บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ไรโซเบียม

ลักษณะของเชื้อไรโซเบียม

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งอยู่ใน Class Shizomycetes Order Eubacteriales Family Rhizobiacea มีชื้อ Genus ว่า Rhizobium เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน มีความสามารถพิเศษในการเข้าสร้างปมในรากพืชตระกูลถั่วได้ เชื้อไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเมื่อเลี้ยงในสภาพปกติจะมีรูปร่างเป็นแท่งยาว (rod shape) แต่เมื่อเชื้อไรโซเบียมเข้าสู่ระบบรากของพืชจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป โดยเชื้อไรโซเบียมที่พบในปมรากของพืชตระกูลถั่วจะมีรูปร่างไม่แน่นอน เช่น มีรูปร่างเป็น X, Y หรือ star shape ไรโซเบียมที่เข้าไปอาศัยอยู่ในปมแล้วจะเรียกว่า แบคทีรอยด์ (bacteroied) (Alexander, 1977) ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน มีแขนงแยกออกและบวมมีช่องว่างภายใน (vacuated swarmer) ซึ่งจะแบ่งตัวออกเป็นพวก bacilli ในที่สุดเมื่อแบคทีรอยด์แตกตัว ส่วนไรโซเบียมที่เลี้ยงในอาหารที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เลี้ยงไรโซเบียมโดยเฉพาะ(artificial media) โดยปกติแล้วไรโซเบียมที่กำลังเจริญจะมีลักษณะเป็นท่อนยาวเล็กๆ เคลื่อนไหวโดยใช้ flagella (Somasegaran and Hoben, 1994)

ขั้นต่างๆ ในชีพจักรของไรโซเบียม (Waksman, 1952) (ภาพที่ 1) พอที่จะสรุปได้ดังนี้

ขั้นที่ 1 เซลล์รูปร่างกลมไม่เคลื่อนที่ (nonmobile) เตรียมที่จะเปลี่ยนเป็น swarmer (preswarmer) พบในสารละลายดิน (soil solution) ที่ออกฤทธิ์เป็นกลาง

ขั้นที่ 2 เซลล์รูปทรงกลม ขนาดโตขึ้นและไม่เคลื่อนที่เช่นเดียวกัน พบในอาหาร หรือสภาพแวดล้อมที่มีฟอสเฟตและคาร์โบไฮเดรตบางชนิด

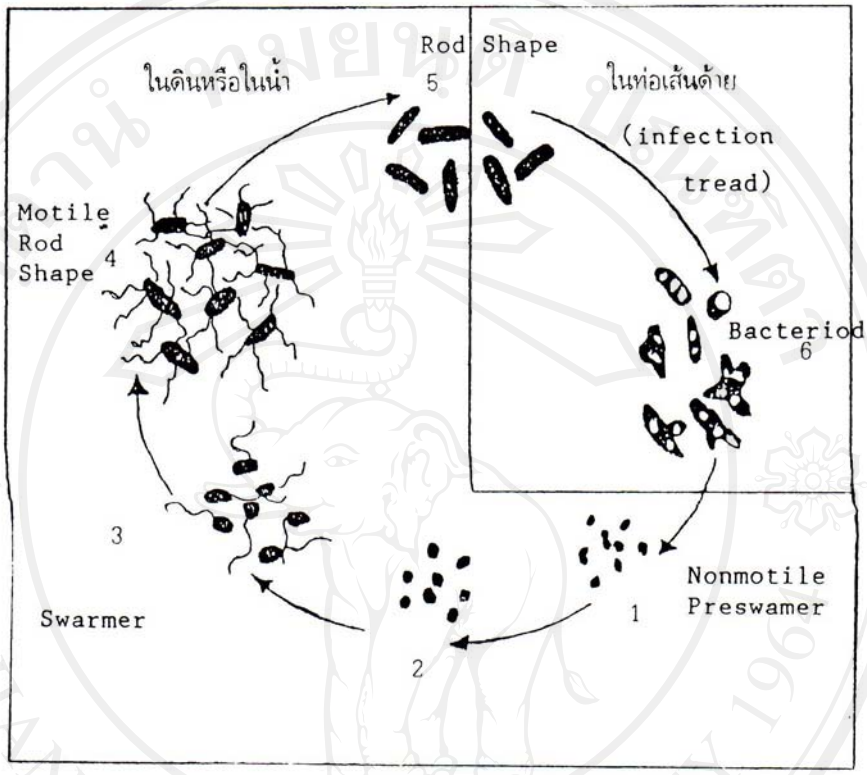
ขั้นที่ 3 เซลล์ขยายยาวขึ้นเป็นวงรี (eliipsoidal) มีflagellum ปรากฏขึ้นและอยู่ในขั้น swarmer เคลื่อนที่ได้เร็ว

ขั้นที่ 4 เซลล์ขยายตัวได้เร็วขึ้นจนเป็นท่อนยาวเล็ก เคลื่อนที่ได้ช้าลง

ขั้นที่ 5 เซลล์เป็นท่อนยาว บางส่วนเข้าสู่พืช สร้างท่อเส้นด้ายเข้าสู่เซลล์พืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นที่ 6 เซลล์แบ่งออกเป็นส่วนๆ โดยchromatin และแยกออกเป็นก้อนกลม ซึ่งในที่สุดจะแยกตัวออกเป็น preswarmer อีกครั้งหนึ่ง



รูปที่ 1 ชีพจักรของไรโซเบียม

1. เซลล์รูปทรงกลมไม่เคลื่อนที่; 2. เซลล์รูปทรงกลมขนาดโตขึ้น ไม่เคลื่อนที่; 3. เซลล์ขยายยาวเป็นวงรี flagellum เคลื่อนที่เร็ว; 4. เซลล์ขยายตัวเป็นท่อนยาว เคลื่อนที่ช้า; 5. เซลล์เป็นท่อนยาวปราศจาก flagellum บางส่วนเข้าสู่พืช สร้างท่อเส้นด้ายและเข้าสู่เซลล์พืช; 6. แบคทีรอยด์
ที่มา : สมศักดิ์, 2541

การเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียมในพืชตระกูลถั่ว

เชื้อไรโซเบียมนี้สามารถตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่วได้ต่อเมื่อเชื้อต้องอาศัยร่วมกันในปมราก หรือลำต้นในภาวะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน หรือเรียกว่า symbiosis (Denison and Kiers, 2004) กลไกของเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสู่รากพืชได้นั้น เริ่มจากการที่รากพืชปล่อยสารจำพวก flavonoid ออกมา จากนั้นสารนี้จะไปกระตุ้นให้ไรโซเบียมเคลื่อนตัวสู่รากพืช และกระตุ้นกลุ่มของยีนส์ในเชื้อไรโซเบียม ที่ควบคุมการสร้างปม (nodulation genes หรือ nod) ให้มีการแสดงออกเพื่อผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง กับการสร้างสารพวก lipopolysaccharide หรือเรียกว่า nod

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

factor เชื้อไรโซเบียมปลดปล่อยสารนี้ ออกสู่ภายนอกเซลล์ จากนั้น nod factor ก็จะทำให้รากพืชตระกูลถั่วนั้นโค้งงอ และเปลี่ยนเป็นโครงสร้างของปมต่อไป (Simms and Tayler, 2002) ในช่วงนี้เชื้อไรโซเบียมจะเคลื่อนตัวเข้าสู่รากของพืช ไปตามโครงสร้างที่เรียกว่า infection thread ซึ่งยืนในเซลล์รากพืชเป็นตัวแสดงออก เพื่อให้เกิดโครงสร้างนี้และโครงสร้างที่จะขยายตัวออกมาเป็นปมต่อไป (หนึ่ง และ นันทกร , 2539)

เมื่อเชื้อไรโซเบียมสามารถเข้าสร้างปมได้แล้ว ก็จะเริ่มขบวนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้กับพืช โดยสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenease) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในการควบคุมกลไกที่จะทำปฏิกิริยาเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย กลุ่มของยีนในไรโซเบียมที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนนี้เรียกว่า nif ซึ่งจะแสดงออกเพื่อทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ไนโตรจีเนส นอกจากนี้ยังพบยีนส์ในกลุ่ม fix ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนถ่ายอิเลกตรอน และพลังงานในขบวนการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย (Moat and Foster, 1995)

ความเหมาะสมระหว่างสายพันธุ์ไรโซเบียมกับชนิดของพืชตระกูลถั่ว

เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มไรโซเบียมสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายกลุ่ม เมื่อจำแนกโดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล ในอดีตนักวิทยาศาสตร์ได้จัดจำแนกเชื้อไรโซเบียมตามชนิดของพืชตระกูลถั่วที่เชื้อไรโซเบียมนั้นๆ สามารถเข้าไปสร้างปมได้ เช่น เชื้อไรโซเบียมถั่วเหลือง เชื้อไรโซเบียมถั่วแดง เป็นต้น (Sahgal and Johri, 2003) จึงแสดงให้เห็นว่า เชื้อไรโซเบียมมีความเฉพาะเจาะจงกับพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิด (host specificity) ดังนั้นการเลือกใช้เชื้อไรโซเบียมเพื่อผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ จึงต้องคำนึงถึงพืชตระกูลถั่วที่จะใช้ปลูกด้วย ในการจำแนกเชื้อไรโซเบียมอาจต้องใช้หลายวิธีรวมกัน เมื่อกล่าวถึงความสัมพันธุ์ระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วแล้ว สิ่งสำคัญที่สุดคือความสามารถของไรโซเบียมที่จะทำให้เกิดปมและตรึงไนโตรเจนร่วมกับพืชตระกูลถั่ว ดังนั้นการจำแนกแบบ cross-inoculation group หรือ plant-inoculation group จึงควรจะเป็นการจัดจำแนกที่สำคัญที่สุดและนิยมใช้กันในปัจจุบันถึงแม้จะมีความไม่แน่นอนเกิดขึ้นบ้างเป็นบางครั้ง (Burton, 1965)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ชนิดของไรโซเบียม (Species) และกลุ่มพืชตระกูลถั่วต่างๆ ที่ไรโซเบียมอาศัย

จีนัส	สปีชีส์	พืชตระกูลถั่ว
Allorhizobium	*A. undicola*	*Neptunia natant*
Azorhizobium	*Az. caulinodans*	*Sesbania rostata*
Bradyrhizobium	*B. elkanii* *B. japonicum* *B. liaoningense*	*Glycine max* *G. max* *G. max*
Mesorhizobium	*M. amorphae* *M. chacoense* *M. ciceri* *M. huakuii* *M. loti* *M. mediterranium* *M. plurifarium* *M. tianshanense*	*Amorphae fruticosa* *Prosopis alba* *Cicer arietinum* *Astragalus* *Loti* *Cicer arietinum* *Acacia, Leucaena* *Glycyrrhiza, Sophora and Clycine*
Methylobacterium	*M. nodulants*	*Crotalaria pedocarpa*
Rhizobium	*R. etli* *R. Galegae* *R. Gallicum* *R. giardinii* *R. hainanense* *R. huautlense* *R. leguminosarum* *R. mongolense* *R. phaseoli* *R. sullae* *R. tropici* *R. trifolii* *R. yanglingense*	*Phaseolus vulgaris* *Galege* *P. vulgaris* *P. vulgaris* *Centrosema, Desmodium, Stylosanthes, Tephrosia* *Sesbania herbacia* *Trifolium, Vicia* *Medicargo ruthenica* *P. vulgaris* *Hedysarum hedisari* *Leuceana, P. vulgaris* *Trifolium* *Amorphicarpaea,Trisperma, Corolliina varia and Gueldenstaedtia multiflora*
Sinorhizobium	*S. arboris* *S. fredii* *S. kostiense* *S. medicae* *S. meliloti* *S. saheli* *S. terangae* *S. xinjiangense*	*Acacia Senegal* *Prosposis shilensis* *G. max* *A. Senegal, P. chilensis* *Medicargo spp.* *M. sativa* *Sesbania* *Acacia, Sesbania* *G. max*

ที่มา :Sahgal and Johri, 2003

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้

ไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่วจะตรึงไนโตรเจนได้มากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับระดับของธาตุไนโตรเจนในดิน ถ้าดินขาดไนโตรเจนมาก การตรึงไนโตรเจนจะมีมากที่สุด ถ้าดินไม่ขาดไนโตรเจนพืชได้รับไนโตรเจนจากดินเพียงพอ การตรึงไนโตรเจนจะมีน้อยหรือไม่ตรึงไนโตรเจนเลย ดังนั้นถ้ามีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนลงไปในดินในปริมาณมากไรโซเบียมจะไม่ตรึงไนโตรเจน

ได้มีการประเมินการตรึงไนโตรเจนของพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ (ดังตารางที่ 2) จะพบว่าปริมาณของไนโตรเจนที่ไรโซเบียมตรึงได้นั้นจะเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของพืชตระกูลถั่วชนิดนั้นๆ โดยไม่จำเป็นต้องให้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนและถ้าหากสภาวะต่างๆ เหมาะสม มีไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนแล้ว นอกจากจะช่วยให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของถั่วนั้นสูงด้วยแล้ว เมื่อทำการไถกลบพืชตระกูลถั่วนั้นลงสู่ดิน โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่วที่ใช้เป็นปุ๋ยพืชสด เช่น พืชตระกูลถั่วจำพวกโสนชนิดต่างๆ ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในอัตราที่ค่อนข้างสูง เมื่อทำการไถกลบสู่ดินก็จะย่อยสลายและปลดปล่อยไนโตรเจนสู่ดินเป็นประโยชน์ต่อพืชที่ปลูกตามต่อไป

ตารางที่ 2 ปริมาณไนโตรเจนที่ถั่วชนิดต่างๆ ตรึงได้โดยประมาณในสภาพไร่นา

พืชถั่ว	ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้โดยประมาณ (กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ต่อปี)
ถั่วเหลือง	10-27
ถั่งเขียว	10-55
ถั่วลิสง	12-50
ถั่วพุ่ม	12-57
ถั่วแดงหลวง	7-11
ถั่วลันเตา	8-12
ถั่วมะแฮะ	27-45
ถั่วปากอ้า	7-88
ถั่วคาโลโป	59-72
ถั่วลาย	21-65
โสน	87-149

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ปริมาณไนโตรเจนที่ถั่วชนิดต่างๆ ตรึงได้โดยประมาณในสภาพไร่นา (ต่อ)

พืชถั่ว	ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้โดยประมาณ (กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ต่อปี)
โสนอัฟริกา	190
กระถินยักษ์	12-94
ถั่วอัลฟาฟ่า	37-46
ถั่วฝักยาว	12-57

ที่มา:FAO, 1984

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านการเกษตรมีความก้าวหน้าไปมาก ได้มีการค้นคว้าวิจัยหาสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีความเหมาะสมกับชนิดถั่วนั้นๆสามารถเข้าสร้างปมได้จำนวนมากและตรึงไนโตรเจนให้กับต้นถั่วชนิดนั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพจนมีการพัฒนาผลิตไรโซเบียมออกมาในรูปแบบของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำเร็จรูป ซึ่งปัจจุบันวิชาการเกี่ยวกับไรโซเบียมเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าไรโซเบียมสามารถใช้ทดแทนปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้เป็นอย่างดี ช่วยให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนการผลิตได้มากและยังช่วยเพิ่มผลผลิตคุณภาพของถั่วที่ปลูกอีกด้วย

จากผลการทดลองวิจัยถึงการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการปลูกถั่วเหลืองในสภาพไร่นาของเกษตรกรจะพบว่าปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมช่วยเพิ่มผลผลิตให้กับถั่วเหลืองเป็นอย่างดี (ตารางที่3และ 4)

ตารางที่ 3 แสดงผลผลิตของถั่วเหลืองในสภาพไร่นาเกษตรกร เมื่อใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมและไม่ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

วิธีการ	ผลผลิตเฉลี่ย(กิโลกรัมต่อไร่)		
	จังหวัดกาฬสินธุ์	จังหวัดอุดรธานี	จังหวัดหนองคาย
ไม่ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม	147.32	112.81	80.04
ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดผง(พีท)	217.35	220.80	233.59
ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดเหลว	220.00	284.11	247.60

ที่มา: กองปฐพีวิทยา, 2538

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 แสดงผลผลิตของถั่วเหลืองในสภาพไร่นาเกษตรกร เมื่อใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ไม่ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม และใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน(ตามอัตราแนะนำ)ที่จังหวัดขอนแก่น

วิธีการ	ผลผลิตเฉลี่ย(กิโลกรัมต่อไร่)
1. ไม่ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน	70.0
2. ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดผง(พีท)	284.8
3. ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดเหลว	319.1
4. .ใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนอัตรา 12 กก. N ต่อไร่	157.6

ที่มา: ศรัณยา และ วิทยา, 2541

เนื่องจากในปัจจุบันการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่วที่เป็นพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง ของเกษตรกรไทยพบว่าอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างต่ำ (วิทยา, 2545) ทั้งนี้อาจจะเกิดจากหลายๆสาเหตุ ได้แก่ ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับประโยชน์ของการนำเอาปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมไปใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตให้กับถั่วที่ปลูกนั้นมีการเผยแพร่สู่เกษตรกรน้อยและไม่มีการส่งเสริมอย่างจริงจัง หาซื้อปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมได้ยาก ทั้งนี้เพราะไม่มีการวางจำหน่ายเหมือนปุ๋ยเคมีหรือมีจำหน่ายแต่ก็น้อยแห่ง ทั้งๆที่ตามความเป็นจริงแล้วเกษตรกรสามารถที่จะใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมทดแทนปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะหากสภาพดินที่ใช้ปลูกถั่วมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ เช่น เป็นดินร่วนทรายหรือค่อนข้างเป็นดินทราย ถ้าหากมีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการปลูกถั่ว นอกจากจะช่วยเพิ่มผลผลิตของถั่วนั้นได้เท่ากับหรืออาจจะสูงกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนแล้วยังจะช่วยให้คุณภาพของถั่วดีด้วย โดยเฉพาะถั่วเหลืองที่เป็นพืชเศรษฐกิจที่เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น ใช้เป็นอาหารโปรตีนทดแทนอาหารโปรตีนจากเนื้อสัตว์ สกัดเป็นน้ำมันพืชและสามารถนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์อีกด้วย ปกติในแต่ละปีการผลิตเมล็ดถั่วเหลืองของเกษตรกรไทยได้ผลผลิตไม่เพียงพอสำหรับใช้ภายในประเทศโดยประมาณว่าผลิตได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของความต้องการใช้ภายในประเทศเท่านั้น นอกจากนี้ผลผลิตโดยเฉลี่ยต่อไร่ของถั่วเหลืองของไทยจะประมาณ 220 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งเป็นอัตราค่อนข้างต่ำ การที่จะเพิ่มผลผลิตต่อไร่ของเกษตรกรให้สูงขึ้นกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบันก็โดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการปลูกถั่วด้วยซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถจะช่วยได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจุบันแม้แต่ประเทศที่มีความเจริญทางด้านวิทยาการและเทคโนโลยีด้านต่างๆ ยังคงมีการนำปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมไปใช้ให้เป็นประโยชน์กับพืชตระกูลถั่วเพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนอย่างกว้างขวางและใช้กันมานานแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา เป็นต้น เกษตรกรในประเทศเหล่านี้ ทุกครั้งเมื่อปลูกถั่วจะใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมควบคู่ด้วยเสมอและมีโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมจำนวนหลายโรงงานเพื่อทำการผลิตจำหน่ายให้เกษตรกรและมีการผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ส่วนประเทศไทยส่วนที่รับผิดชอบในการผลิตอยู่ในส่วนของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร มีโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมแบบอุตสาหกรรมและมีกำลังผลิตได้ประมาณปีละ 200 ตัน สามารถนำไปใช้กับพื้นที่ปลูกถั่วได้ประมาณ 1 ล้านไร่ หากเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ที่ทำการปลูกถั่วของประเทศแล้วจะเพียงพอใช้ได้กับพื้นที่ปลูกประมาณ 15-20 เปอร์เซนต์ของพื้นที่ปลูกทั้งหมดเท่านั้น

วิธีการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมมี 2 วิธีการ คือ การคลุกหัวเชื้อไรโซเบียมกับเมล็ดถั่ว และอีกวิธีหนึ่งคือ การใส่หัวเชื้อไรโซเบียมลงไปในดิน สำหรับวิธีแรกนั้นหัวเชื้อไรโซเบียมจะถูกผสมกับเมล็ดโดยใช้สารที่ช่วยให้เชื้อติดเมล็ด เช่น แป้งเปียกชนิดเหลว สารละลายน้ำตาล 30 % หรือน้ำมันพืช โดยอัตราการใช้ที่พอเหมาะ เช่น เมื่อใช้กับถั่วเหลือง10 กิโลกรัม หรือถั่วลิสง 15 กิโลกรัม หรือถั่วเขียว 5 กิโลกรัม กับหัวเชื้อไรโซเบียม 200 กรัม จะใช้ปริมาณของสารที่ช่วยให้ติดเมล็ด 300 ml (นันทกร, 2529) เมื่อคลุกเชื้อกับเมล็ดเสร็จแล้วควรนำไปปลูกทันทีในดินที่มีความชื้น โดยใช้ดินกลบเพื่อให้ดินรักษาความชื้นไว้ อย่างไรก็ดีในดินที่เป็นกรดมากๆ อาจใส่หินปูน หรือ หินฟอสเฟสลงไปเคลือบเมล็ดถั่วที่คลุกเชื้อแล้วอีกชั้นหนึ่งเพื่อลดความเป็นกรดของดินบริเวณรอบๆ เมล็ด ซึ่งจะทำให้เชื้อไรโซเบียมมีชีวิตอยู่รอดได้โดยไม่ถูกทำลายไปในสภาวะที่เป็นกรด

การใช้เชื้อไรโซเบียมอีกวิธีหนึ่ง คือ การใส่เชื้อไรโซเบียมลงไปในดินก่อนทำการปลูก เกษตรกรสามารถเลือกใช้วิธีนี้ได้เมื่อเมล็ดถั่วที่ต้องการจะปลูกคลุกด้วยสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่เป็นอันตรายต่อเชื้อไรโซเบียม เช่น สารฆ่าเชื้อรา เป็นต้น หรือเมื่อต้องการเชื้อไรโซเบียมปริมาณมากเพื่อเอาชนะเชื้อที่มีอยู่ในดิน ซึ่งอาจเป็นเชื้อไรโซเบียมที่ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน การใส่เชื้อไรโซเบียมลงไปในดินโดยตรงนี้สามารถทำได้ 2 ลักษณะ คือ ใส่ในรูปของแข็ง เช่น ผสมหัวเชื้อไรโซเบียมกับดิน ทราย หรือขี้เถ้าแกลบ แล้วหยอดลงไปในหลุมปลูก หรือใส่ในรูปของเหลวโดยนำหัวเชื้อที่อยู่ในรูปผงมาละลายน้ำผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปฉีดพ่นลงบนดินที่ต้องการจะปลูก โดยต้องระมัดระวังว่าเมื่อผสมน้ำแล้วอัตราส่วนของเชื้อที่จะใช้กับเมล็ดจะต้องไม่น้อยกว่าที่กำหนดไว้

นอกจากนี้การใช้เชื้อไรโซเบียมในสภาพไร่ยังจะต้องคำนึงถึงปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ ที่จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการเข้าสร้างปม และการตรึงไนโรเจนต่ำลงด้วย เช่น ค่าพีเอช หรือค่าความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นกรดด่างของดิน เนื่องจากในสภาพดินที่เป็นกรดหรือด่างมากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อการเพิ่มปริมาณและการเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม นอกจากนี้ธาตุอาหารในดินยังมีบทบาทสำคัญที่จะส่งผลกระทบต่อการสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุไนโตรเจน โดยดินที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนต่ำถั่วจะสร้างปมกับเชื้อไรโซเบียมได้ดีมาก และสามารถตรึงธาตุไนโตรเจนจากอากาศได้เพียงพอต่อความต้องการของพืช ในขณะที่ดินซึ่งมีปริมาณธาตุไนโตรเจนสูงจะทำให้ถั่วสร้างปมกับเชื้อไรโซเบียมได้ช้า หรือไม่สร้างปมเลย แต่ถ้าสามารถสร้างปมได้ปมนั้นก็อาจไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ในทางตรงกันข้ามถ้าดินที่จะทำการปลูกขาดธาตุอาหารเหล่านี้ คือ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โมลิบดีนัม เหล็ก และโบรอน ก็จะทำให้ปมถั่วมีขนาดเล็กลง และส่งผลกระทบโดยตรงต่อขบวนการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมอีกด้วย

2.2 การผลิตเชื้อไรโซเบียมสำหรับใช้คลุกเมล็ดพืชตระกูลถั่ว

หัวเชื้อไรโซเบียมในปัจจุบันได้จัดทำขึ้นในหลายรูปแบบในเชิงการค้า เช่น ในรูปแบบของการคลุกเชื้อไรโซเบียมลงในวัสดุพาหะ เช่น พีท (peat) ถ่านหินลิคไนท์ ผงถ่าน ดินเหนียว อะพาไทท์ เวอร์มิคิวไลท์ หรือปุ๋ยหมักที่ย่อยสลายดีแล้ว (Burton, 1979) หรือใช้ในรูปของเชื้อไรโซเบียมผงแห้งโดยวิธีการ spray dry และ freeze dry เชื้อไรโซเบียมในรูปของเหลว หรือเชื้อไรโซเบียมผสมสารสังเคราะห์ แต่รูปแบบของหัวเชื้อไรโซเบียมที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบัน คือ ในรูปแบบของเชื้อที่ผสมอยู่กับพีท (Brick, 1999) การใช้ผงพีท ในหลายๆประเทศแม้จะพบว่ามีแหล่งดินพีทมากมายแต่อาจจะมีแหล่งดินพีทที่มีคุณภาพเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นวัสดุพาหะในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมได้เพียงไม่กี่แหล่งเท่านั้น เช่น ในประเทศโคลัมเบีย มีแหล่งดินพีทมากมาย แต่จากการตรวจสอบพบว่ามีเพียง 1-2 แหล่งเท่านั้นที่พอจะนำไปใช้เป็นวัสดุพาหะในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมได้ดี

2.2.1 การผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมในรูปผงพีท

จากผลการศึกษาและทดลองพบว่าถ้าหากมีการใช้ดินพีทที่มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ที่ดี เมื่อใช้เป็นวัสดุพาหะในการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมแล้ว จะช่วยทำให้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมที่ทำการผลิตออกมามีคุณภาพดีด้วย ดังเช่น ของออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีแหล่งของดินพีทที่มีคุณภาพดีและปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมที่ผลิตออกมาจำหน่ายให้เกษตรกรนั้นนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ดังตาราง3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 แสดงคุณสมบัติดินพีทที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมของDEMILCOสหรัฐอเมริกา

Peat contents	Amounts
Total nitrogen	1.5-2.0%
Organic matter	80-85%
Crude ash	15-20%
pH	4.5-5.0

ที่มา: Burton, 1979

สำหรับประเทศไทยนั้นแหล่งดินพีทที่นำมาใช้เพื่อการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมในปัจจุบันส่วนใหญ่จะได้จากแหล่งดินพรุ ซึ่งมีอยู่มากมายทางภาคใต้ เช่น จังหวัดนาราธิวาส ยะลา ปัตตานี เป็นต้น ซึ่งคุณภาพค่อนข้างจะต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับของสหรัฐอเมริกา (ตารางที่ 4)

ตาราง 6 แสดงคุณสมบัติดินพีทที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมของไทย

ส่วนประกอบของพีท	ประมาณ
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	0.8-1.3%
ปริมาณอินทรียวัตถุ	55-75%
ความสามารถในการอุ้มน้ำ	70-145%
ความเป็นกรด-ด่าง	4.5-5.0

ที่มา : กองปฐพีวิทยา. 2545

สำหรับความละเอียดของอนุภาคดินพีทนั้น จะกำหนดไว้ประมาณ 80-100 เมส (mesh) หรือประมาณ 0.18-0.15 มิลลิเมตร เนื่องจากดินพีทส่วนมากจะมีสภาพของความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างต่ำโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วงประมาณ 4-5 ซึ่งไรโซเบียมส่วนมากไม่สามารถเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนหรืออาศัยอยู่ได้ จึงจำเป็นต้องปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของดินพีท ให้อยู่ในช่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหมาะสมกับความต้องการของไรโซเบียมที่จะอาศัยอยู่ได้ ด้วยปูนแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) คือช่วง pH ประมาณ 6.5-7.0

ระบบการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมจากผงพีทในปัจจุบัน

ประเทศต่างๆ ที่มีการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมจำหน่ายในปัจจุบัน สามารถแบ่งวิธีการผลิตได้เป็น 2 ระบบ (Burton, 1979)

1. ระบบที่ผลิตโดยทำให้วัสดุพาหะปลอดเชื้อหรือฆ่าเชื้อก่อน (Sterile Carrier)

การผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมระบบนี้กระทำโดยการนำเอาวัสดุพาหะดินพีทที่ปรับสภาพความเป็นดรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง 6.5-7.0 ด้วยปูนแคลเซียมคาร์บอเนตเสียก่อน แล้วจึงนำไปบรรจุลงในถุงพลาสติกชนิดที่มีความหนาประมาณ 0.038-0.076 มิลลิเมตร ซึ่งความหนาของถุงพลาสติกขนาดนี้จะช่วยเก็บรักษาความชื้นได้ดีและอากาศก็สามารถถ่ายเทเข้าออกจากถุงได้ดี จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อ ซึ่งการฆ่าเชื้อวัสดุพาหะสามารถทำได้หลายวิธี แต่ที่นิยมใช้กันอยู่ทั่วไปมี 2 วิธี วิธีแรกคือ การนึ่งฆ่าเชื้อ(Autoclave หรือ Steam Sterilization) วิธีนี้ต้องบรรจุวัสดุพาหะลงในถุงพลาสติกชนิดทนร้อน หรือ Polypropylene จากนั้นนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 3-4 ชั่วโมง วิธีการฆ่าเชื้อแบบที่สองคือการใช้รังสีแกมม่า (Gamma-irradiation) วิธีนี้ต้องบรรจุวัสดุพาหะที่จะฆ่าเชื้อลงในวัสดุพาหะชนิดธรรมดา(ถุงเย็น) จากนั้นนำไปผ่านขบวนการฉายรังสีแกมม่าที่ระดับความเข้มข้นของรังสี 5 แมกกาเรด (Mrad)

การฆ่าเชื้อจะได้ผลดีขึ้นเมื่อวัสดุมีความชื้นประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ การใช้ความชื้นมากว่านี้จะไปลดปริมาณของไรโซเบียมที่จะใส่ลงไปในวัสดุพาหะนั้น โดยปกติเมื่อผลิตหัวเชื้อโดยใช้วัสดุพาหะเป็นผงพีทขั้นตอนสุดท้ายจะมีความชื้นประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์

2. ระบบที่ผลิตโดยวัสดุพาหะไม่ฆ่าเชื้อ (Non sterilie carrier)

การผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมในระบบนี้ทำโดยการนำไรโซเบียมที่เลี้ยงไว้ในอาหารได้ปริมาณและจำนวนเซลล์ตามที่ต้องการแล้ว จึงนำไปผสมกับวัสดุพาหะที่ทำการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วงประมาณ 6.5-7.0แล้ว ด้วยเครื่องผสมไรโซเบียมขนาดใหญ่ โดยปกติแล้วอัตราส่วนผสมของไรโซเบียมต่อดินพีทที่ทำการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างแล้วจะอยู่ในช่วงประมาณ 1 ต่อ 1 หรือ 1 ต่อ 2 ขึ้นอยู่กับแต่ละประเทศที่ดำเนินการ เช่น สหรัฐอเมริกาใช้อัตราส่วนผสม 1 ต่อ 1 สำหรับกรมวิชาการเกษตรใช้ประมาณ 1 ต่อ 2 แล้วปรับให้มีความชื้นประมาณ 35-40 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การผลิตผงเชื้อไรโซเบียมจากผงพีทในประเทศไทย

การผลิตเชื้อไรโซเบียมในประเทศไทยประกอบด้วยขั้นตอนการผลิต 3 ขั้นตอน คือ การเตรียมหัวเชื้อ การเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในอาหารเหลว และการผสมเชื้อไรโซเบียมกับสารผสม (กองปฐพีวิทยา, 2534)

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อ

เริ่มดำเนินการจากการเติมอาหารเหลวลงในขวดเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อไรโซเบียมเจริญอยู่บนอาหาร yeast extract manitol agar นำไปเข้าเครื่องเขย่าเพื่อให้เซลล์หลุดออกมา หรืออาจเตรียมหัวเชื้อโดยการเตรียมอาหารเหลวใน flask ขนาดเล็กก่อน แล้วจึงใช้ไซริงจ์ฉีดเชื้อเข้าไป นำไปเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำหัวเชื้อมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยการย้อมสีแกรม แล้วส่องกล้องจุลทรรศน์ดูว่ามีเชื้ออื่นปะปนมาหรือไม่

ขั้นตอนที่ 2 การเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในอาหารเหลว

ใช้อาหารเหลว yeast extract manitol borth โดยเตรียมใน flask หรือในขวดขนาดใหญ่ ขั้นแรกเตรียมอาหารสูตรดังกล่าว ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ถึง 2 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาตรของอาหารเหลว เมื่ออาหารเย็นลงจึงถ่ายหัวเชื้อลงไป ให้อากาศที่ปราศจากเชื้ออื่นเพื่อให้การเจริญเติบโตของเชื้อไรโซเบียมเป็นไปได้ด้วยดี เชื้อไรโซเบียมจะเพิ่มจำนวนไปเรื่อยๆ ภายใน 3-4วัน ปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นเป็น 10^9 cells/ml ซึ่งจะเป็นระยะปลายของ log phase เมื่อถึงระยะนี้ก็พร้อมที่จะนำไปผสมกับพีทได้

ขั้นตอนที่ 3 การผสมเชื้อไรโซเบียมกับพีท

เมื่อเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมในอาหารเหลวจนได้ปริมาณสูงสุดแล้ว นำไรโซเบียมเหล่านั้นไปผสมกับพีทที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.5 แล้ว ผสมเชื้อให้มีความชื้นอยู่ประมาณ 40ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ บ่มไว้นาน 2 ถึง 3 วัน ร่อนผ่านตะแกรงจากนั้นบรรจุลงถุงพลาสติก ถุงละ 200 กรัม ปิดถุง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมจากผงพีทพบว่ามีข้อจำกัดในด้านการนำไปใช้กล่าวคือต้องนำไปผสมกับสารเหนียว เช่น น้ำข้าว น้ำมันพืช น้ำเชื่อม เป็นต้น ทำให้มีความยุ่งยากในการใช้งานและอายุการใช้งานของจุลินทรีย์ที่เก็บโดยวิธีนี้จะสั้น เนื่องจากมีข้อจำกัดต่อจุลินทรีย์ในด้านอาหารและอากาศ ซึ่งจากการทดลองของ Feng (2002) พบว่าเชื้อ *Rhizobium* sp สายพันธุ์ SU343 ที่ใส่ลงในพีทมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 4.8×10^8 เซลล์ต่อกรัมของผงพีท เป็น 1.3×10^8 เซลล์

ต่อกรัมของผงพีท ภายในระยะเวลาหนึ่งวัน ในทำนองเดียวกันกับเชื้อ *Bradyrhizobium lupini* สายพันธุ์ WU425 ที่ใช้ผสมลงในพีทก็พบว่าจำนวนเชื้อลดลงจาก 7.2×10^8 เป็น 1.4×10^8 เซลล์ต่อกรัมของผงพีทภายในเวลา1วัน และหลังจากนั้นจึงค่อยๆลดลงช้า จนกระทั่งเหลือ 1.1×10^8 เซลล์ต่อกรัมของพีทหลังจากเก็บไว้นาน 85 วัน ซึ่งนอกจากนี้แล้วเขาได้ทำการทดสอบเกี่ยวกับข้อจำกัดในด้านอาหาร โดยการสะกัดสารละลายจากผงพีทที่เก็บไว้นาน 14 วัน แล้วนำมาทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นใช้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ SU343 ที่มีปริมาณเชื้อประมาณ$1.8 \times 10^8 \pm 0.3 \times 10^8$ cells ml^{-1}ใส่ลงในอาหารและทำการวัดการ พบว่าหลังจาก 3 วัน และ 10วันมีจำนวนเชื้อ $1.8 \times 10^8 \pm 0.4 \times 10^8$ cells ml^{-1} และ $1.0 \times 10^8 \pm 0.2 \times 10^8$ cells ml^{-1}ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีเมื่อระยะเวลาผ่านไปปริมาณธาตุอาหารที่มีอยู่ในผงพีทก็มีจำนวนลดลงส่งผลให้มีข้อจำกัดในด้านธาตุอาหารต่อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้จุลินทรีย์ลดจำนวนลง

นอกจากนี้ยังพบว่าสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมก็ส่งผลต่อเชื้อไรโซเบียมได้ เช่น ความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนภายในถุงบรรจุหัวเชื้อผงพีทจะลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนจำนวนมากในช่วงการเจริญเติบโตระยะแรก ซึ่งเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ที่บรรจุอยู่ในถุงที่ปิดสนิทจะอยู่ในสภาพที่ขาดออกซิเจนได้ (Feng, 2002)

2.2.2 ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดเหลว

การใช้เชื้อไรโซเบียมในอาหารวุ้นในปัจจุบันไม่นิยมใช้กันแล้ว ยกเว้นในการทดลองขนาดเล็กเท่านั้น ส่วนการใช้เชื้อจากอาหารเหลวนั้นยังมีการใช้กันอยู่บ้างทั้งในยุโรปและอเมริกา ปกติการใช้เชื้อจากอาหารเหลวนั้นต้องใช้เป็นจำนวนมาก เพื่อให้มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับการใช้เชื้อในพีทการใช้เชื้อในรูปที่เป็นอาหารวุ้นหรืออาหารเหลวนี้จะให้ผลการตอบสนองที่ต่ำกว่าการใช้เชื้อในผงพีท เพราะพีทจะช่วยป้องกันอันตรายให้กับไรโซเบียมและส่งเสริมการอยู่รอดของเชื้อไรโซเบียมบนผิวเมล็ดถั่วได้ดีกว่า

วิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดเหลวมีวิธีการโดยสังเขปดังนี้ (กองปฐพีวิทยา, 2545)

1. ทำการปลูกถ่ายเชื้อไรโซเบียมลงไปใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 150 ml

2. เลี้ยงขยายเชื้อโดยเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28°C ความเร็ว 200 rpm จนกระทั่งเชื้ออยู่ในระยะ late log phase (ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 cells/ml) ซึ่งเชื้อที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น สำหรับปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดเหลวต่อไป

3. ใส่เชื้อเริ่มต้นจำนวน 150 ml ลงไปใน Elenmeyer flask ขนาด 2,000 ml ซึ่งมีอาหาร YEM ที่ฆ่าเชื้อแล้วอยู่ภายใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เลี้ยงขยายเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C โดยใช้เครื่องปั๊มอากาศผ่านตัวกรองอากาศขนาด 0.45 μm ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อจนกระทั่งเซลล์มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 10^9 cells/ml

5. บรรจุเชื้อเหลวที่ได้จำนวนลงในถุงที่ทำจาก polypropylene จำนวน 20 ml หลังจากนั้นปิดผนึกปากถุงโดยใช้เครื่องปิดความร้อน (heat sealer) ปุ๋ยชีวภาพชนิดเหลวที่ได้นี้จะต้องเก็บที่อุณหภูมิเหมาะสม (ประมาณ 4°C สำหรับการเก็บเป็นระยะเวลานาน)

6. ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมชนิดเหลวจำนวน 20 ml ต่อเมล็ด 1 kg. โดยไม่ต้องใช้สารเหนียวช่วยในการเกาะติดเมล็ด

2.2.3 การผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมโดยการทำเป็นผงแห้ง

มีการใช้วิธีทำแห้งเพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง โดยการนำน้ำออกและไม่ให้เกิดความชื้นอีก ส่วนใหญ่ใช้เก็บเชื้อรา ซึ่งต้านทานต่อความแห้งมากกว่าเชื้อกลุ่มอื่น วิธีการนี้ใช้ได้กับเชื้อยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น การทำแห้งโดยใช้วัสดุต่างๆ มีดังนี้

1. ทราย ดิน ซิลิกาเจล และดินเบา เชื้อราที่สร้างสปอร์รอดชีวิตแบบแห้งในดินหลายเชื้อเก็บได้นานถึง 5 ปีโดยลักษณะไม่เปลี่ยนแปลงไป

2. แผ่นกระดาษหรือดิสก์ (paper disk)การเก็บเชื้อบนแผ่นกระดาษใช้ได้กับเชื้อยีสต์และ staphylococci หลังจากทำแห้งแล้วเก็บแผ่นกระดาษหรือดิสก์ไว้ในห่อฟอยด์ภายในภาชนะปิดไม่ให้อากาศเข้า หรือระหว่างแผ่นกระดาษมีสารที่ทำให้ยึดติดกันได้ วิธีการนี้มีราคาถูกสำหรับส่งเชื้อทางไปรษณีย์ได้จำนวนมาก

3. Predried plugs วัสดุหลายชนิด เช่น แป้ง เปปโตนหรือเดกซแตรน เมื่อสัมผัสกับสารละลายเชื้อจะช่วยดูดซับก่อนนำไปทำแห้งอีกครั้ง และเก็บภายใต้สุญญากาศ วิธีการนี้ใช้ได้ดีกับเชื้อที่บอบบาง เช่น *Neisseria gonorrthoeae และ Vibrio cholereae*

4. เจลาตินดิสก์ (gelatin disk) ทำโดยผสมเชื้อลงในอาหารเหลวเจลาตินนำไปหยดและปล่อยให้แข็งบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วทำให้แห้งหรือทำแห้งแบบเยือกแข็ง

สารเคลือบเซลล์

การเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการทำแห้งนั้นสามารถเก็บเชื้อให้รอดชีวิตได้เป็นระยะเวลายาวนาน รวมทั้งสามารถเก็บเชื้อได้เป็นจำนวนมากอีกด้วย สิ่งจำเป็นที่ต้องใช้ในการทำแห้งคือการเลือกใช้สารเคลือบเซลล์เพื่อป้องกันความร้อนหรือความเย็น (cryoprotectants หรือ protective substances) ที่เกิดขึ้นระหว่างขบวนการทำแห้งที่เหมาะสมต่อเชื้อแต่ละประเภทจะสามารถทำให้เชื้อมีชีวิตรอดได้นานแตกต่างกัน สารประกอบที่นิยมใช้เป็นสารป้องกันเชื้อจากความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ร้อน หรือความเย็น และอันตรายอื่นๆ ระหว่างการทำแห้งนี้ ได้แก่ สคิมมิลค์ น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล (glycerol) โซเดียมกลูตาเมต (sodium glutamate) หรือส่วนผสมของน้ำตางกลูโคสกับซีรัม

โดยทั่วไปผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งมีกรดอะมิโน (amino) และอะมิโนชูการ์ (amino sugar) ต่อโยงกัน มีกรดไตโคอิก (teicoic acid) หรือลิโพโพลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ลิพิด โปรตีน ลิโพโปรตีน (lipoprotein) และคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะสปอร์ของแบคทีเรียจะมีสารแคลเซียมไดปิโคลิเนต (calcium dipicolinate) ประกอบอยู่ด้วย ส่วนประกอบที่อยู่บริเวณผิวเซลล์น่าจะมีปฏิกิริยาหรือเกี่ยวข้องกับสารเคลือบเซลล์ นอกจากนี้น้ำของเซลล์จุลินทรีย์ก็มีบทบาทต่อการรอดชีวิตทั้งในระหว่างกระบวนการทำให้แห้งและภายหลังกระบวนการ (สมบูรณ์, 2544)

ประเภทของสารเคลือบเซลล์

สามารถแบ่งกลุ่มสารเคลือบเซลล์ตามคุณสมบัติความเป็นกรด ด่าง การเป็นสารรีดิวซ์ และขนาดของโมเลกุล ดังนี้

- สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกกรด (acid monomers) เช่น กลูตาเมต แอสปาราจีน (asparagines) มาเลต (malate) และแอสปาเตต (aspartate)

- สารประกอบโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเป็นกลาง (neutral monomers) เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แลคโตส (lactose) ซูโครส แรฟฟิโนส (raffinose) ซอร์บิตอล (sorbital) ไซลิทอล (xylitol) อินอะซิตอล และ ดีแอล-ทรีโอนีน (DL-threonine)

- สารประกอบโมเลกุลเดี่ยวจำพวกด่าง (basic monomers) เช่น ไลซีน (lysine) และ อาร์จินีน (arginine)

- สารประกอบพวกพอลิเมอร์ และดีเกรเดทีฟ (polymer and degradatives) เช่น อัลบูมิน (albumin) เจลาติน มิวซีน เปปโตน แป้ง เดกสตริน เปคติน ส่วนสกัดจากเนื้อ ส่วนสกัดจากยีสต์ พอลิไวนิลไพโรลิโดน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และ ฟีคอล

- สารประกอบธรรมชาติ (natural substances) เช่น สคิมมิลค์ และ ซีรัม

- สารประกอบจำพวกรีดิวส์ (reducing agents) เช่น แอสคอร์เบต ซีสทีอีน ไฮดรอกซีลามีน และเซมิคาร์บาไซด์

ผลของสารเคลือบเซลล์ที่มีต่อการรอดชีวิตของเชื้อ

การเติมสารป้องกันความเย็นนั้นสามารถเลือกใช้ได้แตกต่างกันโดยอาจเตรียมเป็นสารละลายชนิดเดียวสำหรับผสมกับเชื้อ เช่น สารละลายของสคิมมิลค์ ซูโครส กลูโคส หรืออาจ

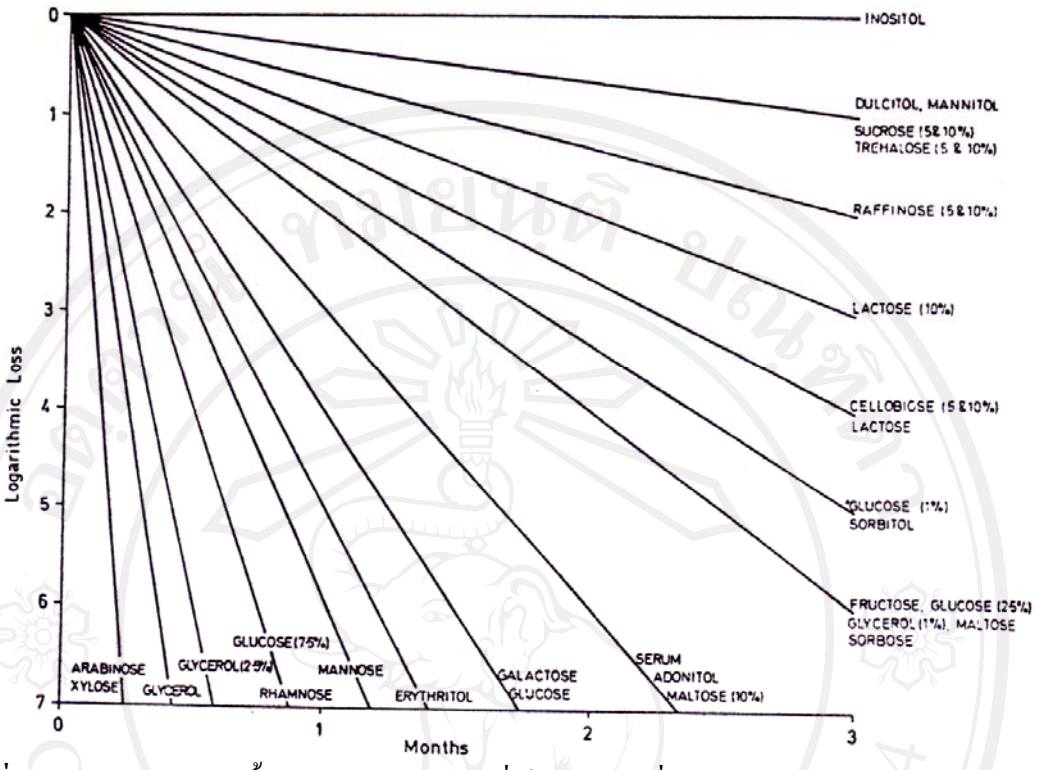
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมเป็นส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรตกับซีรัม การจะเลือกใช้สารชนิดใดและต่อเชื้อประเภทใดนั้น ควรมีการตรวจสอบเชื้อภายหลังจากการทำแห้งก่อน ดังเช่นการทดลองของ Redway (1974) ที่ตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ *Haemophilus suis* เมื่อเก็บรักษาเชื้อที่ทำแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 45°C โดยตรวจสอบผลเป็นช่วงๆ ภายในระยะเวลา 3 เดือน การทดลองนี้ใช้คาร์โบไฮเดรตเข้มข้น 5 % ผสมกับซีรัมของม้า ผลการตรวจสอบพบว่าส่วนผสมของอินอะซิตอลกับซีรัมจะทำให้เชื้อรอดชีวิตมากที่สุด แต่ส่วนผสมของอะราบิโนสไซโลสกับซีรัม จะทำให้เชื้อรอดชีวิตน้อยที่สุด

กิจกรรมของสารเคลือบเซลล์จะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปสารที่ช่วยป้องกันได้ดีต้องมีหมู่ไฮโดรเจนบอนด์อยู่ในโมเลกุลสามหมู่หรือมากกว่าและมีหมู่ที่ไอโอโนสได้อยู่ด้วย คือมีหมู่อะมิโนอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาคาร์บอน มีหมู่คาร์บอกซีอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาและแกมม่าและมีส่วนของโมเลกุลระหว่างหมู่แกมม่า คาร์บอกซีและหมู่ไฮโดรเจนบอนด์ พบว่าการเติมสารจำพวกที่มีหมู่อะมิโน จะมีส่วนลดพิษของอนุมูลคาร์บอนิลได้ ในสารประกอบจำพวกน้ำตาลและพอลิแอลกอฮอล์มีหมู่ไฮดรอกซีมากกว่าห้าหมู่ซึ่งอาจช่วยในการป้องกันเซลล์จากอันตรายได้ เช่น ไซลิทอลมีผลป้องกัน แต่อะริทรีตอลไม่มีผลป้องกัน นอกจากนี้ขนาดของโมเลกุลก็มีส่วนสำคัญ เช่น กลูตาเมต มีกิจกรรมสูงเมื่อเทียบกับสารจำพวกแอลฟ่าอะมิโนไดคาร์บอกซิเลตซอร์บิตอล สามารถช่วยป้องกันได้แต่แมนิตอลและดูลซิตอลไม่มีผลในการป้องกัน สิ่งสำคัญที่ค่อนข้างซับซ้อนอีกประการหนึ่ง ก็คือ สารเคลือบเซลล์ต้องสามารถป้องกันเชื้อเชื้อแห้งจากผลทางกายภาพระหว่างที่สภาวะแวดล้อมของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไป เช่น กลีเซอรอล และ dimethylsulfoxide ความเข้มข้น 0.5 M จะซึมเข้าสู่เซลล์และช่วยลดความเสียหายเมื่อถูกขจัดน้ำออก สารประกอบขนาดใหญ่ เช่น ซีรัม อัลบูมิน เดกซแตรน ความเข้มข้น 10^{-5}+10^{-3} M จะไม่เข้าสู่เซลล์แต่จะรวมอยู่ที่ผิวของเซลล์ และป้องกันการสัมผัสกับอากาศ

การรอดชีวิตของเชื้อที่ทำแห้งนั้นขึ้นอยู่กับน้ำที่เป็นองค์ประกอบภายในของเซลล์ และผลของปฏิกิริยาของสารเคลือบเซลล์กับองค์ประกอบของผิวเซลล์หรือสารที่มีอยู่ภายในเซลล์ สารเคลือบเซลล์จะทำให้อิเลกโตรไลต์เป็นกลางไม่ทำให้ความสามารถเลือกนำสารเข้าออกเซลล์เมมเบรนเปลี่ยนแปลงหรือสูญไป และสารป้องกันความเย็นยังป้องกันไม่ให้เชื้อสัมผัสกับอากาศในขณะที่เปิดเชื้อออกมาเพื่อนำไปใช้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2 การรอดชีวิตของเชื้อ *Haemophilus suis*ที่เก็บรักษาไว้ที่ 45°C ภายหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยใช้ซีรัมของม้าผสมกับคาร์โบไฮเดรต 5 % หรือตามที่ระบุไว้เป็นสารป้องกันความเย็น (ที่มา : Redway and Lapage, 1974)

การเคลือบเซลล์ แม้ว่าจะเป็นการทำให้สามารถเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ให้อยู่ได้นานอยู่แล้ว แต่ก็มีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่ออายุการใช้งานของหัวเชื้อไรโซเบียม ซึ่งปัจจัยเหล่านั้นก็คือ อุณหภูมิที่เก็บผงแป้ง และเปอร์เซ็นต์ความชื้นของผงแป้ง (Somaseqaran และHoben, 1994 อ้างโดย Pedro *et al*, 2002) โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บผงแป้งก็มีอิทธิพลต่อการอยู่รอดของเซลล์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บคือ 4 °C และ15 °C (Corcoran, 2004) ซึ่งจะมีการลดลงของเซลล์น้อย

2.2.3.1 การทำให้เชื้อจุลินทรีย์แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry)

วิธี Freeze dry เป็นวิธีที่ใช้ในการเก็บรักษาแบคทีเรีย แอคติโนมัยซิส และ ยีสต์ จากการศึกษาค้นคว้าพบว่ายังไม่เคยมีการใช้วิธีการนี้กับเชื้อไรโซเบียม ซึ่งวิธีการนี้เป็นการสกัดน้ำออกจาก ตัวอย่างโดยที่ตัวอย่างยังคงสภาพเดิม และสามารถที่จะเก็บได้ง่ายในอุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีแช่แข็งเชื้อ เป็นการใช้หลักการทางฟิสิกส์ที่เรียกว่า sublimation ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนรูปของสะสารจากของแข็งกลายเป็นไอ โดยที่ไม่ผ่านการเป็นของเหลว(ระเหิด) (Senawong,ไม่ระบุ ค.ศ.)ในการสะกัดน้ำออกจากตัวอย่างประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1)แช่แข็งสารละลาย (Freezing) เพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ

2) หลังจากแช่แข็งตัวอย่างจะถูกใส่ในเครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum) ซึ่งจะทำให้เกิดการระเหิด ตัวอย่างเหลวสามารถที่จะทำให้แข็งโดยการเก็บไว้ใน vacuum และทำให้อุณหภูมิของตัวอย่างลดลงโดยวิธีการระเหยเย็น (evaporative cooling)จนกระทั่งตัวอย่างแข็ง ประมาณ 15% ของน้ำในตัวอย่างเหลวจะหายไป (Lisa, 1988)

3)หลังจากที่ระเหิดแล้วนำตัวอย่างออกจากเครื่อง เพื่อที่จะลดปริมาณน้ำที่ติดอยู่กับของแข็งที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายให้มีความชื้นอยู่ที่ 1-4% โดยใช้ เครื่องดูดแห้งสุญญากาศ (vaccum dryer) (Maa, 2000)

การFreeze dry หรือ Lyophilization เป็นการหลีกเลี่ยงการเสื่อมสภาพจากการได้รับความร้อน โดยการแช่แข็งในระหว่างที่ทำให้เซลล์แห้งเป็นวิธีที่ใช้ในการเก็บรักษา ยีสต์ แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซิสที่มีความไวต่อความแห้ง (desiccation), แสง, ออกซิเจน, osmotic pressure, surface tension และปัจจัยอื่น ๆ (Khursheed, 1990)เป็นที่นิยมทำกัน เนื่องจากมีความสะดวกซึ่ง Ampoules ที่ใช้ในการบรรจุเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งและทำให้แห้งแล้ว นั้นมีการปิดผนึกสนิท ในลักษณะของสุญญากาศ ซึ่งง่ายในการจับ หรือ วางในระหว่างการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการและง่ายต่อการขนส่งเนื่องจากไม่จำเป็นที่จะต้องแช่เย็น

Toshiru *et al.* (2005) พบว่า หลังจากการเก็บยีสต์ไว้โดยวิธีการแช่แข็งเชื้อ (freeze dry) จำนวน 101สายพันธุ์ เป็นเวลานาน 1 ปี ปรากฏว่าประสบความสำเร็จ 99.0% (100/101) มีเพียงสายพันธุ์ Candida เท่านั้นที่ไม่สามารถอยู่รอดได้ ส่วนแบคทีเรียจากการทดลอง 1,996 สายพันธุ์ พบว่าสามารถอยู่รอด 1,992 สายพันธุ์ หลังจากที่ทำการเก็บเป็นเวลา 1 ปี มีเพียงสายพันธุ์ Lactobacillus curvatus และ Pseudomonas fluorescens เท่านั้นที่ไม่สามารถอยู่รอดได้ และพบว่า แอคติโนมัยซิสจากการทดลองซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสายพันธุ์ Streptomyces สามารถอยู่รอดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.3.2 การSpray dry เชื้อจุลินทรีย์ (การอบแห้งแบบพ่น)

การอบแห้งแบบพ่น เป็นวิธีการที่ใช้ในพ่นสารละลายให้เป็นละออง เข้าสู่ห้องอบที่มีอากาศร้อนโดยละอองดังกล่าวมีพื้นที่ผิวต่อหน่วยสูง และมีการกระจายลอยตัวอยู่ในอากาศ จะทำให้เกิดการอบแห้งอย่างมีประสิทธิภาพ วิธีนี้ใช้ในการผลิตเม็ดวัสดุแห้งๆที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม

และมีความสม่ำเสมอสูง โดยทั่วไปแล้ววิธีการนี้นิยมใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร (Frederick, 2000) และในปัจจุบันได้มีการนำวิธีการพ่นแห้งมาใช้ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด รวมทั้งใช้ในทางการแพทย์ แต่ในทางด้านการเกษตรยังไม่พบเป็นที่แพร่หลาย

การทำงานของ spray dryer เบื้องต้น

กระบวนการของ spray dryer เริ่มจาก อากาศจะถูกดูดผ่าน filter และผ่านตัวให้ความร้อน จากนั้นจึงเข้าสู่ห้องอบแห้ง (drying chamber) ส่วนวัตถุดิบที่ใช้ spray (feed) ควรมีลักษณะเหลว จากนั้นสารละลายของเหลวจะถูกดูดโดยปั๊มผ่านอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดละอองฝอยภายในห้องอบและจุดสัมผัสกับอากาศร้อนทำให้เกิดการระเหยของน้ำอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิกระเปาะเปียกเล็กน้อย จะได้ผงผลิตภัณฑ์ที่ตกลงสู่ด้านล่างของ drying chamber และผงบางส่วนที่หลุดมากับอากาศจะถูกแยกโดยใช้ cyclone จนได้ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการอบด้วย spray dryer นั้นประกอบด้วย 4 กระบวนการ (Mosters,1976) คือ

1. การทำให้ feed กระจายตัวเป็นละออง (Atomization of feed)

กระบวนนี้ทำให้ feed เป็นละอองโดยใช้ atomizer ซึ่งถือว่าเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของ spray dryer โดยลักษณะของ atomizer มี 3 ชนิด คือ

1.1 Rotary Atomizer

atomizer ชนิดนี้ feed จะไหลลงบนจานหมุน ซึ่งใกล้กับจุดศูนย์กลางโดยจานหมุนจะมีความเร็วรอบสูงประมาณ 5,000-10,000 รอบต่อนาที และ feed จะถูกเหวี่ยงออกด้านข้างกระจายเป็นละอองโดยขนาดเฉลี่ย 30-120 mm ซึ่งขนาดเฉลี่ยนี้จะแปรผันโดยตรงกับอัตราการไหลของ feed ความหนืดและแปรผกผันกับอัตราการหมุนและเส้นผ่านศูนย์กลางของจานหมุน

1.2 Pressure Nozzles

วิธีนี้ feed จะไหลผ่าน orifice ภายใต้ ความดันสูง ทำให้ของเหลวที่ออกมาจากหัวฉีดเป็นฝอยโดยไม่ใช้อากาศ อนุภาคที่ได้จะมีขนาดเฉลี่ย 120-250 mm โดยขนาดอนุภาคจะแปรผันโดยตรงกับอัตราการไหลของ feed ความหนืด และแปรผกผันกับความดัน

1.3 Two-fluid Nozzle (Pneumatic Nozzle)

อุปกรณ์ชนิดนี้ feed และอากาศจะไหลผ่านหัวของ nozzle ซึ่งจะทำให้ feed แตกเป็นละอองฝอยเนื่องจากการไหลผ่านของอากาศด้วยความเร็วสูงภายใน nozzle การปรับอัตราการไหลของอากาศ จะช่วยในการกระจายเป็นละอองของ feed วิธีนี้นิยมใช้กับ feed ที่มีความหนืดสูง อย่างไรก็ตามวิธีนี้ มีค่าดำเนินการที่สูงและให้ผลผลิตที่ต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การสัมผัสของละอองฝอยกับอากาศ โดยพิจารณาจากตำแหน่งของ atomizer กับอากาศแห้งขาเข้าโดยจะแบ่งเป็น

-การไหลผ่านทางเดียวกัน (co-current flow)

-การไหลผ่านสวนทางกัน (counter-current flow)

-การไหลผ่านแบบผสม (mixed flow)

3. การระเหยของละอองฝอย

เมื่อละอองสัมผัสกับอากาศแห้งร้อน จะเกิดการระเหยชั้นไออิ่มตัวบริเวณผิวของละอองอย่างรวดเร็ว โดยจะมีอุณหภูมิที่ผิวละอองที่อุณหภูมิกระเปาะเปียกของอุณหภูมิอากาศแห้งจะแพร่สู่ผิวหนังซึ่งอยู่ในสภาวะอิ่มตัว ช่วงนี้จึงเป็นช่วงที่อัตราระเหยคงที่ จนกระทั่งความชื้นต่ำไม่มีการแพร่สู่ผิวหน้า ทำให้เกิดชั้นแห้งหนาขึ้นตามเวลา ช่วงนี้อัตราการระเหยจะลดลง

4. ขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์แห้งจากอากาศ

การแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอากาศนั้น โดยทั่วไปนิยมใช้ cyclone เป็นตัวเก็บผลผลิตภัณฑ์ที่ตกลงสู่ด้านล่างของ cyclone ส่วนลมที่ออกจากด้านบนของ cyclone จะผ่านไปยังตัวเก็บขั้นสุดท้ายทั้งนี้อาจเป็น wet scrubber หรือ bag filter หรือ electrostatic precipitator ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณผง ที่มีและประสิทธิภาพการนำกลับมา

การปรับเปลี่ยนตัวแปรทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ โดยตัวแปรเหล่านั้น คือ

1. ลักษณะของ feed โดยถ้า feed มีความหนืดสูง (หรือผลจากการลดลงของอุณหภูมิของ feed) ทำให้ได้ละอองที่มีขนาดใหญ่ขึ้นที่สภาวะของ atomizer เดียวกัน (ถ้ามีความหนืดมาก จะทำให้ มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย)

2. อัตราการไหลของ feed โดยที่ถ้าอัตราการไหลของ feed สูงขึ้นทำให้ได้ละอองที่หยาบขึ้น

3. อัตราไหลของอากาศที่ลดลงทำให้เวลา ที่ละอองอยู่ใน drying chamber นานขึ้นและจะสัมผัสกับอากาศร้อนนาน จึงมีการนำความชื้นออก ได้มากขึ้น

4. อุณหภูมิอากาศขาเข้า (inlet air temperature) การเพิ่มอุณหภูมิขาเข้าทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการระเหย และทำให้ bulk density ลดลง เนื่องจากเกิดความพรุนและ มีการแตกหักของผลิตภัณฑ์ อุณหภูมิอากาศขาออก การปรับอัตราไหลของ feed มีผลต่ออุณหภูมิขาออก ถ้าอัตราการไหลของ feed สูงขึ้นทำให้อุณหภูมิขาออก (outlet air temperature) ลดลง และ จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นสูง จะเกาะอยู่บริเวณผนังของ drying chamber ได้

Larena (2003) ได้ทำการทดลองกับ เชื้อ *P. oxalicum.* โดยการนำ conidia มาละลายในน้ำกลั่น 50 ml เพื่อให้เชื้อมีความเข้มข้น 10^7 conidia/mlโดยเปรียบเทียบระหว่างใช้ และ ไม่ใช้สาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เคลือบเซลล์ (โดยใช้เป็นเหมือนวัสดุพาหะในขบวนการนี้) และหลังจากนั้นทำการพ่นแห้ง โดยใช้เครื่องพ่นลมร้อน (SD-05, Lab Plant, Huddersfield, UK). สารละลายที่ได้ จะถูกส่งเข้าไปโดยใช้ปั๊มโดยมีอัตราเร็ว ที่ 200 ml/min. สารละลายจะถูก สเปรย์โดยใช้หัวฉีดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 mm โดยการพ่นให้เป็นไอเข้าสู่ในช่องที่จะทำให้ผงเชื้อแห้ง (drying chamber) (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.215 m และยาว 0.5 m) โดยให้มีอุณหภูมิภายในอยู่ที่150°C. อนุภาคของแป้งจะเคลื่อนที่ผ่านเครื่องแยกผงแป้ง และทำการเก็บผงแป้งในขวดเก็บ

การพ่นแห้งแม้ว่าจะเป็นวิธีการที่ทำให้สามารถเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ให้อยู่ได้นาน แต่ก็ยังมีปัจจัยอื่นๆ ทีมีผลต่ออายุการใช้งานของหัวเชื้อซึ่งก็คือ ชนิดของวัสดุพาหะ (carrier) และสารเคลือบเซลล์ จากการทดลองของ Corcoran (2004) พบว่า เชื้อ Lactobacillus rhamnosus GG มีเปอร์เซนต์เหลือรอดสูงสุดในการใช้ RSM เป็นสารเคลือบเซลล์(ประมาณ 50%) และจากการใช้ inulin (Raftilose® P95) (43·1%). inulin (Raftiline® HP) มีเปอร์เซนต์เหลือรอดต่ำสุดคือ 7·1% พบว่าการใช้ Inulin (20%w/v) ส่งผลให้มีการลดลงของเซลล์สูงสุดคือ 0·011–0·25% และในการใช้ polydextrose (PD) (20% w/v) เป็นสารเคลือบเซลล์ก็มีเปอร์เซ็นต์เหลือรอดต่ำ คือ 0·45% ชนิดของสารเคลือบเซลล์ที่นิยมใช้คือ skim milk (RSM) , polydextrose (PD) , inulin ,แป้งเปียก และ gum Arabic เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิที่เก็บผงแป้ง และเปอร์เซ็นต์ความชื้นของผงแป้ง (Pedro *et al*., 2002)ก็มีผลปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในหัวเชื้อ กล่าวคือ Corcoran (2004) พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บผงแป้งมีอิทธิพลต่อการอยู่รอดของเซลล์ โดยผงแป้งของเชื้อLactobacillus rhamnosus GG จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บคือ 4°C จะมีการลดลงของเซลล์เพียง 30-fold (1×10^8 CFU g1) แป้งที่เก็บในอุณหภูมิ 37°C นาน 8 สัปดาห์มีการลดลงของจำนวนเซลล์สูงสุดคือ40-fold ($5{\cdot}1 \times 10^6$ CFU g1) และอัตราการตายต่ำสุดพบในการเก็บที่15°C (16-fold decrease)

ข้อเสียของการพ่นแห้ง คือ การเสื่อมสภาพของโปรตีน (Hellman and Cammack,1983) และการตายของเซลล์ในบางส่วน จึงมีการใช้สารหลายชนิด เช่น skim milk และ meso-inositol , น้ำผึ้ง , glutamate , raffinose, น้ำตาล และ คาร์โบไฮเดรตต่าง ๆ (Malik, 1976 & 1988) เพื่อที่จะบรรเทาความเสียหายที่เกิดจากขบวนการspray dry (Simione and Brown,1991) โดยใช้ผสมกับเซลล์ที่จะนำไปผ่านความร้อน เพื่อที่จะป้องกันความเสียหายของเซลล์จากขบวนการdrying (Khursheed, 1990)

Israeli *et al*. (1993) พบว่าเมื่อใช้ Disaccharide trehalose เปรียบเทียบกับsucrose และ peptone ที่ใช้ในการเคลือบเซลล์สามารถใช้ในการเก็บรักษาเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทนแล้ง CIAT 899 และ CFN 42 ซึ่งสายพันธุ์ CFN 42 จะมีความไวต่อชนิดของสารเคลือบเซลล์ที่ใช้มากกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

CIAT 899 ไว้ได้ในปริมาณสูง และป้องกันความเสียหายของแบคทีเรีย ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เหลือรอดถึง 75 % ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่เคลือบน้ำตาลซึ่งมีปริมาณเชื้อน้อยกว่าถึง 10 %

และเนื่องจากในอนาคตการที่จะนำดินพีทมาใช้เป็นวัสดุพาหะเพื่อการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมให้เกษตรกรนำไปใช้คลุกกับเมล็ดถั่วปลูกอาจประสบปัญหาได้ ทั้งนี้เพราะแหล่งดินพีทที่นำมาใช้ในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมนั้นส่วนใหญ่ได้มาจากดินพรุ และมักจะอยู่ในเขตป่าสงวน ประกอบกับการขุดเพื่อเอาดินพีทมาใช้อาจจะเป็นการทำลายสภาพแวดล้อมธรรมชาติให้สูญเสียไปได้ และประกอบกับสถานการณ์ในปัจจุบันในเขต 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ส่งผลให้ไม่สามารถนำพีทออกนอกพื้นที่ได้ส่งผลให้พีทมีราคาเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการค้นคว้าวิจัยและทดลองเพื่อหาวัสดุหรือวิธีการอื่นๆ มาทดแทนการใช้ดินพีท โดยที่วัสดุหรือวิธีเหล่านั้นควรจะมีคุณภาพที่แน่นอน หาได้ง่ายภายในประเทศ มีปริมาณมากใช้ได้อย่างต่อเนื่องและราคาไม่แพง เมื่อนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพแล้วไรโซเบียมจะต้องสามารถอาศัยอยู่ได้ มีจำนวนของเชื้อไรโซเบียมต่อหน่วยในวัสดุหรือวิธีการนั้นๆ ไม่น้อยกว่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ สามารถมีอายุการเก็บรักษาได้นานโดยที่ไรโซเบียมยังคงมีประสิทธิภาพทั้งในการเข้าสร้างปมและการตรึงไนโตรเจนได้สูง ประการสำคัญคือเกษตรกรนำไปใช้ได้ง่ายและสะดวกขึ้น และราคาไม่แพง วิธีการที่สามารถทำได้และน่าสนใจคือ การSpray dry เชื้อจุลินทรีย์

วัสดุพาหะ (carriers)

นอกจากวิธีในการผลิตและสารเคลือบเซลล์ที่มีผลต่อการเหลือรอดของเชื้อแล้วพบว่าวัสดุพาหะก็มีส่วนในการเหลือรอดของเซลล์ ซึ่งตามแบบเดิมที่ใช้วัสดุพาหะผงพีทซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมในการเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของไรโซเบียม กล่าวคือมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด เท่ากับ 0.8-1.3%ปริมาณอินทรียวัตถุเท่ากับ 55-75% ความสามารถในการอุ้มน้ำ เท่ากับ 70-145% และค่าความเป็นกรด ด่าง เท่ากับ 4.5-5.0 แต่ในปัจจุบันการใช้ผงพีทนอกจากทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูงแล้ว ยังเป็นการทำลายระบบนิเวศน์ตามธรรมชาติเนื่องจากพื้นที่ที่มีดินพีทส่วนใหญ่อยู่ในเขตป่าสงวน ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการคิดค้นหาวัสดุพาหะชนิดอื่นๆ มาทดแทนการใช้ดินพีท เช่น ลิกไนท์ ขี้เลื่อย ผงที่บดจากเปลือกถั่วลิสง vermiculite, graphite, ทาลค์, ขุยมะพร้าว, ชานอ้อย, ปุ๋ยหมักจากซังข้าวโพด, ผงถ่าน และเปลือกข้าว (Saha, 2000 & Paul, 1994) โดยวัสดุพาหะที่สนใจศึกษาและนำมาเป็นวัสดุพาหะ คือทาลคัม ซึ่งเป็นวัสดุที่มีราคาถูก และสามารถหาได้ง่าย มีลักษณะเป็นผงละเอียดคล้ายแป้งฝุ่น ทำให้ผงแป้งตรึงแน่นบริเวณผิวเมล็ด และติดอยู่เป็นปริมาณมากบริเวณ hilum โดยไม่ต้องใช้ร่วมกับสารเหนียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทาลค์ หรือ ทาลคัม (Magnesium Silicate Hydroxide, $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$)

ทาลคัม เป็นแร่ที่มีความสำคัญในทางด้านอุตสาหกรรมที่มีลักษณะที่ทนต่อความร้อน กระแสไฟฟ้า มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ น้ำ 4.8%, MgO 31.7% และ SiO_2 63.5% มีค่าความเป็น กรด- ด่าง อยู่ระหว่าง 7-8 โดยทั่วไปแล้วใช้ทาลคัมในอุตสาหกรรมการผลิตยาง พรมน้ำมัน ผลิตภัณฑ์แร่ใยหิน สารทำความสะอาด และสบู่ ใช้ในอุตสาหกรรมทำกระดาษ และใช้เป็นวัสดุพาหะของสารกำจัดศัตรูพืช และแมลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved