

ผลของสาร EM ต่อการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

Effect of EM on Growth and Nitrogen Fixation Efficiency of Blue Green Algae

สมพร ชุณหลือชานนท์ บรรเทาญ แต่งกล้า และ จิรายุทธ ต้นวินกุล¹

Somporn Choonluchanon, Bunharn Tangcham, and Jirayuth Tunveenukul

ABSTRACT

Effective Microorganism or EM is widely distributed to the farmers with diversity application purposes. The experiment was conducted at Soil Microbiology Research Group, Division of Soil Science to obtain the effect of EM on the growth and nitrogen fixation efficiency of Blue Green Algae (BGA). Five species of BGA, *Nostoc sp.*, *Calothrix sp.*, *Tolypothrix sp.*, *A. siamensis* and *A. oryzae* were cultured in N-free nutrient solution (BG₁₁) containing EM at the concentration of 0, 150, 300 and 600 ppm, respectively. Dry biomass, ARA and chlorophyll content were estimated as growth and nitrogen fixing efficiency parameter of BGA. Results found that the growth and nitrogen fixation of BGA in EM solution at the concentrations of 150 and 300 ppm were better than control. The growth reduction was found at the concentration of EM upper than 300 ppm.

Key words : EM, blue green algae, nitrogen fixation

บทคัดย่อ

จากการที่สารละลาย EM กำลังถูกเผยแพร่เพื่อใช้ในการเกษตรและสิ่งแวดล้อมอย่างกว้างขวางในขณะนี้ จึงได้ทำการทดลองถึงผลกระทบต่อ การเจริญ

เติบโตและการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 5 ชนิด คือ *Nostoc sp.*, *Calothrix sp.*, *Tolypothrix sp.*, *Anabaena siamensis* และ *A. oryzae* ในสารละลาย BG₁₁ ที่มีสารละลาย EM เข้มข้น 3 ระดับ คือ 150, 300 และ 600

¹ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร

Soil Microbiology Research Group, Division of Soil Science, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand.

ppm. ผลการทดลองพบว่า สาร EM ในระดับ 150 และ 300 ppm. ช่วยให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นมากกว่าการเลี้ยงสาหร่ายโดยไม่ใส่สาร EM และการเจริญเติบโตจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EM สูงกว่า 600 ppm.

คำนำ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue Green Algae หรือ BGA) จัดอยู่ใน Division Cyanophyta โดยมี cyanobacteria อยู่เป็นจำนวนมาก มีทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและเป็น filament ในจำนวนนี้มีอยู่ไม่น้อยกว่า 100 strains ที่มีทั้งคลอโรฟิลล์และไนโตรจีเนสเอนไซม์ ทำให้มีความสามารถทั้งสังเคราะห์แสงและตรึงไนโตรเจนได้ (Steward et al., 1980) พวกที่ตรึงไนโตรเจนได้นั้น ส่วนใหญ่จะมีเซลล์พิเศษเรียกว่า heterocyst cell ต่ออยู่กับ vegetative cell ใน filament ของ BGA ซึ่งภายใน heterocyst มี nitrogenase enzyme เป็นตัวตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจน (Steward et al., 1980) ในพวกที่ไม่มี heterocyst จะตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพ anaerobic (Becking, 1979) ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของ BGA แตกต่างกันออกไปเช่นในช่วงฤดูปลูกข้าวของประเทศอินเดีย สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 2.24 กก.N/ไร่ ใน West Bengal ตรึงได้ 2.4-7.84 กก.N/ไร่ และในประเทศญี่ปุ่นตรึงได้ประมาณ 3.52 กก.N/ไร่ (Watanabe, 1962) และจากการทดลองใช้ BGA ในนาข้าวของ Roger and Kulasooriya (1980) ปรากฏว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สามารถเพิ่มผลผลิตได้ 14 % จะเห็นได้ว่า BGA สามารถตรึงไนโตรเจนได้ปีละหลายๆ ทำให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นเป็นอันมาก สารประกอบ ไนโตรเจนที่ถูกตรึงได้จะปลดปล่อยออกมาเป็นประโยชน์กับพืชเมื่อจุลินทรีย์ชนิดนี้ตาย

ลงทำให้พืชได้รับสารประกอบไนโตรเจนเสริมแทนปุ๋ยเคมีในการเจริญเติบโต ได้มีการศึกษาเพื่อหาทางนำเอา สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) ในหลาย ๆ ประเทศ (Venkataraman, 1977 ; Roger and Kulasooriya, 1980) และพบว่า การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีปัจจัยหลายอย่างเป็นสิ่งกำหนดโดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุอาหารต่างๆ ทั้งธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และธาตุอาหารเสริม

สาร EM ที่กำลังเผยแพร่เพื่อใช้ประโยชน์ในการเกษตรและสิ่งแวดล้อมอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน ซึ่งยังไม่ทราบส่วนประกอบที่แน่ชัด อาจจะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ จึงได้ทำการทดลองผลของสาร EM ต่อการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดต่าง ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสารละลาย EM ใช้ EM 1 มล. ผสมกับกากน้ำตาล 1 มล. ในน้ำกลั่น 1 ลิตร (มูลนิธิบำเพ็ญประโยชน์ด้วยกิจกรรมทางศาสนา, 2537)

การเตรียมสารละลาย N-free nutrient solution ที่ใช้เลี้ยง BGA ประกอบด้วย $MgSO_4$ 0.31 mM Na_2CO_3 0.19 mM $CaCl_2$ 0.24 mM Citric acid 0.03 mM $FeNH_4$ citrate 0.01 mM Na_2EDTA 0.03 mM K_2HPO_4 0.22 mM และ Micronutrient solution A 5

วิธีการทดลอง ทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้คัดเลือกสายพันธุ์ดีไว้แล้ว จำนวน 5 ชนิด คือ *Nostoc sp.*, *Calothrix sp.*, *Tolypothrix sp.*, *Anabaena siamensis* และ *A. oryzae* ใน flash ขนาด 250 ml ที่มี N-free nutrient solution อยู่ 100 ml. ใน solution ที่เลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแต่ละชนิด ใส่สารละลาย EM อัตรา 150, 300 และ 600 ppm.

ตามลำดับ เปรียบเทียบกับเลี้ยงใน solution ที่ไม่มีใส่ EM นำ acetylene ที่เลี้ยงสาหร่ายทั้งหมดวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 90 รอบต่อนาที ภายใต้แสงสว่างนาน 45 วัน นำสาหร่ายทั้งหมดมาศึกษาการเจริญเติบโตโดยหาน้ำหนักแห้ง วิเคราะห์คลอโรฟิลล์ และศึกษาการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี acetylene reduction assay

ผล

1. การเจริญเติบโต พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 5 ชนิด ในสารละลาย BG₁₁ ที่มีสารละลาย EM เข้มข้นต่างๆ กันนั้นลักษณะการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันในแต่ละชนิดของสาหร่าย(ตารางที่ 1 รูปที่ 1) ดังนี้คือ *Nostoc sp.*, *Calothrix sp.* และ *A. siamensis* จะให้น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EM และน้ำหนักแห้งจะเพิ่มสูงสุดเมื่อสารละลายที่ใช้เลี้ยงมี EM 300 ppm. การเจริญเติบโตของ *A. oryzae* พบว่าเมื่อเพิ่ม EM ถึง 150 ppm. ทำให้สาหร่ายมีน้ำหนักแห้งสูงสุด หลังจากนั้นการเจริญเติบโตจะลดลงและการเจริญเติบโตของ *Tolypothrix sp.* ในสารละลายที่มี EM 150 และ 300 ppm. ไม่แตกต่างกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EM ถึง 600 ppm. พบว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายจะลดลง แต่ก็ยังสูงกว่าเลี้ยงสาหร่ายโดยไม่ใส่ EM จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 5 ชนิด ในแต่ละระดับความเข้มข้นของ EM พบว่าสาหร่ายมีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นที่ความเข้มข้น 300 ppm. *A. oryzae* เจริญเติบโตน้อยกว่าสาหร่ายอีก 4 ชนิด

2. อัตราการตรึงไนโตรเจน ผลการทดลองจากตารางที่ 2 และรูปที่ 2 พบว่าการตรึงไนโตรเจนของ *Tolypothrix sp.* และ *A. siamensis* เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อสารละลายที่ใช้เลี้ยงมี EM อยู่ 150 ppm. หลัง

จากนั้นอัตราการตรึงไนโตรเจนจะลดลงส่วน *A. oryzae* และ *Calothrix sp.* มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงสุดเมื่อมี EM 300 ppm. แต่การตรึงไนโตรเจนของ *Nostoc sp.* จะลดลงเมื่อใส่ EM เพิ่มขึ้นทุกระดับความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรึงไนโตรเจนในสาหร่ายทุกชนิดที่ใช้ทดลองพบว่าเมื่อมี EM เข้มข้นมากขึ้น *A. oryzae* สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่นๆ การที่สาหร่ายบางชนิดเช่น *Nostoc sp.* มีอัตราการตรึงไนโตรเจนลดลง แต่การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงในสารละลายที่มี EM เพิ่มขึ้น อาจจะเป็นเพราะว่า *Nostoc* สามารถดูดซึมสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในสารละลาย EM มาใช้ในการเจริญเติบโตได้

3. ปริมาณคลอโรฟิลล์ ผลการทดลองจาก table 3 และ Figure 3 พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นไปในทำนองเดียวกันกับน้ำหนักแห้งกล่าวคือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกชนิดจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเมื่อใส่ EM ในปริมาณ 150 และ 300 ppm. โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มี EM 150 ppm. มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายทุกชนิดในระดับความเข้มข้นของ EM เดียวกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากที่ระดับความเข้มข้น 300 ppm. *A. oryzae* และ *Calothrix sp.* มีปริมาณคลอโรฟิลล์น้อยกว่าสาหร่ายอีก 3 ชนิด ที่เหลือจากการที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการเจริญเติบโต การตรึงไนโตรเจนและปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงเมื่อเพิ่มสาร EM สูงขึ้นเกินกว่า 150 ppm. อาจจะเป็นเพราะว่าในอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย เมื่อใช้ EM มากขึ้นจะมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น ซึ่งจะทำให้แสงที่สาหร่ายจะใช้ในการสังเคราะห์แสงลดลง จึงทำให้สาหร่าย มีการเจริญเติบโตลดลง

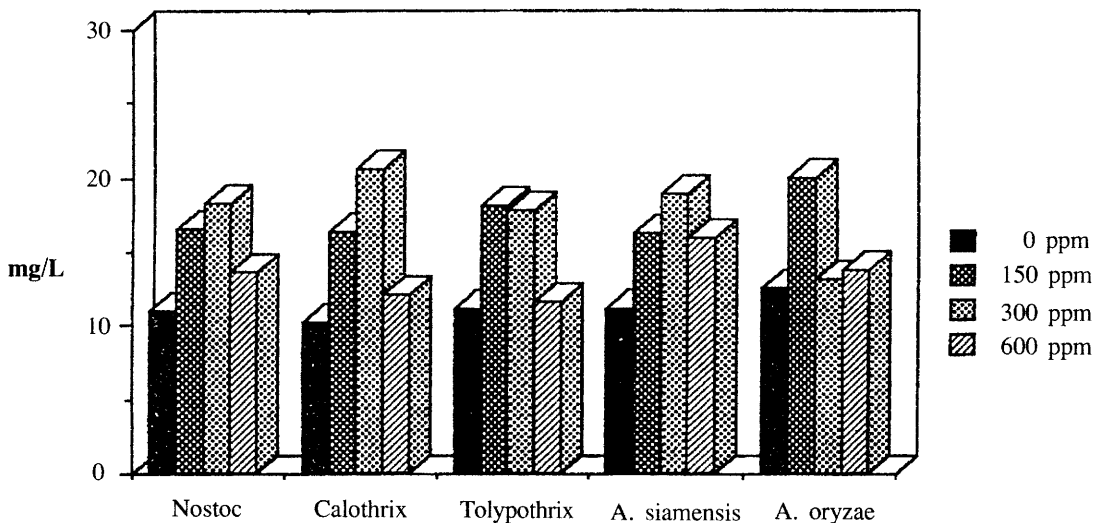
Table 1 Dry biomass production (mg/L) of BGA as affected by EM at different concentrations.

Treatment	ppm			
	0	150	300	600
<i>Nostoc sp.</i>	109.13	165.80	182.67	136.00
<i>Calothrix sp.</i>	102.00	163.53	206.00	120.20
<i>Tolypothrix sp.</i>	110.67	180.87	177.80	116.20
<i>A. siamensis</i>	110.87	162.67	189.13	159.53
<i>A. oryzae</i>	125.80	199.13	131.53	138.00

LSD (5 %) = 42.07

LSD (1 %) = 56.33

CV % = 17.0

**Figure 1** Effect of EM concentrations on dry biomass of blue green algae.

สรุป

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าสาร EM ในระดับ 150 และ 300 ppm. ช่วยทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายเพิ่มขึ้น แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ EM

ให้สูงกว่านี้การเจริญเติบโตของสาหร่ายจะลดลง ดังนั้นในการใช้สาร EM ผสมในอาหารเลี้ยงสาหร่าย จึงไม่ควรใช้เกิน 300 ppm.

Table 2 Effect of EM at different concentrations on acetylene reduction activity (U mole C₂H₄/gdwt/h) of BGA.

Treatment	ppm			
	0	150	300	600
<i>Nostoc sp.</i>	3.43	1.50	2.08	0.77
<i>Calothrix sp.</i>	1.32	0.87	8.27	0.98
<i>Tolypothrix sp.</i>	6.08	9.78	4.93	2.28
<i>A. siamensis</i>	1.56	4.24	3.78	2.04
<i>A. oryzae</i>	3.12	8.47	15.32	6.02

LSD (5 %) = 7.72

LSD (1 %) = 10.34

CV % = 107.6

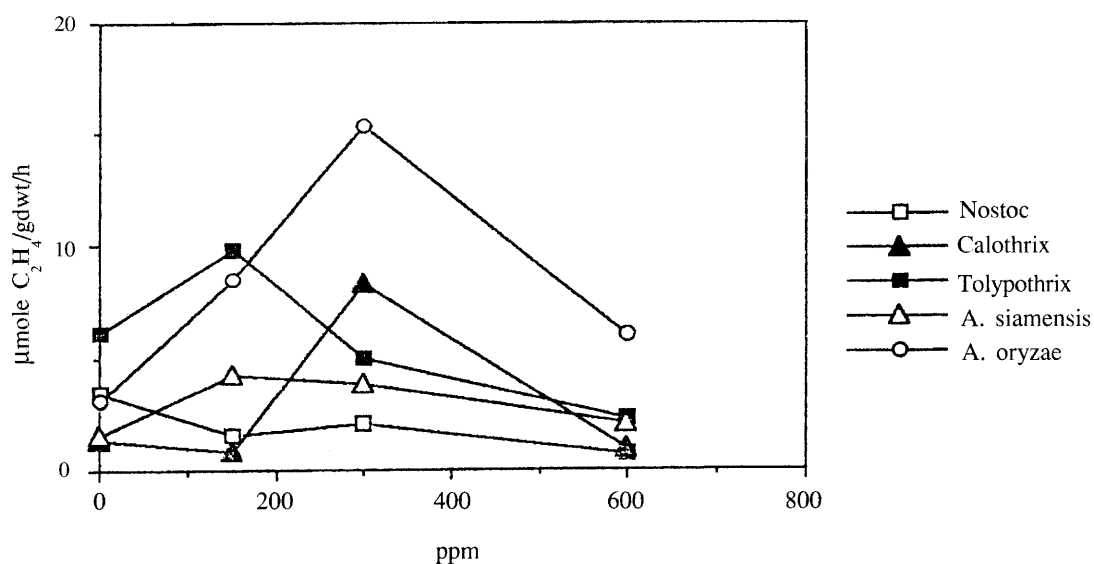


Figure 2 Effect of EM concentrations on nitrogen fixation of blue green algae.

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์ฝึกอบรมและเผยแพร่เกษตรกรรมชาติคิวเซ. 2537. การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์อีเอ็มจากธรรมชาติ เพื่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมในวันนี้, ซีรสารการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 37 น.

Becking, J.H. 1979. Environmental requirements of azolla for use in tropical rice production, pp. 354-373. In I. Watanabe (ed.) Nitrogen and Rice. International Rice Research Institute. Los Banos. Philippines.

Roger. P.A. and A. Kulasooriya. 1980. Blue Green

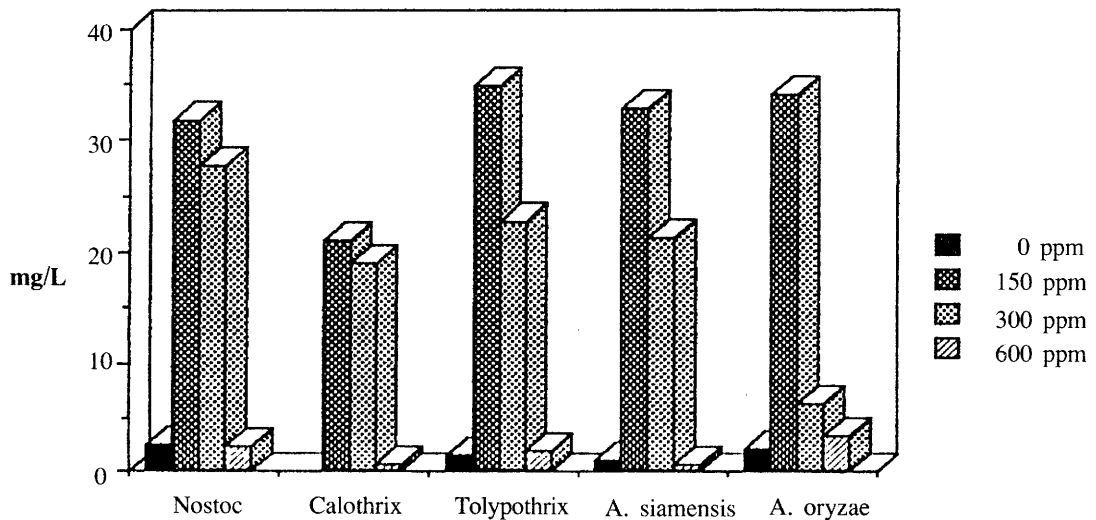
Table 3 Effect of EM at different concentrations on chlorophyll content (mg/L) of BGA

Treatment	ppm			
	0	150	300	600
<i>Nostoc sp.</i>	0.25 a	3.17 a	2.77 a	0.22 a
<i>Calothrix sp.</i>	0.01 a	2.11 a	1.89 ab	0.06 a
<i>Tolypothrix sp.</i>	0.15 a	3.49 a	2.26 a	0.18 a
<i>A. siamensis</i>	0.11 a	3.28 a	2.12 a	0.06 a
<i>A. oryzae</i>	0.20 a	3.41 a	0.61 b	0.32 a

LSD (5 %) = 0.61

LSD (1 %) = 0.82

CV % = 13.26

**Figure 3** Effect of EM concentrations on chlorophyll content of blue green algae.

Algae and Rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines. 112 p.

Steward, W.D.P., P. Rowell and N.A.Rai. 1980. Symbiotic nitrogen fixing cyanobacteria, pp. 239 - 277. In W.D.P. Stewart. and J.R. Gallon (eds.) Nitrogen Fixation. Academic Press, London.

Venkataraman, G.S. 1977. Blue green algae as a biological nitrogen input on rice cultivation, pp.

132 - 141 In S.P. Sen, Y.P. Abrol and S.K. Sinha (eds.) Nitrogen Assimilation and Crop Productivity. Proceedings National Symposium, Hissar, India.

Watanabe, A. 1963. Effect of nitrogen fixing blue green algae *tolypothrix tenius* on the nitrogenous fertility of paddy soil and on the crop yield of rice plant. J. Gen. Appl. Microbiol. 8 : 85 - 91.