of high loading of nitrogen and phosphorus, the plants may suffer from low light intensity caused by algae blooms [14-15]. The wetland species used in the CWs commonly are emergent macrophytes. Many studies have been carried out on fast

growing wetland species such as *Phragmites* spp. in temperate regions [1,9] and thus far, there have been only a few studies done on tropical free-floating macrophytes. Furthermore, many previous studies have been done on evaluation of the efficiency of CW systems [4,16], but there is little published data on the efficiency of macrophytes in terms of growth, uptake capacity and nutrient allocation in the plant tissue.

The potential to grow and uptake nutrients are important characteristics used in the selection of aquatic macrophytes for CWs. The growth and uptake capacity depends on species and their environments. Water Spinach (*Ipomoea aquatica*) is a free-floating macrophyte often found in a wide variety of environments. This plant has been used in water treatment system for removal of nutrients and also some heavy metals [17-20]. Moreover, the plant is edible, so after harvesting it can be used to feed animals because of its high total N and crude protein content [21]. A study by Jampeetong *et al.* (unpublished) showed that *I. aquatica* grew well in growth medium with NH_4^+ and the plants had a high NH_4^+ uptake rate compared to NO_3^- . However, ability of the plants to grow under high NH_4^+ concentrations is unknown. It is evident that wastewater containing high concentrations of ammonium constitute a problem for plants used in CWs (unpublished data). Therefore, this study is aimed at assessing the growth and morphological responses, NH_4^+ uptake and nutrient allocation in the plant tissue of *Ipomoea aquatica* supplied with different NH_4^+ concentrations. The results of this study will be useful for selecting aquatic macrophytes for use in treatments of high NH_4^+ strength wastewater in tropical CWs.

2. Materials and Method

2.1 Experimental set up and growth study

Ipomoea aquatica was collected from natural ponds in Chaing Mai, Thailand. The plants were cultivated in the greenhouse of the Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand at a temperature range of 32–35° C during the day and 22–25° C at night. The light regime was approximately 80% of full sun and the light:dark cycle was 14:10 h. The growth medium was a full-strength standard nitrogen-free nutrient solution [22] to which micronutrients and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of KH_2PO_4 were added. The pH of the growth medium was adjusted to 7.0.

For the experiment, similar sized plants (35-40 cm shoot length) from the stock cultures were placed in 5-L containers (n=8) in the greenhouse. The experimental treatments consisted of five levels of NH_4^+ -N: 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM and 15 mM prepared from $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The NH_4^+ concentration was increased in steps over a period of four days to the final treatment levels. During the experiment, the growth medium was changed every second day, and epiphytic algae were removed gently by hand. All treatments were arranged in a randomized complete block design. After four weeks, the plants were harvested and cleaned. Then, the plants were freeze-dried to constant dry weight. The relative growth rate (per day) for each treatment was calculated using the formula: $\text{RGR} = \ln W_2 - \ln W_1 / (t_2 - t_1)$, where W_1 and W_2 are the initial and final dry weights (gram), and t_1 and t_2 are initial and final time (days).

2.2 Plant morphology

After four weeks, root number, root length, new shoot number and leaf area of the plants in each treatment were recorded. Then, the plants were separated into shoots and roots before being freeze dried.

2.3 Ammonium uptake

NH_4^+ uptake rates of *I. aquatica* were determined after four weeks of growth in the treatments under the same conditions as the growth study. Four replicates of similar sized plants from each treatment were pre-incubated in a container with a NH_4^+ free growth medium for 18 h. After pre-incubation, the plants were placed in 240 mL vessels with 500 μM NH_4^+ . Five millilitres of water samples were withdrawn each hour for measurement of NH_4^+ concentrations. The NH_4^+ uptake was estimated based on N depletion curve. The NH_4^+ concentration in all samples was analysed using a modified salicylate method (Quikchem Method no. 10-107-06-3-B; Lachat Instruments, Milwaukee, WI, USA). After the experiment (6 hours), all plants were cleaned and separated into shoots and roots, and then freeze dried. The NH_4^+ uptake rate was calculated from a depletion curve with linear regression analyses and related to volume and root dry weight (DW).

2.4 Inorganic NH_4^+ in the plant tissue

The freeze-dried leaves and roots were cut into small pieces. Five milligrams of dried plant material was extracted with 15 mL of distilled water at 98° C in a water bath for exactly 20 minutes. Then, the NH_4^+ concentration in the extracts was analysed by a modified salicylate method (Quikchem Method no. 10-107-06-3-B; Lachat Instruments, Milwaukee, WI, USA). The absorbance of the extracts was measured at 690 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Lambda 25 version 2.85.04, USA).

2.5 Chlorophyll contents

The contents of chl *a*, chl *b*, total chl *a+b* and carotenoids were determined according to Lichtenthaler method [23]. The freeze-dried leaves were cut into fragments. The plant

materials (approximately 8 mg) were extracted with 8 mL of 96% ethanol in the dark and at room temperature. After 24 hours, the absorbance of the extracts was measured at 648.6 and 664.2 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Lambda 25 version 2.85.04, USA).

2.6 Mineral elements

The concentration of total N, phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca) and magnesium (Mg) in both leaves and roots was analysed in subsamples (150–180 mg) of finely ground freeze-dried plant material. The samples were digested by mixing with 7 mL acid solution (concentrate H₂SO₄ 1 L., K₂SO₄ 100 g and selenium 1 g) at a temperature range of 100–330 °C. Total N was analysed according to Kjeldahl method [24] and the concentrations of P, K, Ca and Mg were analyzed by Chapman and Pratt method [25].

2.7 Statistics

All statistics were carried out using the software Statgraphics Plus ver. 4.1 (Manugistics, Inc., MD, USA). Data was tested for normal distribution and homogeneity of variance using the Cochran's C-test. If necessary, data was log-transformed to ensure homogeneity of variance. The data was tested by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences between treatments were identified by the Tukey HSD's test at a 5% significance level.

3. Results

3.1 Growth and morphology

The growth of *Ipomoea aquatica* was affected by external NH₄⁺ supply and it was significantly different between treatments (Figure 1a). The plants grew well in the

medium with NH_4^+ concentration of 0.5, 1 and 5 mM, but their growth was suppressed when they were supplied with 10 and 15 mM NH_4^+ . Root length and root number of the plants grown on 10 and 15 mM NH_4^+ decreased (Figure 1b,c), especially at 15 mM NH_4^+ , and some dead plants and rotted roots and stems were encountered. Furthermore, high NH_4^+ concentrations had negative effects on leaves of *Ipomoea*, producing small leaves and the loss of some old leaves when they grew on 10 and 15 mM NH_4^+ and it was significantly different from the treatments of 0.5, 1 and 5 mM NH_4^+ (Figure 1d).

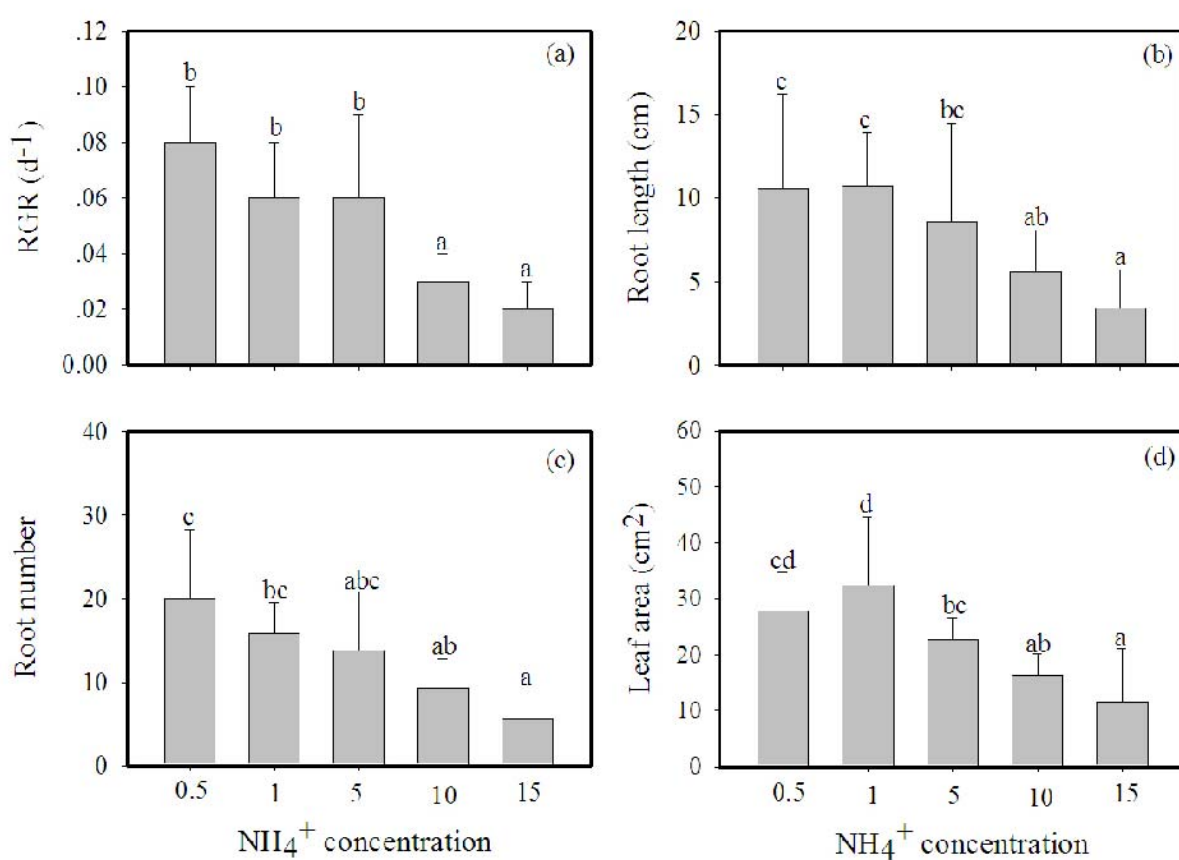


Figure 1 The relative growth rate, RGR (a), Root length (b), root number (c) and leaf area (d) (mean $\pm$ SE) of *Ipomoea aquatica* grown at different NH_4^+ -N concentrations (0.5, 1, 5, 10, 15 mM). Different letters above columns indicate significant differences between treatments.

3.2 Chlorophyll contents

Overall, Chl *a*, Chl *b*, total Chl *a+b* and carotenoids were affected by NH_4^+ concentrations and significant differences were found between treatments (Table 1). The Chl *a* and Chl *b* were low in the plants grown on NH_4^+ concentration higher than 5 mM. The carotenoids decreased slightly in plants grown at high NH_4^+ concentrations (10, 15 mM) and there was a significant difference from the plants grown on NH_4^+ concentration of 1 and 5 mM.

Table 1 Contents of chlorophylls and carotenoids of *Ipomoea aquatica* (mean $\pm$ SE) grown at different NH_4^+ -N concentrations. Different letters superscripts between columns indicate significant differences between treatments.

	NH_4^+ concentrations					F-ratio
	0.5 mM	1 mM	5 mM	10 mM	15 mM	
1. Chl <i>a</i> (mg g ⁻¹ dw)	12.6 $\pm$ 2.2 ^b	13.2 $\pm$ 1.9 ^b	11.1 $\pm$ 1.7 ^{ab}	9.7 $\pm$ 2.1 ^a	9.2 $\pm$ 2.0 ^a	5.98**
2. Chl <i>b</i> (mg g ⁻¹ dw)	5.4 $\pm$ 1.1 ^b	5.4 $\pm$ 0.8 ^b	4.5 $\pm$ 0.6 ^{ab}	4.0 $\pm$ 0.7 ^a	3.9 $\pm$ 0.9 ^a	5.62**
3. total Chl <i>a+b</i>	18.0 $\pm$ 3.3 ^b	18.5 $\pm$ 2.6 ^b	15.6 $\pm$ 2.3 ^{ab}	13.7 $\pm$ 2.8 ^a	13.1 $\pm$ 2.8 ^a	5.94**
4. Ca/ Cb	2.4 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	3.57
5. Carotenoids (mg g ⁻¹ dw)	1.9 $\pm$ 0.3 ^{ab}	2.1 $\pm$ 0.3 ^b	2.0 $\pm$ 0.3 ^b	1.6 $\pm$ 0.4 ^a	1.6 $\pm$ 0.3 ^a	1.2*

* (P<0.05), ** (P<0.01)

3.3 NH_4^+ uptake

The NH_4^+ uptake rate of *I. aquatica* was approximately 50% decreased in plants grown on NH_4^+ concentration of 5, 10 and 15 mM and it was significantly different from the plants grown on 0.5 and 1 mM (Figure 2a)

3.4 NH_4^+ hot water extractable

The NH_4^+ concentration in the plant tissue of both leaves and roots was lowest in the plants supplied with 10 mM NH_4^+ and it was significantly different from other treatments. At 15 mM NH_4^+ , the concentration of NH_4^+ increased reaching the same levels as in the plants grown on NH_4^+ at 1 and 5 mM NH_4^+ (Figure 2b).

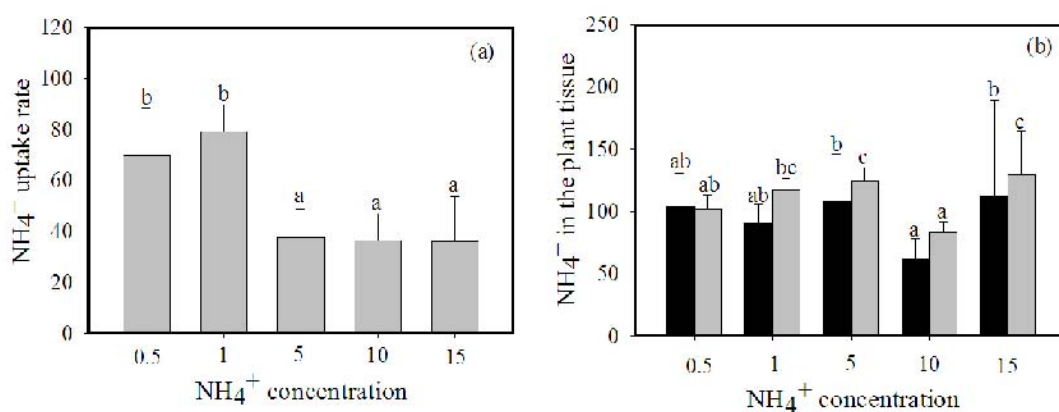


Figure 2 NH_4^+ uptake rate ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root dw h}^{-1}$) (a) and NH_4^+ concentration in leaves (dark column) and roots (grey column) ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ plant dw}$) (mean $\pm$ SE) of *Ipomoea aquatica* grown at different NH_4^+ -N concentrations (0.5, 1, 5, 10, 15 mM). Different letters above columns indicate significant differences between treatments.

3.5 Minerals

Minerals concentrations were slightly affected by external NH_4^+ supply (Figure 3a-j). Generally, total N concentration in leaves was higher than in roots, and the total N concentrations in the leaves was significantly increased when the plants were supplied with a high NH_4^+ concentration especially at 10 and 15 mM. For mineral anion, concentration of P in both leaves and roots was decreased. The P concentrations in the roots of the plants supplied with 1 and 5 mM decreased by 18% and 36%, respectively and were found to be significantly different from the treatment supplied with 0.5 mM NH_4^+ . For other mineral cations (K, Ca, Mg), they were slightly affected by NH_4^+ concentrations.

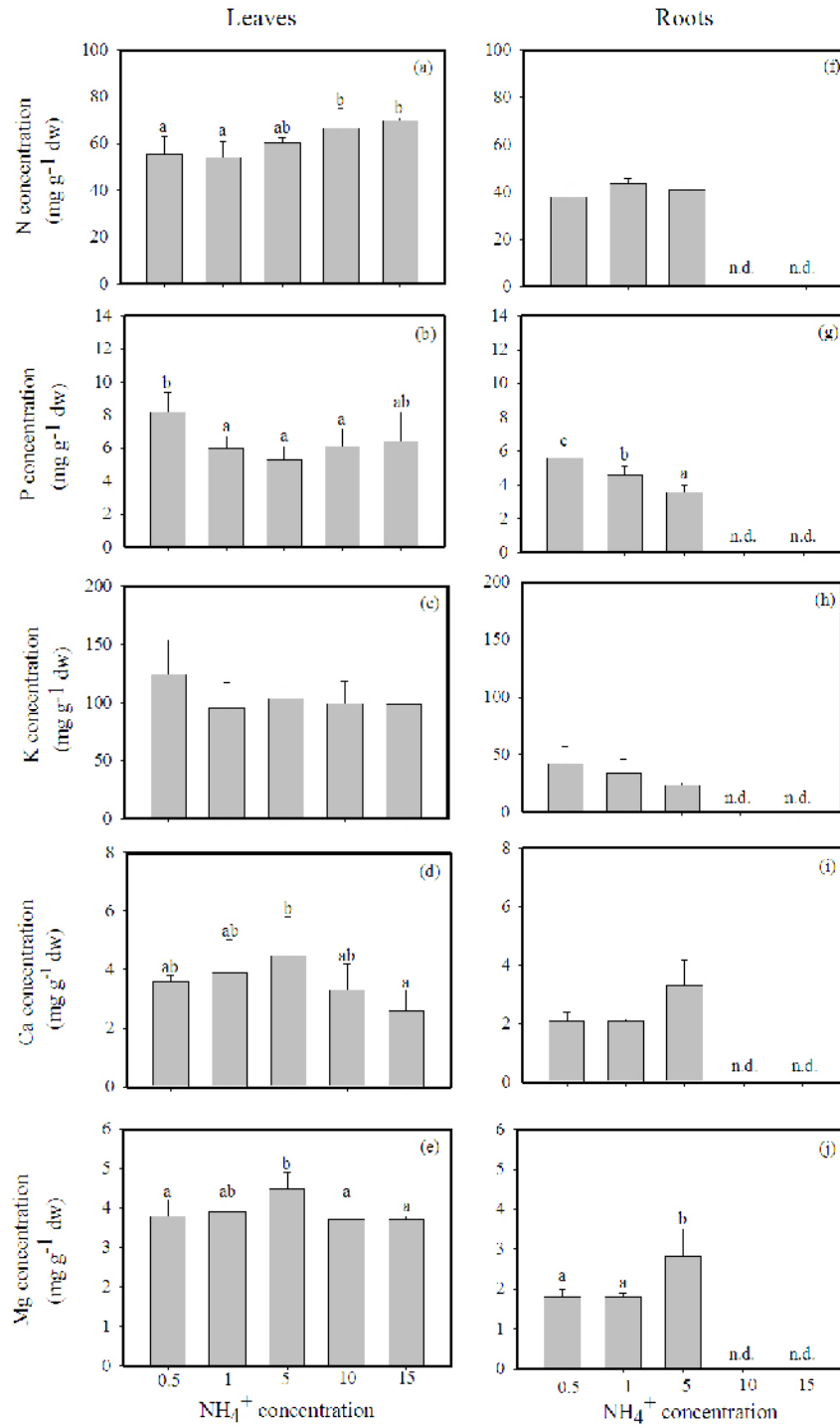


Figure 3 Concentrations of N (a, f), P (b, g), K (c, h), Ca (d, i) and Mg (e, j) in leaves and roots (mean±SE) of *Ipomoea aquatica* grown at different NH₄⁺-N concentrations (0.5, 1,

5, 10, 15 mM). Different letters above columns indicate significant differences between treatments. (n.d. not determined)

4. Discussion and Conclusion

Growth of *Ipomoea aquatica* was affected by external NH_4^+ concentration. As demonstrated in the present study, *I. aquatica* grew well in a wide range of NH_4^+ concentration from 0.5–5 mM which corresponds to levels commonly found in hypereutrophic water and wastewater from households or agriculture areas [26-27]. At higher NH_4^+ concentration, the growth of the plants was suppressed and negative effects on its morphology were found including short roots, small leaves and chlorosis. Furthermore, old roots and stems were damaged particularly in the plants supplied with NH_4^+ concentration at 10 mM and 15 mM. Similar results were found in other free-floating macrophytes, for example *Salvinia natans* [28], *Lemna* spp. [29]. *I. aquatica* has been used in water treatments and it has been intensively studied in East and Southeast Asia because it is edible and people can use it for food and animal feed after harvest. *I. aquatica* has high content of crude protein and vitamin A and C [21]. Hence, using this species in constructed wetlands under the influence from household and farm lands could be a good way of reducing inorganic nitrogen and other nutrients from polluted water. The ability of this species to exist and remove excess N from wastewater depends on the type of wastewater. At high strength of wastewater from farmlands such as piggery farms in which NH_4^+ concentration may reach 20 mM, NH_4^+ would stress the efficient N removal by this species even though NH_4^+ was the preferred inorganic N form for many aquatic macrophytes [8-11,30]. To prevent the plants from the NH_4^+ toxicity and maintain their high N uptake rate, dilution of wastewater to suitable levels for the plants are needed.

The NH_4^+ uptake of *I. aquatica* was affected by external NH_4^+ concentration. In the present study show that uptake rates were significantly decreased in the plants supplied with NH_4^+ at concentration of 5, 10 and 15 mM. Generally, the root is an important part of plants for nutrient uptake. Under high NH_4^+ concentrations, many species, including *I. aquatica*, showed damage of roots [28,31-32]. The plants had short roots and a low number of roots resulting in a low root surface area for nutrient absorption. Thus, it is possible that *I. aquatica* grown on NH_4^+ at very high concentrations may suffer from nutrient deficiency caused by root damage, not by NH_4^+ uptake that also can influence other mineral uptake [28].

Many free-floating species were NH_4^+ tolerant, with their shoots exposed to light as advantage. This is in contrast to submerged species in which the plants may suffer from low light intensity in eutrophic water [33]. However, shoot of *I. aquatica* was affected by the high external NH_4^+ supply, leaves of the plants decreased in leaf surface area particularly in the plants grown on 15 mM NH_4^+ that also had loss of old leaves and growth of new leaves was suppressed resulting in very small young leaves. The results revealed that *I. aquatica* can grow on wastewater with NH_4^+ as high as 5 mM and the NH_4^+ toxicity found in this species was small. Therefore we suggest that *I. aquatica* can be used in high polluted water treating system in cases where NH_4^+ concentration in the polluted water is less than 5 mM in order to prevent NH_4^+ toxicity that lead to the plant damage and nutrients returned to water treatment systems via submerged stems and rotted roots.

Generally, plants fed with NH_4^+ had low concentrations of mineral cations K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} in their tissue (28,32). Many studies suggested that minerals deficiency is a cause of

NH_4^+ toxicity symptom in some plants fed solely with NH_4^+ [30,32,34]. In the present study, we did not determine total N and other minerals concentration in the roots of the plants fed with 10 mM and 15 mM NH_4^+ , but data from the plants fed with 0.5 mM, 1 mM and 5 mM NH_4^+ showed that the plants had small mineral concentration viability both in the leaves and roots. Similar results found in *Canna indica* and *Sesbania sesban* fed with NH_4^+ that the changes in mineral concentrations were small [30,35]. Hence, mineral deficiency caused NH_4^+ toxicity symptom in *I. aquatica* was relative mild compared to growth stunting and changes in shoot and root morphology.

In summary, external NH_4^+ concentration affect growth and morphology of *Ipomoea aquatica*. The plants grew well in NH_4^+ concentration as high as 5 mM which corresponds to what can be found in wastewater from household or agricultural area. At higher concentration, the growth of *I. aquatica* was suppressed and some negative morphological responses in both shoots and roots were observed. The plants had short roots, decreased shoot and root number, small leaves and some rotted submerged stems and roots were found especially in the plants grown on 15 mM NH_4^+ . Because of root damage it affected nutrient uptake including that of NH_4^+ , resulting to a decreased NH_4^+ uptake rate but the effects on mineral concentrations in the plant tissue were relatively small.

Acknowledgements

The study was funded by The Thailand Research Fund and Commission on Higher Education, Project No. MRG5280224.

References

1. H.H. Schierup and H. Brix, "The Use of Aquatic Macrophytes in Water-Pollution Control", *Ambio.*, **1989**, *18*, 100-107.
2. J. Iamchaturapatr, S. Yi and J. Rhee, "Nutrient removals by 21 aquatic plants for vertical free surface-flow (VFS) constructed wetland", *Ecol. Eng.*, **2007**, *29*, 287-293.
3. K.Boonsong and M. Chansiri, "Domestic Wastewater Treatment using Vetiver Grass Cultivated with Floating Platform Technique", *AU J.T.*, **2008**, *12*, 73-80.
4. L.H. Cui , X.Z. Zhu, S.M. Luo, Y.H. Liu, "Removal of total nitrogen by *Cyperus alternifolius* from wastewaters in simulated vertical-flow constructed wetlands", *Ecol. Eng.*, **2009**, *35*, 1271–1274.
5. S. Kantawanichkul, S. Kladprasert and H. Brix, "Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucratus*", *Ecol. Eng.*, **2009**, *35*, 238-247.
6. Metcalf and Eddy, "Wastewater engineering treatment and reuse", Singapore, **2004**.
7. H. Brix, K. Dyhr-Jensen and B. Lorenzen, "Root-zone acidity and nitrogen source affects *Typha latifolia* L. growth and uptake kinetics of ammonium and nitrate", *J. Exp. Bot.*, **2002**, *53*, 2441-2450.
8. N. Cedergreen, T.V. Madsen, "Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*", *New Phytol.*, **2002**, *155*, 285-292.
9. E. Tylova-Munzarova, B. Lorenzen, H. Brix and O. Votrubova, "The effects of NH_4^+ and NO_3^- on growth, resource allocation and nitrogen uptake kinetics of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*", *Aquat. Bot.*, **2005**, *81*, 326-342.

10. Y.Y. Fang, O. Babourina, Z. Rengel, X.E. Yang and P.M. Pu, “Ammonium and nitrate uptake by the floating plant *Landoltia punctata*”, *Ann. Bot.*, **2007**, 99, 365-370.
11. A. Jampeetong and H. Brix, “Nitrogen nutrition of *Salvinia natans*: Effect of inorganic nitrogen form on growth, morphology, nitrate reductase activity and uptake kinetics of ammonium and nitrate” *Aquat. Bot.*, **2009a**, 90, 67-73.
12. L.H. Cui, X.Z. Zhu, S.M. Luo and Y.H. Liu, “Purification efficiency of vertical-flow wetland system constructed by coal slag and turf adsorbing medium on municipal wastewater”, *Chinese J. Appl. Ecol.*, **2003**, 14, 597–600.
13. D.-F. Xu, Y.-X. Li, H. Fang and X.-L. Zhao, “Effects of Physiological Character of Four Wetland Plants on Design of the Constructed Wetland Bed”, *J. Agro. Environ. Sci.*, **2009**, 28, 587-591.
14. A.J.P. Smolders, J.G.M Roelofs and C. Den Hartog, “Possible causes for the decline of the water soldier (*Stratiotes aloides* L) in the Netherlands”, *Arch. Hydrobiol.*, **1996**, 136, 327–342.
15. G.H.P Arts, “Deterioration of atlantic soft water macrophyte communities by acidification, eutrophication and alkalisation”, *Aquat. Bot.*, **2002**, 73, 373–393.
16. D. Konnerup, T. Koottatep and H. Brix, “Treatment of domestic wastewater in tropical, subsurface flow constructed wetlands planted with *Canna* and *Heliconia*”, *Ecol. Eng.*, **2009**, 35, 248–257.
17. A. Göthberg, M. Greger and B.-E. Bengtsson, “Accumulation of heavy metals in water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated in the Bangkok region, Thailand”, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2002**, 21, 1934-1939.

18. Y.-F. Lin, S.-R. Jing, D.Y. Lee and T.-W. Wang, “Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system”, *Aquaculture*, **2002**, *209*, 169-184.
19. M. Li, Y.-J. Wu, Z.-L. Yu, G.-P. Sheng and H.-Q. Yu, “Nitrogen removal from eutrophic water by floating-bed-grown water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk.) with ion implantation”, *Water Res.*, **2007**, *41*, 3152-3158.
20. A. Weerasinghe, S. Ariyawansa and R. Weerasooriya, “Phyto-remediation potential of *Ipomoea aquatica* for Cr(VI) mitigation”, *Chemosphere*, **2008**, *70*, 521-524.
21. P. Somkol, “Water spinach (*Ipomoea aquatica*) as a feed resource for growing rabbits”, *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, **2009**, *16*, 91-99.
22. R.M. Smart and J.W. Barko, “Laboratory culture of submerged freshwater macrophytes on natural sediments”, *Aquat. Bot.*, **1985**, *21*, 251–263.
23. H.K. Lichtenthaler, “Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic Biomembranes”, *Methods Enzymol*, **1987**, *148*, 350–382.
24. E.A. Hanlon, J.G. Gonzales and J.M. Bartos, “Soil testing laboratory chemical procedures and training manual”, *Circular*, 1994, *812*, Institute Food and agricultural Science, University of Florida, Gainesville, FL.
25. H.D. Chapman and P.F. Pratt “Methods of analysis for soils, plants and waters” Division of Agriculture Sciences. University of California. U.S.A., **1978**.
26. A. Barbieri and M. Simona, “Trophic evolution of Lake Lugano related to external load reduction: Changes in phosphorus and nitrogen as well as oxygen balance and biological parameters”, *Lake Reservoirs Res. Manage.*, **2001**, *6*, 37-47.
27. X. Yang, X. Wu, H.-L. Hao And Z.-l. He, “Review: Mechanisms and assessment of water eutrophication”, *J Zhejiang Univ Sci*, **2008**, *9*, 197-209.

28. A.Jampeetong and H. Brix, “Effects of NH_4^+ concentration on growth, morphology and NH_4^+ uptake kinetics of *Salvinia natans*”, *Eco.l Eng.*, **2009b**, 35, 695-702.
29. E.B.-I. Monselise and D. Kost, “Different ammonium-ion uptake, metabolism and detoxification efficiencies in two Lemnaceae”, *Planta*, **1993**, 189, 167-173.
30. D. Konnerup and H.Brix, “Nitrogen nutrition of *Canna indica*: Effects of ammonium versus nitrate on growth, biomass allocation, photosynthesis, nitrate reductase activity and N uptake rates”, *Aqua. Bot.*, **2010**, 92, 142-148.
31. M. Litav, and Y. Lehrer, “The effects of ammonium in water on *Potamogeton lucens*”, *Aqua. Bot.*, **1978**, 5, 127-138.
32. D.T Britto and H.J. Kronzucker, “ NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review”, *Plant Physiol.*, **2002**, 159, 567-584.
33. T. Cao, P. Xie, L. Ni, M. Zhang and J. Xu, “carbon and nitrogen metabolism of an eutrophication tolerative macrophyte, *Potamogeton crispus*, under NH_4^+ stress and low light availability”, *Environ. Exp. Bot.*, **2009**, 66, 74-78.
34. A. Miller and M. Cramer, “Root nitrogen acquisition and assimilation”, *Plant Soil*, **2005**, 274, 1-36.
36. T.H. Dan and H. Brix, “Growth responses of the perennial legume *Sesbania sesban* to NH_4^+ and NO_3^- nutrition and effects on root nodulation”, *Aqua. Bot.*, **2009**, 91, 238-244.

Responses of *Salvinia natans* to high NH_4^+ concentrations in the laboratory scale

Arunothai Jampeetong^{a*} and Suwasa Kantawanichkul^b

^a Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Meuang, Chiang Mai 50202, Thailand

^b Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author. Tel.: +66 53 943346-51; fax: +66 53 892259.

E-mail address: ajampeetong@yahoo.com (A. Jampeetong).

Abstract

Growth, morphology, NH_4^+ uptake and minerals allocation in *Salvinia cucullata* Roxb. ex Bory grown with different supplies of NH_4^+ were investigated. Plants of uniform size were grown on a medium which is full strength Smart and Barko with different NH_4^+ concentrations (0.5, 1, 5, 10 and 15 mM) and incubated in a greenhouse for four weeks. *Salvinia cucullata* grew well in the medium with 0.5–1 mM NH_4^+ with relative growth rates 0.11-0.12 d⁻¹ without presenting NH_4^+ toxicity symptom. With NH_4^+ concentration above 5 mM, the growth of the plants was suppressed and signs of NH_4^+ toxicity were observed. NH_4^+ toxicity symptoms were obvious in plants supplied with 10 mM and 15 mM NH_4^+ . The plants had a low growth rate, short roots, a low number of roots and showed chlorosis. Rotted roots and stems were also found in the plants fed with 15 mM NH_4^+ . At high NH_4^+ concentrations, the plants operate low affinity transport systems (LATS) for NH_4^+ uptake and showed linear responses to external concentrations that is energetically cost associated with futile ion cycling resulting in declined in plant growth. Furthermore, the high NH_4^+ supply had a negative effect on K uptake resulting in low K concentration in the plant tissue, especially in its roots. Under NH_4^+ rich water, the external NH_4^+ concentration may stimulate growth of *S. cucullata* that may cause an invasion of this species but at high NH_4^+ concentration (> 5 mM) the plants may suffer from NH_4^+ toxicity leading to plant damage and subsequent degradation of freshwater ecosystems.

Key words: aquatic fern, futile cycling, NH_4^+ toxicity, *Salvinia cucullata*

Introduction

Since the mid-1800s, the industrial revolution and human's activities have altered the global environment. The increasing human population leads to high demand on both terrestrial and aquatic ecosystems. Around one-third to one-half of the land's surface has been cleared for urbanizations, farmlands, which in turn alters the hydrological cycle. Such activities impact the biogeochemical cycles of carbon, phosphorus and nitrogen. It has been reported that human caused increase of nitrogen input into terrestrial and aquatic ecosystem (Lampert and Sommer, 1997). Overall, the global nitrogen production of agriculture fertilizers increased eight times (from < 10 million metric tonnes of N) during 1950–1990, and it is predicted to exceed 135 million metric tonnes of N by 2030 (Vitousek, 1997). The high N-load in aquatic ecosystem is thus very strongly affected by humans.

Increasing external N supply and other nutrients to aquatic ecosystem cause alterations in structure and function of the ecosystem (Smith et al., 1999). The excess of nutrients can enhance phytoplankton and plant growth. The algae bloom can decline the light intensity, dissolved oxygen that influenced on submerged species (Prepas and Charette, 2003), while free-floating plants have growth form that can obtain enough light and oxygen by hanging the roots near the water surface (Caraco et al., 2006). However, the high nutrient loading still causes adverse conditions for the existence of these plants in the ecosystem. Especially high N loads from farmland and water discharged from the household directly affect plant growth and populations.

Many studies have shown that NH_4^+ is a preferred form of inorganic nitrogen for many aquatic macrophytes, but at high concentration it can be harmful (Miller and

Cramer, 2005; Cao et al., 2009a; Cao et al., 2009b; Jampeetong and Brix 2009b; Wang et al., 2010). Plants' response to various NH_4^+ concentrations is different among species. Sensitive species show NH_4^+ toxicity symptoms such as stunting growth, chlorosis, rotted roots and even dead plants in the water column (Britto and Kronzucker, 2002; Cao et al., 2007; Cao et al. 2009b). A high NH_4^+ concentration is favorable and stimulates growth of some species. Most invasive species responded well to a wide range of environmental conditions, including variation in nutrient levels (McFarland et al., 2004; Hellmann et al., 2004; Hastwell et al., 2008; Hussner et al., 2009; Owens and Smart, 2010). However, there are only few studies of the effects of NH_4^+ concentration on invasive species compared to the abundant studies on vegetable or crop plants (Schortemeyer et al., 1997; Britto and Kronzucker, 2002; Roosta and Schjoerring, 2007).

Salvinia cucullata Roxb. Ex Bory is a free floating aquatic fern distributed in water bodies around the tropics. The plants are fast growing and have a high dispersal rate (Napompeth, 1989; McFarland et al., 2004). The record of this species is rare but it has invaded several aquatic ecosystem like other *Salvinia* spp. Many species of *Salvinia*, for example *S. molesta*, were stimulated by nutrient enrichment resulting of human activity and that this creates similar problems in many countries. Dense mats of *Salvinia* spp. can obstruct transportation, irrigation, hydroelectric production, degrade water quality and altered species composition and ultimately ecosystem functions (McFarland et al., 2004; Ensbey, 2009). These plants mainly obtain nutrients from the water column via the modified third leaf, which resembles roots. *S. natans* grew well in a medium with NH_4^+ -N and the plants had a greater ability to take up NH_4^+ from the medium through its roots than NO_3^- (Jampeetong and Brix, 2009a). Further more, this species can tolerate to NH_4^+ as high as 5 mM which can be found in household wastewater, hence, it was suggested

that *S. natans* can be a new candidate for water treatments (Jampeetong and Brix, 2009b). Knowledge of the increasing of NH_4^+ levels in the water column on growth and some physiological characteristics of *S. cucullata* are still lacking but they are needed in order to be able to predict impact of excessive NH_4^+ on its population and distribution. The objective of this study was to determine the effects of NH_4^+ concentration on growth, morphology, NH_4^+ uptake and minerals allocation in *S. cucullata*. Results from this study can be used to predict when and where that the plants become an invader or when it may suffer loss of its biomass because of NH_4^+ toxicity leading to degradation of the environment under changing hydrological conditions especially by human activities. Additionally, this information may help to find a solution or suggestion on weed management program in the future.

2. Materials and methods

2.1 Experimental set up and growth study

Salvinia cucullata was collected from natural ponds in Chaing Mai province, Thailand. The plants were cultivated in the greenhouse at the Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, at a temperature range of 32–35° C during the day and 22–25° C at night. The light regime was approximately 80% of full sun and the light:dark cycle was 14:10 h. The growth medium was a full-strength standard nitrogen-free nutrient solution (Smart and Barko, 1985) to which micronutrients and 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of KH_2PO_4 were added. The pH of the growth medium was adjusted to 7.0.

For the experiment, the plants from the stock cultures (approximately 3 g *fw*) were placed in 5 - litre containers (n=5) in the greenhouse. The experimental treatments consisted of five levels of $\text{NH}_4^+\text{-N}$: 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM and 15 mM prepared from

(NH₄)₂SO₄. The NH₄⁺ concentration was increased in steps over a period of four days to the final treatment levels. During the experiment the growth medium was changed, and epiphytic algae were removed gently by hand every second day. All treatments were arranged in a randomized complete block design to minimize effects of environmental gradients in the greenhouse. After four weeks, the plants were harvested and cleaned. Then, the plants were freeze-dried to constant dry weight. The relative growth rate (d⁻¹) for each treatment was calculated using the formula: $RGR = \ln W_2 - \ln W_1 / (t_2 - t_1)$, where W₁ and W₂ are the initial and final dry weights (g), and t₁ and t₂ are initial and final time (days).

2.2 Plant Morphology

After four weeks, the 3rd or 4th set of leaves counted from the apical shoot were sampled to record their morphology. Each sample was separated into roots, leaves and horizontal stems. The root number was counted and root length was measured. Leaves' surface area (one side) was measured. Then, all part of the plants was freeze dried and their dry weight measured.

2.3 NH₄⁺ uptake

After four weeks, the NH₄⁺ uptake rates were measured. Four replicates of similar sized plants from each treatment were pre-incubated for 18 h in a container with a NH₄⁺ free growth medium under the same conditions as the growth study. After pre-incubation, the plants were placed in a 300 ml beaker with 500 μM NH₄⁺-N. In each hour, 5 ml of water samples were withdrawn for measurement NH₄⁺. The NH₄⁺ concentration in all samples was analysed using a modified salicylate method (Quikchem Method no. 10-107-06-3-B; Lachat Instruments, Milwaukee, WI, USA). After the experiment (6 hours), all plants

were freeze dried and the NH_4^+ uptake rate was calculated from NH_4^+ depletion curve with linear regression analyses and related to volume and dry weight (DW).

2.4 Chlorophyll contents

The content of chl *a*, chl *b*, total chl *a+b*, and carotenoids in the leaves of *Salvinia* was determined according to Lichtenthaler (1987). Freeze-dried leaves were cut into small pieces. Pigments were extracted from sub-sample (approximately 10 mg) with 8 ml of 96% ethanol in the dark at room temperature. After 24 hours, the absorbance of the extracts was measured at 648.6 and 664.2 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Lambda 25 version 2.85.04, USA).

2.4 NH_4^+ in the plant tissue

The inorganic NH_4^+ in the plant tissue was determined by hot water extraction. Freeze-dried plant material was cut into small pieces. Five mg of dried plant material was extracted with 15 ml of distilled water at 98° C in a water bath for exactly 20 minutes. Then, the concentration of NH_4^+ in the extracts was analysed using a modified salicylate method (Quikchem Method no. 10-107-06-3-B; Lachat Instruments, Milwaukee, WI, USA). The absorbance of the extracts was measured at 690 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Lambda 25 version 2.85.04, USA).

2.5 Mineral elements

The concentration of total N, phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca) and magnesium (Mg) in plant tissue was analysed in subsamples (150–180 mg) of finely ground freeze dried plant material. The samples were digested by mixing with 7 ml acids solution (concentrate H_2SO_4 1 L., K_2SO_4 100 g and selenium 1 g) at temperature range of

100–330 °C. Total N was analysed by the Kjeldahl method (Hanlon et al. 1994) and the concentrations of P, K, Ca and Mg were analyzed according to Chapman and Pratt (1978).

2.6 Statistics

All results were analyzed using the software Statgraphics Plus ver. 4.1 (Manugistics, Inc., MD, USA). Data were tested for normal distribution and variance homogeneity using Cochran's C-test. If necessary, data were log-transformed to ensure homogeneity of variance. The data were tested by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences between treatments were identified by Tukey HSD's test at the 5% significance level.

3. Results

3.1 Growth and morphology

The growth of *Salvinia cucullata* was significantly different when supplied with different NH_4^+ concentration (Fig. 1). The relative growth rate (RGR) of the plants grown on NH_4^+ at concentration of 0.5 mM and 1 mM was not significantly different, but at higher concentrations of NH_4^+ , the RGR of the plants was significantly lower. High NH_4^+ concentrations affected both root length and root number (Fig. 2a, 2b). The plants grown on NH_4^+ at concentration of 5 mM, 10 mM and 15 mM had shorter roots and fewer numbers of roots than the plants grown on 0.5 mM and 1 mM NH_4^+ treatments.

3.2 NH_4^+ uptake rate

The NH_4^+ uptake was significantly affected by the external NH_4^+ concentration (Fig. 3a). Interestingly, the NH_4^+ uptake rate was significantly higher in the plants grown on NH_4^+ at concentration of 5 mM, 10 mM and 15 mM.

3.3 Chlorophyll and carotenoid contents

The contents of chlorophylls and carotenoids were affected by external NH_4^+ supply (Table 1). Both chlorophyll *a* and *b* was significantly different between treatments. The highest amount of chlorophylls was found in the plants grown on 0.5 mM NH_4^+ , and the chlorophylls were decreased when the external NH_4^+ concentration in the growth solution was increased. Similarly, the carotenoids was significantly higher in the plants grown on 0.5 mM NH_4^+ whereas at higher concentration of NH_4^+ , it was decreased in the amount of carotenoids.

3.4 NH_4^+ in the plant tissue

The amount of NH_4^+ in both leaves and roots was increased when increasing external NH_4^+ concentrations and it was significantly different between treatments (Fig. 3b).

3.5 Mineral contents

Overall, the mineral contents were affected by external NH_4^+ concentration (Fig. 4a-j). When external NH_4^+ supply increased, the total N was significantly reduced in leaves but increased in roots, particularly in the plants fed with NH_4^+ at concentration of 10 mM and 15 mM. Similarly, the concentration of K, Ca and Mg in roots was significantly decreased in the plants fed with 10 mM and 15 mM NH_4^+ and it was small effects found in leaves.

4. Discussion

The relative growth rate (RGR) of *Salvinia cucullata* increased to the highest values when the plants were supplied with 1 mM NH_4^+ , this level of NH_4^+ also stimulate growth

of some species of aquatic macrophytes (Monselise and Kost, 1993; Jampeetong and Brix, 2009b). At concentration of NH_4^+ higher than 5 mM, the growth of the plants was suppressed and at the same time negative effects on root morphology was found. The plants had short and few roots. Generally, at NH_4^+ concentration at which the symptoms of toxicity appeared most plants showed low growth rates, had short roots and some plants present chlorosis (Britto and Kronzucker, 2002). These symptoms were obviously found in *S. cucullata*, especially when the plants were grown on NH_4^+ at concentration of 10 mM and 15 mM. Similar results were found in *S. natans* which tolerated NH_4^+ up to 1 mM but this species can grow in the growth medium with NH_4^+ at concentration as high as 5 mM and the effects of high NH_4^+ concentration that occurred in this species were relatively mild (Jampeetong and Brix, 2009b). There are only few observations of the effects of NH_4^+ concentration on aquatic macrophytes, however, the tolerant species commonly showed NH_4^+ toxicity symptom when the external NH_4^+ supply reached 1–5 mM (Britto and Kronzucker, 2002; Cao et al., 2007; Cao et al., 2009a; Cao et al., 2009b; Jampeetong and Brix, 2009b; Wang, 2010). Tolerance has been documented in many free floating macrophytes for example *Azolla* (Kitoh et al., 1993), duckweeds (*Wolffia*, *Lemna*, *Spirodela*) (Caicedo et al., 2000; Monselise and Kost, 1993) and *Salvinia* (Jampeetong and Brix, 2009b) but in contrast to submerged species they show damaged leaves or rotted roots and dead plants when they are exposed to high NH_4^+ concentrations (Litav and Lehrer, 1978). Under high N loading condition the free floating plants may have advantages over the submerged species which leads to decrease in submerged populations and subsequent changes in species composition in such as aquatic ecosystems. The present study showed that external NH_4^+ concentration especially at 1 mM can stimulate growth of *S. cucullata*, thus in mildly polluted water ($\text{NH}_4^+\text{-N} < 5$ mM) this species may become a successful invader. However, NH_4^+ enriched water

($\text{NH}_4^+\text{-N} > 5 \text{ mM}$) could be a stressor for this species to survive leading to plant detriment and cause of environmental degradation.

In tropical lakes and reservoirs the water column is a main N source for root uptake of free floating macrophytes including *Salvinia* spp. Generally, there are two transport systems operating ion influx across the plasma membrane of root cells: high-affinity transport systems (HATS) that mediate uptake from relatively dilute solution, and low-affinity transport systems (LATS) that function at higher external concentrations and show linear responses to external concentrations (Britto and Kronzucker, 2006). In this study, interestingly, we found that *S. cucullata* grown on NH_4^+ at the level of 10 mM and 15 mM still had a high NH_4^+ uptake rate. At high external concentration the high NH_4^+ influx and concurrent high NH_4^+ efflux can occur and lead to futile cycling. This phenomenon takes a high energetic cost (40% increased in root respiration) resulting in declined plant growth (Britto et al., 2001; Kronzucker et al., 2001; Britto and Kronzucker, 2006). Contrastingly, *S. natans* had decreased the NH_4^+ uptake rate when they grown on NH_4^+ concentrations higher than 1 mM. Similar results were found in tolerant species, for example *L. gibba* (Korner et al., 2001), rice, *Oryza sativa* (Britto et al., 2001) and common reed, *Phragmites australis* (Tylova et al., 2008). The study by Wang (1994) showed that rice lowers the membrane polarization with increasing NH_4^+ provision and thereby decreases the influx of NH_4^+ into the roots. This ability prevents NH_4^+ accumulation in the plant cells resulting from cytosol pH disturbance that is a cause of NH_4^+ toxicity in the sensitive species. However, other physical factors except external NH_4^+ concentration can affect the NH_4^+ uptake of *S. cucullata*. In tropical area the plants may cope with high temperate and light intensity especially in the summer, the further study need to determine effects of these two factors on the NH_4^+ uptake of this species.

Increased knowledge of this species may help to predict plant population as well as indicating where *Salvinia* may become problematic based on water quality parameters especially nutrient level.

Salvinia is well known throughout tropical and temperate regions of the world as an invasive species (McFarland et al., 2004; Al-Hamdani and Ghazal, 2009). It has been reported that both chemical and biological control were used for *Salvinia* management, but using pesticide is not ecologically friendly. Reversely, plant application as bio-filter and nutrient removal in wastewater treatments are currently another option that is highly beneficial. Some species of *Salvinia* have been used in various constructed wetlands for wastewater treatment (Olguin et al., 2003; Mohah, 2006; Eugenia, 2007). It was documented that *Salvinia* spp. had a high N removal, resulting in high N and protein contents in the plant tissue makes this species ideal for use as a feed animal or fertilizer after harvested (Leterme et al., 2009). However, under high N loading especially in anoxic condition, NH_4^+ is predominant form of inorganic N the plants may suffer from mineral deficiency. *S. natans* grown at 10 mM and 15 mM NH_4^+ decreased mineral cation in the plant tissue and increased concentration of anion leading to cation-anion imbalance (Jampeetong and Brix, 2009b). Similar results were found in the present study showing a low K content in the plants grown in the medium with NH_4^+ at concentration as high as 5 mM and it dramatically decreased concentration of K in its roots when the plants were supplied with NH_4^+ at concentration of 10 mM and 15 mM. K deficiency and other cations imbalance explain NH_4^+ toxicity symptoms in plants supplied with high NH_4^+ concentrations. Thus, high amount of NH_4^+ discharge from household and agriculture area into natural water bodies may cause decaying plant material leading to degradation of the environment. Management strategies to reduce nutrient input are needed in association with conservation programmes for example using wastewater

treatment technologies together with wetland protection would help to improve water quality and reduce the potential for proliferation of this species.

In summary, external NH_4^+ concentration affected growth, morphology, NH_4^+ uptake and nutrient concentrations of *S. cucullata*. The plants grew well in the medium with NH_4^+ concentration of 1 mM, but at higher concentration growth of the plants was suppressed and they had short and few roots and chlorosis of leaves. At high NH_4^+ concentration the plants operate low affinity transport systems (LATS) and showed linear responses to external concentrations that is energetically cost associated with futile ion cycling resulting declined in plant growth. Furthermore, mineral contents in the plants tissue, particularly K concentration were dramatically decreased in plants grown on NH_4^+ at concentration higher than 5 mM. In natural water bodies with levels of NH_4^+ up to 1 mM, this concentration may stimulate growth and can be an important cause of invasion, but at higher NH_4^+ concentrations the plants may suffer from NH_4^+ toxicity leading to plant decay and degradation of aquatic ecosystems. It was suggested that water quality control by reduced nutrient input to the water bodies is a strategy can be done to govern the population of *S. cucullata*.

Acknowledgements

The study was funded by The Thailand Research Fund and Commission on Higher Education, Project No. MRG5280224.

References

- Al-Hamdani, S.H., Ghazal, J.J., 2009. Selected physiological responses of *Salvinia minima* to various temperature and light intensities. *Am. Fern J.* 99, 155-161.
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J., 2001. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* 98, 4255-4258.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physio.* 159, 567-584.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2006. Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. *Trends Plant Sci.* 11, 529-534.
- Caicedo, J.R., van der Steen, N.P., Arce, O., Gijzen, H.J., 2000. Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). *Water Res.* 34, 3829-3835.
- Cao, T., Xie, P., Ley, N., Aiping, W., Zhang, M., Wu, S., 2007. The role of NH_4^+ toxicity in the decline of the submersed macrophyte *Vallisneria natans*. *Mar. Freshwater Res.* 58, 581-587.
- Cao, T., Xie, P., Ni, L., Zhang, M., Xu, J., 2009(a). Carbon and nitrogen metabolism of an eutrophication tolerant macrophyte, *Potamogeton crispus*, under NH_4^+ stress and low light availability. *Environ. Exp. Bot.* 66, 74-78.
- Cao, T., Xie, P., Li, Z., Ni, L., 2009(b). Physiological stress of High NH_4^+ concentration in water column on the submerged macrophyte *Vallisneria natans* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 296-299.
- Caraco, N., Cole, J., Findlay, S., Wigand, C., 2006. Vascular plants as engineers of oxygen in aquatic systems. *BioScience* 56, 219-225.

- Chapman, H.D., Pratt, P.F., 1978. Methods of analysis for soils, plants and waters. Division of Agricultural Sciences. University of California. USA.
- Ensbey, R., 2009. *Salvinia*. Primefact 210, 1-6.
- Eugenia, O., Gloria, S.-G., Teresa, P.-P., 2007. Assessment of the phytoremediation potential of *Salvinia minima* Baker compared to *Spirodela polyrrhiza* in high-strength organic wastewater. Water, Air, Soil Pollut. 181, 135-147.
- Hanlon, E.A., Gonzales, J.G., Bartos, J.M., 1994. Soil testing laboratory chemical procedures and training manual. Circular 812, Institute Food and agricultural Science, University of Florida, Gainesville, FL.
- Hellmann, J.J., Byers, J.E., Bierwagen, B.G., Dukes, J.S., 2008. Five potential consequences of climate change for invasive species. Conserv. Biol. 22, 534-543.
- Hastwell, G.T., Daniel, A.J., Vivian-Smith, G., 2008. Predicting invasiveness in exotic species: do subtropical native and invasive exotic aquatic plants differ in their growth responses to macronutrients? Diversity Distrib. 14, 243-251.
- Hussner, A., Meyer, C., Busch, J., 2009. The influence of water level and nutrient availability on growth and root system development of *Myriophyllum aquaticum*. Weed Res. 49, 73-80.
- Jampeetong, A., Brix, H., 2009(a) Nitrogen nutrition of *Salvinia natans*: Effect of inorganic nitrogen form on growth, morphology, nitrate reductase activity and uptake kinetics of ammonium and nitrate. Aquat. Bot. 90, 67-73.
- Jampeetong, A., Brix, H., 2009(b). Effects of NH_4^+ concentration on growth, morphology and NH_4^+ uptake kinetics of *Salvinia natans*. Ecol. Eng. 35, 695-702.
- Kitoh, S., Shiomi, N., Uheda, E., 1993. The growth and nitrogen fixation of *Azolla filiculoides* Lam. in polluted water. Aquat. Bot. 46, 129-139.

- Korner, S., Das, S.K., Veenstra, S., Vermaat, J.E., 2001. The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquat. Bot.* 71, 71-78.
- Kronzucker, H.J., Britto, D.T., Davenport, R.J., Tester, M., 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends Plant Sci.* 6, 335-337.
- Lampert, W., Sommer, U., 1997. *Limnoecology*. Oxford University Press, Inc., New York, U.S.A.
- Leterme, P., Londõno, A.M., Muñoz, J.E. et al., (2009) Nutritional value of aquatic ferns (*Azolla filiculoides* Lam. and *Salvinia molesta* Mitchell) in pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 149, 135-148.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148, 350-382.
- Litav, M., Lehrer, Y., 1978. The effects of ammonium in water on *Potamogeton lucens*. *Aquat. Bot.* 5, 127-138.
- McFarland, D.G., Nelson, L.S., Grodowitz, M.J., Smart, R.M., Owens, C.S., 2004. *Salvinia molesta* D.S. Mitchell (Giant *Salvinia*) in the United States: A review of species ecology and approaches to management. Environmental laboratory ERDC/EL SR-04-2, US Army Corps of Engineer, Engineer Research and Development Center, Washington, D. C. pp. 1-33.
- Miller, A., Cramer, M., 2005. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274, 1-36.
- Mohan, B.S., 2006. Phytotoxicity of cadmium on the physiological dynamics of *Salvinia natans* L. grown in macrophyte ponds. *J. Environ. Biol.* 27, 701-704.
- Monselise, E.B.-I., Kost, D., 1993. Different ammonium-ion uptake, metabolism and detoxification efficiencies in two Lemnaceae. *Planta* 189, 167-173.

- Napompeth, B., 1989. Biological control of insect pests and weeds in Thailand. In: Proceedings of Pests in Tropical Agricultural Ecosystems (Sosromarsono et al. eds.). 122-127. BIOTROP Special Publication No. 36. Bogor, Indonesia.
- Olguin, E.J., Rodriguez, D., Sanchez, G., Hernandez, E., Ramirez, M.E., 2003. Productivity, protein content and nutrient removal from anaerobic effluents of coffee wastewater in *Salvinia minima* ponds, under subtropical condition. Acta Biotechnol. 23. 259-270.
- Owens, C.S., Smart, R.M., 2010. Effects of nutrients, salinity, and pH on *Salvinia molesta* (Mitchell) Growth. APCRP Technical Notes Collection. ERDC/TN APCRP-EA-23. Vicksburg, MS: U.S. Army Engineer Research and Development Center.
- Prepas, E.E., Charrette, T., 2003. Worldwide eutrophication of water bodies: Causes, concerns, controls. Treatise on geochemistry 9, 311-331.
- Roosta, H.R., Schjoerring, J.K., 2007. Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber plants. J. Plant Nutr. 30, 1933-1951.
- Schortemeyer, M., Stamp, P., Feil, B., 1997. Ammonium tolerance and carbohydrate status in maize cultivars. Ann. Bot. 79, 25-30.
- Smart, R.M., Barko, J.W., 1985. Laboratory culture of submerged freshwater macrophytes on natural sediments. Aquat. Bot. 21, 251-263.
- Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C., 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. Environ. pollut. 100, 179-196.
- Tylova, E., Steinbachova, L., Votrubova, O., Lorenzen, B., Brix, H., 2008. Different sensitivity of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima* to high availability of ammonium-N. Aquat. Bot. 88, 93-98.

- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M., 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 227, 494-499.
- Wang, M.Y., Glass, A.D.M., Shaff, J.E., Kochian, L.V., 1994. Ammonium uptake by rice root. *Plant Physiol.* 104, 899-906.
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Li, W., Lu, J., 2010. Effects of ammonium on the antioxidative response in *Hydrilla verticillata*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 73, 189-195.

Legends to the figure

Fig.1 The relative growth rate (RGR) of *Salvinia cucullata* grown at different NH_4^+ concentration (0.5, 1, 5, 10, 15 mM) Different letters above columns indicate significant differences between treatments.

Fig. 2 Root length (a) and root number (b) (mean $\pm$ SE) of *Salvinia cucullata* grown at different NH_4^+ concentration (0.5, 1, 5, 10, 15 mM). Different letters above columns indicate significant differences between treatments.

Fig.3 NH_4^+ uptake rate ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ root dw h}^{-1}$) (a) and NH_4^+ concentration in leaves (dark column) and roots (grey column) ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ plant dw}$) of *Salvinia cucullata* (mean $\pm$ SE) grown at different NH_4^+ concentration (0.5, 1, 5, 10, 15 mM). Different letters above columns indicate significant differences between treatments.

Fig. 4 Concentrations of N (a, f), K (b, g), Ca (c, h), Mg (d, i) and P (e, j) in leaves and roots of *Salvinia cucullata* (mean $\pm$ SE) grown at different NH_4^+ concentration (0.5, 1, 5, 10, 15 mM). Different letters above columns indicate significant differences between treatments.

Table 1 Contents of Chlorophylls and Carotenoids of *Salvinia cucullata* Roxb. Ex Bory (mean $\pm$ SE) grown at different NH_4^+ concentration. Different letters superscripts between columns indicate significant differences between treatments.

	0.5 mM	1 mM	5mM	10 mM	15 mM	F-ratio
1. Chl <i>a</i> (mg g ⁻¹ dw)	8.38 $\pm$ 1.36 ^d	6.53 $\pm$ 0.64 ^c	5.14 $\pm$ 1.54 ^b	3.79 $\pm$ 1.07 ^a	3.02 $\pm$ 0.56 ^a	34.5***
2. Chl <i>b</i> (mg g ⁻¹ dw)	3.42 $\pm$ 0.6 ^c	2.53 $\pm$ 0.26 ^b	2.21 $\pm$ 0.61 ^b	1.73 $\pm$ 0.41 ^a	1.53 $\pm$ 0.34 ^a	22.9***
3. total Chl <i>a+b</i>	11.8 $\pm$ 1.9 ^d	9.1 $\pm$ 0.9 ^c	7.4 $\pm$ 2.1 ^b	5.6 $\pm$ 1.5 ^a	4.6 $\pm$ 0.5 ^a	31.3***
4. Ca/Cb	2.5 $\pm$ 0.1 ^d	2.6 $\pm$ 0.1 ^{cd}	2.3 $\pm$ 0.2 ^{bc}	2.2 $\pm$ 0.2 ^b	2.0 $\pm$ 0.2 ^a	19.1***
5. Carotenoids (mg g ⁻¹ dw)	1.4 $\pm$ 0.3 ^c	1.0 $\pm$ 0.1 ^b	1.0 $\pm$ 0.3 ^b	0.8 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.6 $\pm$ 0.1 ^a	12.3***

*** (P<0.001)

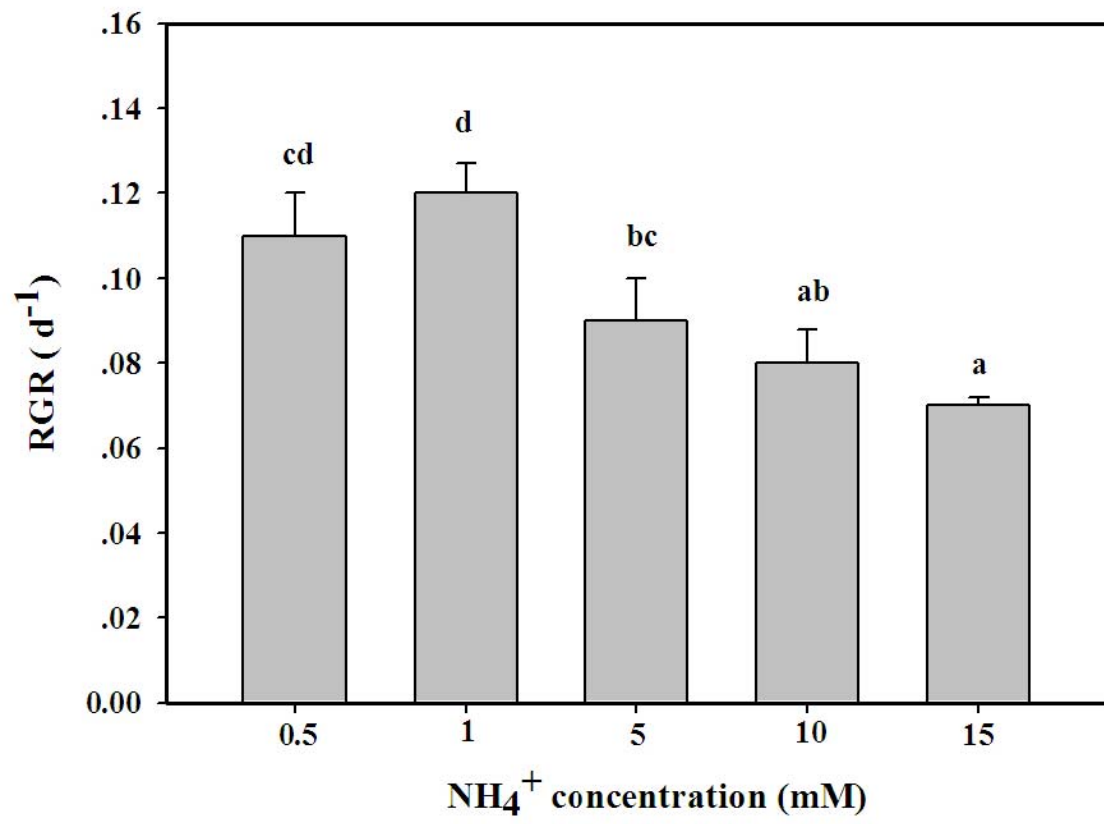


Fig. 1

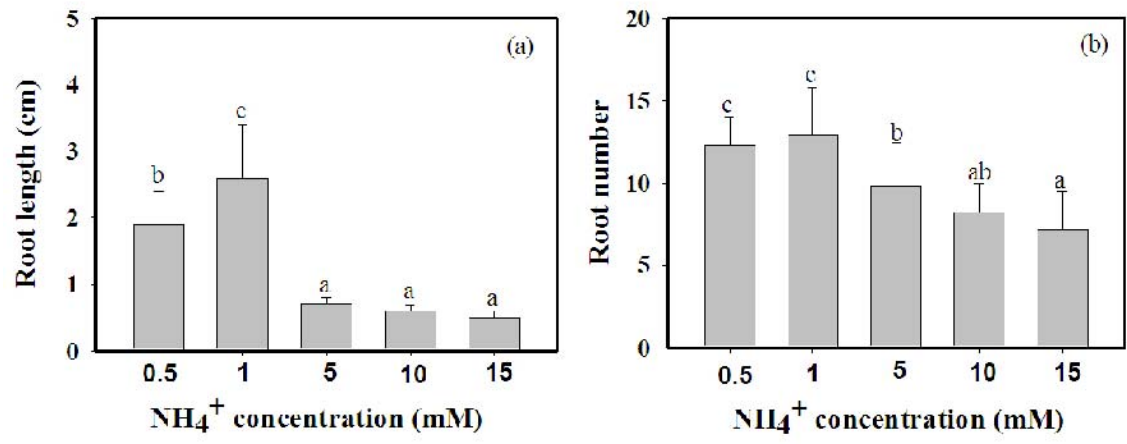


Fig.2

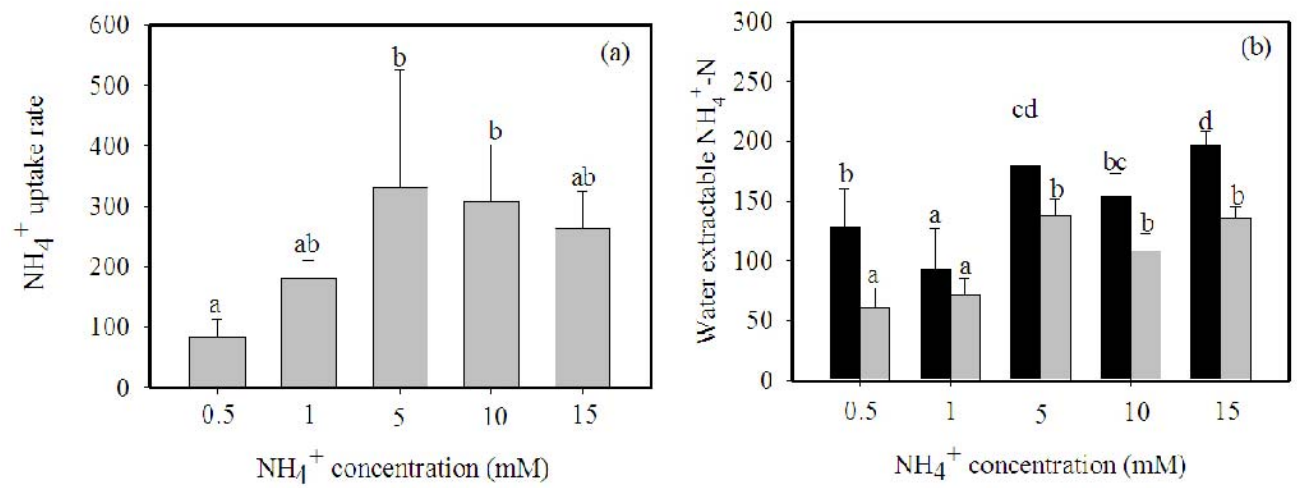


Fig.3

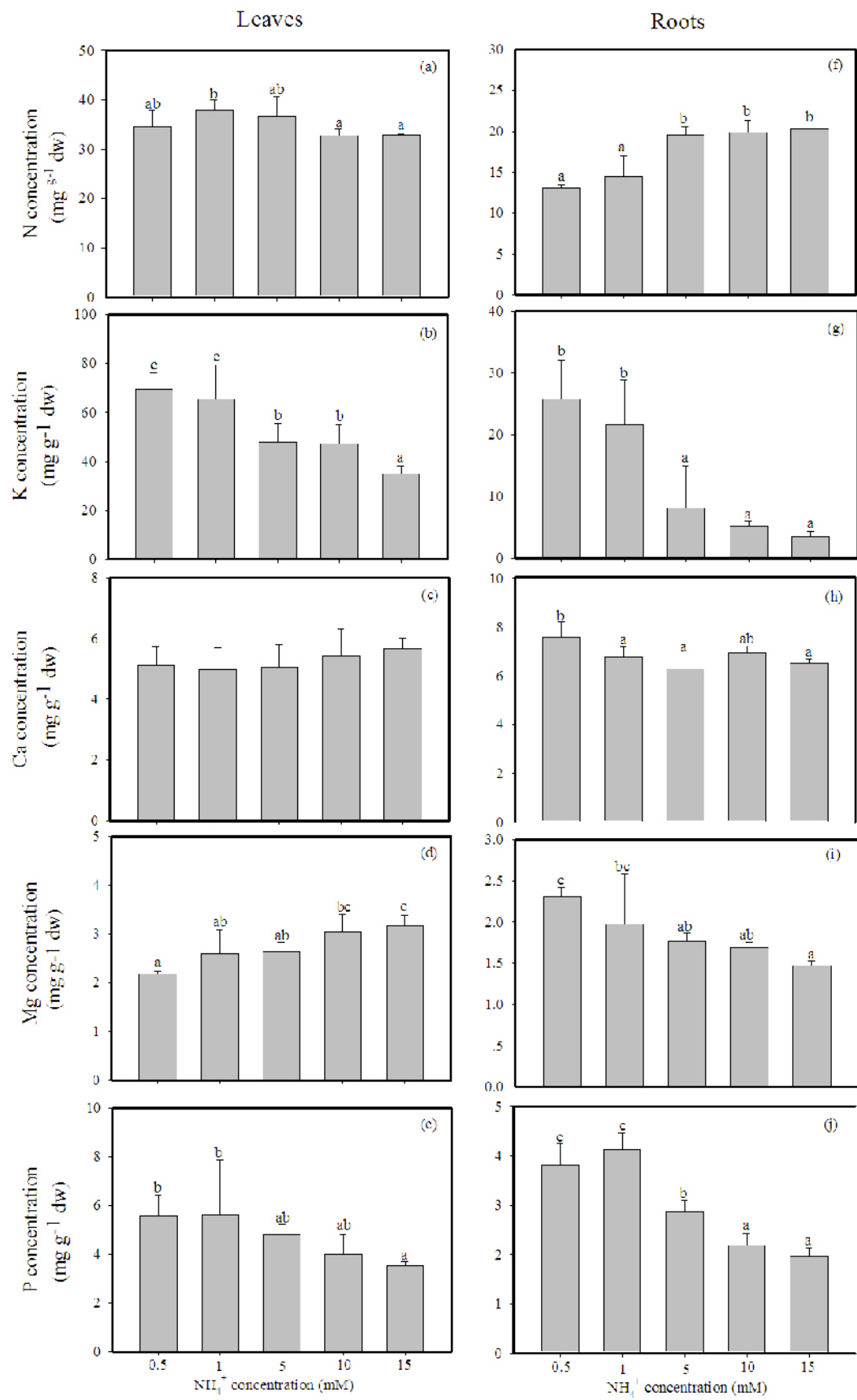


Fig.4