TH000030

การเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในกากตะกอนและวัสดุเหลือใช้เพื่อผลิตปุ๋ยชีวภาพ

อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์ และ ศรัณยา เปียแดง*
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
*ฝ่ายนิเวศวิทยารังสี กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhizobium japonicum* THA-7 ในสารพาหะตำหรับต่างๆคือดินพีท (Peat) กากตะกอน (Sludge) และกากตะกอนกรองจากโรงงานน้ำตาล (Filter press cake) และส่วนผสมของกากตะกอนและกากตะกอนกรองจากโรงงานน้ำตาล สารพาหะเหล่านี้ได้ผ่านการฉายรังสีแกมมา เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ระดับรังสี 55 กิโลเกรย์มาแล้ว จากการผสมเชื้อไรโซเบียมที่เลี้ยงในอาหารเหลว Mannitol Yeast Extract และเจริญอยู่ในช่วงปลาย Log phase ลงในสารพาหะตำหรับต่างๆจนมีค่าความชื้นประมาณ 50 เปอร์เซนต์ มีเชื้อไรโซเบียมอยู่ในระดับ 10^7 เซลล์ต่อกรัมของสารพาหะ เชื้อเพิ่มปริมาณเซลล์ได้สูงถึง 10^9 เซลล์ต่อกรัม เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ ~30^o เซลเซียสเป็นเวลา 17 วัน เมื่อนำเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4^o-5^o เซลเซียส ไว้เป็นเวลา 120 วัน เชื้อไรโซเบียมในสารพาหะทุกตำหรับยังคงมีปริมาณสูงถึง 10^8 เซลล์ต่อกรัม และมีปริมาณสูงสุดในสารพาหะผสมระหว่างกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย และกากตะกอนหม้อกรองจากโรงงานน้ำตาลในอัตราส่วน 1 : 3 ซึ่งน่าจะใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ดีกว่าสารพาหะอื่น

The Cultivation of Rhizobial cells in Sewage Sludge and Waste for the Production of Biological Fertilizer

Aporn Wongwicharn and Sarunya Piadang*.

Department of Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Thonburi.

*Radiation Ecology Section, Biological Science Division, Office of Atomic Energy for Peace.

Abstract

The study on the growth of *Rhizobium japonicum* THA-7 in carriers: Peat Sludge, Filter press cake from sugar industry and the mixer components of Sludge and Filter press cake . These carriers were sterilized by Gamma radiation at 55 Kilograys. Then rhizobium suspension which grew to late log phase in Mannitol Yeast Extract broth were transfer to carriers. The initial rhizobial cells were 10^7 cfu at 50 percent moisture content. The maximum growth (10^9 cfu) was found after incubation at 30^o C for 17 days in all carriers. The rhizobial cells were stored in carriers at 4^o - 5^o C for 120 days. The amount of cells in all carriers were detected at 10^8 cfu. Maximum surviral rate was in the mixture of sludge and filter press cake at the ratio of 1 : 3. Therefore, It should be used as biological fertilizer better than other carriers.

1. บทนำ

พืชตระกูลถั่วเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ โดยเฉพาะถั่วเหลืองซึ่งผลิตได้ไม่เพียงพอกับความต้องการภายในประเทศ ผลผลิตต่อไร่ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่สูงนักคือ 206 กก.ต่อไร่ [1] ในการเพิ่มผลผลิตต่อไร่นั้นนอกจากการปรับปรุงพันธุ์ การปฏิบัติการทางเขตกรรมที่เหมาะสม เช่น การไถพรวน การกำจัดวัชพืชต่าง ๆ ตลอดจนการใส่ปุ๋ยแล้ว การคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยเชื้อไรโซเบียม (*Rhizobium sp*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถอาศัยและสร้างปมในรากของพืชตระกูลถั่วแล้วยังสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศ และเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบไนโตรเจนในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ [9,10]

เชื้อไรโซเบียมปริมาณมากที่เลี้ยงได้ เมื่อยังไม่ได้ใช้คลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วหรือใส่ลงในดินทันทีหรือขนส่งจำหน่ายจ่ายแจกให้เกษตรกร ต้องใช้วลาพอสมควรหลังการเลี้ยงหรือการผลิต จำเป็นต้องเก็บรักษาไว้ในที่เหมาะสม เช่น เก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิดในที่อุณหภูมิต่ำหรือเก็บในวัสดุเสริมเพื่อให้เชื้อไรโซเบียมมีชีวิตอยู่รอดได้มากที่สุด อาจเรียกวัสดุเสริมนี้ว่าสารพาหะ นอกจากนี้ไรโซเบียมยังสามารถเจริญเพิ่มปริมาณขึ้นในสารพาหะที่ดีบางอย่างได้อีกด้วย

สารพาหะที่ดี[9] ควรมีลักษณะเป็นผงประกอบด้วยสารอินทรีย์อยู่ในปริมาณสูง ไม่เป็นพิษต่อเชื้อไรโซเบียม กำจัดเชื้อปนเปื้อนได้ง่าย เกาะติดเมล็ดพันธุ์ได้ดีหาง่าย ราคาถูก ผงเชื้อที่ได้จะมีประสิทธิภาพเพียงใดนั้น นอกจากจะขึ้นกับเชื้อไรโซเบียมและสารพาหะแล้วยังมีปัจจัยบางอย่างมาเกี่ยวข้องเช่น การปนเปื้อน (Contamination) ของจุลินทรีย์ชนิดอื่น อุณหภูมิและความชื้นในระหว่างการเก็บรักษาเชื้อเป็นต้น ซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดของไรโซเบียมในสารพาหะเป็นอย่างมาก การผลิตเชื้อผงในระดับอุตสาหกรรมจะต้องคำนึงถึงความสามารถในการผลิตและง่ายต่อการที่เกษตรกรจะนำไปใช้ด้วย

การผลิตเชื้อผงสำเร็จรูปของประเทศไทยในปัจจุบันใช้ดินพีท (Peat) ซึ่งเป็นสารพาหะ ดินพีทเป็นดินที่มีลักษณะอุ้มน้ำได้ดี มีอินทรีย์วัตถุสูง นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุ ตลอดจน Growth factor ซึ่งช่วยให้ไรโซเบียมเจริญและมีชีวิตรอดได้ดี เนื่องจากดินพีทมีราคาแพงจึงได้มีการนำวัสดุอื่นที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับดินพีทและมีอินทรีย์วัตถุตั้งแต่ 20 เปอร์เซนต์ขึ้นไปมาทดแทน เช่น ดินผสมปุ๋ยอินทรีย์ ดินผสมถ่านหิน เซลลูโลส หรือ กากตะกอนหม้อกรองจากโรงงานน้ำตาล (Filter press cake)[16] เป็นต้น วัสดุเหล่านี้มีอยู่มากในประเทศไทยและยังไม่ได้นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างเต็มที่และคุ้มค่า โดยเฉพาะกากตะกอนหม้อกรองจากโรงงานน้ำตาล ซึ่งในแต่ละปีประเทศไทยมีกากของเหลือใช้ส่วนนี้สูงถึง 1.0 - 1.5 ล้านตันต่อปี[2]

วัสดุอีกอย่างหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้เป็นวัสดุเสริม หรือใช้เป็นสารพาหะของเชื้อไรโซเบียมคือ กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร บ้านเรือน และโรงพยาบาล ซึ่งมีมีปัญหาในการบำบัดและมีผลต่อสภาพแวดล้อมในปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตามกากตะกอนเหล่านี้ยังมีคุณค่า ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ รวมทั้งสารปริมาณน้อย(Minor element) อยู่ในปริมาณสูง[14] เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดและเป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโดยการนำมาใช้ประโยชน์ให้กว้างขวางมากขึ้น จึงน่าสนใจนำไปใช้เป็นวัสดุเสริมเก็บเชื้อไรโซเบียมร่วมกับสารพาหะอย่างอื่น เช่น กากตะกอนหม้อกรองจากโรงงานน้ำตาล แต่เนื่องด้วยกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียมีเชื้อโรคและพยาธิปนเปื้อนเป็นจำนวนมาก มีรายงานว่ากากตะกอนจากทั้ง 3 แหล่งดังกล่าวจำนวน 135 ตัวอย่างมีเชื้อซัลโมเนลลาถึง 72.59 %[15] และในจำนวนตัวอย่าง 162 ตัวอย่างตรวจพบพยาธิ 55.55 %[6] จึงจำเป็นต้องฆ่าเชื้อโรคและพยาธิเหล่านี้ก่อนการนำไปใช้ประโยชน์ วิธีที่น่าสนใจคือ การฆ่าเชื้อในวัสดุเหล่านี้ด้วยการฉายรังสีเพื่อลดปริมาณเชื้อปนเปื้อน ซึ่งน่าจะเป็นวิธีการที่สะดวกในการผลิตผงเชื้อไรโซเบียมในระดับอุตสาหกรรม

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1. เชื้อจุลินทรีย์ *Rhizobium japomicum* THA-7 ได้รับการอนุเคราะห์จากกลุ่มงานจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร

2.2. สารพาหะ ทั้งหมดมี 6 ตำหรับคือ

ตำหรับที่ 1 Peat

ตำหรับที่ 2 Sludge

ตำหรับที่ 3 Filter press cake

ตำหรับที่ 4 Sludge : Filter press cake ในอัตราส่วน 1:1

ตำหรับที่ 5 Sludge : Filter Press Cake ในอัตราส่วน 1:3

ตำหรับที่ 6 Sludge : Filter press cake ในอัตราส่วน 1:9

Sludge = กากตะกอนจากอุตสาหกรรมเบียร์

Filter press cake = กากตะกอนหม้อกรองจากโรงงานน้ำตาล

วิธีการเตรียมสารพาหะมีดังนี้

Sludge ที่ได้จากโรงงานนำมาตาก บดให้ละเอียดแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 10 มิลลิเมตร Filter press cake บดให้ละเอียดแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 10 มิลลิเมตรก่อนนำไปใช้

สารพาหะแต่ละตำรับ นำมาหาค่าความชื้นด้วยวิธีการอบที่อุณหภูมิ 85°ซ. จนน้ำหนักคงที่ และวัดความเป็นกรดด่าง(pH) ด้วย pH meter

2.3. การฉายรังสีเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนในสารพาหะ

บรรจุสารพาหะแต่ละตำหรับ ตำหรับละ 10 กรัมลงในขวดขนาด 4 x 7 cm. และนำไปฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 0, 20, 30, 40, 50, 55 และ 60 กิโลเกรย์ เพื่อหาระดับรังสีที่ทำลายเชื้อปนเปื้อนได้หมด โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมาแบบ Carrier Type Model JS-8900 ที่ศูนย์ฉายรังสีอาหารและผลผลิตทางการเกษตร ของสำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ มีความแรงรังสีเมื่อวันที่ 1 เมษายน 2536 เท่ากับ 249,329.987 คูรี

2.4. การศึกษาการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารเหลว

เขี่ยเชื้อ *Rhizobium japonicum* THA-7 ซึ่งได้เลี้ยงไว้บนอาหารวุ้นเอียง Mannital Yeast Extract (MYE) ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดความขุ่น (Optical density) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร จนได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.2 ใช้เชื้อที่ความเข้มข้นนี้เป็นเชื้อเริ่มต้น (Inoculum) ในปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ ลงเลี้ยงในอาหารเหลว MYE และนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วเท่าเดิม เก็บตัวอย่างเชื้อไรโซเบียมมาวัดค่า O.D และตรวจนับจำนวนเชื้อไรโซเบียมทั้งหมด (Direct count) ด้วย Haemacytometer และหาจำนวนเซลที่มีชีวิต (Viable count) ด้วยวิธีการ Spread plate บนอาหาร Mannital Yeast Extract Congo Red Agar

2.5. การศึกษาการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะที่ผ่านการฉายรังสี

บรรจุสารพาหะแต่ละตำหรับลงในถุงพลาสติก (Polyethylene) สำหรับฉายรังสีถุงละ 10 กรัม และนำไปฉายรังสีแกมมาในระดับที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้หมด จากนั้นนำเชื้อไรโซเบียมที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว MYE จนเชื้อเจริญอยู่ในช่วงปลาย Log phase มาคลุกผสมกับสารพาหะที่เตรียมไว้ จนมีความชื้นประมาณ 50-51 เปอร์เซนต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (~30°ซ) แล้วสุ่มตัวอย่างมาตรวจหาเซลไรโซเบียมในสารพาหะแต่ละตำหรับ (หรือเรียกว่าเชื้อผง) เพื่อศึกษาหาระยะเวลาที่เชื้อเจริญเพิ่มปริมาณเซลสูงสุด

2.6. การศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะ

วิธีการโดยเตรียมสารพาหะและเชื้อไรโซเบียมเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 5 แต่เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนได้เวลาที่เชื้อได้ปริมาณเซลสูงสุด จากนั้นย้ายไปบ่มต่อในที่มีอุณหภูมิต่ำประมาณ 4-5°ซ. และสุ่มตัวอย่างเชื้อผงมาตรวจนับจำนวนไรโซเบียมที่มีชีวิตความชื้น และ pH ในวันแรก และเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 14 21 28 45 60 90 และ 120 วัน ตามลำดับ

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1. ผลการทดสอบคุณสมบัติของสารพาหะ

ผลการทดสอบหาความชื้นและความเป็นกรดด่างของสารพาหะทั้ง 6 ตำหรับ พบว่า ดินพีทมีความเป็นกรดสูงประมาณ 3.6 ส่วน Filter press cake มีสภาพเป็นกลางค่อนข้างไปทางด่างเล็กน้อย (7.70) สารพาหะตำหรับที่มีส่วนผสมของ Sludge และ Filter press cake มีสภาพเป็นกลางซึ่งมีค่า pH แตกต่างกันเล็กน้อยขึ้นกับอัตราส่วนในการผสม ดังแสดงใน Table 1. โรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาพ pH เป็นกลางประมาณ 6.5-7.5 [11] ซึ่งสารพาหะตำหรับที่ใช้ Filter press cake หรือ Sludge เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง และตำหรับที่มีส่วนผสมของ Filter press cake และ Sludge มีค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อไรโซเบียมอยู่แล้ว ส่วนดินพีทนั้นจำเป็นต้องปรับ pH ให้สูงขึ้นด้วย $CaCo_3$ เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของไรโซเบียม

ผลการวัดความชื้นของสารพาหะพบว่า Sludge มีความชื้นสูงสุดคือ 8.63 เปอร์เซนต์ ส่วนสารพาหะตำหรับอื่น ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน ผลดังแสดงใน Table 1. ค่าความชื้นมีผลต่อการเจริญและการเพิ่มปริมาณของเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะ [11]

Table 1. Shown moisture content and pH of carriers.

carriers	moisture content (%)	pH
1. Peat	7.35	3.60
2. Sludge	8.63	6.54
3. FC	6.78	7.70
4. S : FC = 1 : 1	6.78	6.77
5. S : FC = 1 : 3	7.12	6.83
6. S : FC = 1 : 9	7.13	7.25

FC = Filter press cake

S = Sludge

3.2. ผลการศึกษาหาระดับรังสีที่เหมาะสมที่ทำให้สารพาหะมีสภาพปลอดเชื้อ

สารพาหะที่ใช้มีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูงซึ่งจากการวิเคราะห์หาแบคทีเรียพบว่ามีอยู่ในปริมาณ 1.0×10^7 - 5.8×10^7 เซลล์ต่อกรัม มีเชื้อราอยู่ในปริมาณ 2.0×10^4 - 2.0×10^5 เซลล์ต่อกรัม ดินพีทมีแบคทีเรียและราอยู่ในปริมาณต่ำกว่า Filter press cake และ Sludge คือพบอยู่ในช่วง 10^4 เซลล์ต่อกรัม ผลดังแสดงใน Table 2 และ Table 3 ตามลำดับ

เพื่อทำลายจุลินทรีย์ในสารพาหะก่อนนำไปใช้ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อการเจริญและการมีชีวิตอยู่รอดของไรโซเบียมในสารพาหะ[9] จึงจำเป็นต้องทำลายจุลินทรีย์เหล่านี้ วิธีการฉายรังสีเป็นวิธีที่สะดวก มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพสูงสุดในการฆ่าเชื้อโรคหรือเชื้อจุลินทรีย์ การทดลองนี้จึงเลือกใช้การฉายรังสีแกมมา รังสีแกมมาเป็น Ionizing radiation ที่มีพลังงานสูงมีอำนาจทะลุทะลวงได้ดีสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทำลายเชื้อปนเปื้อนในวัตถุต่างๆที่มีความหนาได้ดี โดยที่รังสีไม่ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของวัตถุเปลี่ยนแปลง[12] ทั้งนี้เพราะรังสีไม่มีผลในการทำลายเซลโดยตรงแต่จะเป็นตัวชักนำให้โมเลกุลของน้ำแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ (H^+ ,OH^-) แล้วเกิดสารประกอบเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์อย่างรุนแรงและเป็นพิษกับจุลินทรีย์[8]

ผลการฉายรังสีแกมมาเพื่อหาระดับรังสีที่เหมาะสมที่จะทำให้สารพาหะทุกตำหรับมีสภาพปลอดเชื้อพบว่า ที่ระดับของรังสี 50 กิโลเกรย์ ทำให้สารพาหะทุกตำหรับปลอดเชื้อแบคทีเรีย (Table 2) และที่ระดับรังสี 55 กิโลเกรย์ ทำให้สารพาหะทุกตำหรับปลอดเชื้อรา (Table 3) ดังนั้นเพื่อทำให้สารพาหะอยู่ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ จึงเลือกการฉายรังสีที่ระดับ 55 กิโลเกรย์ ซึ่งเป็นระดับที่สูงเมื่อเทียบกับการฉายรังสีเพื่อทำลายเชื้อโรค มีรายงานว่ารังสีขนาด 3 กิโลเกรย์เพียงพอที่จะฆ่าเชื้อโรคในกากตะกอนได้[13]

3.3. ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในอาหารเหลว

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Rhizobium japonicum* THA-7 ในอาหารเหลว MYE โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีค่า OD = 0.2 (550 นาโนเมตร) ในปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ พบว่าเชื้อเจริญอยู่ในช่วง Lag phase อยู่ระยะเวลาหนึ่งและเจริญถึงช่วงปลาย Log phase เมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลาประมาณ 96 ชั่วโมง ดังแสดงใน figure 1. เชื้อ *Rhizobium japonicum* THA-7 เป็นไรโซเบียมสายพันธุ์ที่เจริญช้า (Slow grower) ซึ่งเจริญในอาหารเหลวจนถึงช่วงปลาย Log phase ต้องใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน[9] ปริมาณเชื้อสูงสุดประมาณ 2.6×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสมใจและสมศักดิ์[4] ซึ่งเชื้อที่เจริญอยู่ในระยะนี้มีความสมบูรณ์แข็งแรง[11] เหมาะสมที่จะนำไปผสมกับสารพาหะต่อไป

3.4. ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะ

ผลการศึกษาการเจริญของ *Rhizobium japonicum* THA-7 ในสารพาหะโดยเมื่อผสมเชื้อไรโซเบียมที่เจริญในอาหารเหลว MYE ในระยะปลาย Log phase ลงในสารพาหะตำหรับต่างๆจนมีค่าความชื้น 50 เปอร์เซนต์ และมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในสารพาหะประมาณ 10^7เซลล์ต่อกรัม หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ ~30° ซ. พบว่าเชื้อเจริญเพิ่มปริมาณในสารพาหะทุกตำหรับได้สูงสุดเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 17 วัน ทั้งนี้เพราะเป็นไรโซเบียมสายพันธุ์ที่เจริญช้า[9] เชื้อไรโซเบียมเจริญในสารพาหะตำหรับที่ใช้ Filter press cake ได้ปริมาณเซลล์สูงเท่ากับ 2.2 x 10^9 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งใกล้เคียงกับดินพีทที่มีเซลล์อยู่ 1.8 x 10^9 เซลล์ต่อกรัม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ Filter press cake มีลักษณะร่วนซุยถ่ายเทอากาศได้ดีและเชื้อไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ[9] นอกจากนี้ Filter press cake ยังมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของไรโซเบียม และมีแร่ธาตุอาหารต่าง ๆ ที่ไรโซเบียมต้องการคือ มีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซยม แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส คอปเปอร์และอื่นๆ[7,16] เซลล์ไรโซเบียมเพิ่มปริมาณได้ต่ำสุด คือ 1.0 x 10^9 เซลล์ต่อกรัม ในสารพาหะที่ใช้ Sludge ทั้งนี้อาจเป็นเพราะลักษณะทางกายภาพของ Sludge อัดตัวกันค่อนข้างแน่น อากาศถ่ายเทได้ไม่ดีทั้งที่มีธาตุอาหารต่างๆที่ไรโซเบียมต้องการ[14] ปริมาณเซลล์ไรโซเบียมใน สารพาหะตำหรับอื่นๆมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 1.2 x 10^9 - 1.8 x 10^9 เซลล์ต่อกรัม แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเซลล์ไรโซเบียมในสารพาหะแต่ละตำหรับไม่แตกต่างกันมากนักดังแสดงใน figure 2. ซึ่งปริมาณเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะแต่ละตำหรับมีค่าสูงเทียบได้กับมาตรฐานของประเทศออสเตรเลีย[3] คือ 10^9 เซลล์ต่อกรัม

3.5. ผลการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะ

ผลการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Rhizobium japonicum* THA-7 ในสารพาหะหรือเชื้อผง หลังจากคลุกเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว MYE ในระยะปลาย Log phase ลงในสารพาหะแต่ละตำหรับจนได้ค่าความชื้น 50 เปอร์เซนต์และบ่มที่อุณหภูมิ ~30° ซ. เป็นเวลา 17 วัน เพื่อให้เชื้อไรโซเบียมเจริญเพิ่มจำนวนในสารพาหะได้สูงสุด เก็บตัวอย่างมาหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ตัวอย่างที่เหลือนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่ำ ~ 4°-5° ซ. เพื่อให้เชื้อไรโซเบียมมีชีวิตรอดได้สูงสุด[9] จากนั้นเก็บตัวอย่างมาตรวจนับหาเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 7, 14, 21, 28, 45, 60, 90, และ 120 วันตามลำดับ ผลดังแสดงใน figure 3. จากผลการทดลองพบว่าเชื้อโรโซเบียมที่บ่มในสารพาหะที่อุณหภูมิ ~ 30° ซ. เป็นเวลา 17 วัน เพิ่มปริมาณเซลสูงสุดถึงระดับ 10^9 เซลล์ต่อกรัม และหลังจากที่ได้ย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำปริมาณเชื้อในสารพาหะลดลงเล็กน้อย หลังจากที่เก็บไว้เป็นเวลา 28 วัน แต่เมื่อเก็บไว้เป็น

เวลา 45 วันเชื้อลดจำนวนลงประมาณ 1 log cycle จนอยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อกรัมและเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 120 วัน ปริมาณเซลล์ไรโซเบียมยังคงมีระดับ 10^8 เซลล์ต่อกรัมทุกตำหรับและปริมาณเซลล์ในแต่ละตำหรับไม่ต่างกันมากนักดังแสดงใน figure 3. ซึ่งเชื้อผงที่ได้มีปริมาณเทียบได้กับมาตรฐานเชื้อผงของประเทศออสเตรเลียคือ ที่ระดับ 10^8 เซลล์ต่อกรัมเมื่อถึงมือผู้จำหน่าย[3] และปริมาณเชื้อที่ยอมรับกันในหลายๆประเทศอยู่ในระดับ 10^7 เซลล์ต่อกรัม[9]

เนื่องจากผลการมีชีวิตรอดของเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะแต่ละตำหรับไม่แตกต่างกันมากนัน จึงได้แสดงค่าการมีชีวิตรอดของเชื้อไรโซเบียมในรูปของเปอร์เซนต์ความแตกต่างโดยเปรียบเทียบกับดินพีทซึ่งได้ใช้เป็นสารพาหะตำหรับควบคุม และเป็นสารพาหะที่นิยมใช้กันมากที่สุด[9] ดังแสดงใน Table 4. ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อไรโซเบียมเจริญและเพิ่มจำนวนใน Filter press cake ได้ใกล้เคียงกับดินพีทมากที่สุดโดยแตกต่างกันเพียง 3.1 เปอร์เซนต์เท่านั้น ส่วนในสารพาหะตำหรับอื่นๆนั้นเชื้อไรโซเบียมสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ไม่แตกต่างกันแต่ค่าที่ได้ต่ำกว่าในดินพีทและ Filter press cake

ผลการศึกษาความชื้นของเชื้อผงในช่วงแรกนั้นมีค่าใกล้เคียงกันซึ่งอยู่ในช่วง 50-51 เปอร์เซนต์และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำไว้เป็นเวลา 120 วัน ความชื้นลดลงอยู่ในระดับ 48-50 เปอร์เซนต์ ดังแสดงใน figure 4. ซึ่งสมศักดิ์[5] ได้รายงานไว้ว่าความชื้นที่เหมาะสมของสารพาหะอยู่ในช่วง 50 เปอร์เซนต์ แสดงว่าสารพาหะตำหรับต่าง ๆ ที่ศึกษามีความเหมาะสมในการเก็บเชื้อไรโซเบียม

ผลการศึกษาค่า pH ของเชื้อผง หลังจากที่ได้บ่มเชื้อไว้ในสารพาหะเป็นเวลา 17 วัน ค่า pH ของเชื้อผงแต่ละตำหรับแตกต่างกันอยู่ในช่วง 6.30 - 7.43 หลังจากได้ย้ายเชื้อผงไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำ pH ลดลงอยู่ในช่วงประมาณ 5.0 และเชื้อผงที่ใช้ Filter press cake เป็นสารพาหะยังคงมีค่า pH สูงกว่าสารพาหะตำหรับอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามที่ระดับ pH 3.3 เชื้อไรโซเบียมก็ยังคงมีชีวิตอยู่ได้[11] เชื้อ *Rhizobium japonicum* สายพันธุ์ที่ศึกษาเป็นสายพันธุ์ที่เจริญได้ช้าซึ่งจะสามารถทนสภาพความเป็นกรดได้ดี[9] และยืนยันได้จากจำนวนเซลล์ไรโซเบียมที่มีชีวิตรอดในสารพาหะแต่ละตำหรับที่ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงใน figure 5.

Table 2. Total bacterial count in carriers after irradiation at the doses of 0-60 kGy.

Dose (kGy) / carriers	Total bacterial count (cfu)						
	0	20	30	40	50	55	60
1. Peat	3.2×10^4	1.0×10^3	4.0×10^2	1.5×10	0	0	0
2. Sludge	5.8×10^7	6.0×10^5	1.1×10^4	1.9×10	0	0	0
3. FC	5.0×10^7	5.2×10^3	6.5×10^2	7.0×10	0	0	0
4. S:FC= 1:1	1.6×10^7	1.3×10^5	1.0×10^3	2.0×10	0	0	0
5. S:FC = 1:3	1.0×10^7	1.4×10^3	1.0×10^2	1.0×10	0	0	0
6 S:FC = 1.9	1.8×10^7	1.0×10^3	1.5×10^2	5.0×10	0	0	0

FC = Filter press cake

S = Sludge

Table 3. Total fungi count in carriers after irradiation at the doses of 0-60 kGy.

doses(kGy) / carriers	*Total fungi count (cfu)*						
	0	20	30	40	50	55	60
1. Peat	1.0×10^4	8.5×10^3	7.5×10^3	1.5×10^2	0	0	0
2. Sludge	2.0×10^4	1.1×10^3	1.0×10^3	2.0×10^2	5.0×10^2	0	0
3. FC	1.3×10^5	1.1×10^4	1.5×10^2	1.0×10^2	1.0×10	0	0
4. S:FC = 1:1	1.2×10^5	1.0×10^3	1.0×10^3	1.0×10^2	9.0×10	0	0
5. S:FC = 1:3	1.1×10^5	5.0×10^2	1.0×10^2	3.0×10^2	1.0×10	0	0
6. S:FC = 1.9	2.0×10^5	1.0×10^3	2.2×10^2	1.5×10^2	1.0×10	0	0

FC = Filter press cake

S = Sludge

Table 4. Percents and differences of survival fraction of *Rhizobium japonicum* THA-7 in carriers comparing to Peat kept for 120 days at 4^0 - 5^0 C.

Carriers	Survival fraction (cfu)	Percent (%)	Difference (%)
1. Peat	1.98×10^8	100	0
2. Sludge	1.30×10^8	65.6	-34.4
3. FC	1.92×10^8	96.9	-3.1
4. S:FC = 1:1	1.42×10^8	71.7	-28.3
5. S:FC = 1:3	2.30×10^8	116.1	+16.1
6. S:FC = 1:9	1.42×10^8	71.7	-28.3

FC = Filter press cake

S = Sludge

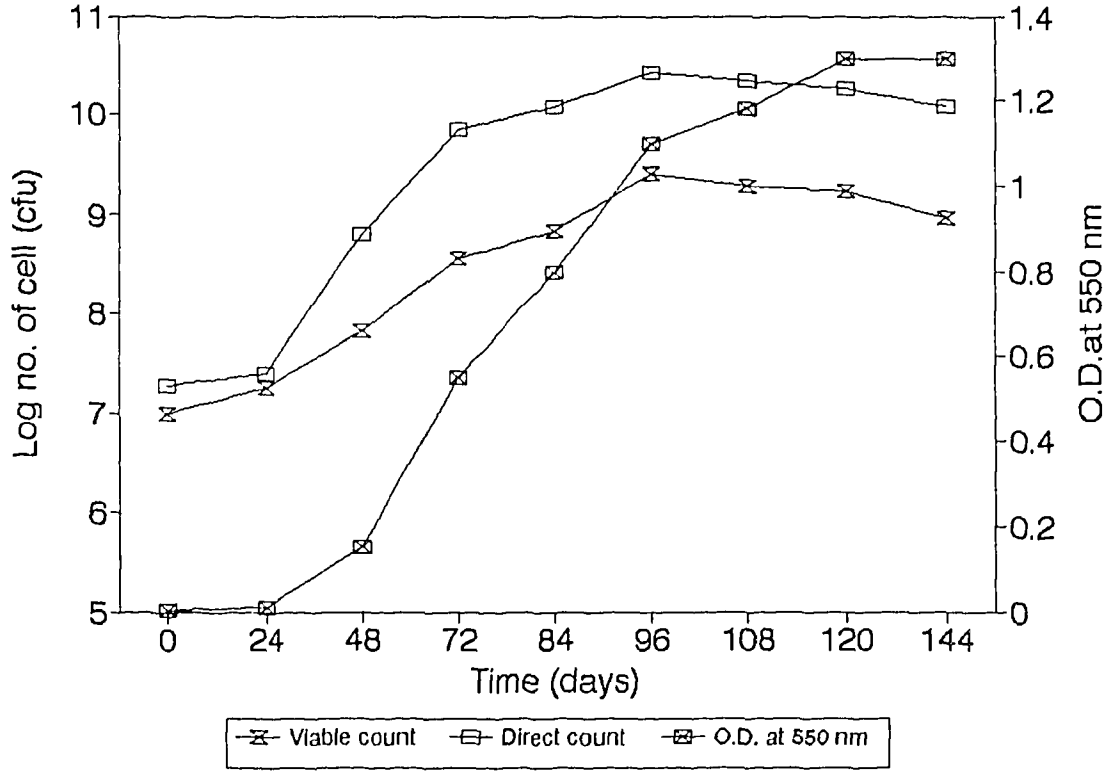

Figure 1 Growth of Rhizobium japonicum THA-7 in Mannitol Yeast Extract Broth at 30 C

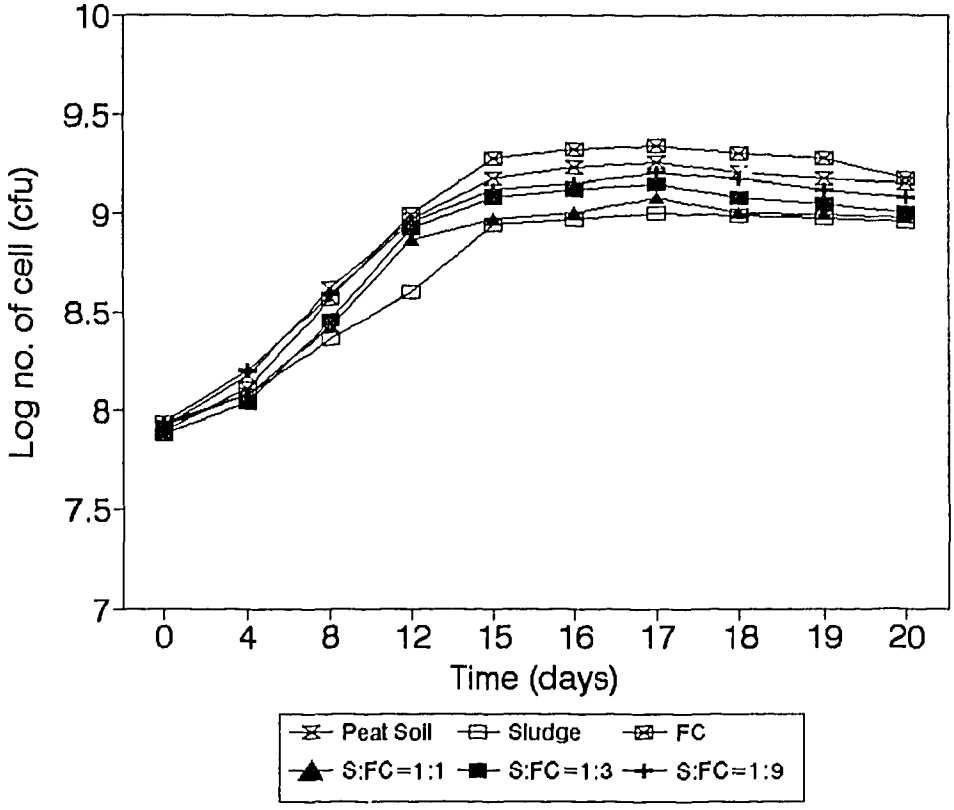

Figure 2 Growth of Rhizobium japonicum THA-7 in carriers at 30 C

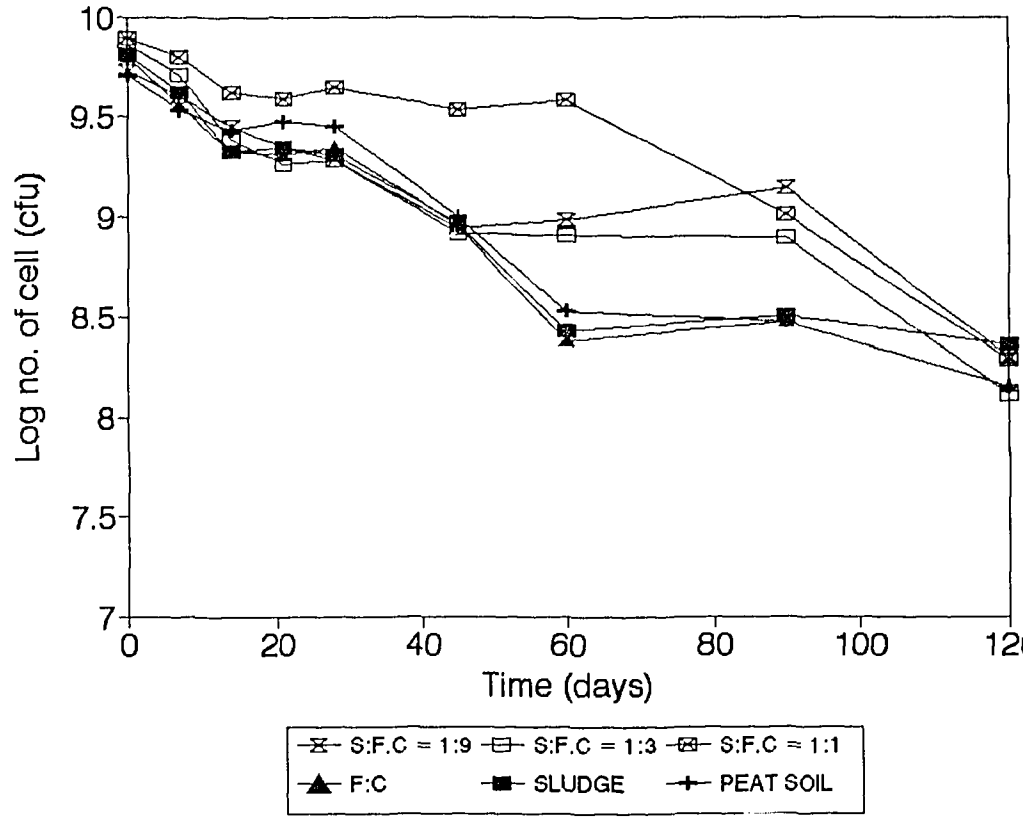

Figure 3 Total count of Rhizobium japonicum THA-7 in carriers kept at 4-5 C

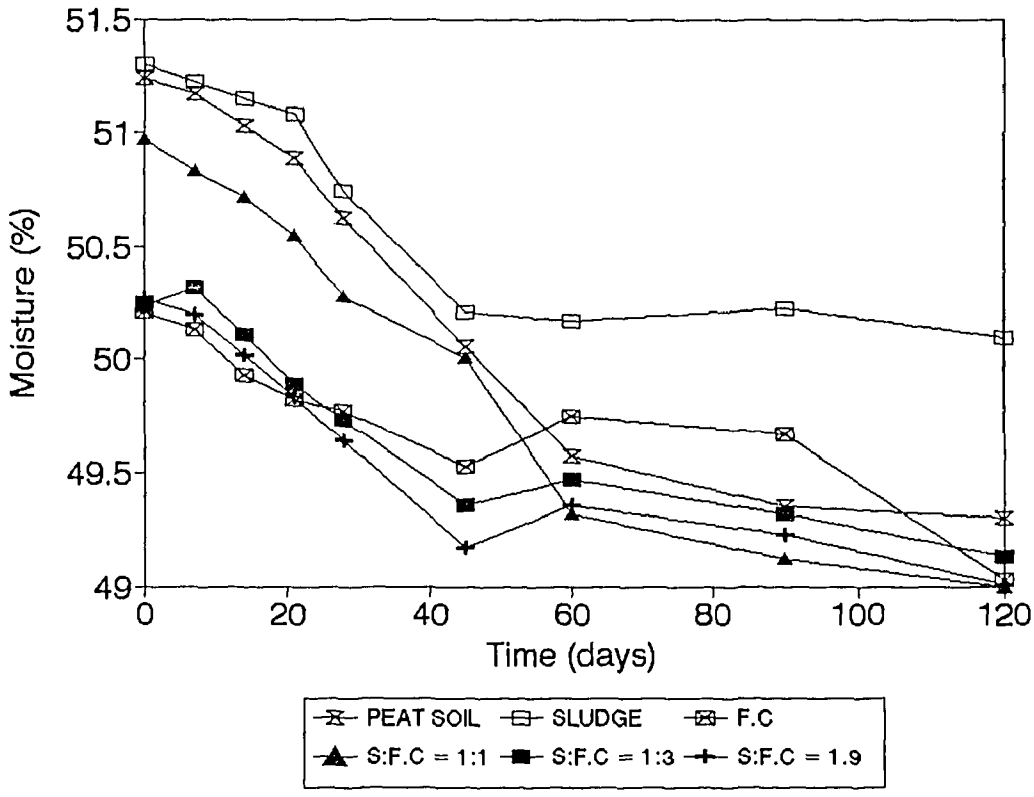

Figure 4 Moisture content of carriers kept at 4-5 C

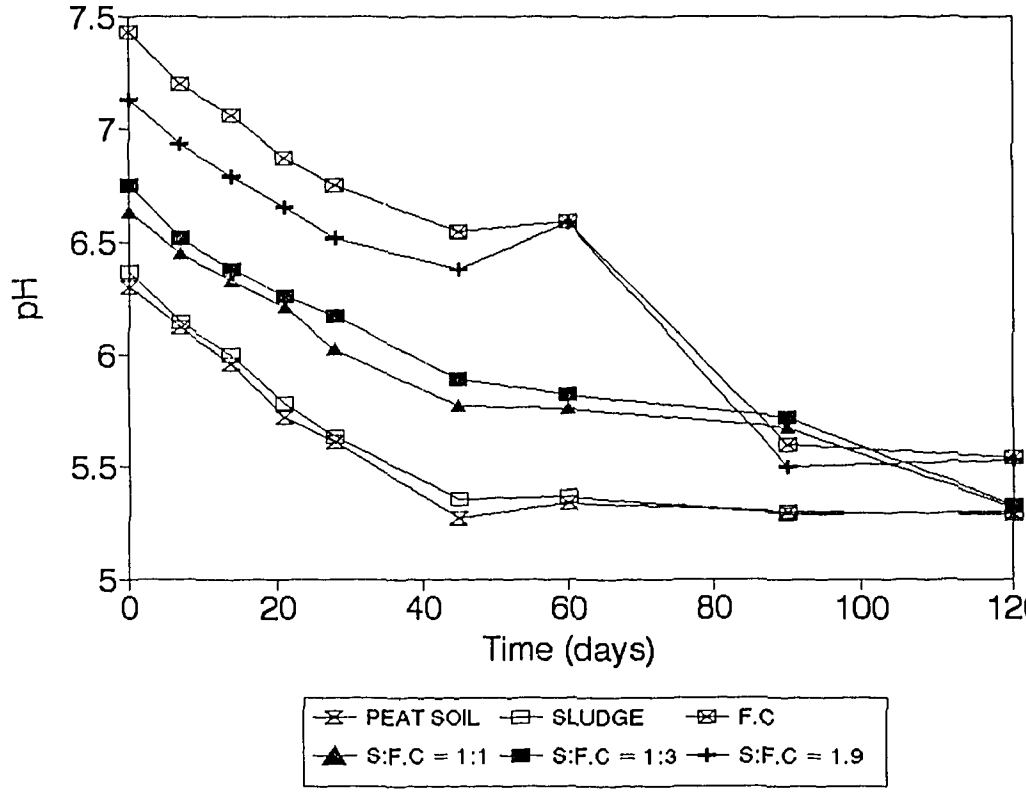

Figure 5 pH of carriers kept at 4-5 C

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการนำกากตะกอน และของเหลือใช้มาทำเป็นสารพาหะเก็บเชื้อไรโซเบียมนั้น โดยได้ศึกษาความชื้นพบว่ามีค่าความชื้นใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 6.7 - 8.6 เปอร์เซนต์ และมีค่า pH อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการเจริญของไรโซเบียมคือ 6.5 - 7.7 ยกเว้นดินพีทที่มี pH ต่ำ จึงต้องปรับ pH ให้มีค่าเหมาะสม

ในการศึกษาการเจริญของ *Rhizobium japonicum* THA-7 ในอาหารเหลว Mannitol Yeast Extract เชื้อเจริญถึงช่วงปลาย Log phase เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 2.6×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เมื่อได้คลุกเชื้อไรโซเบียมที่เลี้ยงในอาหารเหลว MYE ในระยะปลาย Log phase ลงในสารพาหะแต่ละตำหรับจนได้ระดับความชื้นประมาณ 50 เปอร์เซนต์ พบว่า ปริมาณเชื้อในสารพาหะเริ่มต้นอยู่ในช่วง 7.7×10^7 - 8.7×10^7 เซลล์ต่อกรัม เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°ซ.) เป็นเวลา 17 วัน เชื้อเจริญเพิ่มปริมาณในสารพาหะทุกตำหรับได้สูงสุดโดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดใน Filter press cake เท่ากับ 2.2×10^9 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อในดินพีทคือ 1.8×10^9 เซลล์ต่อกรัม ในสารพาหะตำหรับอื่น ๆ มีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกัน เชื้อเพิ่มปริมาณใน Sludgeได้ต่ำที่สุดคือ 1.1×10^9 เซลล์ต่อกรัม

จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะหลังจากที่เชื้อไรโซเบียมเจริญเพิ่มปริมาณในสารพาหะได้สูงสุด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4° - 5° ซ. พบว่าเมื่อเก็บเชื้อในสารพาหะไว้เป็นเวลา 120 วัน ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในสารพาหะทุกตำหรับยังคงมีค่าสูงในระดับ 10^8 เซลล์ต่อกรัม และเชื้อจะเจริญได้สูงสุดในสารพาหะผสมระหว่าง Sludge และ Filter Press Cake ในอัตราส่วน 1 : 3 คือมีค่าเท่ากับ 2.30×10^8 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งพาหะผสมดังกล่าวมีปริมาณเชื้อสูงกว่าในดินพีท 16.1% แสดงให้เห็นว่ากากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย และกากตะกอนหม้อกรองจากโรงงานน้ำตาลซึ่งเป็นของเสียและวัสดุเหลือใช้สามารถนำมาหมุนเวียน (recycling) ใช้ในกิจการเกษตรในรูปของปุ๋ยชีวภาพได้ ซึ่งจะได้พัฒนารูปแบบของผลิตภัณฑ์ให้เหมาะแก่การใช้งานของเกษตรกรและศึกษาการเพิ่มผลผลิตแก่พืชตระกูลถั่วในแปลงทดลองต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ คุณโชติรส อภิศักดิ์ศิริ และ คุณประภัสสร สาระคต ที่ได้ช่วยเก็บข้อมูลบางส่วนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณวิทยา ธนานุสนธุ์ กรมวิชาการเกษตร ที่ได้อนุเคราะห์เชื้อไรโซเบียมในการทดลองครั้งนี้ ขอขอบคุณ ผศ.สายพิณ ไชยนันทน์ ที่ได้มีส่วนให้ความคิดเห็นในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณสมาน นิยมญาติ คุณโอภาส อิสสระชัย และ คุณเจริญ คำหล้า ที่ได้กรุณาฉายรังสีกากตะกอนและสารพาหะ และขอขอบคุณ คุณชัชชัย มหาสุภาพ ที่ได้ช่วยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์บางส่วนในการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2529. "สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2528-2529, โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.
2. ทำเนียบโรงงานน้ำตาล " สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย " ประจำปี 2537.
3. นันทกร บุญเกิด. 2527. การผลิตเชื้อไรโซเบียม และการควบคุมคุณภาพที่ประเทศออสเตรเลีย. สัมมนาทางวิชาการ ประจำปี 2527. กลุ่มงานจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.
4. สมใจ ปฏิยุทธ์ และ สมศักดิ์ โคตรพงศ์. 2530. " ประวัติและการผลิตเชื้อไรโซเบียม เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตรปุ๋ยชีวภาพ. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.
5. สมศักดิ์ วังใน. 2525. " การตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมพืชตระกูลถั่ว " ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
6. ศรัณยา เปียแดง, ภารดี มามีชัย ดำรง เขียวศิลป์ และ อนุชิต อิสริยเมตต์, 2533. การสำรวจพยาธิในกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำทิ้งจากโรงพยาบาลและแหล่งชุมชน
7. Sorasith et al, 1983. ปริมาณกากของเสียชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในประเทศไทย น. 26 ใน จงรักษ์ ผลประเสริฐ, สมร มุตตามระ และ สมพล บุณทานนท์ (ผู้รวบรวม) แนวโน้มการใช้ประโยชน์จากกากของเสียอินทรีย์สารในปัจจุบันและอนาคต การประชุมวิชาการ เรื่อง การใช้ประโยชน์จากกากของเสียและทรัพยากรเหลือใช้. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 17-18 มิถุนายน 2530.
8. Brock, T. D. and M. Brock. 1978. Basic Microbiology with Application, Engle wood cliffs, Prentice-Hall, 111-113 p.
9. Burton, J. C. 1979. Bacteria for Azotification, in Microbial Biomass, Vol. 4 Academic press. Inc. (London) 65-76 p.
10. Kremer, R. J. and H. L. Peterson. 1983. Appl. Environ. Microbial, 1970-1974. p.
11. Lowendorf, H.S. 1980. Factor affecting Survival of Rhizobium in soil, in Advance in Microbial Ecology. Vol.4, (Editor, Alexander, M.) New York. 87-117 p.
12. Pelczar, M. J. and E. C. S. Chan. 1981. Element of Microbiology. London. MC Graw-Hill Book Company. 327. p.

13. Piadang, S. 1992. Sludge Irradiation Activity in Thailand. Presented at International Symposium on Applications of Isotopes and Padiation in Conservation at the Environment. Karlsruhe, Germany.

14. Piadang, S. and N. Suddhapreda. 1992. Evaluation of components in sludges. Presented at the 4th Steering committee meeting between OAEP and JAERI at OAEP, 8 and 10 July 1992.

15. Piadang, S., Sermkiattipong, NG. Pongpat, S, Bangtrakulnonth, A, Pornruangwong, S. and Mahabhol, N. 1988. The investigation of *Salmonella* sp. in sewage sludges in Thailand, Water Pollution Control in Asia, Pergamon Press.

16. Sundhagul, M. and P. Suyanandana. 1979. Soil Microbiology and Plant Nutritnt, University of Malaya, Malaya, 145-149 p.