



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาว
ที่มีต่อจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชัน
เพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของไนโตรเจนในดิน
(Effects of long-term application of organic amendments
on soil microorganisms mediating ecosystem
functioning for nitrification to enhance N fertility of soil)

โดย ดร.พุกษา หล้าวงษา

26 กรกฎาคม 2560

สัญญาเลขที่ TRG5780022

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาว
ที่มีต่อจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชัน
เพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของไนโตรเจนในดิน

(Effects of long-term application of organic amendments
on soil microorganisms mediating ecosystem
functioning for nitrification to enhance N fertility of soil)

ดร.พุกษา หล้าวงษา

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และมหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code: TRG5780022

Project Title: การศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชันเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของไนโตรเจนในดิน (Effects of long-term application of organic amendments on soil microorganisms mediating ecosystem functioning for nitrification to enhance N fertility of soil)

Investigator: ดร.พฤกษา หล้าวงษา สังกัด มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: phrueksa@gmail.com

Project Period: 2 ปี (2 มิถุนายน 2557 – 1 มิถุนายน 2559)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยคือเพื่อศึกษาผลกระทบของการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพระยะยาวที่มีต่อจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในดินรวมทั้งชนิดและความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินโดยจะเน้นไปที่กลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนธาตุอาหารพืชไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักในดิน เช่น กระบวนการไนตริฟิเคชัน ผลการศึกษาพบว่าเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินในดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (กรรมวิธีทดลองควบคุม) ดินที่ใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง และใบมะขามร่วง เพื่อทดลองหาจำนวนประชากรแบคทีเรีย อาร์เคีย แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในแปลงทดลองด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction และ พบว่าจำนวนประชากรของแบคทีเรีย อาร์เคีย และ แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ทั้งสองชนิด ได้แก่ ซากถั่วลิสง และใบมะขามร่วง มีจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดังกล่าวสูงกว่าในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงมีจำนวนประชากรสูงที่สุด รองลงมาคือกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง และกรรมวิธีทดลองควบคุมมีจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียต่ำที่สุด ทั้งนี้การศึกษาโครงสร้างชุมชนและหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียวิเคราะห์โดยวิธี T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) และ Pyrosequencing ผลการทดลองวิเคราะห์ความโครงสร้างชุมชนและหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียพบว่าในดินทั้งสามกรรมวิธีทดลองจะสามารถพบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มากที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียในสกุล *Paenibacillus*

โดยในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามและกรรมวิธีทดลองควบคุมยังสามารถพบแบคทีเรียในสกุล *Tumebacillus* และ *Herbaspirillum* ด้วย อย่างไรก็ตามพบแบคทีเรียในสกุล *Alicyclobacillus* เฉพาะในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามเพียงกรรมวิธีทดลองเดียว และพบแบคทีเรียในสกุล *Ochrobactrum* และ *Rhodococcus* เฉพาะในกรรมวิธีทดลองเท่านั้น นอกจากนี้พบว่าความหลากหลายทางชีวภาพของอาร์เคียในดินทั้ง 3 กรรมวิธีการทดลองจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Crenarchaeota มากที่สุด รองลงมาคืออาร์เคียในไฟลัม Euryarcheota และ อาร์เคียในไฟลัม Parvarchaeota ตามลำดับ โดยกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วมจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Euryarcheota มากที่สุด และกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Crenarchaeota มากที่สุด เป็นที่น่าสนใจว่าโครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองควบคุมมีความแตกต่างกับโครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์อย่างชัดเจน โดยสรุปแล้วผลการทดลองดังกล่าวจะสามารถอธิบายได้ว่าคุณภาพสารอินทรีย์ซึ่งได้แก่ องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไนโตรเจน คาร์บอน ลิกลิน และโพลีฟีนอล รวมทั้งสาร allelochemicals ที่ได้จากใบมะขาม และคุณสมบัติทางกายภาพของสารอินทรีย์สามารถส่งผลทำให้จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดินในดินที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนธาตุอาหารพืชในโตรเจนแตกต่างกันได้ ทั้งนี้ยังรวมถึงโครงสร้างชุมชนและความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดินด้วย

Keywords: จำนวนประชากรและโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียและอาร์เคียในดิน (soil bacterial and archaeal abundance and community structure) อินทรีย์วัตถุในดิน (Soil organic matter) คุณภาพสารอินทรีย์ (organic input quality) การหมุนเวียนธาตุอาหาร (nutrient cycling)

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ อยู่ระหว่างการจัดเตรียมต้นฉบับในการตีพิมพ์
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
ผลที่ได้จากการดำเนินงานโครงการ “การศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนโตรฟิกเคชันเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของไนโตรเจนในดิน” ได้มีการนำไปใช้ในการสอนระดับปริญญาตรีวิชาจุลชีววิทยา นิเวศวิทยา และเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน (122 462) และวิชาดินเขตร้อน (122 433) ในหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) วิชาเอกปฐพีศาสตร์ และหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม) และนำไปใช้ในการสอนระดับบัณฑิตศึกษา วิชาจุลชีววิทยาทางดินขั้นสูง (129 761) ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีศาสตร์และสิ่งแวดล้อม) และหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปฐพีศาสตร์และสิ่งแวดล้อม)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
องค์ความรู้จากผลงานวิจัยได้ถูกนำเสนอในการประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 17 และตีพิมพ์ลงในวารสารแก่นเกษตร ฉบับพิเศษ รายละเอียด ดังนี้
Lawongsa, P., Rungthong, R., Kamolmanit, B., Saenjan, P. and Vityakon, P. (2016). Responses of soil bacterial population to the appearance of allelopathic substances. Khon Kaen agriculture Journal 44 supplement 1: 983-990.
องค์ความรู้จากผลงานวิจัยได้ถูกนำเสนอในการประชุมระดับนานาชาติ The 4th International Symposium on Biological Engineering and Natural Sciences รายละเอียด ดังนี้
Lawongsa, P. and Vityakon, P. (2016). Diversity and Structure of Soil Bacterial Communities under Long-Term Application of Different Quality of Organic Residues in Tropical Sandy Soil. The 4th International Symposium on Biological Engineering and Natural Sciences. July. 19-21. Sapporo, Japan. 941-952.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2557 จาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับสนับสนุนการทำวิจัยในโครงการการศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชันเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของไนโตรเจนในดิน (Effects of long-term application of organic amendments on soil microorganisms mediating ecosystem functioning for nitrification to enhance N fertility of soil) ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ Faculty of Agricultural Sciences, Institute of Agricultural Sciences in the Tropics (Hans-Ruthenberg-Institute), University of Hohenheim ประเทศเยอรมนี ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องในโครงการวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาสาขาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือทั้งในส่วนของการใส่สารอินทรีย์และการเก็บตัวอย่างดินในภาคสนาม และการทดลองในส่วนของห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัยทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ดร.พฤษภา หล้าวงษา
(หัวหน้าโครงการวิจัย)

บทคัดย่อ

ผลการศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชันในดินพบว่าเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินในดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (กรรมวิธีทดลองควบคุม) ดินที่ใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง และใบมะขามร่วง เพื่อทดลองหาจำนวนประชากรแบคทีเรีย อาร์เคีย แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในแปลงทดลองด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction พบว่าจำนวนประชากรของแบคทีเรีย อาร์เคีย แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย และแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ทั้งสองชนิด ได้แก่ ซากถั่วลิสง และใบมะขามร่วง มีจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดังกล่าวสูงกว่าในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ ทั้งนี้ผลการทดลองวิเคราะห์ความโครงสร้างชุมชนและหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียพบว่าในดินทั้งสามกรรมวิธีทดลองจะสามารถพบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มากที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียในสกุล *Paenibacillus* โดยในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามและกรรมวิธีทดลองควบคุมยังสามารถพบแบคทีเรียในสกุล *Tumebacillus* และ *Herbaspirillum* ด้วย อย่างไรก็ตามพบแบคทีเรียในสกุล *Alicyclobacillus* เฉพาะในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามเพียงกรรมวิธีทดลองเดียว และพบแบคทีเรียในสกุล *Ochrobactrum* และ *Rhodococcus* เฉพาะในกรรมวิธีทดลองเท่านั้น นอกจากนี้พบว่าความหลากหลายทางชีวภาพของอาร์เคียในดินทั้ง 3 กรรมวิธีทดลองจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Crenarchaeota มากที่สุด รองลงมาคืออาร์เคียในไฟลัม Euryarcheota และ อาร์เคียในไฟลัม Parvarchaeota ตามลำดับ โดยกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Euryarcheota มากที่สุด และกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Crenarchaeota มากที่สุด เป็นที่น่าสนใจว่าโครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองควบคุมมีความแตกต่างกับโครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์อย่างชัดเจน โดยผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าคุณภาพสารอินทรีย์ซึ่งได้แก่ องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไนโตรเจน คาร์บอน ลิกนิน และโพลีฟีนอล รวมทั้งสาร allelochemicals ที่ได้จากใบมะขาม และคุณสมบัติทางกายภาพของสารอินทรีย์สามารถส่งผลทำให้จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดินในดินที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนธาตุอาหารพืชไนโตรเจนแตกต่างกันได้ ทั้งนี้ยังรวมถึงโครงสร้างชุมชนและความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดินด้วย

Abstract

The project “Effects of long-term application of organic amendments on soil microorganisms mediating ecosystem functioning for nitrification to enhance N fertility of soil” appeared that higher bacterial, archaeal, ammonia oxidizing bacterial and Ammonia oxidizing archaeal population were found in soil treated with organic residues (groundnut stover and tamarind) when compared to control (soil without organic residue application) by real-time polymerase chain reaction. In all three gene libraries, the majority of sequences were affiliated with the firmicutes which was predominantly represented by sequences of *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. (all treatment). Several sequences were affiliated with firmicute (*Tumebacillus* sp.) and beta-proteobacteria (*Herbaspirillum* sp.) with large proportions in control and tamarind treatment. The other majority of isolates obtained from tamarind treatment belonged to the firmicutes *Alicyclobacillus* sp., In the control treatment, several sequences were, in contrast to the others, assigned as alpha-proteobacteria, *Ochrobacterium tritici* and *Ochrobactrum anthropi* with the high G-C gram-positive bacteria *Rhodococcus gingshengii*. The finding of archaeal biodiversity showed that dominant archaeal phylum of Euryarcheota was found in soil treated with tamarind. Crenarchaeota was found to be dominant archaeal family in soil treated with groundnut strover. Different archaeal community structures in control was observed when compared with archaeal community structures in soil treated with organic residues. The findings appeared that different quality of organic residues such as nitrogen content, carbon contents, lignin contents, polyphenol contents including allelochemicals from tamarind and physical properties of organic residues can alter bacterial and archaeal population and biodiversity.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	1
ความสำคัญ และที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีการดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัย	12
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	33
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	38
บทความวิจัยเรื่อง Responses of soil bacterial population to the appearance of allelopathic substances	38
บทความวิจัยเรื่อง Diversity and Structure of Soil Bacterial Communities under Long-Term Application of Different Quality of Organic Residues in Tropical Sandy Soil	47

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กรรมวิธีทดลองของการทดลองภาคสนามในสถานีทดลอง	8
2	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับแบคทีเรีย	10
3	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับอาร์เคีย	11
4	ค่าวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของดิน	12
5	จำนวนประชากรของแบคทีเรียเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์	14
6	จำนวนประชากรของอาร์เคียเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์	15
7	จำนวนประชากรของแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์	16
8	จำนวนประชากรของอาร์เคียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์	17
9	ผลของ caffeic acid ที่มีต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในดิน	19
10	ผลของ tannic acid ที่มีต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในดิน	20
11	ผลของ gallic acid ที่มีต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในดิน	21
12	ชนิดของแบคทีเรียที่พบจากตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์และดินในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์	26

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวความคิด (conceptual framework) ของโครงการวิจัย	3
2	ผลของสารสกัดใบมะขามที่มีต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในดิน	18
3	Principle component analysis (PCA) ของประชากรแบคทีเรียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง	24
4	Dendrogram จาก Bray-Curtis similarity index ของประชากรแบคทีเรียจากดินในแต่ละกรรมวิธีทดลอง	24
5	ชนิดของประชากรแบคทีเรียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในระดับ Family level	28
6	Heat map แสดงความหลากหลายทางชีวภาพของประชากรแบคทีเรียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในระดับ Family level	29
7	Principle component analysis (PCA) ของประชากรอาร์เคียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง	30
8	Dendrogram จาก Bray-Curtis similarity index ของประชากรอาร์เคียจากดินในแต่ละกรรมวิธีทดลอง	31
9	ชนิดของประชากรอาร์เคียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในระดับ Phylum level [ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์]	32
10	ชนิดของประชากรอาร์เคียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในระดับ order level [ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์]	32

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

การแก้ปัญหาดินทรายที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ สามารถทำได้โดยการใส่สารอินทรีย์ลงไปในดินเพื่อปรับปรุงโครงสร้างของดินและเป็นการบำรุงดิน เช่น ชากใบมะขาม ใบพลวง ฟางข้าว หรือซากต้นใบกล้วย เป็นต้น (Vityakon et al., 2000; Puttaso et al., 2011; Samahadthai et al., 2010) สารอินทรีย์เหล่านี้มีศักยภาพช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินได้เนื่องจากเกิดกระบวนการสลายตัว (decomposition) ขึ้นในดิน ทั้งนี้ระบบการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน (decomposition subsystem) ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยที่สำคัญ 3 ชนิดได้แก่ คุณภาพของสารอินทรีย์ (quality หรือ Q) ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของสารอินทรีย์ รวมทั้ง modifiers ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีของสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่มีอิทธิพลต่อการทำงานหรือพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เข้าย่อยสลายสารอินทรีย์โดยกลไกที่นอกเหนือจากการเป็นแหล่งคาร์บอน ธาตุอาหาร และพลังงาน เช่นสาร allelochemicals เป็นต้น สิ่งมีชีวิตที่ทำการย่อยสลาย ทั้งสัตว์และจุลินทรีย์ดิน (organism หรือ O) และสภาพแวดล้อมทางกายภาพและเคมี (physicochemical environment หรือ P) เช่น อุณหภูมิ เนื้อดิน ความชื้นดิน และ pH ของดิน เป็นต้น สำหรับสิ่งมีชีวิตในดิน ทั้งสัตว์และจุลินทรีย์ดิน เป็นปัจจัยการย่อยสลายที่มีบทบาทสำคัญยิ่ง จำนวนประชากรและชนิดของจุลินทรีย์ต่างกัน รวมทั้งกิจกรรม ความสามารถของจุลินทรีย์ดินในการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างกันสามารถก่อให้เกิดการย่อยสลายที่ต่างกันไป

เนื่องจากในการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพลงในดินเป็นระยะเวลายาวนานนั้นอาจส่งผลกระทบต่อจำนวน ชนิด และกิจกรรมของจุลินทรีย์ดั้งเดิม ทำให้แม้ว่าสารอินทรีย์ดังกล่าวอาจช่วยในการปรับปรุงบำรุงดินและเพิ่มผลผลิตของพืชได้ในระยะแรก แต่ก็อาจส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ดินในระยะยาว ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ต่างคุณภาพต่อความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดิน โดยเน้นที่จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดิน ได้แก่ แบคทีเรีย (Bacteria) อาร์เคีย (Archaea) แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia oxidizing bacteria; AOB) และแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia oxidizing archaea; AOA) ในดิน ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อการเกิดกระบวนการแปรรูปของแอมโมเนียให้มาเป็นไนโตรเจนโดยการการทำงานของเอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิจีเนส และความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดินซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้เป็นกระบวนการเริ่มต้นของการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันในดิน ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความรู้ ความเข้าใจในการประยุกต์ใช้สารอินทรีย์ต่างคุณภาพมาใช้ในการแก้ปัญหาดินเสื่อมโทรม ความอุดมสมบูรณ์ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีดินทรายมากในภาคนี้ได้อย่างถูกต้อง โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อความเป็นประโยชน์ของจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาทางด้านการเกษตรแบบยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียและอาร์เคียในดิน
2. เพื่อศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อจำนวนประชากรแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียและแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในดิน
3. เพื่อศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อความหลากหลายทางชีวภาพของประชากรจุลินทรีย์ในดิน

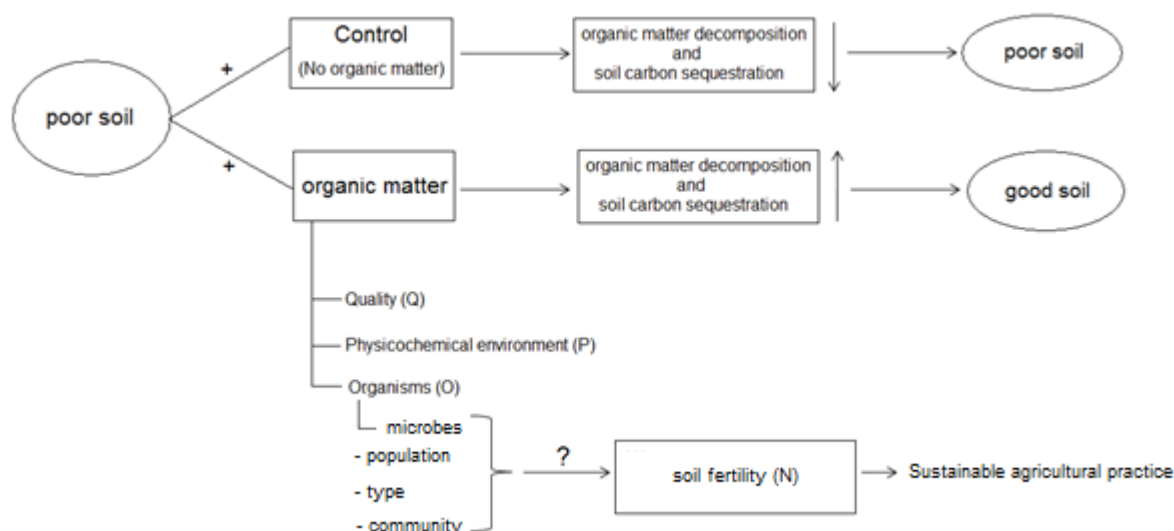
ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยการศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชันเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของไนโตรเจนในดิน (Effects of long-term application of organic amendments on soil microorganisms mediating ecosystem functioning for nitrification to enhance N fertility of soil) มีขอบเขตการศึกษามุ่งเน้นศึกษาจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดิน ได้แก่ แบคทีเรีย อาร์เคีย แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย และแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในดิน ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อการเกิดกระบวนการแปรรูปของแอมโมเนียให้มาเป็นไนโตรเจนโดยการทำงานของเอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิจีเนส และความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดินซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้เป็นกระบวนการเริ่มต้นของการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพระยะยาว

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การแก้ปัญหาดินทรายที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ สามารถทำได้โดยการใส่สารอินทรีย์ลงไปในดินเพื่อปรับปรุงโครงสร้างของดินและเป็นการบำรุงดิน เช่น ชากใบมะขาม ใบพลวง ฟางข้าว หรือซากต้นใบถั่วลิสง เป็นต้น (Vityakon et al., 2000; Puttaso et al., 2011; Samahadthai et al., 2010) สารอินทรีย์เหล่านี้มีศักยภาพช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินได้เนื่องจากเกิดกระบวนการสลายตัว (decomposition) ขึ้นในดิน ทั้งนี้ระบบการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน (decomposition subsystem) ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ คุณภาพของสารอินทรีย์ (quality หรือ Q), สิ่งมีชีวิตที่ทำการย่อยสลาย ทั้งสัตว์และจุลินทรีย์ดิน (organism หรือ O) และสภาพแวดล้อมทางกายภาพและเคมี (physicochemical environment หรือ P) สำหรับสิ่งมีชีวิตในดิน ทั้งสัตว์และจุลินทรีย์ดิน เป็นปัจจัยการย่อยสลายที่มีบทบาทสำคัญยิ่ง จำนวนประชากรและชนิดของจุลินทรีย์ต่างกัน รวมทั้งกิจกรรม ความสามารถของจุลินทรีย์ดินในการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างกัน ก็ก่อให้เกิดการย่อยสลายที่ต่างกันไป

เนื่องจากในการใส่สารอินทรีย์ต่างคุณภาพลงในดินนั้นอาจส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ดินดั้งเดิม ทำให้แม้ว่าสารอินทรีย์ดังกล่าวอาจช่วยในการปรับปรุงบำรุงดินและเพิ่มผลผลิตของพืชได้ในระยะแรก แต่ก็อาจส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ดินในระยะยาว รวมทั้งอัตราสารอินทรีย์ที่ใส่ก็สามารถส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ดินดังกล่าวด้วยเช่นกัน ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนโตรฟิกเคชันเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของไนโตรเจนในดิน (ภาพที่ 1) เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในการประยุกต์ใช้สารอินทรีย์ต่างคุณภาพมาใช้ในการแก้ไขปัญหาดินเสื่อมโทรมความอุดมสมบูรณ์ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีดินทรายมากในภาคนี้ได้อย่างถูกต้อง โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อความเป็นประโยชน์ของจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาทางด้านการเกษตรแบบยั่งยืนต่อไป



ภาพที่ 1 กรอบแนวความคิด (conceptual framework) ของโครงการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงผลกระทบของสารอินทรีย์ต่างคุณภาพที่มีต่อประชากรและความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดิน
2. สามารถนำผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติในฐาน TCI และในวารสารระดับนานาชาติในฐาน ISI อย่างน้อย 1 เรื่อง
3. สามารถนำผลงานในการประชุมระดับชาติและ/หรือนานาชาติ
4. ผลจากงานวิจัยที่ได้จะถูกนำไปถ่ายทอดแก่นักวิชาการที่เกี่ยวข้องของมหาวิทยาลัยขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร กรมพัฒนาที่ดิน สำนักงานสิ่งแวดล้อม และพนักงานด้านเกษตรในองค์การบริหารส่วนตำบล เพื่อนำผลไปประยุกต์ใช้ให้ถึงมือเกษตรกรต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. การปรับปรุงบำรุงดิน

ดินที่เหมาะสมสำหรับการเพาะปลูกนั้นจะต้องมีคุณสมบัติที่ดีสามประการได้แก่คุณสมบัติทางเคมี คือ ดินต้องมีความสมดุลของแร่ธาตุอาหารพืช ทั้งธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรองและจุลธาตุ และมีปฏิกิริยาของดินที่เป็นกลางคือดินต้องไม่เป็นกรดเป็นด่างหรือมีความเค็มจนเกินไป คุณสมบัติทางกายภาพ คือ ดินต้องมีความสมดุลของอากาศและน้ำ คือดินต้องมีโครงสร้างที่ดี มีการร่วนซุย อากาศถ่ายเทได้ดี มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี เมื่อดินเกาะกันอย่างหลวมๆ เพื่อช่วยให้รากพืชสามารถแผ่ขยายและซอนโซไปหาแร่ธาตุอาหารพืชได้ง่ายในระยะที่กว้างและไกล เป็นดินที่อ่อนนุ่มไม่แข็งกระด้าง คุณสมบัติทางชีวภาพ คือเป็นดินที่มีความสมดุลของจุลินทรีย์ เป็นดินที่มีจุลินทรีย์และสิ่งที่มีชีวิตขนาดเล็กในดินที่เป็นประโยชน์ในปริมาณมาก สามารถสร้างกิจกรรมต่างๆ ที่ก่อให้เกิดประโยชน์แก่พืชได้ดี เช่นสามารถย่อยแร่ธาตุในดินที่ยังไม่ประโยชน์แก่พืชหรือให้ประโยชน์น้อยให้เป็นประโยชน์แก่พืช

ดินที่ใช้ทำการเพาะปลูกที่มีปัญหาไม่ว่าจะเป็นดินที่เสื่อมค่าขาดความอุดมสมบูรณ์ ดินเหล่านี้สามารถปรับปรุงให้เกิดประโยชน์ใช้ในการเพาะปลูกได้ การปรับปรุงบำรุงดินโดยวิธีธรรมชาติเป็นทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ได้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย เป็นการใช้วัสดุที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติหรือวัสดุเหลือใช้มาทำให้เกิดประโยชน์ในการปรับปรุงบำรุงดิน เป็นการใชพืชและสัตว์เป็นแหล่งของธาตุอาหารพืชในดิน ตลอดจนการเขตรกรรมและระบบการจัดการเกษตรที่เหมาะสม เป็นการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีสังเคราะห์มาใช้เป็นวัสดุปรับปรุงบำรุงดินทำให้เกิดผลผลิตที่บริสุทธิ์ เป็นประโยชน์ต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค ช่วยลดต้นทุนการผลิตและลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษอีกด้วย

อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงบำรุงดินโดยวิธีธรรมชาตินั้นจะต้องคำนึงถึงความสมดุลทางเคมี ชีวะ และ กายภาพ เป็นหลัก ซึ่งสามารถดำเนินการได้โดยวิธีต่างๆ เช่นการปรับปรุงบำรุงดินโดยปลูกพืชหมุนเวียน การปลูกพืชสดเป็นปุ๋ยปรับปรุงบำรุงดิน และการใช้ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก รวมทั้งสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อเพิ่มอินทรีย์วัตถุ เพิ่มธาตุอาหารพืชให้แก่ดิน ช่วยให้ดินร่วนซุย ดินอุ้มน้ำได้ดีขึ้น ดินไม่แข็งกระด้าง และรักษาอุณหภูมิดินได้ด้วย

2. อินทรีย์วัตถุและสารอินทรีย์

อินทรีย์วัตถุ (Organic matter) หมายถึง สิ่งที่ได้จากการย่อยสลายตัวของสารอินทรีย์ ได้แก่ ซากพืช ซากสัตว์ รวมทั้งสิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ เศษขยะต่าง ๆ เป็นต้น

กระบวนการสลายตัวของสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระบบดินเป็นกระบวนการที่สำคัญมาก โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการย่อยสลายมี 3 ตัวหลัก คือ คุณภาพของสารอินทรีย์ (quality หรือ Q) ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของสารอินทรีย์ รวมทั้ง modifiers ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีของสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่มีอิทธิพลต่อการทำงานหรือพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เข้าย่อยสลายสารอินทรีย์ เช่นสาร allelochemicals เป็นต้น, สิ่งมีชีวิตที่ทำการย่อยสลาย ทั้งสัตว์ และจุลินทรีย์ดิน (organisms หรือ O) และสภาพแวดล้อมทางกายภาพและเคมี (physicochemical environment หรือ P) เช่น อุณหภูมิ เนื้อดิน ความชื้นดิน และ pH ของดิน เป็นต้น

3. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการสลายตัวของสารอินทรีย์

3.1. ปัจจัยคุณภาพสารอินทรีย์ (quality factor)

คุณภาพของสารอินทรีย์แบ่งได้เป็นคุณภาพทางกายภาพ (physical quality) และทางเคมี (chemical quality) คุณภาพทางกายภาพหมายถึงคุณสมบัติทางกายภาพของสารอินทรีย์ซึ่งมี 3 ลักษณะหลัก ได้แก่ คุณสมบัติ พื้นผิว ความเหนียวทนทาน (toughness) หรือความแข็ง และขนาดชิ้น (Swift et al., 1979) ส่วนคุณภาพของสารอินทรีย์ทางเคมีเป็นประเด็นที่มีการศึกษามาก องค์ประกอบทางเคมีเป็นปัจจัยที่ให้พลังงานคาร์บอน (C) และธาตุอาหารอื่น ๆ แก่สิ่งมีชีวิตที่เข้าย่อยสลายโดยเฉพาะจุลินทรีย์ โดยผ่านทางกระบวนการที่เปลี่ยนรูปสารประกอบอินทรีย์ให้เป็นรูปสารประกอบอนินทรีย์เรียกว่า mineralization เช่น คาร์โบไฮเดรตถูกเปลี่ยนรูปเป็น CO_2 , โปรตีนถูกเปลี่ยนรูปเป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) และไนเตรต (NO_3^-) และไฟเตต ถูกเปลี่ยนเป็นฟอสเฟต (H_2PO_4^-) เป็นต้น สำหรับธาตุอาหารไนโตรเจน (N) การใช้ตัวชี้อัตราส่วน C ต่อ N (C/N ratio) เป็นตัวบ่งบอกว่าจะเกิด net N mineralization หรือ net N immobilization ในการสลายตัวของสารอินทรีย์ชนิดหนึ่ง โดยอัตราส่วน C/N จะถูกใช้เป็นตัวชี้คุณภาพสารอินทรีย์ทางเคมีที่ใช้มาตั้งแต่ยุคต้นของการศึกษาการย่อยสลาย และในปัจจุบันยังมีการใช้อัตราส่วน ลิกนิน/ N ประกอบด้วย (Melillo et al., 1982)

3.2. ปัจจัยสภาพแวดล้อมทางดิน (physicochemical environment)

ปัจจัยสภาพแวดล้อมทางดินเป็นผลมาจากปัจจัยภูมิอากาศที่มีปฏิสัมพันธ์กับดิน ที่มีผลต่อการย่อยสลายในระบบดินซึ่งเป็นปัจจัยทางกายภาพของดิน ได้แก่ ความชื้นดิน และอุณหภูมิดิน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางเคมีดิน ได้แก่ pH ของดิน โดยทั่วไปสารอินทรีย์ในสภาพดินที่ความชื้นต่ำกว่ามีการสลายตัวน้อย พิจารณาจากน้ำหนักแห้งปราศจากเถ้าที่เหลืออยู่มากกว่าในสภาพดินแห้ง (พจนีย์, 2551) Paul and Clark (1996) พบว่า จุลินทรีย์ยังมีความไวต่อความเครียด หรือ แรงยึดน้ำ (moisture tension) ของดิน โดยกิจกรรมจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อค่าแรงยึดน้ำเป็นศูนย์ในสภาพน้ำขัง และเมื่อค่าแรงยึดน้ำของดินเพิ่มขึ้นในสภาพดินแห้งขึ้น นอกจากนี้การเปลี่ยนรูปไนโตรเจนจากรูปอินทรีย์ไปอยู่ในรูปของอนินทรีย์ไนโตรเจน (N mineralization) เป็นกระบวนการย่อยสลายที่ได้รับอิทธิพลจากความชื้นดินด้วย

3.3. ปัจจัยสิ่งมีชีวิตในดิน (decomposer organisms)

สิ่งมีชีวิตในดินที่มีบทบาทในการย่อยสลายมีทั้งสัตว์ (macroorganism หรือ fauna) และ จุลินทรีย์ (microorganism) โดยสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าจุลินทรีย์จะมีหน้าที่หลักในการย่อยสลายทางกายภาพ ได้แก่ กระบวนการทำให้ซากอินทรีย์มีขนาดเล็กลงซึ่งทำให้จุลินทรีย์สามารถเข้าย่อยสลายทางชีวเคมีได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น จุลินทรีย์มีปริมาณน้อยในดิน เพียง 1-3% ของอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมดของดิน (SOC) แต่มีบทบาทสูงที่สุดในการย่อยสลาย ดังเห็นได้จากค่ากิจกรรมจุลินทรีย์ที่วัดจากการหายใจของดินหรือการปลดปล่อย CO₂ จากดิน โดยจุลินทรีย์ปลดปล่อย CO₂ คิดเป็น 80-95% ของการปลดปล่อยทั้งหมด (Lavelle et al., 1993) จุลินทรีย์ที่ทำการย่อยสลายได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อราส่วนใหญ่เป็น chemoheterotrophs ซึ่งได้รับพลังงานและคาร์บอนจากสารอินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ทำการย่อยสลายได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อราส่วนใหญ่เป็น chemoheterotrophs ซึ่งได้รับพลังงานและคาร์บอนจากสารอินทรีย์ ทั้งนี้การใส่สารอินทรีย์ลงในดินเพื่อปรับปรุงและเพิ่มอินทรีย์วัตถุให้กับดินนั้นอาจส่งผลกระทบต่อจำนวนจุลินทรีย์ในดินรวมทั้งโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ได้ โดย Kamolmanit et al., 2013 พบว่าหลังจากมีการใส่สารอินทรีย์ ได้แก่ ซากถั่วลิสง ซากใบมะขาม ใบพลวง และ ฟางข้าว เป็นระยะเวลา 16 ปี สามารถส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ (เชื้อรา) ในดินได้ โดยในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ส่งผลกระทบทำให้จำนวนเชื้อราในดินเพิ่มมากขึ้นได้ ทั้งนี้นอกจากจำนวนประชากรแล้วการใส่สารอินทรีย์ยังส่งผลกระทบต่อโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ (เชื้อรา) ด้วย โดยเชื้อราหลักที่พบในดินที่มีการใส่ ฟางข้าว ได้แก่ *Myceliophthora thermophila* เชื้อราหลักที่พบในดินที่มีการใส่ซากถั่วลิสง ได้แก่ *Myceliophthora thermophila* *Proleptomonas faecicola* และ *Aspergillus fumigates* เชื้อราหลักที่พบในดินที่มีการใส่ใบพลวง ได้แก่ *Myceliophthora thermophila* *Aspergillus versicolor* *Anguillospora longissima* และ *Aspergillus fumigates* เชื้อราหลักที่พบในดินที่มีการใส่ใบมะขาม ได้แก่ *Myceliophthora thermophila* *Aspergillus versicolor* *Fusarium oxysporum* และ *Cryptococcus podzolicus* เป็นต้น

ทั้งนี้ นอกจากการใส่สารอินทรีย์จะส่งผลกระทบต่อเชื้อราในดินแล้วยังส่งผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรียในดินด้วย (Rasche et al., 2014) อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียยังมีจำกัดจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการวิจัยผลกระทบของสารอินทรีย์ต่างคุณภาพที่มีต่อความหลากหลายทางชีวภาพ ชนิดประชากร และกิจกรรมของแบคทีเรียในดินเพิ่มเติม

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. แบบการวิจัย

วางแผนงานทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) 3 ซ้ำ

2. ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย การเก็บข้อมูล การกำหนดพื้นที่

ทำการทดลองในแปลงทดลอง ณ สถานีทดลองของสำนักงานเกษตรและสหกรณ์ ตำบลท่าพระ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น (16°20' N; 102°49' E) ซึ่งดินในแปลงทดลองดังกล่าวจะใส่สารอินทรีย์ปีละครั้ง ในช่วงปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคมของทุกปี โดยเริ่มมาตั้งแต่ปี 2538 โดยแต่ละแปลงย่อยมีขนาด 4 x 4 เมตร ทั้งนี้ตัวอย่างดินที่นำมาวิเคราะห์ในการทดลองในครั้งนี้จะดำเนินการเก็บตัวอย่างดินในการใส่สารอินทรีย์ปีที่ 16 ดำเนินการตามกรรมวิธีต่างๆจำนวน 3 กรรมวิธีทดลองดังมีรายละเอียดและวิธีการปฏิบัติแสดงในตารางที่ 1 สารอินทรีย์ที่ใช้ ได้แก่ ใบมะขามร่วง และเศษซากถั่วลิสง โดยเศษซากของถั่วลิสงจะใช้ทั้งต้นและราก โดยสับเป็นท่อนเล็ก ๆ นำไปตากให้แห้ง กรณีใบมะขามจะใช้เฉพาะใบที่ร่วงหล่นจากต้นใหม่ ทำการรวบรวมใบมะขามร่วง และเศษซากถั่วลิสง ให้ได้ปริมาณที่ต้องการจากนั้นหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นเพื่อนำมาคำนวณน้ำหนักแห้งที่แท้จริงของสารอินทรีย์ที่ต้องใส่ในแต่ละกรรมวิธีทดลอง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 กรรมวิธีทดลองของการทดลองภาคสนามในสถานีทดลอง

กรรมวิธี ทดลอง	การทดลองสภาพไร่	คุณภาพสารอินทรีย์	อัตรา (ตัน นน. แห่ง ต่อเฮกตาร์ ต่อปี)
1	ไม่ใส่สารอินทรีย์ (Control)	-	0
2	ใบมะขามร่วง (tamarind leaves residues)	(intermediate quality) มี C=42.7%, N=1.36%, C/N=31.5, Lignin=8.77%, Polyphenols=3.15% และ cellulose=14.3% (Puttaso et al., 2011)	10
3	ซากถั่วลิสง (groundnut strover)	(high N) มี C=38.8%, N=2.28%, C/N=17.1, Lignin=6.76%, Polyphenols=1.29% และ cellulose=17.8% (Puttaso et al., 2011)	10

3. การเก็บข้อมูล

ทำการเก็บตัวอย่างดิน และทำการวิเคราะห์หาจำนวนประชากร ชนิด และโครงสร้างชุมชนของจุลินทรีย์ดิน

4. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของดิน

ดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างดินในห้องปฏิบัติการทั้งคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของดิน ได้แก่ การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ (% organic matter) โดยวิธี Wet oxidation การวิเคราะห์เนื้อดิน โดยร่อนดินผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร หรือขนาด 10 เมช (Mash) เพื่อหาลักษณะเนื้อดิน (Soil Texture: % Sand, % Silt, % Clay) โดยวิธี Hydrometer การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน (Soil pH) การวิเคราะห์หาค่าการนำไฟฟ้าในดิน (Electrical conductivity; EC) การวิเคราะห์หาความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation exchange capacity; CEC) โดยวิธี Ammonium Acetate Extract การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในดิน (Moisture content) การวิเคราะห์หาค่าความหนาแน่นของดิน วิเคราะห์หาไนโตรเจนทั้งหมดในดิน (total nitrogen) ตามวิธี Kjeldahl method การวิเคราะห์หาฟอสฟอรัสที่เป็น

ประโยชน์ (Available P:ppm) ตามวิธี Bray II การวิเคราะห์หาโพแทสเซียมที่สกัดได้ (extractable K) โดยใช้ Ammonium acetate เป็นตัวสกัดแล้วอ่านค่าจาก Atomic absorption spectrophotometer เป็นต้น

5. การวิเคราะห์จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดินในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ทำโดยวิธี RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากดินตัวอย่างจากทั้ง 3 กรรมวิธีทดลอง แล้วทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายแบบเรียลไทม์ ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งต้องการตรวจวัดได้และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบทำให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจริงจากค่าของ exponential phase ที่ได้จากการเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากดินตัวอย่างจากทั้ง 3 กรรมวิธีทดลอง แล้วทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย 16SrRNA gene และ *amoA* gene แบบเรียลไทม์ โดยใช้ชุดไพรเมอร์ดังนี้ *amoA*1f (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') - *amoA*2r (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3') (Rotthauwe et al., 1997) และ Arch-*amoA*f (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3') - Arch-*amoA*r (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3') (Francis et al., 2005) จะถูกใช้สำหรับการศึกษาจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย และแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย ตามลำดับ โดยชุดไพรเมอร์ Eub338 (5'-ACCTACGGGAGGAGCAGCAG-3') (Lane, 1991) - Eub518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Muyzer et al., 1993) และ Ar109f (5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3') - Ar912r (5'-CTCCCCGCCAATTCCTTTA-3') (Lueders and Friedrich, 2000) ถูกใช้สำหรับการศึกษาจำนวนประชากรของแบคทีเรีย และอาร์เคีย ตามลำดับ

6. การศึกษาชนิด ความหลากหลายทางชีวภาพ และกิจกรรมของแบคทีเรียในดิน

การศึกษานี้ โครงสร้างชุมชน และความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดิน ได้แก่ แบคทีเรีย อาร์เคีย แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย และแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย ทำโดยวิธี T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดชิ้นดีเอ็นเอส่วนปลายที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *AluI* ทั้งนี้ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในวิธี T-RFLP จะเป็นไพรเมอร์ชุดเดียวกันกับการทำ RT-PCR ข้างต้น แต่จะมีการติดฉลากสารกัมมันตรังสีไว้ที่ไพรเมอร์เส้นหนึ่ง หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ T-RFs (Terminal restriction fragments) ด้วยโปรแกรม GeneScan และใช้เทคนิค 454 pyrosequencing ควบคู่ไปด้วย โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายคือ 16SrRNA gene Amplicon V1-V3 โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากดินตัวอย่างจากทั้ง 3 กรรมวิธีทดลอง แล้วทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย 16SrRNA gene โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ศึกษาโดยใช้ primer 27f และ 1492r (Lane, 1991) สำหรับศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียและ primer Ar109f และ

Ar912r (Lueders and Friedrich, 2000) สำหรับศึกษาโครงสร้างชุมชนอาร์เคีย แบคทีเรียปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ, PCR buffer (10x), $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 200 ไมโครโมลาร์, primer 27f และ 1492r 0.45 ไมโครโมลาร์, DNA polymerase 1 ยูนิต และน้ำ จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermocycler ด้วยรอบการทำงานดังตารางที่ 2 และ 3 แล้วทำการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Electrophoresis โดยใช้ 1% Agarose gel ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 โวลต์ 1 ชั่วโมง ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Ethidium bromide และอ่านผลที่ได้ด้วยเครื่อง Gel documentation หลังจากนั้นทำการโคลนยีน 16SrRNA gene โดยใช้พลาสมิดชุดโคลนของ TOPO TA cloning ของบริษัท Invitrogen (USA) และตรวจสอบ PCR products และจัดกลุ่มโคลนที่มีรูปแบบเหมือนกันให้เป็น Operational taxonomic units (OTUs) เดียวกัน จากนั้นนำ OTUs ที่เป็นตัวแทนจากแต่ละกรรมวิธีทดลองไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งตัวอย่างโคลนไปวิเคราะห์ด้วยวิธี 454 pyrosequencing ที่ 1st BASE DNA Sequencing Service นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาค้นหาในฐานข้อมูล GenBank ในเว็บไซต์ของ National Center for Biotechnology Information; NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันกับดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ

ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับแบคทีเรีย

ขั้นตอน	องศาเซลเซียส	เวลา	รอบ
Pre-denaturation	95	5 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	30
Annealing	58	1 นาที	
Extension	72	2 นาที	
Final-extension	72	7 นาที	1

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับอาร์เคีย

ขั้นตอน	องศาเซลเซียส	เวลา	รอบ
Pre-denaturation	95	5 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	30
Annealing	52	1 นาที	
Extension	72	2 นาที	
Final-extension	72	7 นาที	1

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0 ทำการวิเคราะห์ห้ห้ผลลัพธ์ของ กรรมวิธี การทดลองสารอินทรีย์โดยวิธีวิเคราะห์ ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ RCBD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลในแต่ละกรรมวิธีทดลองที่ได้ในแต่ละช่วงเวลาโดยใช้วิธีองค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis: PCA) ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการศึกษ การเปลี่ยนแปลงและเหมาะสมต่อการศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ของชนิดประชากรของจุลินทรีย์ในแต่ละกรรมวิธี การทดลองและในแต่ละช่วงเวลาโดยผลของ PCA ที่ได้จะมีลักษณะเป็นกราฟ 2D หรือ 3D เพื่อให้ง่ายต่อการทำ ความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างที่ต่างกรรมวิธีทดลองกัน และวิเคราะห์ OTUs ในแต่ละกรรมวิธีโดย ใช้โปรแกรม Cytoscape V. 2.8 และจัดทำ heatmap analysis โดยใช้โปรแกรม Mothur v.1.33.3

ระยะเวลาทำการวิจัย

2 ปี เริ่มต้นตั้งแต่เดือน 2 มิถุนายน 2557 – 1 มิถุนายน 2559

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของดิน

ตารางที่ 4 ค่าวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของดิน

สมบัติดิน	กรรมวิธีทดลอง			F-test
	ควบคุม	ซากถั่วลิสง	ใบมะขามร่วง	
Soil texture	Sand	Sand	Sand	-
Bulk density (g/cm ³)	1.65	1.59	1.52	ns
Soil moisture (%)	6.04 ^b	6.91 ^a	7.02 ^a	**
pH	5.08 ^b	6.05 ^a	6.52 ^a	**
EC	33 ^b	212 ^a	94 ^b	**
CEC (cmol/kg)	2.11	2.03	2.20	ns
Total C (g/kg)	0.17 ^b	0.35 ^a	0.39 ^a	**
Total N (g/kg)	0.06 ^b	0.25 ^a	0.21 ^a	**
Soil C/N ratio	29.0 ^a	14.0 ^c	18.8 ^b	**
Organic matter (%)	0.30 ^b	0.60 ^a	0.68 ^a	**
Available phosphorus (mg/kg)	20.42	21.42	18.07	ns
Exchangeable potassium (mg/kg)	30.7 ^c	66.7 ^a	48.7 ^b	**

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

จากการทดสอบสมบัติทางกายภาพของดินนั้นพบว่า การใส่สารอินทรีย์เป็นระยะเวลา 16 ปี ถึงแม้จะทำให้สมบัติทางกายภาพของดินดีขึ้นบ้าง แต่ไม่สามารถทำให้เนื้อดินที่เป็นดินทรายเปลี่ยนแปลงได้ (ตารางที่ 4) ซึ่งสัมพันธ์กับความหนาแน่นรวมของดินและเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินด้วย พบว่าการใส่สารอินทรีย์

มีผลทำให้ดินเก็บความชื้นได้มากขึ้นทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝนเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากสมบัติทางกายภาพของดินมีความเปลี่ยนแปลงได้ค่อนข้างยากและใช้ระยะเวลานาน หากจะปรับปรุงสมบัติทางกายภาพของดินต้องใช้ระยะเวลานานมาก นอกจากนี้ยังพบว่าสมบัติทางกายภาพของดินมีผลมาจากปัจจัยอื่นๆ เช่น สภาพภูมิประเทศ ความชื้น และตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ เป็นต้น (FAO, 1989 และ Smaling, 1993) จึงสามารถสรุปได้ว่าการใส่สารอินทรีย์มีผลทำให้การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดินมีแนวโน้มดีขึ้น อย่างไรก็ตามสมบัติของดินนี้มีความสัมพันธ์น้อยมากกับปริมาณ ชนิด และความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในดิน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำได้รับอิทธิพลจากปัจจัยการเพิ่มสารอาหารลงในดินโดยการใส่สารอินทรีย์ และจากการทดลองพบว่าการใส่สารอินทรีย์เป็นระยะเวลานานสามารถปรับปรุงสมบัติทางเคมีของดินได้ เช่น การใส่สารอินทรีย์สามารถปรับปรุงดินที่มีความเป็นกรดจัด โดยมีส่วนช่วยเพิ่มความเป็นกรด-ด่างของดินให้เข้าใกล้ความเป็นกลางมากขึ้น รวมไปถึงมีผลทำให้ค่าการนำไฟฟ้าของดิน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน ความสามารถในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนของดิน และโพแทสเซียมในดินสูงขึ้น ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์สูงขึ้นส่งผลให้มีความเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของพืชมากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามธาตุอาหารพืชต่างๆที่ตรวจพบส่วนใหญ่ยังอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าที่พืชต้องการ นอกจากนี้ปฏิกิริยาของดินยังมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินซึ่งมีผลในทางอ้อมต่อสถานะความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช โดยมีผลให้จำนวนประชากรแบคทีเรียสูงขึ้น รวมถึงส่งผลให้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามพบว่าในดินที่ไม่ได้รับอิทธิพลจากการใส่สารอินทรีย์มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินค่อนข้างสูง โดยส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่าในกรรมวิธีที่มีการใส่สารอินทรีย์ โดยพบว่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินมีค่ามากที่สุดในกรรมวิธีทดลองที่ไม่ใส่สารอินทรีย์ คือ 20.42 mg/kg ซึ่งจัดว่าเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง (พจนีย์, 2544) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดลองที่ใส่สารอินทรีย์ทั้งสองชนิดพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันและไม่มีผลแตกต่างทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในดินที่ค่อนข้างเป็นกรดจัด (pH ต่ำกว่า 5.0) อาจมีการตกค้างของปุ๋ยฟอสฟอรัสจากการทำการเกษตรก่อนการทดลองในปริมาณที่สูง เนื่องจากฟอสฟอรัสจากปุ๋ยเคมีที่มีการใส่ลงในดินสามารถตกค้างในดินได้เป็นระยะเวลานาน อย่างไรก็ตามพบว่าในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์มีผลลดปริมาณฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์ในดิน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในแปลงทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ทั้งซากถั่วลิสงและใบมะขามร่วงมีสมบัติที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชมากกว่าเป็นผลให้พบวัชพืชขึ้นปกคลุมในแปลงทดลองอยู่เสมอและมีปริมาณที่มากกว่าในแปลงควบคุม ซึ่งวัชพืชเหล่านี้มีการนำเอาฟอสฟอรัสในดินไปใช้อย่างต่อเนื่องจนทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่ในรูปนี้ลดลงได้

2. การวิเคราะห์จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดินในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดินทำโดยวิธี RT-PCR (real-time PCR) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากดินตัวอย่างจากทั้ง 3 กรรมวิธีทดลอง แล้วทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย 16SrRNA gene และ *amoA* gene แบบเรียลไทม์

ผลการทดลองวิเคราะห์หาจำนวนประชากรแบคทีเรียที่ได้มีดังนี้

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) เพื่อทดลองหาจำนวนประชากรแบคทีเรียในแปลงทดลองโดยวิธี Real-time PCR (RT-PCR) พบว่าจำนวนประชากรของแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) มีจำนวนประชากรของแบคทีเรียสูงกว่าจำนวนประชากรของแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (Control) ทั้งนี้จำนวนประชากรของแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพสูงจะมีจำนวนประชากรของแบคทีเรียสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพปานกลาง และกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนประชากรของแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนประชากรของแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนประชากรของแบคทีเรียเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง)

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนประชากรของแบคทีเรีย (gene copies g ⁻¹ soil DW)	
	Mean	SD
Control	6.70E+07 ^b	5.99E+06
Ground nut strover	4.21E+08 ^a	8.16E+07
Tamarind	3.93E+08 ^a	3.83E+07
F-test	*	-

* = ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลองวิเคราะห์หาจำนวนประชากรอาร์เคียที่ได้มีดังนี้

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) เพื่อทดลองหาจำนวนประชากรอาร์เคียในแปลงทดลองโดยวิธี Real-time PCR พบว่าจำนวนประชากรของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) มีจำนวนประชากรของอาร์เคียสูงกว่าจำนวนประชากรของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (Control) ทั้งนี้จำนวนประชากรของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพปานกลางจะมีจำนวนประชากรของอาร์เคียสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพสูง และกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จำนวนประชากรของอาร์เคียเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง)

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนประชากรอาร์เคีย (gene copies g ⁻¹ soil DW)	
	Mean	SD
Control	1.42E+06 ^c	1.32E+05
Groundnut	3.40E+07 ^b	8.69E+06
Tamarind	5.76E+07 ^a	4.49E+06
F-test	*	-

* = ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลองวิเคราะห์หาจำนวนประชากรแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียที่ได้มีดังนี้

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) เพื่อทดลองหาจำนวนประชากรแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียในแปลงทดลองโดยวิธี Real-time PCR พบว่าจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) มีจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียสูงกว่าจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (Control) ทั้งนี้จำนวนประชากรของแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพสูงจะมีจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพปานกลางและกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการไม่มีการใส่สารอินทรีย์ไม่มีความแตกต่าง

กันทางสถิติกับจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์แบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนประชากรของแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ซากถั่วลิสง และใบมะขามร่วง)

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนประชากรของแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย (gene copies g ⁻¹ soil DW)	
	Mean	SD
Control	1.96E+06 ^b	4.09E+05
Groundnut	7.41E+06 ^a	1.50E+06
Tamarind	3.36E+06 ^b	7.34E+05
F-test	*	-

* = ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลองวิเคราะห์หาจำนวนประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียที่ได้มีดังนี้

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) เพื่อทดลองหาจำนวนประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียในแปลงทดลองโดยวิธี Real-time PCR พบว่าจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) มีจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียสูงกว่าจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (Control) ทั้งนี้จำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพสูงจะมีจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพปานกลางและกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนประชากรของแอมโมเนียออกซิไดซ์อาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนประชากรของอาร์เคียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ซากถั่วลิสง และใบมะขามร่วง)

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนประชากรของอาร์เคียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย (gene copies g ⁻¹ soil DW)	
	Mean	SD
Control	1.22E+06 ^b	5.28E+05
Groundnut	4.26E+07 ^a	1.25E+07
Tamarind	4.01E+07 ^a	7.17E+06
F-test	*	-

* = ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

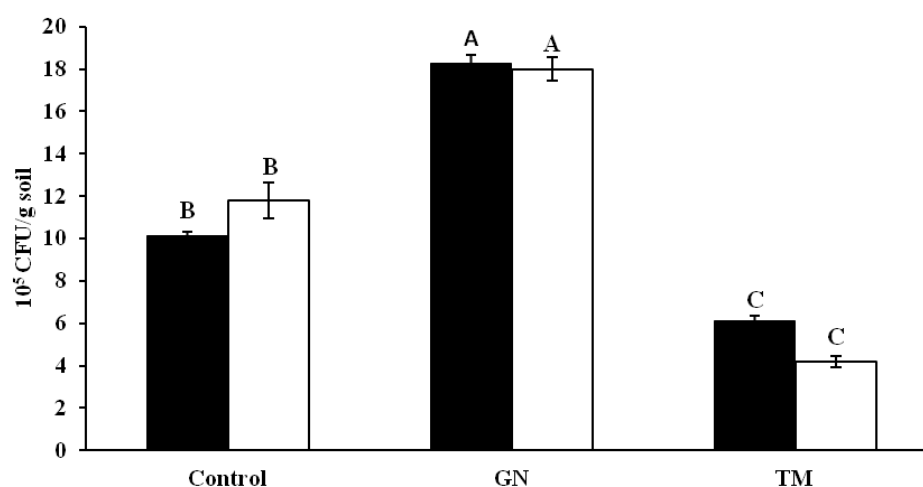
ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์จำนวนประชากรของแบคทีเรียในแปลงทดลองระยะยาวแสดงให้เห็นว่าคุณภาพของสารอินทรีย์สามารถส่งผลต่อจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียและอาร์เคียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในดินได้ โดยสารอินทรีย์คุณภาพสูง เช่นซากถั่วลิสง จะส่งผลให้จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดังกล่าวสูงที่สุด ซึ่งทั้งนี้เป็นผลมาจากในสารอินทรีย์ดังกล่าวมีแหล่งอาหารของแบคทีเรียและอาร์เคียโดยเฉพาะแหล่งอาหารไนโตรเจนสูงที่สุด ซึ่งพบว่าซากถั่วลิสง 1 กิโลกรัมจะมีไนโตรเจนอยู่ถึง 22.8 กรัม (Puttaso et al., 2011) และองค์ประกอบทางเคมีของสารอินทรีย์ เช่นสารอัลลีโลพาที่ที่มีอยู่ในสารอินทรีย์ใบมะขามร่วงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรของแบคทีเรียในดินด้วย

3. การศึกษาผลกระทบของสารสกัดใบมะขามและสารอัลลีโลพาที่ที่มีต่อจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ดิน

จากการศึกษาผลกระทบจากการใส่สารอินทรีย์เป็นระยะเวลานานพบว่าการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงจะส่งผลให้จำนวนแบคทีเรีย จำนวนแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และจำนวนอาร์เคียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง ทั้งนี้เนื่องจากใบมะขามร่วงมีการปลดปล่อย allelopathic substances เช่น แทนนิน (tannin) สารประกอบ ฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และ อัลคาลอยด์ (alkaloids) ออกมา โดยสารดังกล่าวนี้สามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในดินได้ (Lorenzo et al., 2013; Al-Fatimi et al., 2007) ดังนั้นงานวิจัยในส่วนนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของ allelopathic substances ในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์เป็นระยะเวลานานที่มีต่อกลไกทางชีวภาพเน้นที่จำนวนประชากรของแบคทีเรียในดิน โดยทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง ใบมะขามร่วง เป็นเวลา 19 ปี เพื่อวิเคราะห์จำนวนประชากรของ

แบคทีเรียในสภาวะปกติและสภาวะที่มีการใส่สาร allelopathic chemicals ได้แก่ gallic acid, caffeic acid และ tannic acid รวมทั้งสารสกัดใบมะขามร่วมด้วย โดยการศึกษาแบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรกวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ดำเนินการศึกษาจำนวนประชากรของแบคทีเรียในดินแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี serial dilution ร่วมกับสารสกัดจากใบมะขาม (Tamarind Crude extract) 10% โดยการบดใบมะขามแห้งแล้วชั่งน้ำหนัก 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปแช่ยาที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 (Syeda et al., 2003) และหั่วกรองขนาด 0.25 μm จากนั้นนำสารสกัดจากใบมะขามที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้ว 500 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มเป็นเวลา 1 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนี การทดลองที่สองวางแผนการทดลองแบบ Factorial in completely randomized design (CRD) โดยปัจจัยที่หนึ่งคือดินในแต่ละกรรมวิธีทดลอง ปัจจัยที่สองคือความเข้มข้นของสารอัลลีโลพาที (allelopathic chemicals) ดำเนินการศึกษาจำนวนประชากรของแบคทีเรียในดินแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี serial dilution ร่วมกับ allelopathic chemicals 3 ชนิด ได้แก่ caffeic acid, tannic acid และ gallic acid โดยใช้สารละลายของสารเคมีทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 500, 1000 และ 1500 ppm

โดยผลการทดลองที่ได้มีดังนี้คือ สารสกัดใบมะขามร่วน 10% ไม่ส่งผลต่อประชากรของแบคทีเรียในดินทั้ง 3 กรรมวิธี นอกจากนี้การใส่สารอัลลีโลพาที ได้แก่ gallic acid, caffeic acid ไม่ส่งผลต่อประชากรของแบคทีเรียในดินทั้ง 3 กรรมวิธี (ภาพที่ 2) อย่างไรก็ตาม การใส่สารอัลลีโลพาที คือ Tannic acid ลงในดินทั้ง 3 กรรมวิธี ส่งผลให้จำนวนประชากรของแบคทีเรียในดินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9, 10 และ 11) ดังนั้นการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่าสารอัลลีโลพาทีบางชนิดสามารถส่งผลต่อจำนวนประชากรของแบคทีเรียในดินได้



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดใบมะขามที่มีต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในดิน

กรรมวิธีทดลอง: Control (กรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์), GN (กรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์จากถั่วลิสง) และ TM (กรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วน). กราฟแท่งสีดำ: nutrient agar ที่ไม่ได้ใส่สารสกัดใบมะขาม กราฟแท่งสี

ขาว: nutrient agar ที่ใส่สารสกัดใบมะขาม 10% รวมด้วย C.V. (%) = 17.04. ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.

ตารางที่ 9 ผลของ caffeic acid ที่มีต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในดิน

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนประชากรแบคทีเรีย (CFU/g soil)
A: ดินทดลอง	
Control	3.90×10^5 ^b
GN	8.24×10^5 ^a
TM	2.15×10^5 ^c
F-test A	**
B: ความเข้มข้นของ caffeic acid	
Caffeic acid 0 ppm	5.49×10^5
Caffeic acid 500 ppm	4.41×10^5
Caffeic acid 1,000 ppm	4.54×10^5
Caffeic acid 1,500 ppm	4.60×10^5
F-test B	ns
F-test A x B	ns

กรรมวิธีทดลอง: Control (กรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์), GN (กรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง) และ TM (กรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง) ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 10 ผลของ tannic acid ที่มีต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในดิน

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนประชากรแบคทีเรีย (CFU/g soil)
A: ดินทดลอง	
Control	1.18×10^5 ^b
GN	4.45×10^5 ^a
TM	1.37×10^5 ^b
F-test A	*
B: ความเข้มข้นของ tannic acid	
Tannic acid 0 ppm	5.31×10^5
Tannic acid 500 ppm	1.92×10^5
Tannic acid 1,000 ppm	1.13×10^5
Tannic acid 1,500 ppm	9.72×10^4
F-test B	ns
A x B: control soil with 0 ppm tannic acid	3.05×10^5 ^{bc}
control soil with 500 ppm tannic acid	1.13×10^5 ^{ef}
control soil with 1,000 ppm tannic acid	3.75×10^4 ^f
control soil with 1,500 ppm tannic acid	2.13×10^4 ^f
GN with 0 ppm tannic acid	1.05×10^6 ^a
GN with 500 ppm tannic acid	3.32×10^5 ^b
GN with 1,000 ppm tannic acid	2.00×10^5 ^{cde}
GN with 1,500 ppm tannic acid	1.98×10^5 ^{cde}
TM with 0 ppm tannic acid	2.35×10^5 ^{bcd}
TM with 500 ppm tannic acid	1.32×10^5 ^{def}
TM with 1,000 ppm tannic acid	1.07×10^5 ^{ef}
TM with 1,500 ppm tannic acid	7.33×10^4 ^f
F-test A x B	**

กรรมวิธีทดลอง: Control (กรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์), GN (กรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง) และ TM (กรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง) ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 11 ผลของ gallic acid ที่มีต่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในดิน

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนประชากรแบคทีเรีย (CFU/g soil)
A: ดินทดลอง	
Control	6.56×10^5 ^b
GN	2.28×10^6 ^a
TM	6.33×10^5 ^b
F-test A	**
B: ความเข้มข้นของ gallic acid	
Gallic acid 0 ppm	1.40×10^6
Gallic acid 500 ppm	1.29×10^6
Gallic acid 1,000 ppm	1.01×10^6
Gallic acid 1,500 ppm	1.05×10^6
F-test B	ns
F-test A x B	ns

กรรมวิธีทดลอง: Control (กรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์), GN (กรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง) และ TM (กรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง) ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใส่สารอินทรีย์มีผลทำให้มีจำนวนประชากรของแบคทีเรียในดินสูงขึ้นและมีความสัมพันธ์กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน โดยพบว่าดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงจะมีจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในดินสูงตามไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ดินมีส่วนช่วยส่งเสริมกระบวนการต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ภายในดิน เช่น กระบวนการย่อยสลายอินทรีย์สาร กระบวนการตรึงไนโตรเจน เป็นต้น อย่างไรก็ตามการใส่สารอินทรีย์ที่มีสารอัลลีโลพาที่เป็นองค์ประกอบ มีอิทธิพลทำให้จำนวนประชากรของแบคทีเรียลดจำนวนลง

อย่างไรก็ตามพบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินนอกจากจะมีผลเนื่องมาจากปริมาณและชนิดของอินทรีย์วัตถุในดินแล้ว ยังได้รับอิทธิพลจากปัจจัยอื่นๆ แล้วยังพบว่าสภาพแวดล้อมก็มีบทบาทสำคัญมากต่อชนิด ปริมาณ และกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ดิน สภาพแวดล้อมที่สำคัญได้แก่ ความชื้น การถ่ายเทอากาศ อุณหภูมิ pH ของดิน ปริมาณและชนิดอินทรีย์สารในดิน เป็นต้น ส่วนใหญ่คาร์บอนในอินทรีย์วัตถุจะถูกปล่อยออกมาในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นในการใช้สารอินทรีย์ในการปรับปรุงคุณภาพของดินจะต้องคำนึงคุณสมบัติต่างๆ ของวัสดุอินทรีย์ เช่น C/N ratio ไม่ควรสูงเกินไป ซึ่งอาจ

ส่งผลเสียต่อพืช และควรคำนึงถึงสมบัติทางเคมีของสารอินทรีย์ เช่น การใส่สารอินทรีย์จากใบมะขามร่วง ซึ่งมีองค์ประกอบของสารอัลลีโลพาที่อาจทำให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ดำเนินไปได้ช้า และจุลินทรีย์ต้องใช้ไนโตรเจนจากดินอาจทำให้พืชขาดไนโตรเจนได้ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าวัสดุอินทรีย์มีคุณสมบัติที่ทำให้ถูกย่อยสลายได้ช้าเร็วต่างกัน ในการเลือกใส่สารอินทรีย์สำหรับปรับปรุงบำรุงดินจึงควรคำนึงถึงคุณภาพของสารอินทรีย์ด้วย (FAO, 1989 และ Smaling, 1993)

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกับสารสกัดใบมะขาม โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดใบมะขาม 10 % พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารอัลลีโลพาที่กับแบคทีเรียดินในแปลงทดลองจากการทดลองนี้เมื่อนำตัวอย่างดินที่เก็บในช่วงเวลาเดียวกันมาทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบระหว่างการใส่สารสกัดใบมะขาม 10 % กับการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ใส่สารนี้พบว่า การใส่สารสกัดใบมะขาม 10 % มีผลให้จำนวนประชากรของแบคทีเรียที่พบมีจำนวนสูงขึ้นในทุกกรณีวิธีทดลองแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างการใส่สารสกัดใบมะขาม 10 % กับการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ใส่สารสกัดใบมะขาม นอกจากนี้สารสกัดใบมะขามภายใต้สภาวะดังกล่าวมีสารที่เป็นอัลลีโลพาที่จากใบมะขามในความเข้มข้นที่ระดับนี้มีผลกระทบต่อจำนวนประชากรของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อาจเป็นเพราะมีสารที่เป็นอัลลีโลพาที่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ ซึ่งนอกจากจะไม่มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียในดินแล้ว ยังส่งผลในด้านการส่งเสริมกิจกรรมของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียยังสามารถนำสารอื่นๆ ที่ได้จากสารอินทรีย์นี้ไปใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน และแบคทีเรียในดินบางชนิดยังมีความสามารถในการเปลี่ยนสารเคมีให้อยู่ในรูปที่เป็นพิษที่น้อยลง (Inderjit and van der Putten, 2010; Inderjit, 2005) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียในดินบางชนิดยังสามารถใช้จากสารเคมีในกลุ่มสารอัลลีโลพาที่เป็นแหล่งพลังงานในการดำรงชีพ (Jilani et al., 2008) ในขณะที่ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินในกรรมวิธีทดลองที่ใส่ใบมะขามร่วง (TM) มีการตอบสนองต่อสารอัลลีโลพาที่ในอัตราที่ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนประชากรในแต่ละกรรมวิธีทดลอง อย่างไรก็ตามผลกระทบที่เกิดขึ้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น ระบบนิเวศ การศึกษา ช่วงเวลาหลังการใส่สารอินทรีย์ในแปลงทดลองของตัวอย่างดินที่ใช้ทดลองเนื่องจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีคุณภาพที่แตกต่างกันมีผลต่อชนิดและจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายด้วย ในการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากใบมะขามในอัตราที่เหมาะสมไม่ส่งผลในการยับยั้งกิจกรรมและจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียในดิน

การทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกับสารในกลุ่มสารอัลลีโลพาที่ทั้ง 3 ชนิด คือ caffeic acid, tannic acid และ gallic acid โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 0, 500, 1,000 และ 1,500 ppm นั้น พบว่า ในการทดสอบสาร caffeic acid และ gallic acid ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารทั้งสองชนิดกับแบคทีเรีย โดยเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารจำนวนประชากรแบคทีเรียที่พบอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน และไม่มีผลแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในดินในกรรมวิธีทดลองที่ใส่ซากถั่วลิสง (GN) มีการตอบสนองต่อสารทั้งสองชนิดสูงสุด โดยมีแนวโน้มในการลดจำนวนประชากรของแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มีการใส่สารกับอาหารที่ไม่ใส่สารดังกล่าว

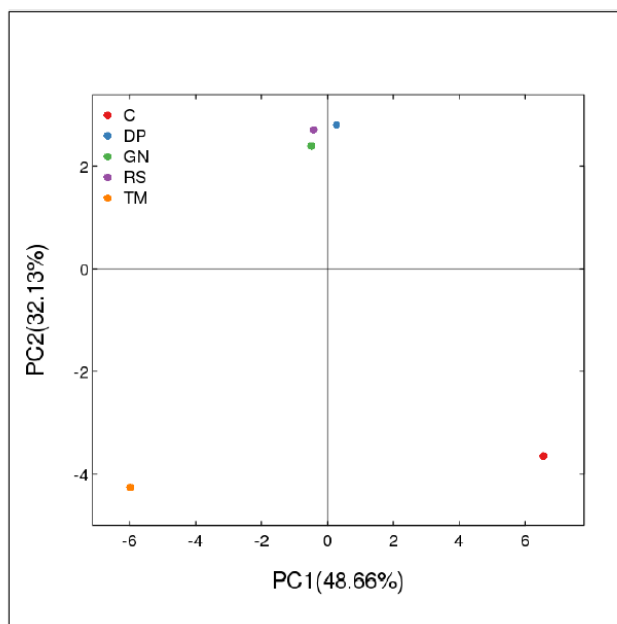
แต่ไม่มีผลแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามในการทดสอบสาร tannic acid เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสาร พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่างสาร Tannic acid กับแบคทีเรีย โดยมีผลให้จำนวนประชากรแบคทีเรียลดลงอย่างชัดเจนในทุกกรณีวิธีการทดลอง และมีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งพบว่าในกรณีวิธีทดลองที่ใส่ซากถั่วลิสง (GN) มีความไวในการตอบสนองต่อสาร Tannic acid สูงที่สุด โดยจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารแล้วจำนวนประชากรแบคทีเรียลดลงชัดเจน ในขณะที่แบคทีเรียในดินในกรณีวิธีทดลองที่ใส่ใบมะขามร่วง (TM) มีการตอบสนองต่อสารต่ำที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใส่สารอินทรีย์จากใบมะขามร่วงที่มีสารอัลลีโลพาที่เป็นองค์ประกอบลงในดินเป็นระยะเวลานานจนอาจเกิดการสะสมของสารนี้เพิ่มขึ้นและอยู่ในระดับที่เป็นพิษได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นไม่สามารถย่อยสลายสารดังกล่าวได้หรือย่อยสลายได้ในปริมาณที่น้อย หรืออาจใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลายสารเหล่านี้ จนอาจส่งผลในการจำกัดชนิดของจุลินทรีย์ในดินนั้นด้วย ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถเจริญในดินบริเวณนี้ได้จะต้องเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสารเคมีที่เป็นพิษให้อยู่ในรูปที่เป็นพิษที่น้อยลง และมีความสามารถในการใช้จากสารอัลลีโลพาที่เป็นแหล่งพลังงานในการดำรงชีพ หรือเป็นแบคทีเรียที่มีความต้องการสารอาหารบางชนิดที่มีความเฉพาะเจาะจง

การปรับตัวเพื่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย พบการปรับตัวของแบคทีเรียในดินกรณีวิธีต่างๆ ดังนี้ ในกรณีวิธีทดลองที่ใส่ใบมะขามร่วง (TM) พบว่าแบคทีเรียที่ปรับตัวเพื่อการอยู่รอดได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรณีวิธีทดลองที่ไม่ใส่สารอินทรีย์และกรณีวิธีทดลองที่ใส่ซากถั่วลิสง (GN) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่พบในดินกรณีวิธีทดลองนี้ที่มีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดได้ดีที่สุด

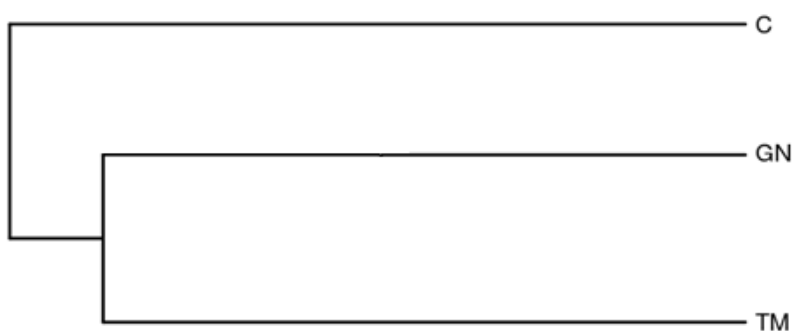
4. การศึกษาชนิด โครงสร้างชุมชน และความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมุนเวียนธาตุอาหารไนโตรเจนในดิน

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) เพื่อทดลองวิเคราะห์หาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในแปลงทดลองโดยวิธี T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) ร่วมกับการวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในแต่ละกรณีวิธีการทดลองร่วมกับการใช้ Principle component analysis (PCA) ของยีน 16S rRNA gene พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่ได้จาก 16S rRNA gene amplicons ในกรณีวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) และกรณีวิธีทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงจะมีโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียแตกต่างออกไปจากดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง และเมื่อสร้าง Dendrogram จาก Bray-Curtis similarity index ของประชากรแบคทีเรียจากดินที่ได้จากแต่ละกรณีวิธีการทดลองพบว่าโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินไม่มีการใส่สารอินทรีย์นั้นมีความแตกต่างจากโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินมีการใส่สารอินทรีย์ และพบว่าโครงสร้างชุมชนของ

แบคทีเรียในดินมีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงมีความแตกต่างจากโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินมีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 Principle component analysis (PCA) ของประชากรแบคทีเรียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง [ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C; Control) ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง (GN; Ground nut strover) และ ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง (TM; Tamarind)]



ภาพที่ 4 Dendrogram จาก Bray-Curtis similarity index ของประชากรแบคทีเรียจากดินในแต่ละกรรมวิธีทดลอง [ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C; Control) ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง (GN; Groundnut strover) และดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง (TM; Tamarind)]

ผลการทดลองวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมุนเวียนธาตุอาหารในดินที่ได้มีดังนี้

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ซากถั่วลิสง และใบมะขามร่วง) เพื่อทดลองวิเคราะห์หาชนิดของแบคทีเรียในแปลงทดลองโดยวิธี T-RFLP พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่ได้จาก 16S rRNA gene amplicons ในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ (ซากถั่วลิสง และใบมะขามร่วง) และกรรมวิธีการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มี *Bacillus* sp. และ *Paenibacillus* sp. เป็นชนิดของแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนใหญ่ในดิน (ตารางที่ 12) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายไนโตรเจนดิน ทั้งนี้ชนิดของแบคทีเรียที่พบในกรรมวิธีทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์นั้นสามารถพบกลุ่มแบคทีเรีย *Tumebacillus* sp. *Ochrobactrum* sp. *Herbaspirillum* sp. และ *Rhodococcus gingshengii* เพิ่มเติมด้วย นอกจากนี้ชนิดของแบคทีเรียที่พบในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงนั้นสามารถพบกลุ่มแบคทีเรีย *Alicyclobacillus* sp. *Tumebacillus* sp. และ *Herbaspirillum* sp. เพิ่มเติมด้วย

ตารางที่ 12 ชนิดของแบคทีเรียที่พบจากตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ซากถั่วลิสง และใบมะขามร่วง) และดินในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์

Theoretical T-RF size (bp)	Actual T-RF size (bp) ^a	Significance Level ^b	Affiliation of predominant (n≥5) bacterial and actinomycetal clones to individual T-RFs		
			Control	Tamarind	Groundnut stover
60	64	*	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
68/69	68	***	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> sp.
70-71	73-74	***/**		<i>Alicyclobacillus</i> sp.	
75	75	***	<i>Tumebacillus</i> sp.	<i>Tumebacillus</i> sp.	
77	78	***	<i>Ochrobactrum</i> sp.		
84	81/82/83/86	*	<i>Herbaspirillum</i> sp.	<i>Herbaspirillum</i> sp.	
137/138/139	130	***	<i>Rhodococcus</i> <i>ginshengii</i>		
140-147	142-146	***			
151/152	152	***			
155	154/155/157/158	***			
166	160/162/163/164	***			
169	168	***			
178/180	180/184	***			
188	188	***			
190	190/191	***			
194	196/197/198	*			
201	200/201	*			
203	204-216	***			
232	230-237	***			
243	240-244	***			
247	246/248/250/251	***			
276	271/276/278	***			

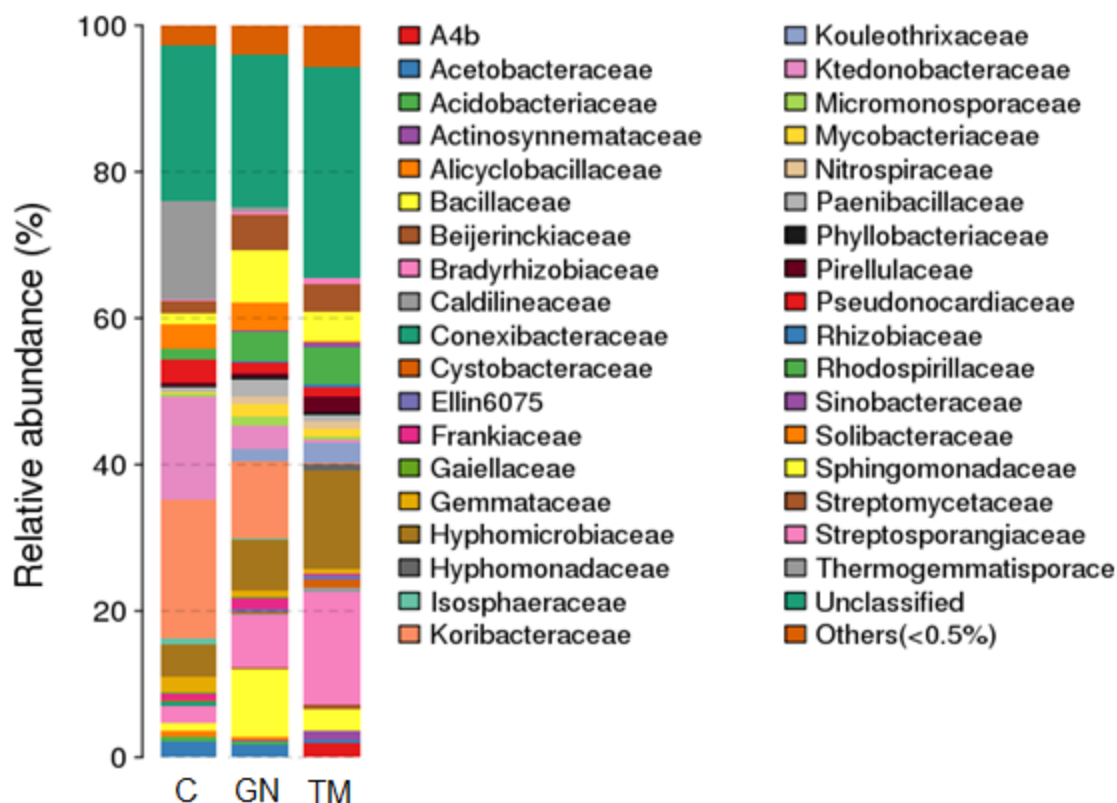
^a Actual T-RF sizes were only counted if generated clones could be clearly assigned to a respective T-RF size

^b ANOVA T-RF height vs. organic input treatments. LSD test at significance levels: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

ทั้งนี้เนื่องจากในสารอินทรีย์ต่างชนิดกันนั้นมียีนประกอบทางเคมีต่างกัน และสารอินทรีย์บางชนิดเช่น สารอินทรีย์โบนะขามร่วงมีสารอัลลิโลพาที่ซึ่งเป็นสารที่สามารถส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในดินอยู่ในองค์ประกอบ ดังนั้นจึงส่งผลให้ความหลากหลายทางชีวภาพและชนิดของแบคทีเรียในดินแตกต่างกัน ซึ่งนอกจากคุณภาพของ สารอินทรีย์จะสามารถส่งผลต่อจำนวนประชากรของแบคทีเรียและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียใน ดินแล้วยังพบว่าสามารถส่งผลต่อจำนวนประชากรของเชื้อราและความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราในดินด้วย (Kamolmanit et al., 2013)

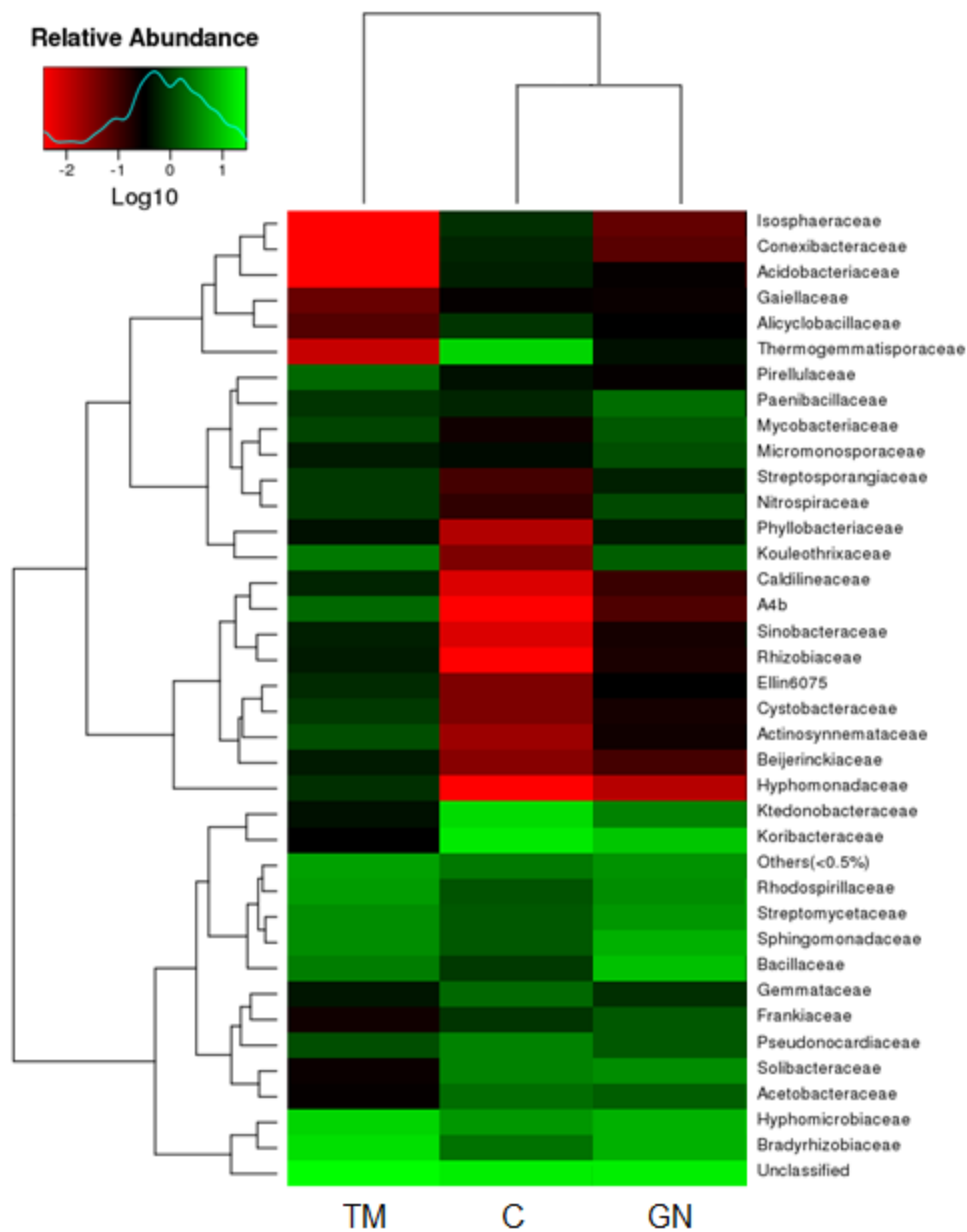
การวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพและชนิดของแบคทีเรียในดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพและชนิดของแบคทีเรียในดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง แสดงดังภาพที่ 5 โดยพบว่าความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์จะสามารถ พบแบคทีเรียในวงศ์ Koribacteraceae มากที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียในวงศ์ Ktedonobacteraceae ความ หลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงจะสามารถพบแบคทีเรียในวงศ์ Ktedonobacteraceae มากที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียในวงศ์ Bacillaceae ความหลากหลายทางชีวภาพของ แบคทีเรียในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์โบนะขามจะสามารถพบแบคทีเรียในวงศ์ Bradyrhizobiaceae มากที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียในวงศ์ Hyphomicrobiaceae และเมื่อวิเคราะห์ Realtive Abundance ของประชากร แบคทีเรียและสร้าง Heat map เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของประชากรแบคทีเรียในแต่ละวิธีการทดลองพบว่า สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียออกได้เป็น 5 กลุ่ม ประชากรแบคทีเรียในกลุ่ม 1 ประกอบด้วยแบคทีเรียในวงศ์ Isosphaeraceae, Conexibacteraceae, Acidobacteriaceae, Gaiellaceae, Alicyclobacillaceae และ Thermogemmatissporaceae ประชากรแบคทีเรียในกลุ่ม 2 ประกอบด้วยแบคทีเรียในวงศ์ Pirellulaceae, Paenibacillaceae, Mycobacteriaceae, Micromonosporaceae, Streptosporangiaceae, Nitrospiraceae, Phyllobacteriaceae และ Kouteleothrixaceae ประชากรแบคทีเรียในกลุ่ม 3 ประกอบด้วย แบคทีเรียในวงศ์ Caldilineaceae, Sinobacteraceae, Rhizobiaceae, Cystobacteraceae, Actinosynnemataceae, Beijerinckiaceae และ Hyphomonadaceae ประชากรแบคทีเรียในกลุ่ม 4 ประกอบด้วยแบคทีเรียในวงศ์ Ktedonobacteraceae, Koribacteraceae, Rhodospirillaceae, Streptomycetaceae, Sphingomonadaceae, Bacillaceae, Gemmataceae, Frankiaceae, Pseudonocardaceae, Solibacteraceae และ Acetobacteraceae ประชากรแบคทีเรียในกลุ่ม 5 ประกอบด้วยแบคทีเรียในวงศ์ Hyphomicrobiaceae และ Bradyrhizobiaceae ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 5 ชนิดของประชากรแบคทีเรียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในระดับ Family level

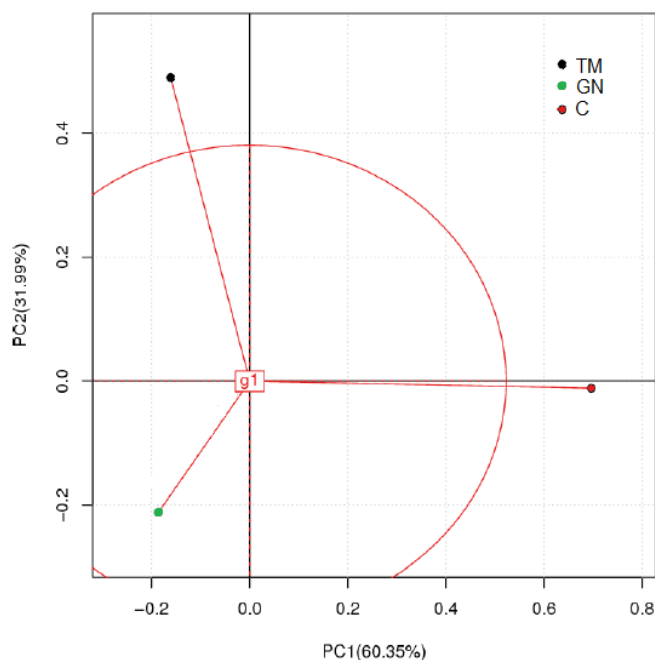
[ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C; Control) ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง (GN; Ground nut strover) และ ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง (TM; Tamarind)]



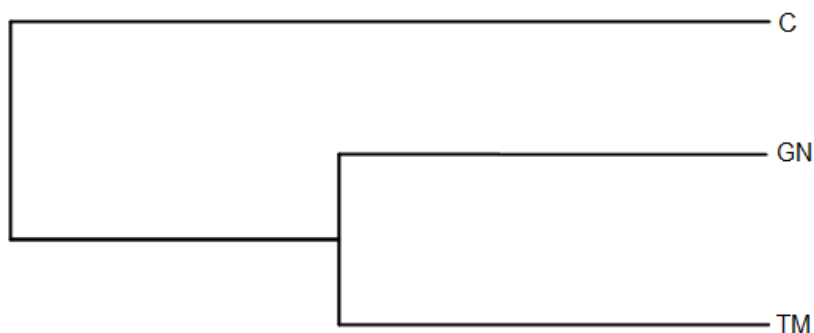
ภาพที่ 6 Heat map แสดงความหลากหลายทางชีวภาพของประชากรแบคทีเรียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในระดับ Family level

[ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C; Control) ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง (GN; Ground nut strover) และดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง (TM; Tamarind)]

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในแต่ละกรรมวิธีการทดลองร่วมกับการใช้ Principle component analysis (PCA) ของยีน 16S rRNA gene พบว่าชนิดของอาร์เคียที่ได้จาก 16S rRNA gene amplicons ในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ ((ใบมะขามร่วง และซากถั่วลิสง) และกรรมวิธีทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 7 โดยในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงจะมีโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียแตกต่างออกไปจากดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง และเมื่อสร้าง Dendrogram จาก Bray-Curtis similarity index ของประชากรแบคทีเรียจากดินที่ได้จากแต่ละกรรมวิธีการทดลองพบว่าโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินไม่มีการใส่สารอินทรีย์นั้นมีความแตกต่างจากโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินมีการใส่สารอินทรีย์ และพบว่าโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินมีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง มีความแตกต่างจากโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินมีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง ดังแสดงในภาพที่ 8



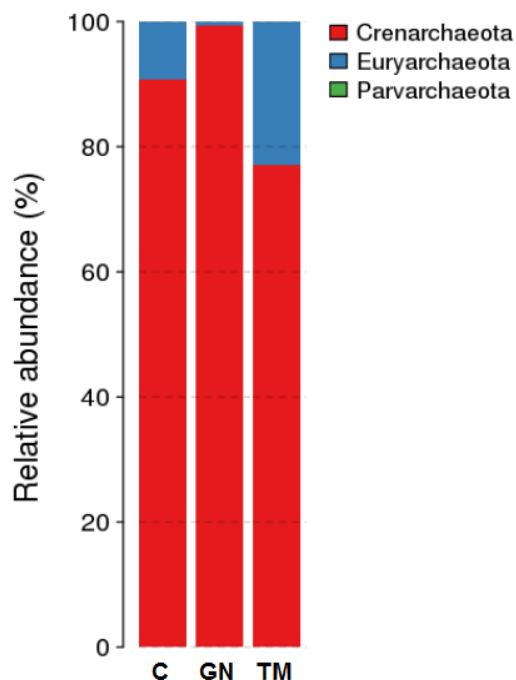
ภาพที่ 7 Principle component analysis (PCA) ของประชากรอาร์เคียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง [ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C; Control) ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง (GN; Ground nut strover) และดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง (TM; Tamarind)]



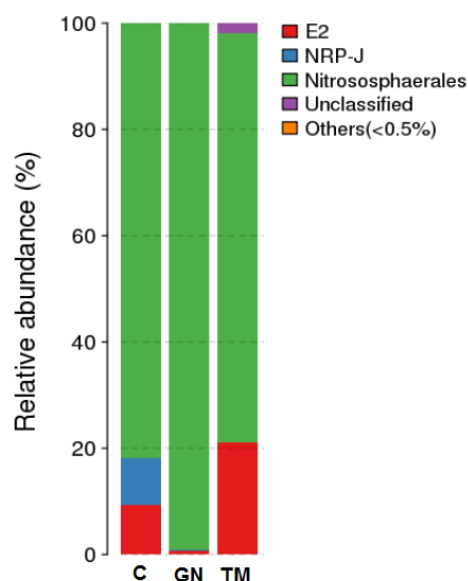
ภาพที่ 8 Dendrogram จาก Bray-Curtis similarity index ของประชากรอาร์เคียจากดินในแต่ละกรรมวิธีทดลอง [ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C; Control) ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง (GN; Groundnut strover) และดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง (TM; Tamarind)]

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพและชนิดของอาร์เคียในดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพและชนิดของอาร์เคียในดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองแสดงดังภาพที่ 9 และ 10 โดยพบว่าความหลากหลายทางชีวภาพของอาร์เคียในดินทั้ง 3 กรรมวิธีการทดลองจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Crenarchaeota มากที่สุด รองลงมาคืออาร์เคียในไฟลัม Euryarcheota และอาร์เคียในไฟลัม Parvarchaeota ตามลำดับ โดยกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Euryarcheota มากที่สุด รองลงมาคือกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ และกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงตามลำดับ ทั้งนี้กรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Crenarchaeota มากที่สุด รองลงมาคือกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ และกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง เมื่อวิเคราะห์ในระดับอันดับ (order level) พบว่าอาร์เคียในกลุ่มของ Nitrososphaerales จะเป็นกลุ่มอาร์เคียกลุ่มหลักในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงสามารถพบเป็นกลุ่มอาร์เคียกลุ่มหลักรองลงมาในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ และกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงตามลำดับ โดยอาร์เคียในกลุ่ม E2 จะสามารถพบมากที่สุดในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง พบรองลงมาในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ และกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงตามลำดับ โดยอาร์เคียในกลุ่มของ NRP-J จะสามารถพบเฉพาะในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์เท่านั้น



ภาพที่ 9 ชนิดของประชากรอาร์เคียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในระดับ Phylum level [ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C; Control) ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง (GN; Ground nut strover) และดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง (TM; Tamarind)]



ภาพที่ 10 ชนิดของประชากรอาร์เคียจากดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในระดับ order level [ดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (C; Control) ดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสง (GN; Ground nut strover) และดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วง (TM; Tamarind)]

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาผลกระทบของสารอินทรีย์ที่ใส่ในระยะยาวที่มีต่อจุลินทรีย์ดินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนโตรฟิกเคชันเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของไนโตรเจนในดินเน้นไปที่การวิเคราะห์จำนวนประชากรและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียและอาร์เคียในดิน โดยการศึกษาพบว่าเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินหลังการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วงและซากถั่วลิสง) เพื่อทดลองหาจำนวนประชากรแบคทีเรีย จำนวนแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และจำนวนอาร์เคียที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในแปลงทดลองโดยวิธี Real-time PCR (RT-PCR) พบว่าจำนวนประชากรของแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงและซากถั่วลิสงมีจำนวนประชากรของแบคทีเรียสูงกว่าจำนวนประชากรของแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (Control) ทั้งนี้จำนวนประชากรของแบคทีเรียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพสูงจะมีจำนวนประชากรของแบคทีเรียสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามร่วงและกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ ตามลำดับ เนื่องจากในสารอินทรีย์ซากถั่วลิสงนั้นมีไนโตรเจนซึ่งเป็นสารอาหารหลักสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและมีสารประกอบลิพิดและโพลีฟีนอลอยู่น้อยทำให้แบคทีเรียสามารถทำการย่อยสลายได้ง่าย นอกจากนี้สาร allelochemicals ที่มีอยู่ในใบมะขาม เช่น สาร tannic acid และ สาร phenolic acids อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่จำกัดการเจริญเติบโตและทำให้ประชากรของแบคทีเรียมีจำนวนน้อยกว่าในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนใกล้เคียงกัน (Lawongsa et al., 2016) อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดใบมะขามความเข้มข้น 10% รวมทั้ง allelopathic chemicals ได้แก่ gallic acid, caffeic acid ไม่ส่งผลต่อจำนวนประชากรของแบคทีเรียในดินทั้ง 3 กรรมวิธี แต่การใส่ allelopathic chemicals คือ Tannic acid ลงในดินทั้ง 3 กรรมวิธีส่งผลให้จำนวนประชากรของแบคทีเรียในดินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของการศึกษาจำนวนประชากรของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ (ใบมะขามร่วงและซากถั่วลิสง) พบว่ามีจำนวนประชากรของอาร์เคียสูงกว่าจำนวนประชากรของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ (Control) ทั้งนี้จำนวนประชากรของอาร์เคียในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามซึ่งเป็นสารอินทรีย์คุณภาพสูงจะมีจำนวนประชากรของอาร์เคียสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงและกรรมวิธีทดลองที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์ ตามลำดับ ทั้งนี้ผลการทดลองวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองพบว่าในดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์จะสามารถพบแบคทีเรียในวงศ์ Koribacteraceae มากที่สุด ในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงจะสามารถพบแบคทีเรียในวงศ์ Ktedonobacteraceae มากที่สุด และในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามจะสามารถพบแบคทีเรียในวงศ์ Bradyrhizobiaceae มากที่สุด ซึ่งจะสังเกตได้ว่าประชากรแบคทีเรียในแต่ละกรรมวิธีการทดลองจะประกอบไปด้วยวงศ์ของประชากรแบคทีเรียวงศ์เดียวกันซ้อนทับกันอยู่ โดยทั้งสามกรรมวิธีทดลองจะสามารถพบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มากที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียในสกุล *Paenibacillus* โดยในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ใบมะขามและกรรมวิธีทดลองควบคุมยังสามารถพบแบคทีเรียในสกุล *Tumebacillus* และ *Herbaspirillum* ด้วย อย่างไรก็ตามพบแบคทีเรียใน

สกุล *Alicyclobacillus* เฉพาะในกรรมวิธีทดลองที่มีการใส่สารอินทรีย์ไบโมะขามเพียงกรรมวิธีทดลองเดียว และพบแบคทีเรียในสกุล *Ochrobactrum* และ *Rhodococcus* เฉพาะในกรรมวิธีทดลองเท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในแต่ละกรรมวิธีการทดลองร่วมกับการใช้ Principle component analysis (PCA) ของยีน 16S rRNA gene พบว่าโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อทำการเปรียบเทียบกับโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ ประกอบกับเมื่อสร้าง Dendrogram จาก Bray-Curtis similarity index ของประชากรแบคทีเรียจากดินที่ได้จากแต่ละกรรมวิธีการทดลองพบว่าโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์นั้นมีความแตกต่างจากโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ ทั้งนี้ผลการทดลองวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในดินในแต่ละกรรมวิธีการทดลองมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการทดลองวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินโดยโครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มีความแตกต่างกับโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์อย่างชัดเจน โดยในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ซากถั่วลิสงจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Crenarchaeota มากที่สุด และดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ไบโมะขามร่วงจะสามารถพบอาร์เคียในไฟลัม Euryarcheota มากที่สุด และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในแต่ละกรรมวิธีการทดลองร่วมกับการใช้ Principle component analysis (PCA) ของยีน 16S rRNA gene พบว่าโครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อทำการเปรียบเทียบกับโครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ ประกอบกับเมื่อสร้าง Dendrogram จาก Bray-Curtis similarity index ของประชากรอาร์เคียจากดินที่ได้จากแต่ละกรรมวิธีการทดลองพบว่าโครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในดินที่ไม่มีการใส่สารอินทรีย์นั้นมีความแตกต่างจากโครงสร้างชุมชนของอาร์เคียในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ ทั้งนี้การใส่สารอินทรีย์ลงในดินเพื่อปรับปรุงและเพิ่มอินทรีย์วัตถุให้กับดินนั้นอาจส่งผลกระทบต่อจำนวนจุลินทรีย์ในดินรวมทั้งโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ได้ โดย Kamolmanit et al., 2013 พบว่าหลังจากมีการใส่สารอินทรีย์ ได้แก่ ซากถั่วลิสง ซากไบโมะขาม ใบพลวง และฟางข้าว เป็นระยะเวลา 16 ปี สามารถส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ (เชื้อรา) ในดินได้ โดยในดินที่มีการใส่สารอินทรีย์ส่งผลกระทบทำให้จำนวนเชื้อราในดินเพิ่มมากขึ้นได้ ทั้งนี้ นอกจากจำนวนประชากรแล้วการใส่สารอินทรีย์ยังส่งผลกระทบต่อโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ (เชื้อรา) ด้วย โดยเชื้อราหลักที่พบในดินที่มีการใส่ ฟางข้าว ได้แก่ *Myceliophthora thermophila* เชื้อราหลักที่พบในดินที่มีการใส่ซากถั่วลิสง ได้แก่ *Myceliophthora thermophila*, *Proleptomonas faecicola* และ *Aspergillus fumigates* เชื้อราหลักที่พบในดินที่มีการใส่ใบพลวง ได้แก่ *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus versicolor*, *Anguillospora longissima* และ *Aspergillus fumigates* เชื้อราหลักที่พบในดินที่มีการใส่ไบโมะขาม ได้แก่ *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium oxysporum* และ *Cryptococcus podzolicus* เป็นต้น ทั้งนี้นอกจากการใส่สารอินทรีย์จะส่งผลกระทบต่อเชื้อราในดินแล้วยังส่งผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรียในดินด้วย (Rasche et al., 2014) โดยการศึกษาชี้ให้เห็นว่าคุณภาพของสารอินทรีย์ ซึ่งได้แก่ องค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของสารอินทรีย์ รวมทั้ง modifiers ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมี

ของสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่มีอิทธิพลต่อการทำงานหรือพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เข้าย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยกลไกที่นอกเหนือจากการเป็นแหล่งคาร์บอน ธาตุอาหาร และพลังงาน เช่นสาร allelochemicals ที่ได้จากใบมะขามเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้จำนวนประชากรของแบคทีเรียและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียแตกต่างกันได้

เอกสารอ้างอิง

- พจนีย์ มอญเจริญ. (2544). การใช้ข้อมูลผลการวิเคราะห์ดินเพื่อการปรับปรุงบำรุงดินและการใช้ปุ๋ยเอกสารวิชาการกองวิเคราะห์ดิน ฉบับที่2/2544. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- พจนีย์ แสงมณี. (2551). ปัจจัยคุณภาพสารอินทรีย์ เนื้อดินและความชื้นดินที่มีอิทธิพลต่ออินทรีย์วัตถุในดินและการเปลี่ยนรูปไนโตรเจน วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาปฐพีศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G. and Lindequist, U. (2007). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacol* 111: 657-666.
- FAO, (1989). Sustainable agricultural production. Implications for agricultural research, by Technical Advisory Committee. FAO Research and Technology Paper No. 4. Rome. 131 pp.
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E. and Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:14683-14688.
- Inderjit. (2005). Soil microorganisms: an important determinant of allelopathic activity. *Plant and Soil* 274: 227-236.
- Inderjit, and van der Putten, W. H. (2010). Impacts of soil microbial communities on exotic plant invasions. *Trends Ecol. Evol* 25: 512-519.
- Jilani, G., Mahmood, S., Chaudhry, A., Hassan, I. and Akram. M. (2008). Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil – a review. *Ann. Microb* 58: 351-357.
- Kamolmanit B, Vityakon P, Kaewpradit W, Cadisch G, Rasche F. (2013). Soil fungal communities and enzyme activities in a sandy, highly weathered tropical soil treated with biochemically contrasting organic inputs. *Biol Fertil Soils* 49: 905- 917.

- Lane, D. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt A, Goodfellow, M. (eds). *Nucleic Acid Techniques Systematics*. John Wiley: West Sussex, UK.115–175.
- Lavelle, P., Blanchart, E., Martin, A., Martin, S., and Spain, A. (1993). A hierarchical model for decomposition in terrestrial ecosystems: application to soils of the humid tropics. *Biotropica* 25: 130-150.
- Lawongsa, P., Rungthong, R., Kamolmanit, B., Saenjan, P. and Vityakon, P. (2016). Responses of soil bacterial population to the appearance of allelopathic substances. *Khon Kaen agriculture Journal* 44 supplement 1: 984-990.
- Lorenzo, P., Pereira, C. S. and Rodríguez-Echeverría, S. (2013). Differential impact on soil microbes of allelopathic compounds released by the invasive *Acacia dealbata* Link. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 156-163.
- Lueders, T., and Friedrich, M. (2000). Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl Environ Microbiol* 66: 2732-2742.
- Melillo, J. M., Aber, J. D., and Muratore, J. F. (1982). Nitrogen and lignin control of hardwood leaf litter decomposition dynamics. *Ecology* 63: 621-626.
- Muyzer, G., Dewaal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Paul, E.A., and Clark, F. E. (1996). *Soil microbiology and biochemistry*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, London. 340 p.
- Puttaso, A., Vityakon, P., Saenjan, P., Trelo-ges, V., and Cadisch, G. (2011). Relationship between residue quality, decomposition patterns, and soil organic matter accumulation in a tropical sandy soil after 13 years. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 89:159-174.
- Rasche, F., Musyoki, M., Rohl, C., Muema, E., Vanlauwe, B., Cadisch, G. (2014). Lasting influence of biochemically contrasting organic inputs on abundance and community structure of total and proteolytic bacteria in tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry* 74:204-213.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P. and Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63:4704-4712.
- Samahadthai, P., Vityakon, P., and Saenjan, P. (2010). Effects of different quality plant residues on soil carbon accumulation and aggregate formation in a tropical sandy soil in

- Northeast Thailand as revealed by a 10 year field experiment. *Land Degradation & Development* 21: 463-473.
- Smaling, E.M.A. (1993). Soil nutrient depletion in Sub-Saharan Africa. In H. van Reulen & W.H. Prins, eds. *The role of plant nutrients for sustainable food crop production in Sub-Saharan Africa*. Leidschendam, The Netherlands.
- Swift, M. J., Heal, O. W. and Anderson, J. M. (1979). *Decomposition in terrestrial ecosystems. Studies in ecology volume 5*. Blackwell Scientific Publications. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Vityakon, P., Meepech, S., Cadisch, G., and Toomsan, B. (2000). Soil organic matter and nitrogen transformation mediated by plant residues of different qualities in sandy acid upland and paddy soils. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* 48: 75-90.

ภาคผนวก

บทความวิจัยเรื่อง Responses of soil bacterial population
to the appearance of allelopathic substances

Responses of soil bacterial population to the appearance of allelopathic substances

Phrueksa Lawongsa^{1*}, Rattiyapon Rungthong¹, Bhanudecha Kamolmanit²,
Patcharee Saenjan¹ and Patma Vityakon¹

ABSTRACT: Increase in soil organic matter accumulation in a degraded tropical sandy soil can be achieved by application of organic residues with appropriate qualities (biochemical composition). However, the effect of allelopathic substances produced by some organic input such as tamarind leaves residue on underlying response of soil microbes remains scarce. To address this question, this study aims to investigate the preliminary effect of allelopathic substances in terms of natural allelopathic substances from tamarind leaves and commercial allelopathic substances (caffeic acid, tannic acid and gallic acid) on bacterial population from unamended soil, soil applied with long-term application of tamarind leaves residue and soil applied with long-term application of groundnut residue. Research finding showed that the appearance of 10% allelopathic substances extracted from tamarind leaves in unamended soil, soil applied with long-term application of tamarind leaves residue and soil applied with long-term application of groundnut residue were not significantly affecting bacterial population which suggested that allelopathic substances contain in tamarind leaves certainly not affect bacterial population with appropriated concentration and certain soil bacteria can transform the new chemicals into less toxic forms. Remarkably, some introduced allelopathic chemicals such as tannic acid had an effect on decreasing of the population of bacteria. Thus, prospective research should consider the effect of allelopathic chemicals, apart from studying microbial population, but also on microbial communities and activities.

Keywords: organic residues, tamarind, allelopathic substances, tannic acid, bacterial population

Introduction

Tropical sandy soils under agricultural land uses in Northeast of Thailand have undergone continuous fertility degradation as seen in low content of soil organic matter. Organic residue application is one way to restore the fertility and enhance productivity of these soils in a sustainable way. Many kinds of organic residues that are readily available in farming systems of this region differ in their quality or their chemical composition which is a controlling factor on decomposition process leading to nutrient release and soil organic matter (SOM) accumulation

(Puttaso et al., 2011; Vityakon, 2007).

Groundnut stover, a high quality organic input, rich in organic nitrogen but low in lignin and polyphenol, is one of organic residue which is normally used for enhancement of nutrient in soil. Apart from groundnut stover, tamarind leaves residue, an intermediate quality organic input, rich in organic nitrogen but low in cellulose as well as with moderate lignin and polyphenol content was also considered as applicable to enhance soil organic matter accumulation, while guaranteeing the release of plant-available nutrients from organic inputs through microbial decomposition and mineralization (Kamolmanit et al., 2013).

¹ Land Resources and Environment Section, Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

² Nakhon Ratchasima Rajabhat University, Nakhon Ratchasima, Thailand

* Corresponding author: phrula@kku.ac.th

However, different biochemical quality including allelopathic potential of some organic residue may affect microbial decomposition, nutrient supply and improvement of soils. Among allelopathic plants, tamarind is well known for its allelopathic potential. There are several phytochemicals playing role as allelopathic substances were found in tamarind leaves such as tannins, phenolic compounds, flavonoid and alkaloids. These chemicals also showed antibacterial and antifungal activity (Lorenzo et al., 2013; Al-Fatimi et al., 2007) as seen in leaf extract of tamarind which showed activity for antibacterial activity against *Burkholderia pseudomallei* (Muthu et al., 2005). Moreover, tamarind possessed a strong activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Melendez and Capriles, 2006). Under this circumstance, it is beneficial to identify one of the major biochemical quality parameters of organic residues controlling their decomposition rates such as allelopathic substance to understand the role of soil microorganisms for restoration soil fertility and promoting the crop productivity. Moreover, the effect of allelopathic substances produced by some organic input such as tamarind leaves residue on responses of soil microbes is not yet fully understood. Our hypothesis was that tamarind leaf releases allelopathic chemicals that lead to changes in soil bacterial population. Hence, the research question of this study was to investigate the effect of allelopathic substances emphasized on crude extract of tamarind leaf which represents natural allelopathic substance along with tannic acid and phenolic acid (including gallic acid and caffeic acid) which represents commercial allelopathic substances on the response of soil

bacterial population.

Materials and methods

Soil sampling

Soil samples were collected from a long-term field experiment at the research station of the Agriculture and Co-operatives of Northeast at Tha Phra subdistrict, Khon Kaen province, Thailand (16°20' N; 102°49' E). The long-term field experiment was established in 1995. This experiment has been designed as the randomized complete block design (RCBD). Apart from control soil (soil with no organic material applied; unamended soil), there were two residue treatments applied in early May every year including; groundnut stover (*Arachis hypogaea*), and tamarind (*Tamarindus indica*) leaves + petiole litter at the rate of 10 Mg ha⁻¹ year⁻¹ to bare soil plots. The organic materials were incorporated to a depth of 20 cm in a 4 x 4 m² plot. Weeds were controlled at approximately monthly intervals. Three random soil samples from each of three replicate plots of each treatment were collected at 0-15 cm depth. Soil texture of all plot sites were sand. The proportions of sand in the topsoil (0-15 cm depth) were approximately between 93.86 - 94.93 %. The pH of all soil samples were found to be ranged in between 4.56 to 6.05 which indicated the slight acidity of soils. The soil pH values of 4.56, 5.46 and 6.05 were obtained from control, groundnut stover and tamarind treatments, respectively. The EC values of 0.1, 0.22 and 0.21 dS/m were obtained from control, groundnut stover and tamarind treatments, respectively and organic matter (OM) values of organic residues supply treatment showed

higher than control with no organic residues supply. OM values of 0.25 %, 0.53 % and 0.53 % were obtained from control, groundnut stover and

tamarind treatments, respectively. In addition, initial chemical characteristics of crop residues were showed in **Table 1**.

Table 1 Biochemical properties (quality) of organic inputs

Residue	Cellulose	Nitrogen [N]	Polyphenols [PP]	Lignin [L]	L/N ratio	PP/N ratio	(L+PP)/N ratio	C/N ratio
	g/kg							
Groundnut	178	22.8	12.9	67.6	2.96	0.6	3.5	17.1
Tamarind	143	13.6	31.5	87.7	6.4	2.3	8.8	31.5

Original data taken from Puttaso et al. (2011)

Treatment used in this study

For the present study, soil samples were obtained from unamended control plots (control soil), soil treated with groundnut stover and soil treated with tamarind leaves residue in March 2014, 19 years after the field experiment had started.

There were two experiments in this study. First experiment was conducted to investigate the effect of natural allelopathic substances (emphasize on crude extract of tamarind leaf) on bacterial population. This experiment has been designed as the completely randomized design (CRD) with three replications. The treatments used in first experiment were control soil (soil with no organic material applied; unamended soil), control soil applied with 10% crude extract of tamarind leaf, soil applied with long-term application of tamarind leaves residue (TM), soil applied with long-term application of tamarind leaves residue in a presence of 10% crude extract of tamarind leaves, soil applied with long-term application of groundnut residue (GN) and soil applied with long-term application of groundnut residue in a presence of 10% crude extract of

tamarind leaves.

Second experiment was divided into three sub-experiments which were to investigate whether allelopathic chemicals (emphasize on tannic acid and phenolic acid (including gallic acid and caffeic acid) affect bacterial population. Sub-experiment I, II and III were a factorial in CRD including two factors and three replications. The first factor involved three treatments which are unamended soil (control soil), TM soil and GN soil, while the second factors were three rates of allelopathic chemicals (caffeic acid, tannic acid and gallic acid) application including 0, 500, 1,000 and 1,500 ppm.

Crude water-soluble extraction of tamarind leaves

Crude water-soluble extraction was done according to the procedure of Parvez et al. (2003) with a slight modification. Appropriate amounts of dried tamarind leaves corresponding to 10% (w/v) were weighed and poured separately into 300 ml conical flasks containing 100 ml of sterilized distilled water. Extraction was carried out under dark condition with continuous shaking at 70 rpm for 2 days at 25 °C in an orbital shaker. The

extracted solution was recovered by filtering with a sterilized 150 mm filter paper twice, then filtered through a 0.20 μm membrane filter and used freshly as a crude water-soluble extract or stored in a refrigerator until further use.

Bacterial population analysis

Bacterial population analysis was done by serial dilution plating technique on nutrient agar medium. In treatment applied with allelopathic substances, the 10% crude extract of tamarind leaf and allelopathic chemicals (caffeic acid, tannic acid and gallic acid) were added into nutrient agar medium before plating. Petri dishes with serial dilution plating were incubated at 28°C for 1-2 days. Bacterial populations were enumerated from the plates and expressed as CFU (colony forming units) per gram soil.

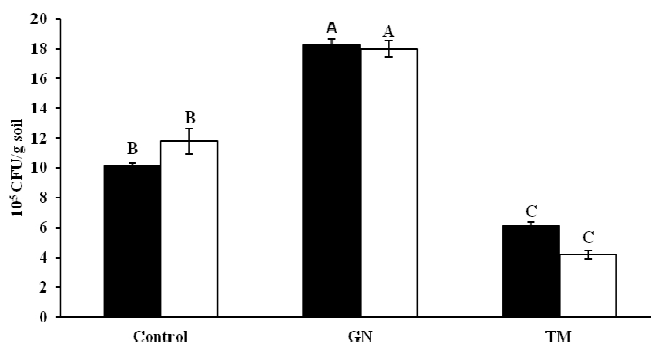
Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS, a statistical program (SPSS, version 16.0). F-test along with least significant differences (LSD) was used to analyze the main treatment effects on assayed soil microbial population.

Results

First experiment: effect of tamarind leaf crude extract on bacterial population

The highest total bacterial count was found in GN treatment without 10% tamarind leaf crude extract appearance (1.83×10^6 CFU/g soil) followed by GN treatment with 10% tamarind leaf crude extract appearance (1.80×10^6 CFU/g soil). However, there is no significantly different was found between these two treatments (**Figure 1**). A similar result was observed in TM treatment. In TM treatment without 10% tamarind leaf crude extract appearance (6.10×10^5 CFU/g soil) showed higher total bacterial count when compared to TM treatment with 10% tamarind leaf crude extract appearance (4.20×10^5 CFU/g soil) and there is no significantly different was found between these two treatments. Interestingly, control treatment without 10% tamarind leaf crude extract appearance (1.01×10^6 CFU/g soil) showed lower total bacterial count when compared to control treatment with 10% tamarind leaf crude extract appearance (1.18×10^6 CFU/g soil). Nevertheless, there is no significantly different was found between these two treatments.



Treatments: Control (soil with unamended organic residue), GN (soil applied with long-term application of groundnut stover) and TM (soil applied with long-term application of tamarind leaves residue). Black bar graph: nutrient agar without 10% tamarind leaf crude extract addition. White bar: nutrient agar added with 10% tamarind leaf crude extract. C.V. (%) = 17.04. Significant difference is indicated by different letters by mean of least significant difference at a probability of 5% ($p < 0.05$).

Figure 1 Effect of tamarind leaf crude extract on bacterial population

Second experiment: effect of allelopathic chemicals on bacterial population

Total bacterial count showed different responses to allelopathic chemicals appearance (Tables 2, 3 and 4).

Sub-experiment I (Caffeic acid appearance): The highest total bacterial count was found in GN treatment (8.24×10^5 CFU/g soil) followed by

control soil (3.90×10^5 CFU/g soil) and TM treatment (2.15×10^5 CFU/g soil), respectively (Table 2). Interestingly, the significantly different of bacterial population was not observed in the appearance of caffeic acid at all concentrations. In addition, there was no interaction between two factors.

Table 2 Effect of caffeic acid on bacterial population

Treatment	Bacterial population (CFU/g soil)
A: Soil	
Control	3.90×10^5 ^b
GN	8.24×10^5 ^a
TM	2.15×10^5 ^c
F-test A	**
B: Concentration of caffeic acid	
Caffeic acid 0 ppm	5.49×10^5
Caffeic acid 500 ppm	4.41×10^5
Caffeic acid 1,000 ppm	4.54×10^5
Caffeic acid 1,500 ppm	4.60×10^5
F-test B	ns
F-test A x B	ns

Treatments: Control (soil with unamended organic residue), GN (soil applied with long-term application of groundnut stover) and TM (soil applied with long-term application of tamarind leaves residue). Significant difference is indicated by different letters by mean of least significant difference. ns = no significant difference.

** = significant difference at $p < 0.01$.

Sub-experiment II (Tannic acid appearance): The highest total bacterial count was found in GN treatment (4.45×10^5 CFU/g soil) followed by TM treatment (1.37×10^5 CFU/g soil) and control soil (1.18×10^5 CFU/g soil), respectively (**Table 3**). However, there was no significant difference of bacterial population between TM treatment and control soil. In addition, the significantly different of bacterial population was not observed in the appearance of tannic acid at all concentrations. Interestingly, the significant interaction took place for soil treatment and the concentration rate of

tannic acid. Appearance of higher concentration of tannic acid has a tendency to reduce bacterial population. As comparison within soil treatment, the highest total bacterial count was found in GN treatment without tannic acid appearance followed by GN treatment with 500 ppm, 1,000 ppm and 1,500 ppm tannic acid appearance, respectively. Likewise, the highest total bacterial count in control and in TM treatment was found without tannic acid appearance followed by 500 ppm, 1,000 ppm and 1,500 ppm tannic acid appearance, respectively.

Table 3 Effect of tannic acid on bacterial population

Treatment	Bacterial population (CFU/g soil)
A: Soil	
Control	1.18×10^5 ^b
GN	4.45×10^5 ^a
TM	1.37×10^5 ^b
F-test A	*
B: Concentration of tannic acid	
Tannic acid 0 ppm	5.31×10^5
Tannic acid 500 ppm	1.92×10^5
Tannic acid 1,000 ppm	1.13×10^5
Tannic acid 1,500 ppm	9.72×10^4
F-test B	ns
A x B: control soil with 0 ppm tannic acid	
control soil with 500 ppm tannic acid	3.05×10^5 ^{bc}
control soil with 1,000 ppm tannic acid	1.13×10^5 ^{ef}
control soil with 1,500 ppm tannic acid	3.75×10^4 ^f
GN with 0 ppm tannic acid	2.13×10^4 ^f
GN with 500 ppm tannic acid	1.05×10^6 ^a
GN with 1,000 ppm tannic acid	3.32×10^5 ^b
GN with 1,500 ppm tannic acid	2.00×10^5 ^{cde}
TM with 0 ppm tannic acid	1.98×10^5 ^{cde}
TM with 500 ppm tannic acid	2.35×10^5 ^{bcd}
TM with 1,000 ppm tannic acid	1.32×10^5 ^{def}
TM with 1,500 ppm tannic acid	1.07×10^5 ^{ef}
TM with 1,500 ppm tannic acid	7.33×10^4 ^f
F-test A x B	**

Treatments: Control (soil with unamended organic residue), GN (soil applied with long-term application of groundnut stover) and TM (soil applied with long-term application of tamarind leaves residue). Significant difference is indicated by different letters by mean of least significant difference. ns = no significant difference. * = significant difference at $p < 0.05$. ** = significant difference at $p < 0.01$.

Sub-experiment III (Gallic acid appearance): The highest total bacterial count was found in GN treatment (2.28×10^6 CFU/g soil) followed by control soil (6.56×10^5 CFU/g soil) and TM treatment (6.33×10^5 CFU/g soil), respectively (Table 4). However, there was no significant

difference of bacterial population between TM treatment and control soil. Interestingly, the significantly different of bacterial population was not observed in the appearance of gallic acid at all concentrations. In addition, there was no interaction between two factors.

Table 4 Effect of gallic acid on bacterial population

Treatment	Bacterial population (CFU/g soil)
A: Soil	
Control	6.56×10^5 ^b
GN	2.28×10^6 ^a
TM	6.33×10^5 ^b
F-test A	**
B: Concentration of gallic acid	
Gallic acid 0 ppm	1.40×10^6
Gallic acid 500 ppm	1.29×10^6
Gallic acid 1,000 ppm	1.01×10^6
Gallic acid 1,500 ppm	1.05×10^6
F-test B	ns
F-test A x B	ns

Treatments: Control (soil with unamended organic residue), GN (soil applied with long-term application of groundnut stover) and TM (soil applied with long-term application of tamarind leaves residue). Significant difference is indicated by different letters by mean of least significant difference. ns = no significant difference.

** = significant difference at $p < 0.01$.

Conclusions and discussions

Recently, the interaction between allelopathic substances and local soil microbes has started to be explored. From this present study, in GN and TM soil, the appearance of 10% tamarind leaf crude extract showed a slightly decrease in total bacterial count. On the other hand, the appearance of 10% tamarind leaf crude extract showed an increase in total bacterial count, but a significant difference was not found between treatment with or without 10% tamarind leaf crude extract addition (Figure 1). Under these circumstances, allelopathic substances contain

in tamarind leaf certainly not affect bacterial population with this concentration. It was particularly evident that certain soil bacteria can transform the new chemicals into less toxic forms (Inderjit and van der Putten, 2010; Inderjit, 2005). In addition, certain soil bacteria can catabolize allelopathic chemical as energy sources (Jilani et al., 2008). In comparison, the inhibition of bacterial growth was stronger in GN soil than control and TM soil as our results showed that soil bacteria in GN soil were more sensitive than soil bacteria in control and TM soil to these allelopathic chemicals, and that the effect depends on the ecosystems studied. In this study, it can be

concluded that appropriated rate of tamarind leaf crude extract had not an effect on bacterial population.

Although, results of sub-experiment I, II and III show that the soil bacteria of long-term application of groundnut stover can be affected by several introduced allelopathic chemicals such as caffeic acid, tannic acid and gallic acid contributing to the process of invasion. In addition, soil bacteria of long-term application of tamarind residues as well as unamended soil can be affected by some introduced allelopathic chemicals such as tannic acid, but not caffeic acid and gallic acid. This could be certified to the fact that it is also possible that native soil microorganisms cannot degrade the novel allelopathic chemicals, which can lead to the accumulation of these compounds up to toxic levels.

Prospective research should thus consider the effect of allelopathic chemicals, apart from studying microbial population, but also on microbial communities and activities. This may include phylogenetic studies and functional genes studies (e.g., microbial genes encoding nutrient cycling processes) to identify microbial community members directly involved in the degradation of organic materials in soils as regulated by organic resource quality.

Acknowledgements

This work was supported by research grant from Khon Kaen University; project no. 581004, TRF Grant for New Researcher (2014-2015), Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy and Soil Organic Matter Management Research Group, Khon Kaen University. Authors would like to thank Dr. Frank

Rasche for his advice and suggestions.

References

- Al-Fatimi, M., M. Wurster, G. Schröder, and U. Lindequist. 2007. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacol.* 111: 657-666.
- Inderjit. 2005. Soil microorganisms: an important determinant of allelopathic activity. *Plant and Soil.* 274: 227-236.
- Inderjit, and W. H. van der Putten. 2010. Impacts of soil microbial communities on exotic plant invasions. *Trends Ecol. Evol.* 25: 512-519.
- Jilani, G., S. Mahmood, A. Chaudhry, I. Hassan, and M. Akram. 2008. Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil – a review. *Ann. Microb.* 58: 351-357.
- Kamolmanit, B., P. Vityakon, W. Kaewpradit, G. Cadisch, and F. Rasche. 2013. Soil fungal communities and enzyme activities in a sandy, highly weathered tropical soil treated with biochemically contrasting organic inputs. *Biol. Fertil. Soils.* 49: 905-917.
- Lorenzo, P., C. S. Pereira, and S. Rodríguez-Echeverría. 2013. Differential impact on soil microbes of allelopathic compounds released by the invasive *Acacia dealbata* Link. *Soil Biol. Biochem.* 57: 156-163.
- Melendez, P. A., and V. A. Capriles. 2006. Antibacterial properties of tropical plant fruit from Puerto Rico. *Phytomedicine.* 13: 272-276.
- Muthu, S. E., S. Nandakumar, and U. A. Roa. 2005. The effect of methanolic extract of *Tamarindus indica* on the growth of clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Indian J. Med. Res.* 122: 525-528.
- Parvez, S. S., M. M. Parvez, E. Nishihara, H. Gemma, and Y. Fujii. 2003. *Tamarindus indica* L. leaf is a source of allelopathic substance. *Plant Growth Regul.* 40: 107-115.
- Puttaso, A., P. Vityakon, P. Saenjan, V. Trelo-ges, and G. Cadisch. 2011. Relationship between residue quality, decomposition patterns, and soil organic matter accumulation in a tropical sandy soil after 13 years. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 89: 159-174.
- Vityakon, P. 2007. Degradation and restoration of sandy soils under different agricultural land uses in Northeast Thailand: a review. *Land Degrad. Develop.* 18: 567-577.

ISBENS-24172

Diversity and Structure of Soil Bacterial Communities under Long-Term Application of Different Quality of Organic Residues in Tropical Sandy Soil

Phrueksa Lawongsa*

Department of Plant Science and Agricultural Resources, Land Resources and Environment
Section, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Thailand
E-mail address: phrula@kku.ac.th

Patma Vityakon

Department of Plant Science and Agricultural Resources, Land Resources and Environment
Section, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Thailand
E-mail address: patma@kku.ac.th

Abstract

Application of organic residues is one way to restore the fertility and build up organic matter in arable tropical soils. This study assessed the diversity and composition of bacterial communities in control soil (soil with no organic residue applied) and four soil treated with long-term application of different quality of organic residues including groundnut strover, tamarind, rice straw and dipterocarp using PCR-based 454 pyrosequencing with bacterial-specific primers targeting the 16S rRNA gene. The principal component analysis depicted a profile of soil bacterial community in control soil was clearly distinguished from soil treated with long-term different quality of organic residues. Interestingly, long-term application of tamarind sample was distant from other organic residues. The heatmap also clustered five soil treatments into two groups, the group contained control soil and the other was soil treated with long-term application of organic residues. *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Acidobacteria* were abundant classes in almost all the soil samples, while the most abundant sequences in control soil library were those related to *Ktenodobacteria*. The findings revealed that long-term application of organic residues strongly affected bacterial community structure and diversity. In addition, the bacterial communities are also responsive to soil properties (pH, soil organic matter and total nitrogen).

Keywords: 454 pyrosequencing, 16S rRNA gene, bacterial communities, organic residues

1. Background/ Objectives and Goals

Sandy and infertile arable soils are mostly found in tropical area. To overcome the limitation, application of organic residues with appropriate qualities (biochemical composition) is one way to restore the fertility and productivity of these soils. In addition, incorporating organic matter into soil can affect the biological, chemical and physical properties of the soil and its overall

health. The significant factor influencing the build-up of organic matter in sandy soils is the quality of organic residues that determined by the chemical as well as the physical characteristics of the residues (Vityakon, 2007). Long-term application of organic residues is bound to change soil nutrient status to different degrees depending on the quality of the residues and may thus affect decomposition of recently added residues and accumulation of soil organic matter (SOM), increase the amount of soil organic carbon (SOC) (Vityakon, 2007; Puttaso et al., 2011a) as well as retain nutrients (Madejón et al., 2001 and Crecchio et al., 2001), shift microbial diversity and enhance microbial activity (Kamolmanit et al., 2013).

Importantly, different qualities of organic residues may influence the number and type of microorganisms present in the soil (Aciego Pietri and Brooks, 2009; Marschner et al., 2003) through decomposition and nutrient transformation (Hadas et al., 2004; Vityakon 2007; Vityakon et al. 2000). Jiang et al. (2014) indicated that addition of further nitrogen significantly alters soil biogeochemical properties, alters the ratio of bacteria to fungi, and decreases microbial carbon utilization. Previous study indicated that microbial biomass was enhanced using high quality organic inputs (rich in organic nitrogen (>2.5 %) lignin (<15 %) polyphenol (<4 %)) as applied as a substitution of mineral fertilizers (Palm et al., 2001; Aciego Pietri and Brooks 2009; Debosz et al., 1999) and Liu et al., 2006 found that low quality (low contents of organic nitrogen (< 2.5 %) and polyphenols (< 4 %) input was more sensitive to inherent soil nutrient availability and led to nitrogen immobilization (Vityakon et al., 2000) as compared to high quality residues, while intermediate quality residue (rich in organic and moderate in lignin and polyphenol contents), was the most effective in accumulating SOC. Puttaso et al., 2011a also suggested that nitrogen-rich residues with low cellulose and moderate lignin and polyphenol contents are best suited to improve SOM content in tropical sandy soils. These attributes were also associated with a high microbial biomass and high efficiency of carbon utilization during later stages of decomposition.

In 2013, Kamolmanit and his colleagues also observed, on the basis of a long-term field experiment in Northeast Thailand, after 16 years continuous soil organic residues application, higher nitrogen availability in the tamarind treatment increased fungal abundance when compared to low nitrogen residues. However, nitrogen availability seemed to regulate not only decomposing soil fungi, but also the abundance and community of bacteria decomposers whose actual contribution to nitrogen turnover remains poorly understood.

Thus, the present study was designed to investigate how long term continuous application of different quality residues into sandy soil shaped diversity as well as community structure of microorganisms focus on bacteria. The hypothesis was that soil microbial communities have been changed after long-term application of different quality of organic residues when compared with control soil (soil with no organic residue applied).

The diversity and composition of bacterial communities were investigated using PCR-based 454 pyrosequencing with 16S rRNA gene as a phylogenetic marker to fulfill the knowledge gap of the underlying response of the soil bacterial community and its turnover of organic matter as regulated by the availability and decomposability of different quality of organic inputs.

2. Methods

2.1 Study Site and Sample Treatment

The long-term field experiments were established at the research station of the Agriculture and Co-operatives of Northeast at Tha Phra subdistrict, Khon Kaen province, Thailand (16°20' N; 102°49' E) since 1995. This experiment has been designed as the randomized complete block design (RCBD). Apart from control soil (C; soil with no organic residues applied), there were four residue treatments applied in early May every year including: groundnut stover; GN (*Arachis hypogaea*) as high quality organic residue, tamarind; TM (*Tamarindus indica*) leaves + petiole litter as intermediate quality organic residue, rice straw; RS (*Oryza sativa*) and dipterocarp; DP (*Dipterocarpus tuberculatus*) leaves litter as low quality organic residue at the rate of 10 Mg/ha/year to bare soil plots. The initial chemical characteristic of crop residue was showed in Table 1. The organic materials were incorporated to a depth of 20 cm in a 4 x 4 m² plot. Weeds were controlled at approximately monthly intervals. For the present study, soil samples were obtained in April 2014, 19 years after the field experiment had started. Three random soil samples from each of three replicate plots of each treatment were collected at 0-15 cm depth for soil physicochemical properties analysis and bacterial community investigation.

2.2 Soil Physicochemical Properties

Soil texture and particle-size distribution were done by hydrometer method. Chemical properties studied include soil reaction were measured by pH meter method in soil to water ratios of 1:2.5 with water, electrical conductivity (EC) was measured in soil to water ratios of 1:5 by EC meter, total nitrogen (Total N) in soil was extracted by Kjeldahl digestion (Bremner, 1960), total organic carbon (TOC) and SOM were determined with dichromate oxidation method according to Walkley and Black (1934). The data were subjected to analysis of variance using SPSS statistical program (SPSS for Windows, version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA.). The differences among various treatment means were compared using the least significant differences test (LSD) at 1% ($P \leq 0.01$) probability level.

2.3 Soil DNA Extraction, PCR Amplification of Bbacterial 16S rRNA Hene and Pyrosequencing

Soil microbial DNA was extracted using PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) by following the manufacturer's instructions. The V1-V3 region of the bacterial 16S ribosomal RNA gene were amplified by PCR using forward primer 8F

(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Turner et al., 1999) and reverse primer 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Muyzer et al., 1993). Amplicons were extracted and sequenced on an Illumina HiSeq/MiSeq platform according to the standard protocols.

2.4 Bioinformatics Analysis

The pyrosequencing reads were clustered into operational taxonomic units (OTUs) (sequences that have 97% similarity were defined as one OTU). Then the OTUs were further clustered using Mothur v.1.31.2 software (Schloss et al., 2011). Based on these clusters, bacterial community richness and diversity indices (Chao1, ACE, Shannon and Simpson) were calculated. In order to display the differences of OTU composition in five soil treatments, principal component analysis (PCA) was used to construct 2-D graph to summarize factors mainly responsible for this difference. The relationships among the bacterial communities in the five soil samples were analyzed by hierarchical clustering analysis using the R v.3.1.1 statistical software including heatmap and venn diagram.

3. Results

3.1 Soil Properties

The soil was characterized as a Khorat Sandy Loam (fine loamy siliceous isohyperthermic Typic (Oxyaquic) Kandistults (Soil Survey Staff, 2014). Five physicochemical characteristics of the soil samples were shown in Table 2. Soil texture of all plot sites were sand. The proportion of sand in the topsoil (0–15 cm depth) was between 93.86 - 94.93 %. The pH of all soil samples were found to vary from 5.1 to 6.62 which indicated the slight acidity of soils. The soil pH values of 5.10, 5.89, 5.91, 6.37 and 6.62 were obtained from C, RS, DP, GN and TM, respectively. The EC values of all soil samples were found in the range of 33.66 to 64.66 $\mu\text{S}/\text{cm}$, indicated that all soil treatments were low in salinity. SOM and TOC values observed in organic residues treated soil showed higher than control soil with no organic residues applied. The highest SOM and TOC values were found in RS which showed no significant difference with GN, followed by DP and TM while, control soil had the lowest SOM and TOC. Total N contents observed in organic residues treated soil showed higher than control soil with no organic residues applied. Soil treated with long-term application of groundnut strover has accumulated the highest total N, followed by RS and TM while DP had the lowest total N among the residue treated soils.

3.2 Microbial Richness and Pyrosequencing Data

The 454 pyrosequencing of V1-V3 region of 16S rRNA gene was used in order to analyze soil bacterial community composition. A total of 292,830 valid reads were obtained from the five soil treatments by pyrosequencing analysis (Table 3). The number of sequences ranged from 56,015 (RS) to 59,781 (DP) at 3% evolutionary distance. The total of 3,116 OTUs was found. Among all soil samples, the highest value was revealed in DP (662 OTUs) and the lowest value

was revealed in TM (576 OTUs). According to the OTU diversity estimated by Shannon's index, the greatest bacterial diversity was observed in GN (5.44), followed by RS (5.42), C (5.29), DP (5.23) and TM (5.22), respectively.

3.3 Bacterial Diversity and Community Structure

A venn diagram was analyzed to demonstrate that OTUs differed among the five soil treatments (Figure 1). The results showed that the number of site-specific OTUs shared among all libraries was 143. The control soil library shared 167, 347, 351 and 370 site-specific OTUs with long-term application of organic residue samples (TM, GN, RS and DP, respectively). The principal component analysis score plot clearly showed bacterial community variation among soil sites of different quality of organic residues application (Figure 2). The first and second principal components explained 48.66% and 32.13% of the variance, respectively. As seen from the PCA, the profiles of bacterial communities in C and DP were separated from those in TM, GN and RS along PC 1, and PC 2 separated bacterial communities in GN, RS and DP from those in C and TM. A profile of soil bacterial communities from long-term with no application of organic residue sample was clearly distinguished from long-term application of organic residue samples. Interestingly, long-term application of tamarind sample was distant from other organic residues, indicating that probably there were some promising chemicals in tamarind that can greatly influence soil bacterial community.

3.4 Relationships between Bacterial Communities among the Five Treatments

The bacterial community abundance of class was difference in the five samples (Figure 3). The most abundant OUTs associated with DP library were the sequences related to *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Acidobacteria*, whereas the same trend was found in GN and RS with different account. The TM library was largely dominated by sequences related to *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Anaerolineae* and *Chloroflexi*, while the most abundance sequences in C library were those related to *Ktenodobacteria* and *Acidobacteria*.

The heatmap plot depicted the relative abundance of each bacterial genera (variable clustering on the Y-axis) within each sample (X-axis clustering) (Figure 4). As seen from the heatmap, the relative abundance of each bacterial genus within each sample clustered five samples into two groups. GN and RS libraries grouped firstly together, and then they clustered with DP and TM. Finally, these groups gathered by decreasing order of similarity with C. Sequence belonging to *Rhodoplanes*, *Kaistobacter* and *Bradyrhizobium* were the most dominant bacterial genera in DP, whereas the same trend was found in RS with different account. In GN sample, the dominant genera were distributed among *Bacillus*, *Kaistobacter* and *Bradyrhizobium*. The dominant genera found in TM were *Balneimonas* and *Kaistobacte*. While, the dominant genera found in C were *Koribacter* and *Rhodoplanes*.

4. Discussions/Conclusions

In this study, the effect of long-term applications of different quality of organic residues on diversity and composition of bacterial communities was investigated via 454 pyrosequencing. Results showed that soil bacteria were mainly composed of *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi* and *Ktenodobacteria*. This diversity profile is commonly found in other soil and environments (Li et al., 2014). Interestingly, long-term continuous organic residues application can enhance the predominant bacterial community of *Alphaproteobacteria* most in the soil (figure 3), which could further enhance soil nutrient cycling.

Concomitantly, PCA clearly showed bacterial variations among treatments. This finding demonstrated that quality of organic residues selects for microorganisms, which shifts in response to changing environmental conditions. As shown in heatmap, the relative abundance of each bacterial genus within each sample clustered five samples into two groups and bacterial genera detected from control soil can be distinguished from organic residue treated soil.

When the relative abundance of bacterial community is considered along with the changes in physicochemical properties of soil, it becomes clear that the property of the soil was the dominant influence on bacterial community composition.

In this study, the long-term continuous application of the residues has resulted in changes in soil pH and nutrient content which reflected their different quality. It is estimated that pH and nutrient content directly alter bacterial community composition by imposing a physiological constraint on growth and survival of soil bacteria. Likewise, previous study showed that environmental stress such as soil pH and deprivation of organic matter input may regulate the diversity and functional potential of soil microbial communities (Wang et al., 2015; Chaparro et al., 2012; Nannipieri et al., 2003)

Fierer and Jackson (2006) have reported that soil pH may have the most influence on bacterial diversity in the soil according to the evidence of strong correlation between bacterial diversity and soil pH at the local scale. Additionally, Rousk et al. (2010) observed short-term effects of soil pH on alteration of soil microbial community composition derived by organic residue. Similarly, Wang et al. (2015) have reported that despite soil pH, organic carbon and organic nitrogen were the most significant factors that correlated with the community distribution of soil bacteria.

In addition, soil microbial communities can also be affected by secondary metabolites produced by plants (Schweitzer et al., 2011). These metabolites including allelopathic chemicals of some organic residue may affect microbial decomposition, abundance and activity (Niro et al., 2016; Lawongsa et al., 2016). Among allelopathic plants, tamarind is well known

for its allelopathic potential. There are several phytochemicals playing role as allelopathic substances were found in tamarind leaves such as tannins, phenolic compounds, flavonoid and alkaloids. Schmidt et al. (2013) found that allelopathic substances, polyphenols (e.g. tannins), change microbial community structures in soils.

This could be certified to the fact that the alteration of soil pH and soil nutrient contents along with accumulation of other chemical compound produced by plant residue itself such as allelochemicals in soil by long-term continuous application of contrasting quality organic inputs have created specific environment which affected significant impact on diversity and composition of bacterial communities. In this sense, the biochemical quality of organic input may promote functionally specialized microorganism diversity.

This study provides data to contribute the knowledge about the bacterial diversity in long-term application of four different types with different quality of organic inputs (groundnut strover, tamarind, rice straw and dipterocarp) for enhancement of soil organic matter and fertility. Moreover, long-term continuous application of organic residues has resulted in the degeneration of soil quality parameters such as soil communities and nutrient content, which in turn further affects crop health and soil sustainable productivity.

Table 1: Biochemical properties (quality) of organic inputs

Residues	Cellulose (g/kg)	Nitrogen; N (g/kg)	Polyphenols; PP (g/kg)	Lignin; L (g/kg)	Cellulose (g/kg)	L/N ratio	PP/N ratio	(L+PP)/N ratio	Carbon:Nitrogen (C/N ratio)
Groundnut strover	388	22.8	12.9	67.6	178	2.96	0.6	3.5	17.1
Tamarind	427	13.6	31.5	87.7	143	6.4	2.3	8.8	31.5
Rice straw	367	4.7	6.5	28.7	507	6.1	1.4	7.5	78.4
Dipterocarp	453	5.7	64.9	175.5	306	30.8	11.4	42.2	79.5

Original data taken from Puttaso et al. (2011b)

Table 2: The physicochemical properties of soil samples used in this study

Treatments*	Soil texture	pH	Electrical conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Soil organic matter (%)	Total organic carbon (%)	Total nitrogen (%)
C	Sand	5.10 ^c	33.66 ^c	0.36 ^b	0.21 ^b	0.07 ^d
GN	Sand	6.37 ^a	64.66 ^a	0.49 ^a	0.29 ^a	0.26 ^a
TM	Sand	6.62 ^a	58.33 ^a	0.42 ^b	0.24 ^b	0.22 ^b
RS	Sand	5.89 ^{bc}	35.66 ^b	0.53 ^a	0.31 ^a	0.24 ^{ab}
DP	Sand	5.91 ^b	45.00 ^b	0.42 ^b	0.25 ^b	0.13 ^c
CV (%)	-	10.85	3.53	7.33	6.62	2.42
F-test	-	**	**	**	**	**

In each column, means followed by the same letter do not differ statistically from each other at $p \leq 0.01$ LSD test

*C denotes no long-term application of organic residue in tropical sandy soil

GN denotes long-term application of groundnut strover in tropical sandy soil

TM denotes long-term application of tamarind in tropical sandy soil

RS denotes long-term application of rice straw in tropical sandy soil

DP denotes long-term application of dipterocarp in tropical sandy soil

Table 3: Summary data for pyrosequencing data from the five treatments

Treatments*	Number of sequence	number of OTUs	Richness and diversity indices			
			Chao 1	ACE	Shannon	Simpson
C	58721	577	656	617	5.29	0.011
GN	59509	649	727	718	5.44	0.115
TM	58804	576	619	620	5.22	0.016
RS	56015	652	726	715	5.42	0.013
DP	59781	662	747	726	5.23	0.016
Total	292830	3116	-	-	-	-

*C denotes no long-term application of organic residue in tropical sandy soil

GN denotes long-term application of groundnut strover in tropical sandy soil

TM denotes long-term application of tamarind in tropical sandy soil

RS denotes long-term application of rice straw in tropical sandy soil

DP denotes long-term application of dipterocarp in tropical sandy soil

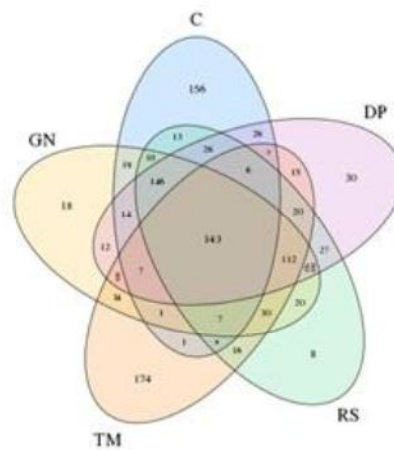


Fig. 1: A Venn diagram displaying the degree of overlap of bacterial OTUs at 3% distance level among treatments

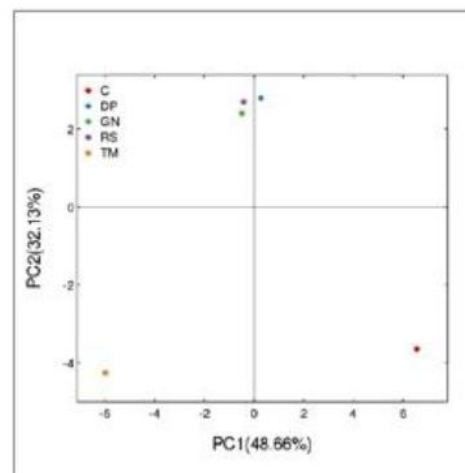


Fig. 2: The principal component analysis of soil bacterial communities among treatments

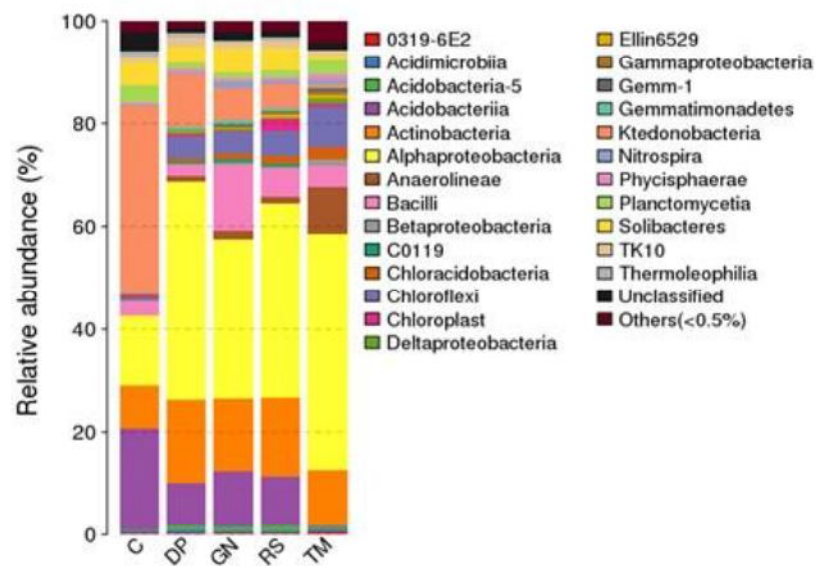


Fig. 3: Relative abundance of predominant bacterial class detected in the five treatments

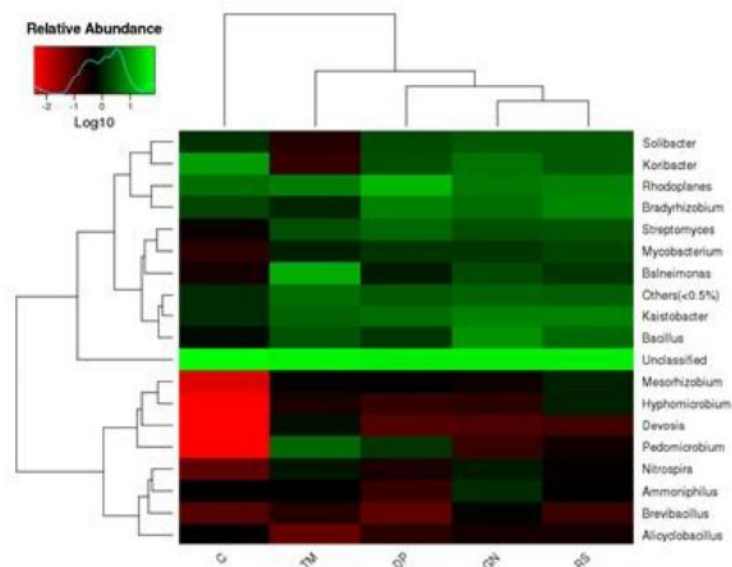


Fig. 4: The hierarchically clustered heatmap of bacterial distribution of different communities from the five treatments at the genus level. Row represents the relative percentage of each bacterial genus, and column stands for different treatments. The relative abundance for each bacterial genus was depicted by color intensity with the legend indicated at the above of figure

4.3 Acknowledgements

This work was supported by research grant from Khon Kaen University; project no. 581004 and no.590604, TRF Grant for New Researcher (2014-2015), Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy and Soil Organic Matter Management Research Group, Khon Kaen University.

5. References

- Aciego Pietri, J. C., & Brookes, P. C.(2009). Substrate inputs and pH as factors controlling microbial biomass, activity and community structure in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(7), 1396–1405.
- Bremner, J. M.(1960). Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *Journal of Agricultural Science*, 55(1), 11-33.
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., & Vivanco, J. M.(2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 48(5), 489–499.
- Crecchio, C., & Stotzky G.(2001). Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite–humic acids–Al hydroxypolymers. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(3-4), 573-581.
- Debosz, K., Rasmussen, P. H., & Pedersen, A. R.(1999). Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: effects of organic matter input. *Applied Soil Ecology*, 13(3), 209–218.
- Fierer, N., & Jackson, R. B.(2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS*, 103(3), 626-631.
- Hadas, A., Kautsky, L., Goek, M., & Kara, E. E.(2004). Rates of decomposition of plant residues and available nitrogen in soil, related to residue composition through simulation of carbon and nitrogen turnover. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(2), 255–266.
- Jiang, X., Cao, L., & Zhang, R.(2014). Effects of addition of nitrogen on soil fungal and bacterial biomass and carbon utilisation efficiency in a city lawn soil. *Soil Research*, 52(1), 97-105.
- Kamolmanit, B., Vityakon, P., Kaewpradit, W., Cadisch, G., & Rasche, F.(2013). Soil fungal communities and enzyme activities in a sandy, highly weathered tropical soil treated with biochemically contrasting organic inputs. *Biology and Fertility of Soils*, 49(7), 905-917.
- Lawongsa, P., Rungthong, R., Kamolmanit, B., Saenjan, P. & Vityakon, P.(2016). Responses of soil bacterial population to the appearance of allelopathic substances. *Khon Kaen agriculture Journal*, 44 (supplement 1), 984-990.
- Li, Y., Wen, H., Chen, L., & Yin, T.(2014). Succession of bacterial community structure and diversity in soil along a chronosequence of reclamation and re-vegetation on coal mine spoils in China. *PLoS ONE*, 9(12), e115024.
- Liu, P., Huang, J., Han, X., Sun, O. J., & Zhou, Z.(2006). Differential responses of litter decomposition to increased soil nutrients and water between two contrasting grassland plant species of Inner Mongolia, China. *Applied Soil Ecology*, 34(2-3), 266–275.
- Madejón, E., López, R., Murillo, J. M., & Cabrera, F.(2001). Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 84(1), 55-65.

- Marschner, P., Kandeler, E., & Marschner, B.(2003). Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3), 453-461.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G.(1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G.(2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 655–670.
- Niro, E., Marzaioli, R. De Crescenzo, S., D'Abrosca, B., Castaldi, S., Esposito, A., Fiorentino, A., Rutigliano, F. A.(2016). Effects of the allelochemical coumarin on plants and soil microbial Community. *Soil Biology & Biochemistry*, 95, 30-39.
- Palm, C. A., Gachengo, C. N., Delve, R. J., Cadisch, G., & Giller, K. E.(2001). Organic inputs for soil fertility management in tropical agroecosystems: application of an organic resource base. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 83(1-2), 27–42.
- Puttaso, A., Vityakon, P., Trelo-ges, V., Saenjan, P., & Cadisch, G.(2011a). Effect of long-term (13 years) application of different quality plant residues on soil organic carbon and soil properties of a sandy soil of Northeast Thailand. *KKU Research Journal*, 16(4), 359–370.
- Puttaso, A., Vityakon, P., Saenjan, P., Trelo-ges, V., & Cadisch, G.(2011b). Relationship between residue quality, decomposition patterns, and soil organic matter accumulation in a tropical sandy soil after 13 years. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 89(2), 159-174.
- Rousk, J., Brookes, P. C., & Bååth, E.(2010). Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 42(6), 926–934.
- Schloss, P. D., Gevers, D., & Westcott, S. L.(2011). Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-Based studies. *PLoS ONE*, 6(12), e27310.
- Schmidt, M. A., Kreinberg, A. J., Gonzalez, J. M., Halvorson, J. J., French, E., Bollmann, A., & Hagerman, A. E.(2013). Soil microbial communities respond differently to three chemically defined polyphenols. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 190-197.
- Schweitzer, J. A., Fischer, D. G., Rehill, B. J., Wooley, S. C., Woolbright, S. A., Lindroth, R. L., Whitham, T. G., Zak, D. R., & Hart, S. C.(2011). Forest gene diversity is correlated with the composition and function of soil microbial communities, *Population Ecology*, 53(1), 35-46.
- Soil Survey Staff.(2014). *Key to soil taxonomy*, 12th edn. Washington, USA: USDA Natural Resources Conservation Service.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., & Palmer, J. D.(1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327–338.

- Vityakon P.(2007). Degradation and restoration of sandy soils under different agricultural land uses in Northeast Thailand: A review. *Land Degradation & Development*, 18(5), 567–577.
- Vityakon, P., Meepech, S., Cadisch, G., & Toomsan, B.(2000). Soil organic matter and nitrogen transformation mediated by plant residues of different qualities in sandy acid upland and paddy soils. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 48(1), 75–90.
- Walkley, A., & Black, I. A.(1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), 29-38.
- Wang, N. F., Zhang, T., Zhang, F., Wang, E. T., He, J. F., Ding, H., Zhang, B. T., Liu, J., Ran, X. B. & Zang, J. Y.(2015). Diversity and structure of soil bacterial communities in the Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6:1188. doi:10.3389/fmicb.2015.01188