ผลของแกลบเผาต่อการลดการสะสมปริมาณสารหนู จำนวนแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและต้านทานสารหนูในดินนาปลูกข้าว

Effect of Rice Husk Charcoal on Reduction of Arsenic Accumulation, Plant Growth Promoting and Arsenic Resistant Bacteria in Paddy Field Soil

เบญจมาส รสโสภา[1)] สุมิตรา จันเนียม[1)] ดวงพร วิฐูรจิตต์[2)] พัชราภรณ์ รักชุม[3)] ชิษณุชา บุดดาบุญ[4)] ยุพิน รามณีย์[5)] นภัสสร โน๊ตศิริ[6)]

Benjamas Rossopa[1)] Sumittra Channaim[1)] Duangporn Withoonjit[2)] Patcharaporn Rakchum[3)]

Chitnucha Buddhaboon[4)] Yupin Rammanee[5)] Napatsorn Notesiri[6)]

Abstract

Arsenic is metalloid element that comes in forms of arsenate (As (III), As^{+3}) and arsenite (As (V), As^{+5}). These arsenic residue could be found in soil. Consumption of arsenic-contaminated rice may cause severe effects on human health. Application of rice husk charcoal can reduce total arsenic in soil and rice grains. The objective of this study was to investigate the utilization of rice husk charcoal for reduction of arsenic accumulation, number of plant growth promoting bacteria and arsenic resistant bacteria in paddy field soils. Experiments were conducted during 2017-2018 in farmer fields which had high concentration of arsenic at Ubon Ratchathani (sandy clay loam), Nakhon Pathom (clay soil) and Nakhon Si Thammarat (loam) provinces. Rice husk charcoal at 1,000 kg/rai was applied to rice fields with rice variety, Pathum Thani 1 compared to farmer practice fields without using rice husk charcoal. Soil samples were collected to determine arsenic accumulation in soil, shoot, roots and rice grains. Isolation of plant growth promoting bacteria on selective media, e.g. nitrogen fixing bacteria, phosphate solubilizing bacteria, cellulolytic bacteria and arsenic resistant bacteria with arsenate and arsenite forms between 2-30 mM were also performed. The results showed that application of rice husk charcoal in all 3 sites had total arsenic level in rice grains in the range of 0.153-0.474 mg/kg which less than those in without charcoal application fields (0.196-0.505 mg/kg) (6-23% reduction). Whilst, the amount of plant growth promoting bacteria level in rice field with applying rice husk charcoal in sandy clay loam and clay soil ranged from 3.80×10^{2}-3.36×10^{4} CFU/g dry soil that was higher than those in without charcoal fields (18.17-1.96×10^{4} CFU/g dry soil). It was also found that the amount of bacteria which resisted arsenate and arsenite showed the highest concentration of 2 mM in sandy clay loam soil,

[1)] ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี อ.บ้านสร้าง จ.ปราจีนบุรี 25150 โทรศัพท์ 0-3727-1385
Prachin Buri Rice Research Center, Ban Sang, Prachin Buri, 25150 Tel. 0-3727-1385

[2)] ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท อ.เมือง จ.ชัยนาท 17000 โทรศัพท์ 0-5641-1733
Chai Nat Rice Research Center, Mueang, Chai Nat 17000 Tel. 0-5641-1733

[3)] ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000 โทรศัพท์ 0-4271-1471
Sakon Nakhon Rice Research Center, Mueang, Sakon Nakhon 47000 Tel. 0-4271-1471

[4)] ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000 โทรศัพท์ 0-4534-4104
Ubon Ratchathani Rice Research Center, Mueang, Ubon Ratchathani 34000 Tel. 0-4534-410

[5)] ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง อ.เมือง จ.พัทลุง 93000 โทรศัพท์ 0-7484-0111
Phatthalung Rice Research Center, Mueang, Phatthalung 93000 Tel. 0-7484-0111

[6)] สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2561-4179
Bureau of Science for Land Development, Land Development Department, Chatuchak, Bangkok 10900 Tel. 0-2561-4179

while the amount of bacteria which resisted arsenate and arsenite had highest concentration of 30 and 10 mM in clay soil fields with applying rice husk charcoal. Therefore, the use of rice husk charcoal could be an alternative method for reduction the total arsenic content in rice grains.

Keywords: Pathum Thani 1, rice husk charcoal, arsenic, arsenic resistant bacteria, plant growth promoting bacteria

บทคัดย่อ

สารหนูเป็นธาตุโลหะหนักในรูปของสารอนินทรีย์อาร์ซิเนต (As (III), As^{+3}) และอาร์ซิไนต์ (As (V), As^{+5}) ซึ่งตกค้างอยู่ในดิน การบริโภคข้าวที่ปนเปื้อนสารหนูมีความเสี่ยงที่จะเกิดอันตรายต่อสุขภาพ การใส่แกลบเผาสามารถช่วยลดปริมาณสารหนูในดินและเมล็ดข้าว การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใส่แกลบเผาต่อการลดการสะสมปริมาณสารหนู จำนวนแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและต้านทานสารหนูในดินที่ปลูกข้าว ดำเนินการในปี พ.ศ. 2560-2561 ในแปลงนาเกษตรกรที่มีการปนเปื้อนของสารหนู จังหวัดอุบลราชธานี (ดินร่วนเหนียวปนทราย) นครปฐม (ดินเหนียว) และนครศรีธรรมราช (ดินร่วน) โดยปลูกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ใส่แกลบเผาอัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ เปรียบเทียบกับวิธีของเกษตรกร (ไม่ใส่แกลบเผา) เก็บตัวอย่างดิน วิเคราะห์การปนเปื้อนของสารหนูในดิน ต้น ราก และเมล็ดข้าว คัดแยกจำนวนแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียละลายฟอสเฟต แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหารจำเพาะ และแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูในรูปอาร์ซิเนตและอาร์ซิไนต์ที่ความเข้มข้น 2-30 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองทั้ง 3 สถานที่ พบว่า การใส่แกลบเผาในแปลงนา พบปริมาณสารหนูในเมล็ดข้าวอยู่ระหว่าง 0.153-0.474 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้อยกว่าแปลงนาที่ไม่ได้ใส่แกลบเผา (0.196-0.505 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) (ลดลงร้อยละ 6-23) ส่วนแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในแปลงนาที่ใส่แกลบเผา ในดินร่วนเหนียวปนทรายและดินเหนียว พบจำนวนระหว่าง 3.80×10^2 - 3.36×10^4 CFU ต่อดินแห้ง 1 กรัม มากกว่าแปลงนาที่ไม่ได้ใส่แกลบเผา (18.17 - 1.96×10^4 CFU ต่อดินแห้ง 1 กรัม) สำหรับแบคทีเรียต้านทานสารหนูในรูปอาร์ซิเนตและอาร์ซิไนต์ การใส่แกลบเผาพบความเข้มข้นสูงสุดที่ระดับ 2 มิลลิโมลาร์ ในดินร่วนเหนียวปนทราย ส่วนอาร์ซิเนต พบความเข้มข้นสูงสุดที่ระดับ 30 มิลลิโมลาร์ และอาร์ซิไนต์ที่ระดับ 10 มิลลิโมลาร์ ในดินเหนียว ดังนั้น การใช้แกลบเผาจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดการสะสมของปริมาณสารหนูในเมล็ดข้าว

คำสำคัญ: ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 แกลบเผา สารหนู แบคทีเรียต้านทานสารหนู แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

คำนำ

สารหนูเป็นธาตุกึ่งโลหะ มีลักษณะเป็นผงสีเทา พบมากเป็นอันดับที่ 20 ของธาตุที่พบบนโลก โดยพบในสิ่งมีชีวิต ทั้งพืชและสัตว์ รวมทั้งในธรรมชาติ ได้แก่ พื้นดิน ทะเล มหาสมุทร และแหล่งน้ำต่างๆ เป็นองค์ประกอบของ ดิน หิน ตามธรรมชาติ สารหนูออกมาสู่บรรยากาศโลกจากอุตสาหกรรมบางประเภทที่ใช้สารนี้ เช่น การอบไม้ การผลิตสี และการผลิตสารกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น (Cullen and Reimer, 1989) จากรายงานวิจัย พบว่า ปริมาณการสะสมสารหนูในข้าวมีความสัมพันธ์กับสารหนูในดิน อินทรียวัตถุ ฟอสฟอรัส พันธุ์ข้าว ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกของดิน (CEC) และชนิดของเนื้อดิน โดยมีผลต่อการสะสมสารหนูในข้าวอย่างมีนัยสำคัญ (Awasthi *et al.*, 2017; Huang, 1994) จึงต้องตระหนักถึงการปนเปื้อนของสารหนูในผลผลิตข้าว

Fu และคณะ (2011) พบว่า สารหนูที่ตกค้างในข้าวกล้องจากหมู่เกาะ Hainan สาธารณรัฐประชาชนจีน มีความเข้มข้นเฉลี่ย 92 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่สำนักงานส่งเสริมสินค้าระหว่างประเทศ (2555) เผยแพร่ผลการตรวจสอบสารปนเปื้อนในข้าวและสินค้าข้าว (rice and rice products) ของนิตยสารเพื่อผู้บริโภค จำนวน 1,200 รายการ พบว่า ข้าวและสินค้าข้าว จำนวน 220 รายการ มีสารหนูสังเคราะห์ตกค้าง (inorganic arsenic) ในระดับ 3.5-6.7 ไมโครกรัมต่อหนึ่งหน่วยการบริโภค และ

อีก 223 ชนิด มีสูงถึง 8.7 ไมโครกรัมต่อหนึ่งหน่วยการบริโภค ซึ่งเป็นข้อมูลที่สร้างความตื่นตัวต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง รัฐบาลท้องถิ่นและองค์กรคุ้มครองผู้บริโภค ได้เรียกร้องให้มีการดำเนินการควบคุมระดับสารตกค้าง นอกจากนี้ "Consumer Report" ได้สุ่มตรวจข้าวหอมมะลิไทยที่จำหน่ายในประเทศสหรัฐอเมริกา ของผู้จัดจำหน่าย 3 ราย พบว่า ข้าวหอมมะลิไทยมีสารหนูตกค้างในระดับต่ำ จากรายงานดังกล่าว ผู้นำเข้าข้าวหอมมะลิรายสำคัญของสหรัฐอเมริกาได้นำข้าวหอมมะลิไปตรวจสอบสารหนูตกค้างในห้องทดลองทั้งสองแบบ พบว่า ระดับสารหนูตกค้างในข้าวหอมมะลิของไทยอยู่ในระดับต่ำกว่าข้าวที่ปลูกในสหรัฐอเมริกามาก ชี้ให้เห็นว่าผู้บริโภคหรือคู่ค้าที่สำคัญของประเทศไทยให้ความสำคัญในความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภคมากขึ้น นอกจากนี้ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ได้วิเคราะห์สารหนูตกค้างในข้าวขาวและข้าวกล้อง พบว่ายังอยู่ในระดับที่ปลอดภัย (< 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) (สุมลธา และจุฑามาศ, 2555)

อนึ่ง ตามมาตรฐานของ Codex (CODEX STAN 193-1995) ได้กำหนดปริมาณสูงสุด (maximum level, ML) ของสารหนูอินทรีย์ในข้าวที่ขัดสีแล้ว (polished rice) และข้าวกล้อง (brown rice) ที่ระดับ 0.02 และ 0.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม การลดการปนเปื้อนของสารหนูในดินขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของการปนเปื้อน และสมบัติของดิน แนวทางการลดการปนเปื้อนสารหนูควรเป็นแบบผสมผสาน (ศุภมาศ, 2545) แนวทางหนึ่ง คือ การใช้แกลบเผา เนื่องจากซิลิคอนในดินอยู่ในรูปซิลิคอนไดออกไซด์ (SiO_2) หรือซิลิกา (silica) เป็นองค์ประกอบในแร่ควอตซ์ (quartz) และแร่อะลูมิโนซิลิเกตชนิดต่างๆ รวมทั้งซิลิกาอสัณฐาน ส่วนรูปของธาตุนี้ในสารละลายดินส่วนมาก คือ กรดโมโนซิลิซิก และกรดพอลิซิลิซิก โดยกรดโมโนซิลิซิกสามารถทำปฏิกิริยากับโลหะหนักได้สารประกอบซิลิเกตที่ละลายน้ำได้น้อย (Awasthi *et al.*, 2018)

การปนเปื้อนสารหนูในดินไม่เพียงส่งผลต่อระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตต่างๆ หากแต่ยังมีผลต่อกระบวนการต่างๆ ของจุลินทรีย์ในดิน ในระยะยาวโลหะหนักอาจส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ดิน ลดกิจกรรม และความหลากหลายของจุลินทรีย์ดิน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของการใส่แกลบเผาต่อการลดการปนเปื้อนสารหนูในดินและข้าว รวมทั้งจำนวนแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และต้านทานสารหนูในดินที่ปลูกข้าว เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์เพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดดินทางชีวภาพสำหรับพื้นที่ปนเปื้อนสารหนูต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดเลือกตัวแทนแปลงนาเกษตรกรที่มีการปนเปื้อนของสารหนู

ใช้ข้อมูลจากโครงการการจัดการผลิตข้าวที่เหมาะสมเพื่อลดการสะสมของสารหนูในข้าวในปีที่ 1 ของกรมพัฒนาที่ดิน โดยคัดเลือกแหล่งที่มีการปนเปื้อนสารหนู ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี เนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย มีปริมาณสารหนู 3.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จังหวัดนครปฐม เนื้อดินเป็นดินเหนียว มีปริมาณสารหนู 16.47 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจังหวัดนครศรีธรรมราช เนื้อดินเป็นดินร่วน มีปริมาณสารหนู 6.56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2. การศึกษาวิธีการปลูกข้าวที่เหมาะสมเพื่อลดการสะสมของสารหนูในแปลงนา

ดำเนินการในแปลงเกษตรกร จังหวัดอุบลราชธานี นครปฐม และนครศรีธรรมราช ในปี พ.ศ. 2560-2561 โดยเลือกวิธีการใส่แกลบเผาเพื่อลดการสะสมสารหนูในข้าว (พัชราภรณ์ และคณะ, 2561) มาขยายผลในนาเกษตรกรในพื้นที่ 2 ไร่ เปรียบเทียบวิธีการใส่แกลบเผาเพื่อลดการปนเปื้อนของสารหนู กับวิธีการของเกษตรกร (ไม่ใส่แกลบเผา) วิธีการละ 1 ไร่ ใช้ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 อัตราเมล็ดพันธุ์ 15 กิโลกรัมต่อไร่ ปลูกโดยวิธีหว่านน้ำตม ใส่แกลบเผาอัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา การดูแลรักษา กำจัดวัชพืช โรคแมลง ปฏิบัติตามคำแนะนำของกรมการข้าว

เก็บข้อมูล ดิน น้ำ ข้าว ทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งเก็บเกี่ยว นำมาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำและดิน และปริมาณสารหนูในดิน ต้น ราก และเมล็ดข้าว สุ่มตัวอย่างข้าวจากทั้งสองกรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 จุด จุดละ 2x5 เมตร

วิเคราะห์ปริมาณสารหนูในดิน โดยย่อยตัวอย่างดิน

ด้วยกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) และกรดไนตริก (HNO_3) ในอัตราส่วน 2:1 โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Amacher (1996) และ Hesse (1971) และวัดด้วยเครื่อง ICP-OES (inductively coupled plasma - optical emission spectrometry) ส่วนปริมาณสารหนูใน ต้น ราก และเมล็ดข้าว วิเคราะห์โดยย่อยตัวอย่างพืชด้วยกรดเปอร์คลอริกและกรดไนตริก ในอัตราส่วน 1:2 (Zarcinas *et al.*, 1983) และวัดปริมาณด้วยเครื่อง AAS-HVG (atomic absorption spectrophotometer - hydride vapor generation)

3. การคัดแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและต้านทานสารหนูในดินปลูกข้าว

เก็บตัวอย่างดินในระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าว จากแปลงนาทดลอง จังหวัดอุบลราชธานีและนครปฐม ในปี พ.ศ. 2560 และ 2561 โดยชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มี 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเจือจางสารละลายดินด้วยเทคนิค dilution plating method ให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-5} และนำสารละลายดินปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง ดำเนินการดังนี้

3.1 การตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย บนอาหารแข็ง Burk's N-free medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญของแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหาร ตรวจนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย และคำนวณหน่วย colony forming unit (CFU)

3.2 การละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย บนอาหารแข็ง National Botanical Research Institute's phosphate growth mediem (NBRIP) (Nautiyal, 1999) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เกิดวงใสรอบและคำนวณหน่วย CFU

3.3 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย บนอาหาร carboxymethyl cellullose agar (CMC agar) (Zucker and Hankin, 1970) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียและคำนวณหน่วย CFU

3.4 การทดสอบการต้านทานสารหนูของแบคทีเรีย บนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ที่มีสารหนูอาร์ซิเนต ($NaHAsO_2.7H_2O$) และอาร์ซิไนต์ ($NaAsO_2$) ที่ระดับความเข้มข้น 2 5 10 15 และ 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำ spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 3 ซ้ำ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียและคำนวณหน่วย CFU

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ข้อมูลสภาพแปลงนาทดลอง

1.1 จังหวัดอุบลราชธานี อุณหภูมิดิน 25.7-32.7 องศาเซลเซียส อุณหภูมิน้ำ 26-32.3 องศาเซลเซียส ค่า pH ของดิน 3.5-4.5 pH ของน้ำ 5.2-6.6 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน 4.3-73.0 ไมโครซิเมนต่อเซนติเมตร ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ 10-62 ไมโครซิเมนต่อเซนติเมตร ปลูกข้าววันที่ 19 มิถุนายน 2560 และเก็บเกี่ยววันที่ 17 ตุลาคม 2560

1.2 จังหวัดนครปฐม อุณหภูมิดิน 30.1-36.5 องศาเซลเซียส อุณหภูมิน้ำ 29.7-35.7 องศาเซลเซียส ค่า pH ของดิน 6.3-7.3 ค่า pH ของน้ำ 6.7-7.2 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน 358.7-984.0 ไมโครซิเมนต่อเซนติเมตร และค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ 0-367 ไมโครซิเมนต่อเซนติเมตร ปลูกข้าววันที่ 28 พฤษภาคม 2560 และเก็บเกี่ยววันที่ 18 กันยายน 2560

1.3 จังหวัดนครศรีธรรมราช อุณหภูมิดิน 26.0-28.7 องศาเซลเซียส อุณหภูมิน้ำ 25.3-29.7 องศาเซลเซียส ค่า pH ของดิน 5.5-6.1 ค่า pH ของน้ำ 5.9-7.2 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน 58.5-92.7 ไมโครซิเมนต่อเซนติเมตร ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ 26.7-59.3 ไมโครซิเมนต่อเซนติเมตร ปลูกข้าววันที่ 9 มกราคม 2561 และเก็บเกี่ยววันที่ 9 พฤษภาคม 2561

2. ผลผลิตข้าว

ดำเนินงานทดลองในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี นครปฐม และนครศรีธรรมราช โดยใส่แกลบเผาในแปลงนาอัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ เปรียบเทียบกับการไม่ใส่แกลบเผา พบว่า ผลผลิตข้าวในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี แปลงที่ใส่แกลบเผา ให้ผลผลิตเฉลี่ย 296 กิโลกรัมต่อไร่ น้อยกว่าแปลงที่ไม่ใส่แกลบเผา (335 กิโลกรัมต่อไร่) เนื่องจากผลกระทบจากภาวะแล้ง จังหวัดนครปฐม แปลงที่ใส่แกลบเผา ให้ผลผลิตเฉลี่ย 808 กิโลกรัมต่อไร่ มากกว่าแปลงที่ไม่ใส่แกลบเผา (788 กิโลกรัมต่อไร่) ส่วนจังหวัด

Table 1 Arsenic found in soil, shoot, root and rice grain in the treatment of rice husk charcoal (1,000 kg/rai) and without rice husk charcoal in farmer's fields at Ubon Ratchathani, Nakhon Pathom and Nakhon Si Thammarat provinces during 2017-2018

Sample	Total arsenic (mg/kg) ($\bar{x}$ ± SD)							
	Rice husk charcoal (1,000 kg/rai)				Without rice husk charcoal			
	25 DAS	50 DAS	90 DAS	120 DAS	25 DAS	50 DAS	90 DAS	120 DAS
Ubon Ratchathani, 2017								
Soil	3.787±0.345	3.521±0.378	4.182±0.561	1.992±0.109	8.015±2.349	7.407±2.381	5.386±0.187	4.629±1.488
Shoot	2.488±0.206	2.067±0.023	1.605±0.034	0.584±0.106	2.688±0.168	2.137±0.097	1.555±0.501	0.448±0.104
Root	8.849±0.946	8.634±0.880	6.679±0.680	4.740±0.569	9.330±0.194	9.163±0.039	7.881±2.085	6.840±0.353
Grain				0.153±0.005				0.200±0.040
Nakhon Pathom, 2017								
Soil	10.915±0.707	11.620±0.987	9.707±0.350	9.166±0.291	10.288±0.949	12.708±1.632	8.350±0.133	8.713±0.203
Shoot	1.782±0.095	1.581±0.081	5.735±2.133	2.477±0.141	1.580±0.280	1.312±0.116	3.641±0.425	2.217±0.552
Root	23.339±3.110	20.520±2.658	30.378±2.902	26.998±0.125	21.912±1.261	19.301±1.078	30.222±2.544	24.289±1.528
Grain				0.175±0.007				0.196±0.029
Nakhon Si Thammarat, 2018								
Soil	5.242±1.144	5.561±1.324	4.779±0.326	6.585±0.606	5.403±0.418	6.221±1.721	4.854±0.886	5.433±1.475
Shoot	4.318±0.208	4.441±0.810	5.201±0.122	5.632±0.539	4.546±0.251	5.266±1.326	5.398±0.534	4.947±0.407
Root	11.232±0.110	10.487±0.404	23.662±1.167	22.276±0.352	12.159±0.781	11.111±0.158	23.069±0.889	20.892±1.112
Grain				0.474±0.026				0.505±0.052

DAS = days after sowing seeds

นครศรีธรรมราช แปลงที่ใส่แกลบเผา ให้ผลผลิตเฉลี่ย 474 กิโลกรัมต่อไร่ มากกว่าแปลงที่ไม่ใส่แกลบเผา (451 กิโลกรัมต่อไร่)

3. ปริมาณสารหนูในดิน ต้น ราก และเมล็ดข้าว

3.1 จังหวัดอุบลราชธานี โลหะหนัก (total arsenic) ในดิน ก่อนการทดลองในกรรมวิธีที่ใส่แกลบเผา พบปริมาณ 6.564±2.931 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนกรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา พบปริมาณ 7.885±1.751 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังเก็บเกี่ยวข้าว พบว่า โลหะหนักในดินในกรรมวิธีที่ใส่แกลบเผามีปริมาณ 1.992±0.109 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลดลงร้อยละ 70 เมื่อเทียบกับดินก่อนการทดลอง และแปลงที่ไม่ใส่แกลบเผามีปริมาณ 4.629±1.488 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลดลงร้อยละ 41 เมื่อเทียบกับดินก่อนการทดลอง ส่วนในต้นและราก ในระยะต่างๆ ทั้ง 4 ระยะ พบว่า โลหะหนัก ในระยะ 120 วันหลังปลูก มีปริมาณลดลง ส่วนเมล็ด โลหะหนักในกรรมวิธีใส่แกลบเผา มีปริมาณ 0.153±0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้อยกว่ากรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา (0.200±0.040 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) (Table 1) หรือลดลงเฉลี่ยร้อยละ 23.5

3.2 จังหวัดนครปฐม โลหะหนักในดิน ก่อนการทดลองในกรรมวิธีใส่แกลบเผา และกรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา พบปริมาณ 11.260±0.112 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังเก็บเกี่ยวข้าว พบโลหะหนักในดิน ในกรรมวิธีใส่แกลบเผาปริมาณ 9.166±0.291 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลดลงร้อยละ 19 เมื่อเทียบกับดินก่อนการทดลอง และกรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผาพบปริมาณ 8.713±0.203 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลดลงร้อยละ 23 เมื่อเทียบกับดินก่อนการทดลอง ส่วนในต้นและรากในระยะต่างๆ ทั้ง 4 ระยะ พบว่า โลหะหนักในระยะ 120 วันหลังปลูก มีปริมาณลดลง ส่วนเมล็ด พบปริมาณโลหะหนักในกรรมวิธีใส่แกลบเผา 0.175±0.007 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้อยกว่ากรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา (0.196±0.029 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) (Table 1) หรือลดลงเฉลี่ยร้อยละ 10.7

3.3 จังหวัดนครศรีธรรมราช โลหะหนักในดิน ก่อนการทดลองในกรรมวิธีใส่แกลบเผาพบ 5.544±0.330 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนกรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผาพบปริมาณ 5.678±1.038 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังเก็บเกี่ยวข้าว พบปริมาณโลหะหนักในดิน ในแปลงกรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา 6.585±0.606 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลดลงร้อยละ 4 เมื่อเทียบกับดินก่อนการทดลอง ส่วนกรรมวิธีใส่แกลบเผาพบปริมาณ 5.433±1.475 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพิ่มขึ้นร้อยละ 16 เมื่อเทียบกับดินก่อนการทดลอง ส่วนในต้นและราก ที่ระยะต่างๆ ทั้ง 4 ระยะ พบโลหะหนักในระยะ 120 วันหลังปลูก มีปริมาณลดลง ส่วนเมล็ด โลหะหนักในกรรมวิธีใส่แกลบเผาพบปริมาณ 0.474±0.026 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้อยกว่ากรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา (0.505±0.052 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) (Table 1) หรือลดลงเฉลี่ยร้อยละ 6.1

จากการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก ทั้ง 3 สถานที่ พบว่า ปริมาณสารหนูในดินเริ่มต้น ที่จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย มีปริมาณสารหนู 3.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จังหวัดนครปฐม เนื้อดินเป็นดินเหนียว มีปริมาณสารหนู 16.47 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจังหวัดนครศรีธรรมราช เนื้อดินเป็นดินร่วน มีปริมาณสารหนู 6.56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

เนื่องจากการดูดซับสารหนูในดินมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกของดิน และปริมาณสารหนูในดิน (Huang, 1994) โดยในดินเหนียว ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกของดินมีมากกว่าดินร่วน และดินร่วนเหนียวปนทราย ดังนั้น ปริมาณสารหนูในดินที่จังหวัดนครปฐม (ดินเหนียว) จึงมีมากกว่าดินร่วน และดินร่วนเหนียวปนทราย สำหรับปริมาณความเข้มข้นของสารหนูในราก มีมากกว่าส่วนต้น และเมล็ด ในทุกระยะของวันที่เก็บตัวอย่าง (Table1) ส่วนปริมาณสารหนูในเมล็ดข้าวของจังหวัดนครศรีธรรมราชพบมากกว่านครปฐมซึ่งมีปริมาณสารหนูเริ่มต้นในดินสูงกว่า อย่างไรก็ตาม ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารหนูในดินและต้นข้าว สอดคล้องกับการศึกษาของ Rezaitabar และคณะ (2010) ที่ไม่พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของปริมาณสารหนูในต้นข้าวและดินที่ปลูก โดยปริมาณสารหนูในรากและต้นข้าวของจังหวัดนครปฐมและนครศรีธรรมราช พบที่ระยะ 90 วัน มีมากที่สุด และลดลงที่ 120 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Doronila และคณะ (2014) ที่พบว่าการสะสมของสารหนูมีแนวโน้มลดลง เมื่อระยะเวลาการปลูกนานขึ้นในหญ้า *Enteropogon acicularis* (Lindl.) Lazarider

Table 2 Isolation of plant growth promoting bacteria (nitrogen fixing bacteria, phosphate solubilizing bacteria, cellulolytic bacteria) in the treatment of rice husk charcoal (1,000 kg/rai) and without rice husk charcoal in farmer's fields at Ubon Ratchathani and Nakhon Pathom provinces in 2017

Treatment	Number of plant growth promoting bacteria (CFU /g dry soil)		
	Nitrogen fixing bacteria	Phosphate solubilizing bacteria	Cellulolytic bacteria
Ubon Ratchathani			
- rice husk charcoal	7.43×10^2	3.80×10^2	1.14×10^3
- without rice husk charcoal	2.94×10^2	2.77×10^2	18.17
Nakhon Pathom			
- rice husk charcoal	2.63×10^4	3.36×10^4	9.99×10^3
- without rice husk charcoal	1.96×10^4	15.1×10^3	10.21×10^4

Table 3 Isolation of arsenic resistant bacteria in the treatments of rice husk charcoal (1,000 kg/rai) and without rice husk charcoal in farmer's fields at Ubon Ratchathani and Nakhon Pathom provinces in 2017

Treatment	Number of arsenic resistant bacteria (CFU /g dry soil)													
	Concentration of arsenate (mM)							Concentration of arsenite (mM)						
	2	5	10	15	20	25	30	2	5	10	15	20	25	30
Ubon Ratchathani														
- rice husk charcoal	1.51×10^2	0	0	0	0	0	0	7.93×10^2	0	0	0	0	0	0
- without rice husk charcoal	12.58	0	0	0	0	0	0	19.43	0	0	0	0	0	0
Nakhon Pathom														
- rice husk charcoal	7.44×10^2	6.88×10^2	1.38×10^2	1.22×10^2	1.14×10^2	1.24×10^2	74.37	6.09×10^3	1.15×10^3	77.42	0	0	0	0
- without rice husk charcoal	2.16×10^3	4.81×10^3	9.19×10^2	10.11×10^2	10.26×10^2	1.22×10^2	88.99	4.32×10^4	5.74×10^3	6.83×10^2	0	0	0	0

เนื่องจากมีการดูดธาตุอาหารจากดินไปสะสมในต้นหญ้าเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Fu และคณะ (2011) พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของบาง fraction ของสารหนูในดินกับในต้นข้าว ด้วยวิธีการ sequential extraction ทั้งนี้โดยทั่วไปพืชจะสะสมสารหนูไว้ในส่วนรากมากกว่าต้น เนื่องจากส่วนรากสัมผัสและดูดซับสารโดยตรง (Pendergrass and Butcher, 2006) แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในเมล็ดข้าว พบว่า มีปริมาณลดลงในแปลงที่ใส่แกลบเผา เนื่องจากแกลบเผาอยู่ในรูปของ activated carbon มีรูพรุน พื้นที่ผิวในการดูดซับมีสูง ซึ่งมีสมบัติในการลดการปนเปื้อนของสารหนู (Agrafioti *et al.*, 2014) ดังนั้น การนำแกลบเผาไปใช้ในพื้นที่ของเกษตรกรต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องด้วย

4. การคัดแยกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและต้านทานสารหนูในดินที่ใช้ปลูกข้าว

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่า ที่จังหวัดอุบลราชธานี แปลงนาที่ใส่แกลบเผา พบแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จำนวน 3.80×10^2-1.14×10^3 CFU ต่อดินแห้ง 1 กรัม มากกว่ากรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา (18.17- 2.94×10^2 CFU ต่อดินแห้ง 1 กรัม) จังหวัดนครปฐม แปลงนาที่ใส่แกลบเผา พบแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน และแบคทีเรียละลายฟอสเฟต มีจำนวนมากกว่ากรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา แต่แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มีจำนวนน้อยกว่ากรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา โดยแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชพบในดินจังหวัดนครปฐม (ดินเหนียว) มากกว่าจังหวัดอุบลราชธานี (ดินร่วนเหนียวปนทราย) (Table 2) ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคดินเหนียว ช่วยเพิ่มการสะสมแหล่งสารอาหารของอินทรียวัตถุในดิน ซึ่งเป็นอาหารและที่อยู่ของจุลินทรีย์ดิน (Voroney, 2007)

อนึ่ง จากงานวิจัยมีรายงานว่า การใส่แกลบเผาช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์กับพืชในดิน เนื่องจากคุณสมบัติของแกลบเผา มีโครงสร้างที่มีรูพรุน พื้นที่ผิว และความชื้นสูง ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Ogawa, 1994) และเพิ่มความหลากหลายของกลุ่มประชากรและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน (Steiner *et al.*, 2008) โดยแบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต ช่วยเพิ่มปริมาณธาตุอาหารให้กับพืช และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสช่วยในการย่อยสลายอินทรียวัตถุในดิน

4.2 การทดสอบการต้านทานสารหนูของแบคทีเรีย ที่จังหวัดอุบลราชธานี แปลงที่ใส่แกลบเผา พบแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูอาร์ซิเนตและอาร์ซิไนต์ จำนวน 1.51×10^2 และ 7.93×10^2 CFU ต่อดินแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ มากกว่ากรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา (จำนวน 12.58 และ 19.43 CFU ต่อดินแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ) โดยแบคทีเรียมีการต้านทานสารหนูอาร์ซิเนตและอาร์ซิไนต์ ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ส่วนที่จังหวัดนครปฐม พบว่า แบคทีเรียมีการต้านทานสารหนูอาร์ซิเนต ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ และอาร์ซิไนต์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยแปลงที่ใส่แกลบเผา พบแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนูอาร์ซิเนตและอาร์ซิไนต์จำนวนน้อยกว่ากรรมวิธีไม่ใส่แกลบเผา (Table 3) ทั้งนี้อาจเนื่องจากสมบัติของดินแตกต่างกัน เช่น เนื้อดิน ปริมาณสารหนูในดิน เป็นต้น ทำให้การสะสมปริมาณสารหนูเริ่มต้นแตกต่างกัน ความสามารถในการต้านทานจึงแตกต่างกัน โดยพบแบคทีเรียที่แยกได้จากแปลงนาจังหวัดนครปฐม (ดินเหนียว) มีความสามารถในการต้านทานสารหนูอาร์ซิเนตและอาร์ซิไนต์ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า และมีจำนวนมากกว่าแปลงนาจังหวัดอุบลราชธานี (ดินร่วนเหนียวปนทราย) อาจเนื่องมาจากปริมาณอินทรียวัตถุในดินเหนียวมีมากกว่าดินร่วนปนทราย และปริมาณสารหนูเริ่มต้นที่มากกว่า สอดคล้องกับรายงานของ Bachate และคณะ (2009)

สรุปผลการทดลอง

การทดลองใส่แกลบเผาอัตรา 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ในแปลงนาที่อยู่ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารหนู เปรียบเทียบกับแปลงที่ไม่ใส่แกลบเผา พบว่า การใส่แกลบเผาทำให้ปริมาณสารหนูในดินและในต้นข้าวลดลง (ยกเว้นส่วนราก) โดยเฉพาะในเมล็ดข้าว กรรมวิธีใส่แกลบเผาพบปริมาณสารหนูลดลงร้อยละ 6-23 เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่ใส่แกลบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของการปนเปื้อน และสมบัติของดินนานั้น สำหรับจำนวนแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่า การใส่แกลบเผาในดินร่วนปนทรายและดินเหนียว มีจำนวนแบคทีเรียดังกล่าว

มากกว่าการไม่ใส่แกลบเผา ส่วนจำนวนแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนู พบว่า การใส่แกลบเผาในแปลงนาดินร่วนเหนียวปนทราย พบจำนวนแบคทีเรียที่ต้านทานสารหนู ในรูปของอาร์ซิเนตและอาร์ซิไนต์ ที่ความเข้มข้นสูงสุดระดับ 2 มิลลิโมลาร์ และการใส่แกลบเผาในแปลงนาดินเหนียว พบจำนวนแบคทีเรียต้านทานสารหนูในรูปของ อาร์ซิเนต ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ระดับ 30 มิลลิโมลาร์ และในรูปอาร์ซิไนตที่ระดับ 10 มิลลิโมลาร์ อนึ่ง แบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถนำไปศึกษาต่อ เพื่อเป็นแนวทางในการใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเติบโตของพืช และขจัดสารหนูให้อยู่ในรูปที่เป็นพิษลดน้อยลง โดยเฉพาะในพื้นที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารหนูในดินนาปลูกข้าวเพื่อให้ผลผลิตข้าวไทยสามารถแข่งขันด้านคุณภาพและความปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ที่สนับสนุนทุนวิจัย และสำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน ที่ช่วยอนุเคราะห์การวิเคราะห์สารหนู

เอกสารอ้างอิง

พัชราภรณ์ รักชุม, นภัสสร โน๊ตศิริ, ชิษณุชา บุดดาบุญ และ อรทัย ศุกรียพงศ์. 2561. การจัดการผลิตข้าวที่เหมาะสมเพื่อลดการสะสมของสารหนูในข้าว. หน้า 31-40. *ใน*: การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ครั้งที่ 35 พ.ศ. 2561. 26-28 มิถุนายน 2561. โรงแรมแซนด์ดูนส์ เจ้าหลาว บีช รีสอร์ท, จังหวัดจันทบุรี.

ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. 2545. ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุมลธา หนูคาบแก้ว และจุฑามาศ สัตยวิวัฒน์. 2555. การควบคุมคุณภาพข้าวเพื่อการส่งออกและความปลอดภัยของผู้บริโภค. สืบค้นจาก: http://www.cri.or.th/en/20120611_ricecontrol.php. (15 กุมภาพันธ์ 2562)

สำนักงานส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. 2555. สารหนูตกค้างในสินค้าข้าวและผลิตภัณฑ์. สืบค้นจาก: http://pcoc.moc.go.th/wappPCOC/65/upload/File_IPD_FILE65204997.pdf. (15 กุมภาพันธ์ 2562)

Agrafioti, E., D. Kalderis and E. Diamadopoulos. 2014. Arsenic and chromium removal from water using biochars derived from rice husk, organic solid wastes and sewage sludge. J. Environ. Manage. 133: 309-314.

Amacher, M.C. 1996. Nickel, cadmium and lead. pp. 739-768. *In*: D.L. Spark, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Takatabai, C.T. Johnson and M.E. Summer (eds.). Method of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods. Soil Science Society of America Inc., Wisconsin, WI.

Awasthi, S., R. Chauhan, S. Dwivedi, S. Srivastava, S. Srivastava and R.D. Tripathi. 2018. A consortium of alga (*Chlorella vulgaris*) and bacterium (*Pseudomonas putida*) for amelioration of arsenic toxicity in rice: a promising and feasible approach. Environ. Exp. Bot. 150: 115–126.

Awasthi, S., R. Chauhan, S. Srivastava and R.D. Tripathi. 2017. The journey of arsenic from soil to grain in rice. Front Plant Sci. 8: 1007.

Bachate, S. , L. Cavalca and V. Andreon. 2009. Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. J. Appl. Microbiol. 107: 145-156.

Cullen, W.R. and K.J. Reimer. 1989. Arsenic speciation in the environment. Chem. Rev. 89: 713-764.

Doronila, A.I., L.E. Maddox, S.M. Reichman, D.J. King, S.D. Kolev and I.E. Woodrow. 2014. Vegetation response of Australian native grass species redgrass (*Bothriochloa macra* (Steudel) S.T. Blake) and spider grass (*Enteropogon acicularis* (Lindl.) Lazarides) in saline and arsenic contaminated gold mine tailings: A glasshouse study. Miner. Eng. 56: 61-69.

Fu, Y., M. Chen, X. Bi, Y. He, L. Ren, W. Xiang, S. Qiao, S. Yan, Z. Li and Z. Ma. 2011. Occurrence of arsenic in brown rice and its relationship to soil properties from Hainan Island, China. Environ. Pollut. 159: 1757-1762.

Hesse, P. R. 1971. A Textbook of Soil Chemical Analysis. New York: Chemical Publishing Co. ING. 520 p.

Huang, Y.C. 1994. Arsenic Distribution in soil. *In*: J.O.

Nriagu (ed.), Arsenic in the Environment. Part I: Cycling and Characterization. Willey. pp. 17-49.

Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170: 265-270.

Ogawa, M. 1994. Tropical agriculture using charcoal. Farming Japan 28: 21–35.

Pendergrass, A. and D. J. Butcher. 2006. Uptake of lead and arsenic in food plants grown in contaminated soil from Barber Orchard. NC. J. Microchem. 83: 14-16.

Rezaitabar, S., A. Esmaili-Sari and N. Bahramifar. 2010. Potential health risk of total arsenic from consumption of farm rice (*Oryza sativa*) from the Southern Caspian Sea littoral and from imported rice in Iran. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 88: 614-616.

Steiner, C., C.D. Keshav, M. Garcia, B. Forster and W. Zech. 2008. Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. Pedobiol. 51: 359-356.

Voroney, R.P. 2007. The soil habitat. pp. 25-52. *In:* E.A. Paul (ed.). Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry, third ed. Academic Press, Burlington, MA.

Zarcinas, B.A., B. Cartwright and L.R. Spouncer. 1983. Nitric acid digestion and multielement analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. Comm. Soil Sci. Plant Anal. 18: 131-146.

Zucker, M. and L. Hankin. 1970. Regulation of pectate lyase synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia carotovora*. J. Bacteriol. 104:13-18.