SUT3-304-53-24-10

รายงานการวิจัย

การพัฒนารูปแบบของหัวเชื้อไรโซเบียม และกระบวนการผลิต
(Development of rhizobial inoculant formulations and production)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-53-24-10

รายงานการวิจัย

การพัฒนารูปแบบของหัวเชื้อไรโซเบียม และกระบวนการผลิต
(Development of rhizobial inoculant formulations and production)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย
ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีปีงบประมาณพ.ศ. 2553
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2554 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง และเครื่องมือวิเคราะห์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) สำหรับการสนับสนุนการใช้รังสีแกมมาในงานวิจัย รวมทั้งกรมวิชาการเกษตรสำหรับการสนับสนุนวัสดุพาหะในงานวิจัย และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ไรโซเบียมเป็นปุ๋ยชีวภาพชนิดหนึ่งที่ใช้สำหรับการปลูกพืชตระกูลถั่ว การผลิตปุ๋ยชีวภาพนี้จำเป็นต้องมีกระบวนการกำจัดเชื้อปนเปื้อนที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้เพื่อให้ได้กระบวนกำจัดเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาหะ เช่น พีท และวัสดุอินทรีย์ที่ย่อยสลายแล้ว สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมโดยวิธีการฉายรังสีแกมมา และการนึ่งด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่มีประสิทธิภาพ จากการทดลองพบว่าการเตรียมวัสดุพาหะที่ต้องการกำจัดเชื้อปนเปื้อนให้มีความชื้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยบรรจุในถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทธิลีน สามารถใช้วิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 10-20 กิโลเกรย์ หรือการนึ่งด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ด้วยเทคนิค tyndallizationโดยการนึ่งด้วยความดันไอน้ำ 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีทิ้งระยะเวลาหลังจากการนึ่งด้วยความดันไอน้ำครั้งแรก 18 ชั่วโมง ก่อนการนึ่งครั้งที่ 2 ทั้งนี้พบว่าวัสดุพาหะที่ผ่านการกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยสองวิธีนี้เมื่อนำไปผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมโดยใช้เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. PRC008 สามารถทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดได้ในพีทนานถึง 6 เดือน โดยมีปริมาณเชื้อในช่วง 10^8-10^9เซลล์ต่อกรัม อย่างไรก็ตามจำนวนของเชื้อไรโซเบียมในวัสดุพาหะที่ผลิตจากวัสดุอินทรีย์ที่ย่อยสลายแล้วสามารถมีอายุการเก็บรักษาได้เพียง 1 เดือน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าชนิดของวัสดุพาหะมีอิทธิพลสำคัญต่อคุณภาพของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม อย่างไรก็ตามวิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนโดยใช้การฉายรังสีแกมมา หรือการนึ่งด้วยความดันไอน้ำโดยใช้เทคนิค tyndallizationสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้พีทเป็นวัสดุพาหะในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Rhizobium is a biofertilizer for leguminous crops. To formulate this form of fertilizer, the suitable sterilization processes of carrier are focused. Therefore, the aim of this research was to elucidate the process of gamma irradiation and autoclaving on peat and compost based carriers for rhizobial inoculant production. Carriers with 10% moisture content packing in polyethylene bag could be efficiently sterilized by irradiation at 10-20 kGy, or by autoclaving with tyndallization approach (autoclaving two times in a row at 121°C for 60 min, with waiting period of 18 hours after each time of autoclaving). The number of *Bradyrhizobium* sp. PRC008 was in the range of 10^8-10^9cfu/g in both irradiated and autoclaved peat after 6 months storage. However, the numbers of bradyrhizobial cell were reduced in compost sterilized by both methods after one month storage. These results indicated that carrier material had an important influence on inoculant quality, while sterilization processes using gamma irradiation and autoclaving with tyndallization approach could be used for efficient rhizobial inoculant production with peat based carrier.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	4
การเตรียมหัวเชื้อและการเก็บรักษา	5
การนับจำนวนเชื้อไรโซเบียมที่ปลูกเชื้อร่วมกับพืช	5
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	5
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
ลักษณะทางเคมีกายภาพของปุ๋ยหมัก	6
ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา	7
การฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้น	10
ความอยู่รอดของเชื้อ*Bradyrhizobium* sp. PRC008 ในวัสดุพาหะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	12
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	14
ภาคผนวก	
ประวัติผู้วิจัย	I

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 สมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของพีทและปุ๋ยหมัก..... 6

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 3.1 จำนวนเชื้อปนเปื้อน, แบคทีเรีย (แท่งสีเทา) และเชื้อรา (แท่งสีขาว) ที่คงอยู่ในปุ๋ยหมัก..... 7

รูปที่ 3.2 จำนวนเชื้อปนเปื้อน, แบคทีเรีย (แท่งสีเทา) และเชื้อรา (แท่งสีขาว) ที่คงอยู่ในพีทและปุ๋ยหมักบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน (PE) และโพลีโพลพิลีน (PP) ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา..... 9

รูปที่ 3.3 จำนวนเชื้อปนเปื้อน, แบคทีเรีย (แท่งสีเทา) และเชื้อรา (แท่งสีขาว) ที่คงอยู่ในพีท (A) และปุ๋ยหมัก(B)..... 11

รูปที่ 3.4 จำนวนของแบรดีไรโซเบียม PRC008 ที่คงอยู่ในพีทนึ่งฆ่าเชื้อ (สี่เหลี่ยมทึบ), พีทที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา (สี่เหลี่ยมโปร่งใส), ปุ๋ยหมักนึ่งฆ่าเชื้อ (สามเหลี่ยมทึบ) และปุ๋ยหมักที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา (สามเหลี่ยมโปร่งใส) หลังเก็บเชื้อไว้นาน 6 เดือน..... 12

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

หัวเชื้อไรโซเบียมถูกใช้เป็นแหล่งของปุ๋ยไนโตรเจนโดยเฉพาะกับพืชตระกูลถั่ว ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมลดการใช้ปุ๋ยเคมี ช่วยลดต้นทุนการผลิตสำหรับพืชตระกูลถั่วหัวเชื้อไรโซเบียมที่จำหน่ายตามท้องตลาดมีด้วยกันหลายรูปแบบ ได้แก่ ชนิดแข็ง หรือชนิดเหลว ที่รักษาเชื้อไรโซเบียมให้มีจำนวนเซลล์อยู่ในระดับ 10^8 เซลล์ต่อกรัมได้อย่างน้อย 6 เดือน (Stephens และ Rask, 2000) แม้ว่าหัวเชื้อชนิดเหลวจะมีกระบวนการผลิตที่ง่ายกว่าชนิดแข็ง แต่ความอยู่รอดของเชื้อต้องคำนึงถึงองค์ประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการผลิต รวมทั้งชนิดของเชื้อไรโซเบียมอีกด้วย (Tittabutrและคณะ, 2007) ดังนั้นหัวเชื้อในรูปของแข็งโดยเฉพาะการใช้พีท (peat) เป็นวัสดุพาหะยังเป็นที่นิยมใช้การผลิตหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ เนื่องจากพีทมีองค์ประกอบต่างๆ ที่ทำให้เชื้ออยู่รอดได้เป็นระยะเวลานาน (Kishore และคณะ, 2005; Okon และ Labandera-Gonzalez, 1994) แต่พีทก็ยังเป็นวัสดุที่มีอยู่จำกัดในหลาย ประเทศเช่นเดียวกับในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวัสดุในท้องถิ่นอื่นมาทดแทนเพื่อใช้ผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป วัสดุพาหะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมหรือปุ๋ยชีวภาพนั้นต้องไม่เป็นพิษ รักษาความชื้นได้ดี ช่วยให้เชื้อเจริญเติบโตและอยู่รอดได้ เตรียมในรูปแบบผงได้ง่ายและค่า pH ที่เป็นกลาง (Albaredaและคณะ; Khavaziและคณะ, 2007; Smith, 1992) มีการทดสอบวัสดุพาหะหลายชนิดเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียม เช่น ดิน ถ่านหิน เวอร์มิคูไลต์ เพอร์ไลต์ แอตทาพูลไลต์ เซไพโอไลต์ อะมอร์ฟัสซิลิกา ปุ๋ยจากเปลือกไม้ กากอ้อย และปุ๋ยหมักจากพืชต่างๆ (Albaredaและคณะ, 2008; Ferreira และ Castro, 2005; Khavaziและคณะ, 2007) อย่างไรก็ตามคุณภาพของหัวเชื้อขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมีกายภาพและชีวภาพของวัสดุพาหะ รวมทั้งการฆ่าเชื้อวัสดุพาหะอีกด้วย (Khavaziและคณะ, 2007; Swelimและคณะ, 2010) ทั้งนี้ปัญหาหลักที่มีผลต่อคุณภาพ และอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อไรโซเบียมคือ การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นในวัสดุพาหะก่อนการฉีดเชื้อบริสุทธิ์เข้าไปผสม ซึ่งส่งผลให้ไรโซเบียมเจริญแข่งขันไม่ทัน

การฆ่าเชื้อวัสดุพาหะในทางอุตสาหกรรมโดยปกติจะใช้รังสีแกมมา หรือการนึ่งฆ่าเชื้อ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความพร้อมของเครื่องมือ กลไกในการฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งด้วยความร้อนชื้น ร่วมกับการใช้ความดัน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ 121องศาเซลเซียสและความดันสูง15 ปอนด์/ตารางนิ้วตามเวลาที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดและองค์ประกอบของวัสดุที่ใช้ อย่างไรก็ตามปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ได้ที่ยังหลงเหลือในวัสดุพาหะภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อยังคงเป็นปัญหาหลัก ในขณะที่การฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาเป็นการทำลายที่สายคู่ของดีเอ็นเอหรือทำให้น้ำแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ และทำลายระบบชีวภาพภายในเซลล์ (Hansen และ Shaffer, 2001) การฆ่าเชื้อวัสดุพาหะของหัวเชื้อไรโซเบียมต้องพิจารณาทั้งการเปลี่ยนแปลงกายภาพ และทางเคมีของวัสดุพาหะโดยที่ไม่มีการปลดปล่อยสารพิษ และไม่ทำลายสารอาหารต่างๆ ในวัสดุดังกล่าว (Strijdom และ van Rensburg, 1981) นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงวิธีการฆ่าเชื้อ จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมีผลอย่างมากต่อคุณภาพหัวเชื้อไรโซเบียมแม้ว่าการใช้รังสีแกมมาในปริมาณสูงมีประสิทธิภาพสูงกว่าการนึ่งฆ่าเชื้อแต่ภายหลังการเก็บเชื้อนาน 6 เดือนจำนวนเชื้อไรโซเบียมกลับไม่มีความแตกต่างกัน

(Khavaziและคณะ, 2007) ปริมาณรังสีที่ใช้ฆ่าเชื้อนั้นแปรผันไปตามคุณสมบัติของวัสดุที่ใช้ เช่น ความหนาแน่น ความชื้น ปริมาณเชื้อปนเปื้อนเริ่มต้น และกระบวนการบรรจุอย่างไรก็ตามปริมาณรังสีที่สูงเกินไปอาจทำให้วัสดุพาหะสร้างสารพิษในปริมาณที่สูงด้วยและจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ได้บางชนิดอาจยังคงหลงเหลืออยู่ในวัสดุพาหะ (Yardinและคณะ, 2000) โดยทั่วไปมีการใช้ปริมาณรังสีในระดับสูงกว่า 50 kGyในการฆ่าเชื้อวัสดุพาหะ อย่างไรก็ตามการใช้รังสีในระดับต่ำกว่าเป็นการลดการใช้พลังงานและเวลาในการฆ่าเชื้อ อีกทั้งยังลดสารพิษที่อาจสร้างขึ้นเมื่อใช้รังสีในระดับสูง วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อหาระดับต่ำสุดในการใช้รังสีแกมมาเพื่อกำจัดเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาหะอย่างมีประสิทธิภาพ โดยตรวจสอบปัจจัยด้านความชื้นและชนิดของพลาสติกที่ใช้เป็นภาชนะรวมถึงการใช้วิธีการนึ่งด้วยความดันไอน้ำโดยเทคนิค tyndallizationเพื่อลดปริมาณสปอร์ที่หลงเหลือจากการนึ่งฆ่าเชื้อที่งอกใหม่ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนพีท และปุ๋ยหมักที่ใช้เป็นวัสดุพาหะในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียม

หัวเชื้อไรโซเบียมได้รับความนิยมจากเกษตรกร ปัญหาหลักที่พบในกระบวนการผลิตคือ การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในหัวเชื้อไรโซเบียม ซึ่งเชื้อปนเปื้อนนี้จะเจริญแข่งขันกับเชื้อไรโซเบียม โดยแย่งธาตุอาหาร หรือพื้นที่ในการยึดเกาะกับวัสดุพาหะ รวมทั้งอาจผลิตสารบางชนิดที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อไรโซเบียมอีกด้วย (Olsen et al. 1995, 1996) ส่งผลให้ปริมาณของเชื้อไรโซเบียมลดลง และทำให้ลดโอกาสที่เชื้อจะเข้าสร้างปมกับพืชด้วยเช่นกัน นอกจากนี้วิธีการฆ่าเชื้อปนเปื้อนในพีท (peat) ปัจจุบันใช้วิธีการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำในสภาวะที่มีความดันสูง (autoclaving) ซึ่งความร้อนที่มากจนเกินไปส่งผลให้มีการเปลี่ยนรูปของสารอินทรีย์ไปเป็นสารพิษบางชนิดขึ้นในพีท ทำให้มีสภาพไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อไรโซเบียม (Strijdom and van Rensburg, 1981) ดังนั้นการทดสอบหาวิธีการฆ่าเชื้อปนเปื้อนวิธีอื่นที่เหมาะสม เช่น การใช้วิธีการฉายรังสี ซึ่งไม่ก่อให้เกิดความร้อนที่มากเกินไป อาจทำให้เชื้อไรโซเบียมสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในวัสดุพาหะได้ดีขึ้นนอกจากนี้การผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมในประเทศไทยมักใช้พีท เป็นวัสดุพาหะ ซึ่งมีอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากพีทนั้นเป็นอินทรีย์วัตถุที่ได้มาจากธรรมชาติ ซึ่งมีแนวโน้มที่จะหมดไปในที่สุด ทำให้การผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมถูกจำกัดด้วยความขาดแคลนวัสดุพาหะ และส่งผลให้การใช้หัวเชื้อไรโซเบียมไม่แพร่หลายเท่าที่ควร ดังนั้นการหาวัสดุพาหะอื่นเพื่อทดแทนพีทจึงมีความสำคัญในกระบวนการผลิต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.เพื่อให้ได้วัสดุพาหะชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติเหมาะสม เพื่อทดแทนการใช้ peat

2.เพื่อให้ได้วิธีการในการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาหะที่มีประสิทธิภาพ

3.เพื่อให้ทดสอบการเจริญของเชื้อไรโซเบียม และอายุการเก็บรักษาของหัวเชื้อในวัสดุพาหะ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการทดสอบการใช้วัสดุย่อยสลายทางการเกษตร (compost) เพื่อใช้ทดแทนพีท และศึกษาการใช้รังสีแกมมา (gamma irradiation) ในการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาหะ โดยทดสอบปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดของวัสดุพาหะ ความชื้น ขนาดบรรจุ วัสดุถุงที่ใช้ในการบรรจุ และปริมาณ

ความเข้มของรังสี(dose)ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนโดยวิธีการฉายรังสีเปรียบเทียบกับการใช้การนึ่งด้วยความดันไอน้ำโดยเทคนิค Tyndallizatoinจากนั้นทดสอบการเพิ่มจำนวนของเชื้อไรโซเบียมจากการใช้วิธี dilution technique ในการผลิต แล้วตรวจสอบการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่เข้าไป และเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่คงเหลืออยู่ในวัสดุพาหะนั้น เป็นระยะเวลา 6 ปี

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้วัสดุพาหะชนิดใหม่ทดแทนการใช้พีทและวิธีการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในวัสดุพาหะที่มีประสิทธิภาพ
2. ได้วิธีการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในวัสดุพาหะที่มีประสิทธิภาพ
3. ได้กระบวนการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมที่ได้คุณภาพ และลดต้นทุนในการผลิต
4. สามารถนำผลงานวิจัยนี้ไปพัฒนาเพื่อทำการผลิตในเชิงพาณิชย์ และอาจจดเป็นสิทธิบัตรได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

2.1.1 วัสดุพาหะ

ใช้พีทและวัสดุอินทรีย์ย่อยสลาย (compost) เป็นวัสดุพาหะในการศึกษาตลอดการทดลอง พีทได้รับจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประเทศไทย ในขณะที่ compost ทำจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น เปลือกมันสำปะหลังกากหม้อกรองอ้อย (filter cake) มูลไก่ มูลเป็ด และมูลวัวค่า pH ของพีทและcompost คือ 4.5 และ 7.49 ตามลำดับ นำพีทและปุ๋ยหมักบดและกรองด้วยตะแกรงร่อนขนาด 100-mesh ก่อนปรับค่า pH พีทให้ใกล้เคียง 7 โดยใช้ $CaCO_3$และวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและเคมีวัสดุพาหะที่ห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืชมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีประเทศไทย

1. การเตรียมวัสดุพาหะ

ปรับความชื้นของวัสดุพาหะด้วยน้ำที่ระดับ 10, 20 และ 30% วัสดุพาหะ 80 กรัม บรรจุวัสดุพาหะลงในพลาสติกขนาด 5×8 นิ้วหนา 0.08 มิลลิเมตร ที่ทำจากโพลีเอธิลีน (PE) หรือโพลีโปรพิลีน (PP) เพื่อฆ่าเชื้อ ภายหลังการบรรจุวัสดุพาหะทำให้มีความหนา 0.8 เซนติเมตร ทั้งนี้ความชื้นของวัสดุพาหะและชนิดของพลาสติกแตกต่างกันไปตามที่ระบุในแต่ละการทดลอง

2. ขั้นตอนการฆ่าเชื้อวัสดุพาหะ

- **การฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา**

นำถุงวัสดุพาหะฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาในระดับที่แตกต่างกัน คือ 5, 10, 15, 20 และ 25 kGy ที่ศูนย์ฉายรังสี ประเทศไทย สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) (จ.นครนายก ประเทศไทย) ใช้โคบอล-60 เป็นแหล่งรังสี ใช้โดสซิมิเตอร์ (dosimeter) เพื่อวัดปริมาณ ความลึกและตำแหน่งของรังสีทำการวิเคราะห์เชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาหะที่ฆ่าเชื้อแล้วไม่เกิน 1 สัปดาห์หลังการฆ่าเชื้อเพื่อทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังคงปนเปื้อนในวัสดุพาหะ

- **การฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ**

ปรับความชื้นของวัสดุพาหะด้วยน้ำที่ระดับ 10% ก่อนบรรจุวัสดุพาหะ 80 กรัม ในพลาสติก PE ขนาด 5×8 นิ้วก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีห่างกัน 18 และ 24 ชั่วโมงหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรก

2.1.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

การนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนทำหลังจากฆ่าเชื้อแล้ว 1 สัปดาห์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยใช้วัสดุพาหะ 10 กรัม เจือจางในน้ำที่ฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตัวอย่างถูกเจือจางในน้ำที่ฆ่าเชื้อลงครั้งละ 10 เท่า ส่วนหนึ่งเลี้ยงบนอาหาร plate count agar (PCA) และ potato dextrose agar (PDA) เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียและเชื้อราตามลำดับ ภายหลังจากบ่มเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน คำนวณจำนวนเซลล์เป็นค่าlog ของ

จำนวนโคโลนีต่อน้ำหนักแห้งของวัสดุพาหะ (log cfu/g) ถุงบรรจุวัสดุพาหะที่ใช้ทดสอบแล้วถูกแยกออกจากการทดลอง

2.2 การเตรียมหัวเชื้อและการเก็บรักษา

Bradyrhizobium sp. PRC008 ได้รับจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประเทศไทย ซึ่งเป็นเชื้อที่กรมวิชาการเกษตรผลิตและแนะนำให้ใช้สายพันธุ์ดังกล่าวสำหรับถั่วเขียว (*Vignaradiata* L.) เพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตเจน ทำการเลี้ยงเชื้อ PRC008 ในอาหารเหลวyeast extract mannitol (YEM) กระทั่งถึงปลายระยะ log phase จากนั้นทำการเจือจางเชื้อลง 10 เท่า ก่อนทำการฉีดเชื้อที่เจือจาง 20 มิลลิลิตร ให้กับในถุงวัสดุพาหะ 80 กรัมที่มีความชื้น 20% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และต้องกระทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อทุกขั้นตอนถุงวัสดุพาหะที่ฉีดเชื้อแล้วนั้นต้องเขย่าเพื่อคลุกเคล้าให้เชื้อกระจายอย่างทั่วถึงส่งผลให้ความชื้นภายในถุงวัสดุพาหะเป็น 40% บ่มถุงวัสดุพาหะที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) นาน 6 เดือน

2.3 การนับจำนวนเชื้อไรโซเบียมที่ปลูกเชื้อร่วมกับพืช

การตรวจสอบจำนวนเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. PRC008 ที่มีประสิทธิภาพกระทำทุก 1 เดือน จนถึงเดือนที่ 6 หลังจากการฉีดเชื้อด้วยการปลูกเชื้อร่วมกับพืชด้วยวิธี most-probable-number (MPN) (Somasegaranและ Hoben, 1994)

2.4 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v. 17for window (Levesque and SPSS Inc., 2006) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 ลักษณะทางเคมีกายภาพของปุ๋ยหมัก

ทำการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีของทั้งปุ๋ยหมักและพีท ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.1 พีทและปุ๋ยหมักมีความแตกต่างกันทั้ง ค่า pH, อินทรียวัตถุ, ปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัสค่า pH ของปุ๋ยหมักนั้นอยู่ในช่วงที่เป็นกลางซึ่งเหมาะสมต่อความอยู่รอดของเชื้อไรโซเบียม ในขณะที่พีทมีความเป็นกรดจึงต้องปรับค่า pH ด้วย $CaCO_3$อินทรียวัตถุในพีทสูงกว่าในปุ๋ยหมักถึง 4.4 เท่า ปริมาณของอินทรียวัตถุอาจช่วยสนับสนุนความอยู่รอดของเชื้อไรโซเบียมได้นานขึ้นในวัสดุพาหะ Khavaziและคณะ (2007) รายงานว่า การผลมเพอร์ไลต์กับวัสดุที่มีอินทรีวัตถุสูงเช่น กากน้ำตาล กากมอลต์สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ยังมีชีวิตหลังเก็บไว้นาน 6 เดือน อย่างไรก็ตามอินทรียวัตถุในปุ๋ยหมักต่ำกว่าในพีทแต่กลับมีสารอาหารที่มากกว่า สารอาหารปริมาณสูงเป็นอีกลักษณะหนึ่งของวัสดุพาหะที่ดี (Smith, 1992) ปุ๋ยหมักที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยเปลือกมันสำปะหลัง กากหม้อกรองอ้อย (filter cake) มูลไก่ และมูลวัว อย่างไรก็ตามไม่ใช่ทุกแหล่งของปุ๋ยหมักสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุพาหะได้ วัสดุทำปุ๋ยหมัก เช่น กากอุ่นทำให้ประชากรของเชื้อ *Sinorhizobiumfredii* SMH12 และ*Bradyrhizobiumjaponicum* USDA110 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังจากเก็บเชื้อไว้เพียง 15 วัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารประกอบของฟีนอล (phenolic compounds) ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียม (Albaredaและคณะ, 2008) ดังนั้นปุ๋ยหมักที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีคุณสมบัติหลายประการที่เป็นตัวชี้วัดถึงศักยภาพของวัสดุพาหะที่ดีเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียม โดยเฉพาะปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตระหว่างการเก็บรักษาตามระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้นเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาและการนึ่งฆ่าเชื้อ รวมทั้งความอยู่รอดของเชื้อเมื่อใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุพาหะเทียบกับการใช้พีท

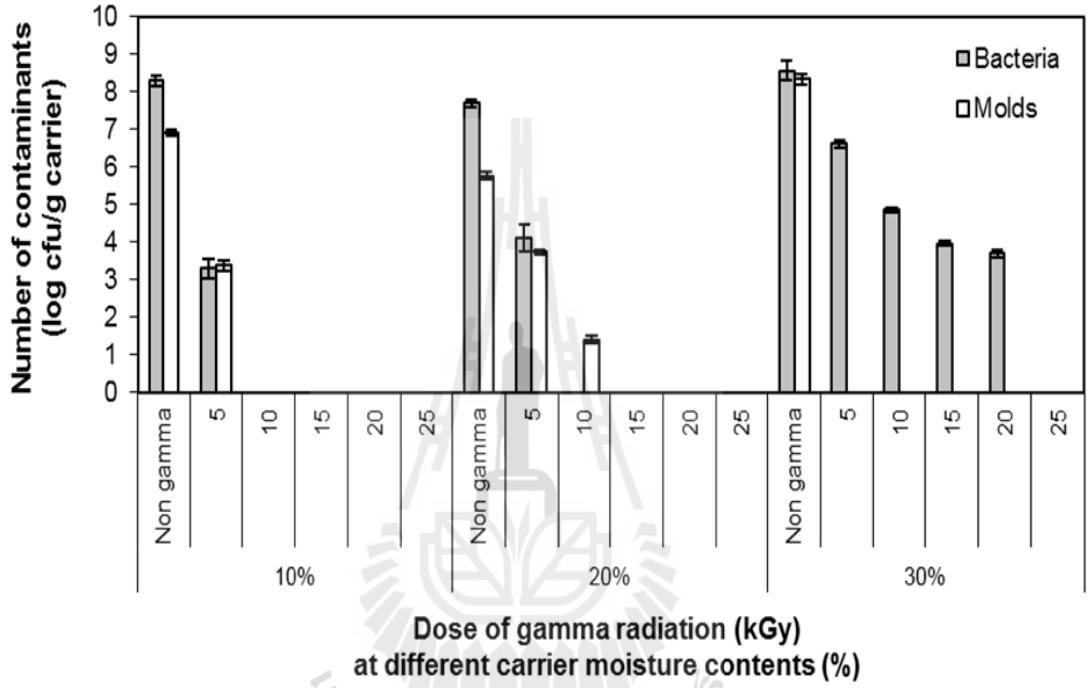
ตารางที่ 3.1 สมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของพีทและปุ๋ยหมัก

Materials	pH	Organic matter (%)	N (%)	P (%)	K (%)	Initial Moisture (%)
Peat	4.5	62.23	1.19	1.73	0.5	8.07
Compost	7.49	14.13	2.19	3.22	0.77	6.78

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา

การใช้รังสีแกมมาเป็นเทคนิคที่ใช้ฆ่าเชื้อในหลายๆ ผลิตภัณฑ์ เช่น ยารักษาโรคและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ ผลิตผลทางการเกษตร ผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ หรือบรรจุภัณฑ์ทางอาหาร อย่างไรก็ตาม การฆ่าเชื้อพีทและปุ๋ยหมักด้วยรังสีแกมมาที่มีประกอบด้วยสารประกอบคาร์บอน

เชิงซ้อน และมักจะมีการปนเปื้อน ซึ่งต้องการระดับของรังสีในการฆ่าเชื้อที่เหมาะสม และปัจจัยอื่นๆ ที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ ปัจจัยด้านความชื้นของวัสดุ (10 20 และ 30%) และชนิดของบรรจุภัณฑ์ (PP และ PE) ถูกตรวจสอบเพื่อหาระดับของรังสีที่ต่ำสุดแต่ยังคงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อปนเปื้อนได้ดี และเนื่องจากพืทมีอยู่อย่างจำกัด ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ปุ๋ยหมักบรรจุในถุงพลาสติกชนิด PP วัดระดับความชื้นที่เหมาะสม และฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 10 15 และ 25 kGy สามารถฆ่าเชื้อปุ๋ยหมักที่ระดับความชื้น 10 20 และ 30% ตามลำดับ (รูปที่3.1)



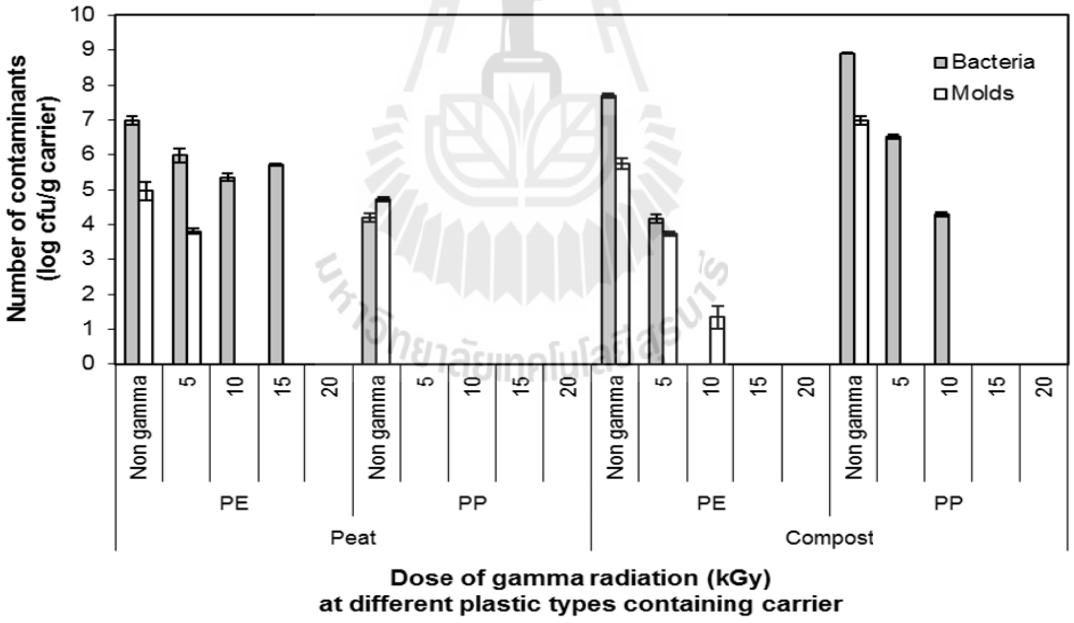
รูปที่ 3.1 จำนวนเชื้อปนเปื้อน, แบคทีเรีย (แท่งสีเทา) และเชื้อรา (แท่งสีขาว) ที่คงอยู่ในปุ๋ยหมักที่ระดับความชื้น 10, 20, และ 30% ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาที่ระดับ0, 5, 10, 15, 20 และ 25 kGy

ในระยะ 1 สัปดาห์แรก ปุ๋ยหมักที่ระดับความชื้น 10% ที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาระดับ 10 kGy ไม่พบการปนเปื้อนแบคทีเรียและเชื้อรา ขณะที่ความชื้น 20 และ 30% พบเชื้อรามากกว่า10 cfu/g และแบคทีเรียมากกว่า 10^4 cfu/g ตามลำดับ เมื่อฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาที่ระดับเดียวกัน เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อใช้รังสีที่ระดับ 20 kGyพบว่ามีแบคทีเรียหลงเหลืออยู่มากกว่า 10^3 cfu/g ในวัสดุพาหะที่ความชื้น 30% (รูปที่3.1) ผลการทดลองเช่นนี้บ่งบอกถึง อิทธิพลของความชื้นที่มีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา ความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนนั้นขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางกายภาพ ความสามารถในการสร้างสปอร์หรือซีสท์ (cyst) สารอาหารต่างๆ รวมถึงปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่นอุณหภูมิ และความชื้น (Yardinและคณะ, 2000) ความชื้นในระดับที่สูงอาจเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนก่อนที่จะมีการฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ ความชื้นยังอาจ

ทำให้มีการงอกของสปอร์ของแบคทีเรีย และส่งเสริมความอยู่รอดให้เชื้อที่ปนเปื้อนในวัสดุพาหะที่มีความชื้นสูง

การตรวจสอบชนิดของพลาสติกที่ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ ทั้งในแง่ของอายุการใช้งาน และสามารถหาได้ตามท้องตลาดในท้องถิ่นพีทและปุ๋ยหมักที่ใช้ศึกษาที่ปรับความชื้นเป็น 10% ก่อนฆ่าเชื้อด้วยรังสี พบว่ารังสีแกมมาสามารถทะลุผ่านพลาสติกชนิด PP พลาสติกชนิด PE และการทดลองนี้ต้องการใช้รังสีในระดับที่ต่ำที่สุด พีทที่บรรจุในพลาสติกชนิด PP พบว่ารังสีผ่านได้ 5 kGyในการฆ่าเชื้อ ในขณะที่พลาสติกชนิด PE ต้องใช้รังสีในระดับ 20 kGyในการฆ่าเชื้อ ในทางตรงข้าม พบจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากกว่า 10^4 cfu/g และเชื้อรามากกว่า 10 cfu/g เมื่อใช้รังสีที่ระดับ 10 kGyทั้งปุ๋ยหมักในพลาสติกชนิด PP และ PE ตามลำดับ (รูปที่3.2)

อย่างไรก็ตามถุงพลาสติกชนิด PE มีอายุการใช้งานนานกว่าถุงพลาสติกชนิด PP เมื่อฆ่าเชื้อด้วยรังสีที่ระดับสูง ในความเป็นจริงแล้วสามารถใช้บรรจุภัณฑ์ที่ทำจากวัสดุต่างๆ ได้หลากหลาย เช่น ขวดแก้ว กระป๋องโลหะ พลาสติกชนิดแข็งต่างๆ เช่น พลาสติกชนิด PP และ PE บรรจุภัณฑ์ที่ดีในการผลิตหัวเชื้อควรรักษาความชื้น มีการแลกเปลี่ยนอากาศได้เพียงพอต่อการเจริญเติบโต และความอยู่รอดเป็นเวลานาน และทนความร้อนในขั้นตอนการปิดผนึกด้วย (Rodriguez-Navarro และคณะ, 2011) ในการทดลองนี้เลือกใช้ถุงพลาสติกชนิด PE เป็นบรรจุภัณฑ์เพื่อทดสอบความอยู่รอดของเชื้อหลังจากฆ่าเชื้อด้วยรังสีที่ระดับสูง



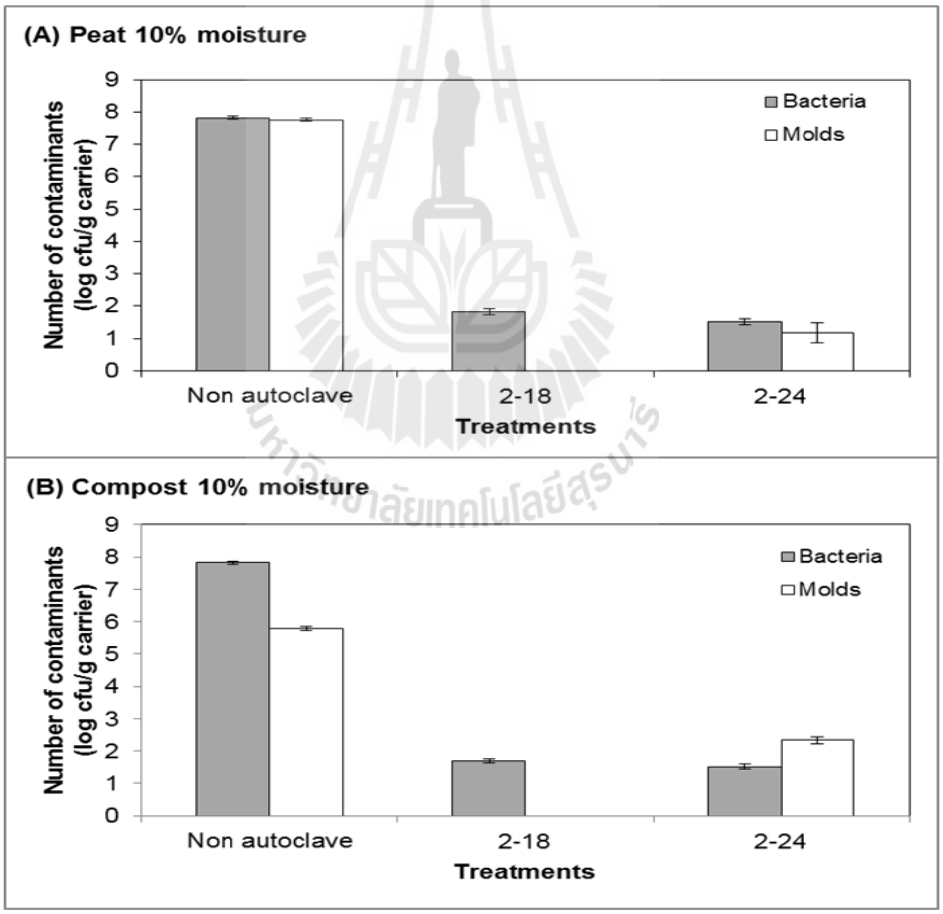
รูปที่ 3.2 จำนวนเชื้อปนเปื้อน, แบคทีเรีย (แท่งสีเทา) และเชื้อรา (แท่งสีขาว) ที่คงอยู่ในพีทและปุ๋ยหมักบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน (PE) และโพลีโพลพิลีน (PP) ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาที่ระดับ 0, 5, 10, 15, and 20 kGy

อย่างไรก็ตาม ยังมีการตรวจพบการปนเปื้อนวัสดุพาหะหลังจากฆ่าเชื้อด้วยรังสีและเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) การฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสีเป็นวิธีการฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ รังสีมีผลโดยตรงต่ออนุภาคที่มีประจุเช่นดีเอ็นเอ และมีผลต่อความอยู่รอดของเชื้อ นอกจากนั้น อนุภาคที่มีประจุ และไอออนต่างๆสามารถทำลายความสมบูรณ์ของเซลล์ ส่งผลให้สปอร์ไม่สมบูรณ์ และตายในที่สุด (Helfinstineและคณะ, 2005) โมเลกุลน้ำที่มีประจุก็สามารถสร้างอนุมูลอิสระ และขัดขวางระบบชีวภาพของเชื้อ (Hansen และ Shaffer, 2001) อย่างไรก็ตาม รังสีแกมมาไม่สามารถกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนให้หมดไปได้ เชื้อบางตัวอาจเกิดความเสียหายจากการฉายรังสีแต่ยังสามารถซ่อมแซม รักษาและเพิ่มจำนวนจากสิ่งที่อยู่รอบๆ ไม่ว่าจะเป็นสารอาหาร ค่า pH และความชื้น ที่เหมาะสม (Yardinและคณะ, 2000) เซลล์ปกติของแบคทีเรียมีความไวต่อรังสีแกมมา ส่วนสปอร์กลับทนทานกว่ายีสต์หรือเซลล์ปกติ (van Gerwenและคณะ, 1999) การบ่มเชื้อเป็นเวลานานอาจส่งผลให้เชื้อฟื้นตัวของเซลล์จากการถูกฉายรังสีของสปอร์ (Abshireและคณะ, 1980) ดังนั้นจึงตรวจพบการปนเปื้อนภายหลังจากฉายรังสีเชื้อปนเปื้อนที่หลงเหลือส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และจุลินทรีย์ที่สร้างแค็ปซูลห่อหุ้มตัวเอง จากการตรวจสอบของ Yardin et al. (2000) พบว่าแบคทีเรียจีนัสหลักที่ปนเปื้อนในวัสดุพาหะ คือ *Bacillus* spp. และ เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีสเมื่อฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาที่ระดับมากกว่า 50 kGyแม้ว่ารังสีแกมมาไม่สามารถฆ่าเชื้อปนเปื้อนได้ทั้งหมด แต่ปริมาณเชื้อปนเปื้อนที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดส่งผลให้เชื้อไรโซเบียมเพิ่มจำนวนและคงอยู่ในวัสดุพาหะได้เป็นเวลานานเมื่อเทียบกับวัสดุพาหะที่ไม่ผ่านการฆ่า

3.3 การฆ่าเชื้อปนเปื้อนด้วยการนึ่งด้วยความดันไอน้ำ

แม้ว่าการฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสีแกมมาเป็นวิธีฆ่าเชื้อในปริมาณมากๆ ใช้เวลาน้อยและประหยัดพลังงาน แต่ในประเทศกำลังพัฒนาบางประเทศไม่สามารถใช้ได้ นอกจากนั้น แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้บางชนิดทนต่อการฉายรังสีแกมมา ดังนั้น การนึ่งฆ่าเชื้อเป็นอีกทางเลือกเพื่อการฆ่าเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาหะ และในการทดลองครั้งนี้ถูกนำมาใช้ฆ่าเชื้อทั้งในรูปของเซลล์แบคทีเรียทั่วไป และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ อาศัยความร้อนจากไอน้ำในการฆ่าเชื้อและสปอร์ โดยอาจต้องนึ่งซ้ำ 2 ถึง 3 ครั้ง (Valero และ Salmeron, 2003; Gould, 2006) ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วัสดุพาหะที่ระดับความชื้นที่ 10% นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียสนาน 60 นาที 2 ครั้ง โดยทิ้งไว้ห่างกัน 18 และ 24 ชั่วโมงหลังจากการนึ่งครั้งแรกเซลล์ปกติของจุลินทรีย์จะถูกฆ่าตายในการนึ่งแต่ละครั้ง ขณะที่สปอร์ของเชื้อจะถูกปล่อยให้งอกออกมาใหม่หลังจากการนึ่งครั้งแรกและถูกฆ่าในการนึ่งครั้งที่ 2 ผลการทดลองพบว่าเชื้อราที่ปนเปื้อนในวัสดุพาหะ 10^{7}-10^{8}และ 10^{5}-10^{6}cfu/g ถูกกำจัดออกไปโดยสิ้นเชิงทั้งในพีทและปุ๋ยหมักตามลำดับ เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง โดยห่างกัน 18 ชั่วโมง แต่แบคทีเรียประมาณ 100 cfu/g ยังคงหลงเหลือในวัสดุพาหะทั้ง 2 ในทางตรงข้ามพบทั้งแบคทีเรียและเชื้อราหลงเหลือในพีทและปุ๋ยหมักเมื่อทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงก่อนการนึ่งครั้งถัดไป จำนวนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่หลงเหลือในปุ๋ยหมักใกล้เคียงกับในพีท คือ อยู่ในช่วง 10-100 cfu/g แต่เชื้อราที่ปนเปื้อนในปุ๋ยหมักสูงกว่าแบคทีเรีย (100-1000 cfu/g) (รูปที่ 3.3) เป็นไปได้ว่าการงอกและระยะเวลาการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียและเชื้อราแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ

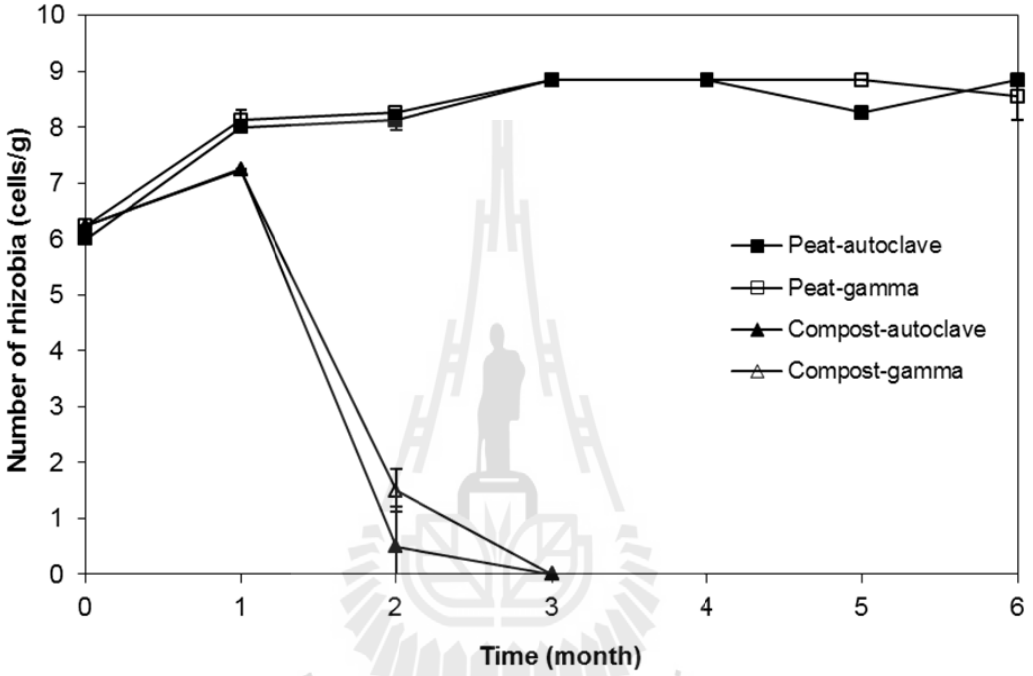
ดังนั้นที่เวลา 24 ชั่วโมงมีจุลินทรีย์บางชนิดเริ่มสร้างสปอร์อีกครั้งยิ่งไปกว่านั้นการตอบสนองของเชื้อแต่ละชนิดต่อสิ่งแวดล้อม เช่นความร้อน ความชื้น ค่า pH และสารอาหารในแต่ละวัสดุพาหะ ก็เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการนึ่งฆ่าเชื้อกระบวนการฆ่าเชื้อที่คล้ายการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นโดยให้ความร้อน 2 ครั้ง และทิ้งระยะห่างในแต่ละขั้นตอนภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Bacillus cereus*และ *B. subtilis*ในผลิตภัณฑ์นม (Brown และคณะ, 1979) แต่ก็สามารถทำลายสปอร์ของ *B. subtilis* ATCC6633 กระบวนการฆ่าเชื้อที่คล้ายการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นโดยให้ความร้อน 2 ครั้ง (Cho et al., 1999) ดังนั้นการกำจัดจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นอาจฆ่าเชื้อได้ไม่หมดก็เป็นได้ประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการนี้ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของวัสดุที่เลือกใช้ อย่างไรก็ตาม การลดลงของเชื้อปนเปื้อนส่งผลต่อจำนวนไรโซเบียมที่เพิ่มขึ้นในวัสดุพาหะขณะเก็บรักษาไว้ ดังนั้น การนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และทิ้งให้ห่างกัน 18 ชั่วโมงถูกใช้เพื่อเตรียมพีทและปุ๋ยหมักในการทดสอบการเก็บรักษาหัวเชื้อไรโซเบียมเป็นเวลานานเทียบกับการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา



รูปที่ 3.3 จำนวนเชื้อปนเปื้อน, แบคทีเรีย (แท่งสีเทา) และเชื้อรา (แท่งสีขาว) ที่คงอยู่ในพีท (A) และปุ๋ยหมัก(B) ที่ไม่ฆ่าเชื้อ และฆ่าเชื้อ 2 ครั้งห่างกัน 18 ชั่วโมง (2-18) และ 24 ชั่วโมง (2-24)

3.4 ความอยู่รอดของเชื้อ*Bradyrhizobium* sp. PRC008 ในวัสดุพาหะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้ปุ๋ยหมักแทนการใช้พีท และพิสูจน์ว่าการนึ่งฆ่าเชื้อหรือการฉายรังสีแกมมาที่สามารถลดปริมาณเชื้อปนเปื้อนในวัสดุพาหะพีทและปุ๋ยหมักที่ฉีดด้วย *Bradyrhizobium* sp. PRC008 กระทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อใช้ในการทดสอบความอยู่รอดเมื่อเก็บเป็นเวลานานที่อุณหภูมิห้องนับจำนวนเซลล์ทุกเดือนด้วยวิธี MPN จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ฉีดเข้าคือ10^6 cells/g (รูปที่3.4)



รูปที่ 3.4 จำนวนของแบรดีไรโซเบียม PRC008 ที่คงอยู่ในพีทนึ่งฆ่าเชื้อ (สี่เหลี่ยมทึบ), พีทที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา (สี่เหลี่ยมโปร่งใส), ปุ๋ยหมักนึ่งฆ่าเชื้อ (สามเหลี่ยมทึบ) และปุ๋ยหมักที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมา (สามเหลี่ยมโปร่งใส) หลังเก็บเชื้อไว้นาน 6 เดือน

จากผลการทดลองพบว่า แบรดีไรโซเบียมสามารถเจริญเติบโตจาก10^6เป็น 10^8 cells/g ในพีทได้ดีว่าปุ๋ยหมักจากการฆ่าเชื้อทั้ง 2 วิธี เมื่อผ่านไป 1 เดือน และจำนวนเซลล์ยังคงอยู่ที่ระดับ 10^8 cells/g เมื่อเก็บนานกว่า 6 เดือนถือว่าอยู่ในระดับที่สูงในการแข่งขันและเข้าสร้างปมในเมล็ดถั่วเขียว (รูปที่ 4) ดังนั้นเชื้อปนเปื้อนที่ยังหลงเหลือในพีทหลังจากการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมมาหรือการนึ่งฆ่าเชื้อไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบรดีไรโซเบียมอย่างไรก็ตาม ไม่จำเป็นต้องใช้ปุ๋ยหมักเป็นวัสดุพาหะในการผลิตหัวเชื้อแบรดีไรโซเบียม จำนวนเชื้อเพิ่มเพียง 10 เท่า (10^6- 10^7 cells/g) เมื่อผ่านไป 1 เดือนและลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 2 ทั้งจากการฉายแสงและการนึ่งฆ่าเชื้อ (รูปที่3.4) ผลการทดลองดังกล่าว บ่งบอกถึงสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และความอยู่รอดของแบรดีไรโซเบียมในปุ๋ยหมักอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในปุ๋ยหมัก หรือมีการ

ปล่อยสารพิษบางชนิดหลังจากการฆ่าเชื้อทั้งสองวิธี (Strijdom และ van Rensburg, 1981) แม้ว่าการให้รังสีแกมมาสร้างความร้อนน้อยกว่าการนึ่งฆ่าเชื้อ แต่อาจส่งผลกระทบโดยตรงต่อองค์ประกอบทางเคมีของบางอนุภาคปุ๋ยหมักที่ใช้ในการศึกษาทำจากเปลือกมันสำปะหลัง กากหม้อกรองอ้อย (filter cake) มูลไก่และมูลวัว แต่ไม่ใช่วัสดุทุกชนิดสามารถใช้ทำปุ๋ยหมักเพื่อผลิตหัวเชื้อได้ Albaredaและคณะ (2008) เคยรายงานว่าปุ๋ยหมักที่ทำจากากองุ่นทำให้จำนวนไรโซเบียมลดลงอย่างชัดเจน เป็นไปได้ว่าสารพิษบางส่วนยังคงอยู่ในปุ๋ยหมักที่ใช้ในการทดลอง อีกทั้งสภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจมาจากจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ที่หลงเหลือในปุ๋ยหมักหลังการฆ่าเชื้อ จุลินทรีย์ปนเปื้อนดังกล่าวอาจสร้างสารพิษ หรือแก่งแย่งสารอาหารที่มีอยู่ในวัสดุพาหะส่งผลให้จำนวนเชื้อแบรดีไรโซเบียมลดลงในที่สุด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

วัสดุพาหะมีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อคุณภาพหัวเชื้อไรโซเบียม ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วัสดุย่อยสลายทางการเกษตร ที่ทำจากส่วนผสมของเปลือกมันสำปะหลัง กากหม้อกรองอ้อย (filter cake) มูลไก่ และมูลวัว ไม่สามารถใช้เป็นวัสดุพาหะทดแทนพีทในการผลิตหัวเชื้อแบรดีไรโซเบียมได้ นอกจากนี้ ประสิทธิภาพของกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสีแกมมา และการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) สามารถใช้ฆ่าเชื้อวัสดุพาหะพีทได้ ความชื้นและชนิดของถุงพลาสติกที่ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์มีผลต่อระดับของรังสีแกมมาที่ใช้ฆ่าเชื้อ การฉายรังสีที่ระดับ 20 kGyสามารถฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในพีทที่มีความชื้น 10% ซึ่งบรรจุในถุงพลาสติก PE นอกจากนั้น พีทที่มีความชื้น 10% สามารถฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที 2 ครั้ง ทิ้งระยะห่างกัน 18 ชั่วโมงจากทั้งสองวิธีพบว่าจำนวนเชื้ออยู่ในระดับที่สูงกว่า 10^8 cells/g และเข้าสร้างปมได้ดีกับเมล็ดถั่วเขียว หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 เดือน

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากพีทที่ใช้เป็นวัสดุพาหะในประเทศไทยขาดแคลน การหาวัสดุพาหะทดแทนที่มีประสิทธิภาพจึงใจเป็นต้องศึกษาวิจัยเพื่อประสิทธิภาพในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Abshire, R. L., B. Bain, and T. Williams.(1980). Resistance and recovery studies on ultraviolet irradiated spores of *Bacillus pumilus*.Applied Environmental Microbiology. , 39(4):695.

Albareda, M., D. N. Rodriguez-Navarro, M. Camacho, and F. J. Temprano. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. Soil Biology and Biochemistry. 40(11):2771-2779.

Brown, J. V., R. Wiles, and G. A. Prentice. (1979). The effect of a modified tyndallization process upon the sporeforming bacteria of milk and cream. International Journal of Dairy Technology. 32 (2):63–114.

Cho, H. Y., A. E. Yousef, and S. K. Sastry. (1999). Kinetics of inactivation of *Bacillus subtilis* spores by continuous or intermittent ohmic and conventional heating. Biotechnology and Bioengineering. 62(3):368-372.

Ferreira, E. M. and I. V. Castro.(2005). Residues of the cork industry as carriers for the production of legumes inoculants.SilvaLusitana. 13(2):159-167.

Gould, G. W. (2006). History of science-spores. Lewis B. Perry Memorial Lecture. Journal of Applied Microbiology. 101(3):507-513.

Hansen, J. M. and H. L. Shaffer.(2001). Sterilization and preservation by radiation sterilization. In: S.S. Block ed.Disinfection, sterilization, and preservation.pp. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Helfinstine, S. L., C. Vargas-Aburto, R. M. Uribe, and C. J. Woolverton. (2005). Inactivation of *Bacillus* endospores in envelopes by electron beam irradiation. Applied Environmental Microbiology. 71(11):7029-32.

Khavazi, K., F. Rejali, P. Seguin, and M. Miransari.(2007). Effects of carrier, sterilization method, and incubation on survival of *B.japonicum*in soybean (*Glycine max* L.) inoculants.Enzymeand Microbial Technology. 41, 780-784.

Kishore, G.K., S. Pande, and A.R. Podile. (2005). Phylloplane bacteria increase seedling emergence growth and yield of field-grown groundnut (*Arachishypogea*L.). Letters in Applied Microbiology.

Levesque, R., and SPSS Inc., (2006).SPSS programming and Data Management, 3rd Edition. SPSS Institute. United State of America. ISBN 1-56827-374-6

Oboh, G. (2006). Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisae*and *Lactobacillus* spp.solid media fermentation techniques.http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue1/full/1/

Okon, Y., and C. A. Labandera-Gonzalez. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry.Vol 26(12) : 1591–1601.

Olsen P. E., Rice W. A., and Collins, M. M. (1995). Biological contaminants in North American legume inoculants. *Soil Biol. Biochem*. 27:699-701.

Olsen P. E., Rice W. A., Bordeleau L. M., Demidoff A. H., and Collins M. M. (1996). Levels and identities of nonrhizobial microorganisms found in commercial legume inoculant made with nonsterile peat carrier. Canadian Journal of Microbiology. 42:72-75.

Rodriguez-Navarro, D. N., I. M. Oliver, M. A. Contreras, and J. E. Ruiz-Sainz.(2011). Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects.Agronomy for Sustainable Development.

Smith, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application.Canadian Journal of Microbiology.

Somasegaran, R. J., and H. J. Hoben.(1994).Handbook for Rhizobia Methods in Legume-Rhizobium Technology. Edwards, Inc., Ann Arbor, USA.

Stephens, J. H., and H. M. Rask.(2000). Inoculant production and formulation.Field Crops Research.

Strijdom, B. W., and H. J. van Rensburg.(1981). Effect of stream sterilization and gamma irradiation of peat on quality of *Rhizobium* inoculants.Applied Environmental Microbiology.

Swelim, D. M., M. A. Nassef, and E. I. Elkhatib. (2010). Survival and shelf life of leguminous trees rhizobia as affected by sterilization, culture dilution and maltose and trace elements enriched carrier. Journal of Applied Science Research.

Tittabutr, P., W. Payakapong, N. Teaumroong, P.W. Singleton, and N. Boonkerd.(2007). Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculantformulations with polymeric additives.ScienceAsia. 33: 069-077.

Valero, M., and M.C. Salmeron. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology.

vanGerwen, S.J.C., F.M. Rombouts, K. van Riet, and M.H. Zwietering. (1999). A data analysis of the irradiation parameter D for 10 bacteria and spores under various conditions.Journal of Food Protection.

Yardin, R., I. R. Kennedy, and J. E. Thies. (2000). Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as bio-fertilisers and bio-pesticides. Radiation Physics and Chemis