

การมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อไรโซเบียมเมื่อใช้พีทผสมกับลิกไนต์เป็นตัวนำ

สมใจ ปฏิยุทธ วิทยา ธานานุสนธิ์
และสมศักดิ์ โคตรพงศ์*

Survival of Rhizobia in Various Ratios of Peat and Lignite

Somchai Patiyuth, Vithaya Thananusont,
and Somsak Kotepong*

บทคัดย่อ

ทำการทดลองใช้ลิกไนต์อัตราส่วนต่างๆ ผสมกับพีท 1 ส่วน เพื่อใช้เป็นตัวนำของเชื้อไรโซเบียม โดยใช้เชื้อไรโซเบียม 2 สายพันธุ์คือ USDA 110 และ THA-7 ผลการศึกษาพบว่าเชื้อไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์เพิ่มปริมาณเซลล์ได้สูงถึง 10^9 เซลล์ต่อกรัม ภายใน 1 สัปดาห์ สายพันธุ์ THA-7 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในลิกไนต์ และในลิกไนต์ผสมพีท ได้ดีกว่าสายพันธุ์ USDA 110 ปริมาณเซลล์ของสายพันธุ์ THA-7 ในทุกอัตราของสารผสมมีสูงถึง 10^9 เซลล์ต่อกรัม นานถึง 3 เดือน และลดลงถึง 10^8 เซลล์ที่ระยะสุดท้ายของการทดลอง

สายพันธุ์ THA-7 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในลิกไนต์ และในทุกอัตราของลิกไนต์ผสมพีท สำหรับ Strain USDA 110 เจริญเติบโตได้ดีในลิกไนต์ผสมพีท แต่ในลิกไนต์อย่างเดียว ปริมาณเซลล์ลดลงเร็วกว่าในสารผสมที่ระยะหลังของการทดลอง

Abstract

The experiment was conducted by mixing lignite and peat in various ratios then inoculated 20 ml of rhizobia strain USDA 110 and THA-7 in each 60 gram-bag of those autoclaved carriers. The viable numbers of rhizobial cells were counted at 1 hour, 1 week, 1, 2, 3, 4 and 6 months by plate count on yeast mannitol agar plus congo red.

The results showed that the viable cells of rhizobia in both strains increased up to 10^9 cells/g within one week. Rhizobia strain THA-7 could survive in lignite and mixed carriers better than rhizobia strain USDA 110. The viable cells of strain THA-7 in every ratio of lignite and peat maintained at 10^9 cells/g up to 3 months then decreased to 10^8 cells/g at the later stage of the experiment.

* กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

* Soil Science Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

Rhizobia strain THA – 7 could grow well in lignite and in every ratio of lignite mixed with peat. The rhizobia strain USDA 110 could also grow well in every ratio of lignite mixed with peat. In lignite alone the viable cells decreased faster than in mixed carriers at the later stage of this study.

คำหลัก : เชื้อไรโซเบียม ตัวนำของเชื้อไรโซเบียม พีท ลิกไนต์

Keywords : rhizobia, rhizobia carriers, peat, lignite

ลิกไนต์มีปริมาณอินทรีย์คาร์บอน (Organic – Carbon) ประมาณ 30% และยังมีธาตุอาหารหลักคือฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมในปริมาณมีใช้น้อย ซึ่งคุณสมบัตินี้คล้ายคลึงกับพีทที่ใช้เป็นตัวนำของเชื้อไรโซเบียม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในเรื่องราคา ลิกไนต์ถูกกว่า แต่ลิกไนต์มีข้อเสียเปรียบพีทประการหนึ่งก็คือมีความสามารถในการอุ้มน้ำไม่สูงนัก Paczkowski and Berryhill (1979) พบว่าถ่านหินที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำตั้งแต่ 48-92 มล./100 กรัม เมื่อนำมาใช้เป็นตัวนำของเชื้อไรโซเบียมปริมาณเซลล์ไรโซเบียมมีมากกว่า 10^7 เซลล์/กรัม ตลอดระยะเวลา 6 เดือนของการทดลอง และผลของการทดลองของ Kandasamy and Prasad (1971) ก็ให้คำรับรองว่าไรโซเบียมสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้ในลิกไนต์ สมใจ และคณะ (2529) พบว่าลิกไนต์สามารถนำมาใช้เป็นตัวนำของเชื้อไรโซเบียมได้แต่ต้องเก็บรักษาไว้ในห้องเย็น (10°C .) ทั้งนี้เพราะลิกไนต์สูญเสียความชื้นไปอย่างรวดเร็ว เป็นเหตุให้ไรโซเบียมลดปริมาณลงอย่างรวดเร็วด้วย

การนำตัวนำ 2 ชนิด คือ พีทและลิกไนต์มาผสมกัน ช่วยให้คุณสมบัติในการอุ้มน้ำของสารผสมสูงขึ้น และผลที่ตามมาก็คือไรโซเบียมอาจจะมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้นในตัวนำผสมนี้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อต้องการทราบการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อไรโซเบียมในลิกไนต์และลิกไนต์ผสมกับพีทที่ระยะเวลาต่าง ๆ และอัตราส่วนระหว่างลิกไนต์และพีทที่เหมาะสมเพื่อการเก็บรักษาเชื้อไรโซเบียมไว้ได้นาน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม โดยการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 110 และ THA-7 ในฟลัสอาหาร yeast mannitol broth นาน 4-5 วัน (ปริมาณเซลล์มีประมาณ 10^9 เซลล์/มล.)

การเตรียมพีทและลิกไนต์ โดยนำลิกไนต์และพีทบดละเอียด มาปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วยปูนแคลเซียมคาร์บอเนต แล้วจึงนำมาผสมกันตามอัตราส่วนที่กำหนด ซึ่งใส่ในถุงพลาสติกทนร้อนถุงละ 60 กรัม (ทำ 2 ถุงต่อ treatment) นำไปนึ่งในหม้อนึ่งนาน 1 ชั่วโมง 2 วันติดต่อกัน ผึ่งปากถุงเสร็จแล้วจึงใช้ไซริงค์ดูดเชื้อไรโซเบียมที่เตรียมไว้มาฉีดใส่ถุงตัวอย่างถุงละ 20 มล. เขย่าถุงให้เชื้อผสมกันดีกับตัวนำผสม บ่มถุงเชื้อไว้ในห้องอุณหภูมิ $25-30^{\circ}\text{C}$.

การนับปริมาณเซลล์ไรโซเบียม ทำการนับปริมาณไรโซเบียมที่ระยะต่าง ๆ ดังนี้คือที่ 0 7 30 60 120 และ 180 วัน โดยนำถุงเชื้อตัวอย่างมาทำ serial dilution แล้วใช้ 0.1 มล. ของ dilution ที่ 10^{-5} และ 10^{-6} มาหยดบนเพลท (plate) อาหาร YMA + CR แล้วเกลี่ยให้ทั่ว บ่มเพลทอาหารไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ $28-30^{\circ}\text{C}$. นาน 7-10 วัน เมื่อโคโลนี (Colony) ปรากฏบนเพลทอาหารจึงทำการนับปริมาณได้ (Vincent, 1970)

ผลการทดลอง

การมีชีวิตอยู่รอดของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 110 และ THA-7 ในลิกไนต์และลิกไนต์ผสมกับพีทได้แสดงไว้ (Tables 1 and 2)

คุณสมบัติในการอุ้มน้ำของลิกไนต์และพีทผสม พบว่าการผสมลิกไนต์กับพีททำให้เปอร์เซ็นต์การอุ้มน้ำของสารผสมดีกว่าลิกไนต์อย่างเดียว จะเห็นได้ว่าทุกระดับของลิกไนต์ที่ผสมมีเปอร์เซ็นต์การอุ้มน้ำสูงกว่าลิกไนต์ การใช้ลิกไนต์อัตราต่ำทำให้มีเปอร์เซ็นต์การอุ้มน้ำของสารผสมสูงกว่าการใช้ลิกไนต์อัตราสูง (Table 1)

Table 1. Properties of carriers.

Carrier (ratio)	Water holding capacity (%)	Organic - Carbon (%)
L	74.6	29.2
L _{0.5} + P ₁	105.2	27.2
L ₁ + P ₁	92.1	30.7
L _{1.5} + P ₁	85.9	32.7
L ₂ + P ₁	83.8	34.3

L = lignite, P = peat

0.5, 1, 1.5, 2 = ratio of lignite : peat

เชื้อไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์คือ THA-7 และ USDA 110 สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเซลล์ได้ดีในลิกไนต์และลิกไนต์ผสมกับพีททุกอัตรา (Tables 2 and 3) ตัวเลขแสดงให้เห็นชัดเจนว่าภายในเวลา 1 สัปดาห์ ไรโซเบียมสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์จาก 10^8 เซลล์/กรัม เป็น 10^9 เซลล์/กรัม ในทุกอัตราของตัวนำที่ใช้อยู่ในอัตราที่ใช้ลิกไนต์อย่างเดียว และเฉพาะสายพันธุ์ USDA 110 เท่านั้นที่ปริมาณเซลล์ไม่ถึง 10^9 เซลล์/กรัม

สายพันธุ์ THA-7 (Table 2) สามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตได้มากกว่า 10^9 เซลล์/กรัมในทุกตัวอย่างตัวนำที่ใช้ตลอดระยะเวลา 3 เดือนและปริมาณเซลล์ลดลงเล็กน้อยแต่ยังคงมีมากกว่า 10^8 เซลล์/กรัมที่ระยะ 4 เดือน เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในแผนการทดลองแบบ RCB

ทุกระยะของการทดลอง ปรากฏว่าเกือบทุกระยะค่าปริมาณเซลล์ที่นับได้ในทุกตัวรับมีค่าไม่แตกต่างกัน ยกเว้นที่ระยะ 1 สัปดาห์

การมีชีวิตอยู่รอดของไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 110 (Table 3) แตกต่างไปเพียงเล็กน้อยจากสายพันธุ์ THA-7 กล่าวคือในลิกไนต์อย่างเดียวเชื้อไรโซเบียมเจริญเติบโตและมีชีวิตอยู่รอดได้ไม่เท่าในตัวอย่างตัวนำอื่น ๆ นั่นคือปริมาณเซลล์มีมากกว่า 10^8 เซลล์/กรัม ที่ระยะ 1 สัปดาห์ 1 เดือน และ 2 เดือน ขณะที่ในตัวอย่างอื่น ๆ ปริมาณเซลล์มีมากกว่า 10^9 เซลล์/กรัม และที่ระยะ 3 และ 4 เดือน ปริมาณเซลล์ในลิกไนต์อย่างเดียวลดลงไปอีก ปริมาณเซลล์มีเหลือเพียง 10^7 เซลล์/กรัม ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในแผนการทดลองแบบ RCB ผลปรากฏว่าตัวรับของการทดลองมีความแตกต่างกันที่ระยะ 1 สัปดาห์ 1 เดือน และ 3 เดือน

วิจารณ์ผลการทดลอง

ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ มีชีวิตอยู่รอดในลิกไนต์และลิกไนต์ผสมพีทแตกต่างกันเล็กน้อย สายพันธุ์ THA-7 มีชีวิตอยู่รอดในลิกไนต์ได้ดีกว่าสายพันธุ์ USDA 110 ซึ่งผลครั้งนี้เป็นเช่นเดียวกับผลการทดลองของ สมใจ และคณะ (2529) แต่รายงานของ Paczkowski and Berryhill (1979) พบว่าการมีชีวิตอยู่รอดในถ่านหินของ *Rhizobium phaseoli* 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน และไรโซเบียมทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณเซลล์ลดลงในลิกไนต์ที่ระยะหลังของการทดลองทั้งนี้เป็นเพราะ pH ลดต่ำลงซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากการออกซิไดซ์ของแร่ เพื่อเป็นการพิสูจน์ในเรื่องนี้จึงได้วัด pH ที่ระยะสุดท้ายของการทดลอง ผลปรากฏว่า pH ไม่ได้ลดต่ำลงแต่อย่างใดเพราะว่าการทดลองในครั้งนี้ได้ปรับ pH ของลิกไนต์ด้วยปูนแคลเซียมคาร์บอเนตให้เป็น 6.5 ก่อนเริ่มรื้อยแล้ว ดังนั้นการที่ไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 110 มีปริมาณเซลล์ลดลงจึงเนื่องมาจากเหตุอื่น ที่เป็นไปได้ก็คือการเก็บรักษาเชื้อตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องนั้นทำให้ลิกไนต์สูญเสียความชื้นไปส่วนหนึ่ง และไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA 110 ไม่สามารถทนทานต่อการสูญเสียได้ (Bajpai et al., 1978)

การผสมลิกไนต์กับพีททำให้การอุ้มน้ำของสารผสมดีกว่าของลิกไนต์อย่างเดียว ซึ่งคุณสมบัตินี้สำคัญเพราะการอุ้มน้ำหรือเปอร์เซ็นต์ความชื้นนั้นมีอิทธิพลต่อการมีชีวิตอยู่รอดของ

Table 2. Viable cells of *Rhizobia* strain THA-7 in lignite and amended lignite.

Carrier	Viable cells (log ₁₀ per gram)						
	1 hr	1 wk	1 mo	2 mo	3 mo	4 mo	6 mo
L	8.40	9.57 b	9.52	9.33	9.13	8.49	8.39
L _{0.5} + P ₁	8.44	9.76 a	9.75	9.72	9.54	9.01	8.87
L ₁ + P ₁	8.36	9.77 a	9.73	9.71	9.41	8.94	8.92
L _{1.5} + P ₁	8.42	9.76 a	9.38	9.45	9.07	8.46	8.59
L ₂ + P ₁	8.47	9.67 ab	9.81	9.59	9.40	8.64	8.76
F - Value	1.85 ^{ns}	4.82*	1.24 ^{ns}	1.57 ^{ns}	< 1.0	1.92 ^{ns}	

ns = non - significant, * Significant at 5% level and means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT
L = Lignite, P = Peat

Table 3. Viable cells of *Rhizobia* strain USDA 110 in lignite and amended lignite.

Carrier	Viable cells (log ₁₀ per gram)						
	1 hr	1 wk	1 mo	2 mo	3 mo	4 mo	6 mo
L	8.55	8.71 b	8.63 b	8.68	7.85 b	7.73 b	7.57
L _{0.5} + P ₁	8.50	9.54 a	9.42 a	9.03	8.81 a	8.65 a	8.38
L ₁ + P ₁	8.52	9.53 a	9.44 a	9.08	8.41 ab	8.60 a	8.08
L _{1.5} + P ₁	8.46	9.65 a	9.36 a	9.08	8.71 a	8.39 ab	7.60
L ₂ + P ₁	8.53	9.65 ab	9.30 a	9.17	8.83 a	8.23 ab	7.90
F - Value	< 1.0	86.99**	29.78**	< 1.0	3.86*	2.45 ^{ns}	

na = non - significant, * significant at 5% and 1% (**) level and means followed by the same letter are not significantly different at the 5% (1% **) level by DMRT

L = lignite, P = peat

เชื้อไรโซเบียม และจากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการใช้ลิกไนต์ผสมกับพีทในอัตราส่วนลิกไนต์ 1 ส่วน พีท 2 ส่วน หรือ ลิกไนต์ 1 ส่วน พีท 1 ส่วน ทำให้เชื้อไรโซเบียมมีชีวิตอยู่รอดได้นานกว่าการใช้ลิกไนต์อย่างเดียว และเมื่อคิดในแง่ต้นทุนการผลิต การใช้ลิกไนต์ 1 ส่วน พีท 1 ส่วน จะมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่า ดังนั้นถ้าราคาพีทสูงขึ้นกว่าราคาปัจจุบัน (กิโลกรัมละ 10 บาท) จึงควรใช้ลิกไนต์ซึ่งราคาต่ำกว่าพีท (กิโลกรัมละ 5 บาท) มาผสมกับพีทในอัตรา 1 : 1 เพื่อลดต้นทุนการผลิตเชื้อไรโซเบียม

สรุปผลการทดลอง

เมื่อใช้ลิกไนต์ผสมกับพีทในอัตราส่วน 1 : 1 ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำสูงกว่าเมื่อใช้ลิกไนต์อย่างเดียว คุณสมบัตินี้ช่วยให้เชื้อไรโซเบียมเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณเซลล์ได้สูงและยังคงมีปริมาณเซลล์สูงถึง 10⁸ เซลล์/กรัม จนถึงระยะ 6 เดือน และการใช้ลิกไนต์มาผสมกับพีท ทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าการใช้พีทเพียงอย่างเดียว

เอกสารอ้างอิง

- สมใจ ปฏิยุทธ์, วิทยา ชนานุสนธิ์, สมศักดิ์ โคตรพงศ์ และ เย็นใจ วสุวัต.
2529. เปรียบเทียบการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อไรโซเบียมในพืช
กับในลิกไนต์. รายงานผลการค้นคว้าวิจัย ประจำปี 2529 กลุ่มงาน
วิจัยจุลินทรีย์ดิน, กองปฐพีวิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- Bajpai, P.D., B.R. Gupta, and Bali Ram. 1978. Studies on survival
of *Rhizobium leguminosarum* in two carriers as affected by
moisture and temperature conditions. *Indian J. Agric. Res.*
12 : 39–43.
- Kandasamy, R., and N.N. Prasad. 1971. Lignite as a carrier of
Rhizobia. *Curr. Science* 40 : 496.
- Paczkowski, M.W., and D.L. Berryhill. 1979. Survival of *Rhizobium*
phaseoli in Coal – Based Legume Inoculants. *Appl. and Environ.*
Microbiol. 612–615.
- Vincent, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root – Nodule
Bacteria. IBP. Handbook No. 15. Blackwell Scientific
Publication, Oxford. 164 p.