



ความมีชีวิตรอดของสาหร่ายที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในดิน

ดร. สุมิตรา หมุ่มพยัคฆ์ *

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกสาหร่ายจากดินจังหวัดนครสวรรค์ 3 สายพันธุ์ (*Anabaena* sp., *Nostoc commune* and *N. paludosum*) ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเพาะเลี้ยง สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ถูกเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสงที่เหมาะสมเพื่อการผลิตมวลชีวภาพปริมาณสูง สำหรับปัจจัยการเจริญด้านอื่นเหมือนกันคืออาหารสูตร BG-11 อุณหภูมิ $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ นำมวลชีวภาพของสาหร่ายไปจัดชุดการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่ออธิบายลักษณะความรอดชีวิตของสาหร่ายในดินจากอำเภอดงเจริญ หลังจากบ่มดินด้วยมวลชีวภาพของสาหร่ายเป็นเวลา 14 วัน วัดความมีชีวิตอยู่รอดของสาหร่ายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายออกมาสู่น้ำดิน คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดิน ข้อมูลที่ได้จากการทดลองและลักษณะอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องจะถูกนำมาเปรียบเทียบกัน เพื่อนำสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ไปวางแผนการทดลองในขั้นต่อไป

*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำสาขาวิชาชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์

**The survival of polysaccharide-producing algae in soil****Asst. Prof. Dr. Sumitra moopayuk****Abstract**

The screening process of 3 soil algal strains (*Anabaena* sp., *Nostoc commune* and *N. paludosum*) carried in NS province of Thailand, based on their ability to produce EPS in culture. Each of the algal strains were cultivated under suitable light intensity for high biomass production. For the other same growth factors were media (BG-11) and temperature ($30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$). The cell biomass were carried a set of the laboratory experiments describes the survival characteristic of the algal strains in Tak Fa soils. Following inoculation of soil samples with cellular biomass, inoculant survival, soil water EPS production and total carbohydrate in soil were evaluated over a 14 day period. The data from experiment were then compared and, on the basis of these comparisons, all of them were planed to organize for further experiments.

Key words: EPS : Extracellular polysaccharide, Soil polysaccharides, Capsular polysaccharide

บทนำ

จากการที่สาหร่ายมีความสามารถเจริญเติบโต และทนทานได้ในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงช่วงกว้างๆ เช่น สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว *Oscillatoria* และ *Phormidium* เจริญได้ในดินทราย และดินภูเขาไฟที่เป็นแผ่นแข็งๆ ได้ (Painter, 1993) จึงคาดว่าดินตัวอย่างที่มีคุณภาพต่ำ (Anon, 1998) จากอำเภอตากฟ้า เป็นดินปลูกมันสำปะหลังจะตอบสนองต่อการบ่มสาหร่ายที่มีคุณสมบัติผลิตพอลิแซ็กการไรด์ได้ลงไป ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อจัดการวัดความสามารถของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ (*Anabaena* sp., *Nostoc commune* and *N. paludosum*; เป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว) เรื่องความมีชีวิตอยู่รอดในดิน และจะผลิตพอลิแซ็กการไรด์ขณะที่อยู่ในดินได้หรือไม่ ความรู้ที่ได้จะนำไปสู่การทดลองในเรือนเพาะชำ การผลิตสาหร่ายปริมาณมาก การผลิตผลิตภัณฑ์สารปรับสภาพดิน (soil conditioner) มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพดินต่อไป

วิธีทดลอง

การออกแบบการทดลอง

เป็นการทดสอบเพื่อให้ทราบการเจริญของสาหร่ายหลังจากบ่มดินด้วยสาหร่ายนาน 14 วัน หาขนาดประชากรสาหร่ายที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ในดินในรูปค่าประมาณการ (The Most Probable Number counts :MPN), การนับจำนวนเซลล์โดยตรง (directly counting cell), วัดปริมาณเอกซ์ตราเซลล์พอลิแซ็กการไรด์ที่ผิวหน้าดิน หรือเอกซ์ตราเซลล์พอลิแซ็กการไรด์ในน้ำดิน (extracellular polysaccharide on soil surface or soil water EPS) เป็นพอลิแซ็กการไรด์ที่ออกมาจากเซลล์ของสาหร่าย ละลายออกนอกเซลล์สู่น้ำดิน และยังมีพอลิแซ็กการไรด์ที่ผิวของเซลล์ (cell surface) ซึ่งจะออกมาจากแคปซูล หรือ กลุ่มของเซลล์ (clump cells) และวัดปริมาณพอลิแซ็กการไรด์ในดิน

การเตรียมสาหร่ายที่ใช้บ่มดิน

นำหัวเชื้อสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มาขยายปริมาตรจาก 100 มล. ให้ได้ 3-4 ลิตรเพื่อให้เพียงพอที่จะใช้บ่มดิน การขยายขนาดใช้ฟลาสด์ขนาด 2 ลิตร 2 ใบต่อ สาหร่าย 1 สายพันธุ์ เลี้ยงนาน 15 วันสภาวะการเพาะเลี้ยง : เลี้ยง *Anabaena* sp. ใน BG-11 medium ที่อุณหภูมิ $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ตั้งบนเครื่องเขย่าๆ ที่ความเร็วรอบ 165 รอบ/ นาที ที่ความเข้มแสง 80 ไมโครโมลโฟตอน/ เมตร²/ วินาที ($\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) สำหรับ *N. commune* และ *N. paludosum* เลี้ยงเหมือนกันกับ *Anabaena* sp. แต่ใช้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอน/ เมตร²/วินาที เลี้ยงครบ 15 วันใช้เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 165 รอบ/ นาที ปั่นนาน 20 นาทีเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ รินอาหารเลี้ยงเชื้อออกใส่น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปแทน นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงอีกครั้งด้วยเวลาและความเร็วรอบเท่าเดิม



เพื่อล้างอาหารเพาะเลี้ยงออกไป (de Caire, de Cano, de Mule, Palma, & Colombo, 1997) นำเซลล์สาหร่ายแต่ละชนิดหนัก 1.8 กรัมใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 18 มล. ใช้แท่งแก้วคนให้สาหร่ายและน้ำเข้ากัน สำหรับเตรียมรินใส่น้ำดินใช้น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 มล. ล้างหลอดเพื่อชะสาหร่ายที่ติดข้างหลอดออกสัดส่วน (ดังกล่าวนี้คำนวณมาแล้วว่าจะทำให้ดินจากอำเภอดากฟ้ามีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) 20 %

การเตรียมดินและการบ่มดินด้วยสาหร่าย

ใช้ดินจากหมู่บ้านพุม่วง ตำบลอุดมธัญญา อำเภอดากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์ เป็นดินจากแปลงปลูกมันสำปะหลัง เพื่อทดสอบความมีชีวิตอยู่รอดของสาหร่ายในดินดินปลูกมันสำปะหลังจากแหล่งนี้มีค่าระดับความสมบูรณ์ของดินต่ำ (Krutkun, 1996) สภาพเป็นทรายหยาบปนมาก มีค่าอินทรีย์วัตถุ 2.6% เป็นบริเวณที่น่าจะได้รับการปรับปรุงสภาพด้วยสาหร่าย โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนดินได้รับความชื้นจากน้ำฝนปริมาณมากเหมาะกับการเจริญของสาหร่ายเตรียมดินตัวอย่างหนัก 60 กรัมลงจานแก้ว (1.5 cm. in height, 9.5 cm. diameter) 4 จานต่อสาหร่าย 1 สายพันธุ์ มี 3 สายพันธุ์และจานควบคุม 3 จาน 3 จานที่จะเติมสาหร่ายใช้วัดค่าต่าง ๆ เกี่ยวกับสาหร่าย และดิน นำดินรวม 12 จานไปสเตอไรล์ที่ 121°C 15 ปอนด์/นิ้ว² 15 นาทีในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

การบ่มดินและการเก็บตัวอย่างดิน

เมื่อดินที่สเตอไรล์เย็นลงแล้ว นำสาหร่ายที่เตรียมไว้ในหลอดแก้วมารินใส่ให้คลุมหน้าดิน (ดัดแปลงจากการใช้วิธีพ่นสาหร่ายลงดินของ Roger & Burns, 1994) บ่มดินด้วยสาหร่ายดังกล่าวนาน 14 วันที่อุณหภูมิ 25°C ในตู้เพาะเลี้ยง (growth cabinet), ให้แสงสว่างต่อเนื่อง ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟโตล / เมตร²/วินาที ความชื้นอากาศในตู้มีค่า 70% เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพื่อรักษาความชื้นของดินด้วยปริมาตร 10 มล. ทุก ๆ 3 วัน นับจากเริ่มบ่มดินด้วยสาหร่ายเมื่อครบ 14 วัน สังเกตความมีชีวิตอยู่รอดของสาหร่ายได้ที่ว่าสาหร่ายจะเจริญปกคลุมหน้าดิน, น้ำดินมีพอลิแซ็กการไรด์ปนอยู่รินรินออกมาก่อน, ต่อมาใช้ปากกาเขียนแก้วทำเครื่องหมายที่ขอบของจานแบ่งดินในจานออกเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน ดินส่วนที่ 1 วัดค่า MPN และจำนวนเซลล์ทั้งหมด ดินส่วนที่ 2 วัดค่าแคปซูลาร์พอลิแซ็กการไรด์ (capsular PS) ดินส่วนที่ 3 วัดค่าคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของดิน (ซึ่งส่วนที่ 3 นี้จะนำกลับไปบ่มต่อในตู้ให้ครบ 72 วัน แล้ววัดอีกครั้ง) การวัดค่าต่าง ๆ ดังกล่าวมานั้นทำให้ครบดิน 3 จานของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

การวัดความมีชีวิตอยู่รอดของสาหร่าย

• MPN และการนับเซลล์

การวัดความมีชีวิตอยู่รอดของสาหร่าย วัดได้ 2 วิธี วิธีแรกวัดขนาดของประชากรโดยประมาณ หรือค่า MPN วิธีที่ 2 การนับจำนวนเซลล์โดยตรง วัดค่า MPN ตามวิธีของ Woomer, (1994) ดังนี้ ใช้ดินบ่มด้วยสาหร่ายแล้ว 10 กรัมผสมกับอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11 90 มล. แล้วทำสารละลายดินให้เจือจางลง 10 เท่า ทั้งหมดจะมีสารละลายดิน 54 หลอดแก้ว/ สาหร่าย 1 สายพันธุ์ นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยง 21 วัน สภาพแวดล้อมตู้เพาะเลี้ยง เหมือนการบ่มจานดิน จำนวนหลอดที่มีสาหร่ายเจริญขึ้นมาถือว่าเป็นค่าบวก (positive) ถ้าหลอดใดสาหร่ายไม่เจริญ ภายในหลอดจะใสถือว่าเป็นค่าลบ (negative) (no algal growth) นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN ที่เป็น ten fold 3 replicates วิธีที่ 2 การนับจำนวนเซลล์โดยตรง ใช้ Sedwick-Rafter counting chamber. นับเซลล์จากสารละลายหลอดของ MPN ค่าจำนวนเซลล์มีหน่วยเป็น จำนวนเซลล์/ดิน 1 กรัม $\times 10^5$

การวัดพอลิแซ็กคาไรด์ และคาร์โบไฮเดรตในดิน(พอลิแซ็กคาไรด์ ในดิน: (soil polysaccharide content)

• พอลิแซ็กคาไรด์ในน้ำดิน (soil water polysaccharide)

นำน้ำดินที่ผิวหน้าดินออกมามันหมุนเหวี่ยงแล้วนำไปวัดค่าพอลิแซ็กคาไรด์ ในน้ำดินด้วยวิธี phenol sulfuric acid method คัดแปลงจากวิธีของ Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith (1956)

• แคปซูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ (capsular polysaccharide)

วัดค่าแคปซูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์สกัดจากผิวของเซลล์คัดแปลงจากวิธีของ Huang, Liu & Palusen, (1998). ดังนี้ ใส่สาหร่าย 1 กรัมลงในหลอดขนาด 10 ซม. เติมน้ำกลั่น 2 มล. ต้มที่ 100 นาน 10 นาที นำของเหลวที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ไปวัดค่า

• คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดิน (total carbohydrates in soil)

จากจานที่บ่มดินด้วยสาหร่ายตักดิน 1 กรัมใส่ฟลาสต์ขนาด 25 มล. เติม 12 M H_2SO_4 ปริมาตร 1.2 มล. ทำให้คาร์โบไฮเดรตย่อยสลายตั้งฟลาสต์บนเครื่องเขย่านาน 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นลงไป 17.5 มล. ดังนั้นสารละลายจะเจือจางลงเป็น 1M H_2SO_4 ปั่นให้เกิดการย่อยสลายต่อที่อุณหภูมิ 100°C นาน 3 ชั่วโมง ปั่นให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง (GF/ F filter membrane) ปรับสิ่งที่กรองได้ด้วย 3 M NaOH ให้ได้ pH 7 เติมน้ำกลั่นให้สารละลายครบ 100 มล. นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimetric assay ใช้ phenol sulfuric reagent และ glucose standards คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดินมีหน่วยเป็น $mg \cdot g^{-1}$ ดิน

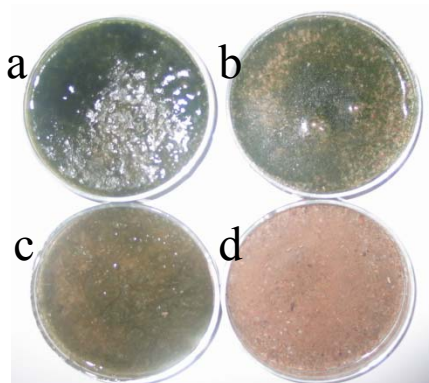
3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ One-way ANOVA (SPSS Version 10) วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างระหว่างสาหร่าย ถ้ามีความแปรปรวนที่ไม่ปกติจะมีการแปลงข้อมูลให้เป็น natural log (ln) และจะใช้ค่า $p < 0.01$ แทนการใช้ < 0.05 (Fowler et.al, 1998) มีใช้ Bonferroni post hoc tests เพื่อความเหมาะสมในการหาความแตกต่างระหว่างจานที่มีสาหร่ายและที่เป็นจานควบคุม

4. ผลการวิจัย

ความมีชีวิตรอดของสาหร่าย

สาหร่ายประสบความสำเร็จในการมีชีวิตรอดหลังจากใส่บ่มดินได้ 14 วัน *Anabaena* sp., *N. commune* และ *N. paludosum* เจริญได้ดีที่ผิวหน้าดินจากอำเภอดากฟ้า ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 a. *Anabaena* sp., b. *N. commune*, c. *N. paludosum* และ d. จานควบคุม(ไม่เติมสาหร่าย)

ถูกเติมลงดินจากตากฟ้าตั้งบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 25 °C ความชื้นอากาศ 70%, ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอน/ม²/วินาที สาหร่ายเจริญขึ้นเต็มผิวหน้าดินในเวลา 14 วัน

Anabaena sp. เจริญขึ้นมากมีความหนาปกคลุมผิวหน้าดินได้มากกว่า *N. paludosum* หรือ *N. commune* ทั้ง *N. commune* และ *N. paludosum* เจริญเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ยังมองเห็นผิวดินได้ *Anabaena* sp. มีสีเขียวแกมน้ำเงินเข้ม (dark blue-green) *N. commune* มีสีเขียวแกมน้ำเงิน และ *N. paludosum* มีสีเหลืองแกมน้ำตาล (yellowish-brown) ไม่มีสาหร่ายอื่นใดเจริญในจานควบคุม ตารางที่ 6 แสดง MPN และการนับจำนวนเซลล์หลังจากบ่มในดิน 14 วัน MPN of *Anabaena* sp., *N. commune* และ *N. paludosum* มีค่า 14×10^3 , 9×10^3 และ 3×10^3 g⁻¹ ดินตามลำดับ ทั้งหมดนี้จึงยืนยันได้ว่าสาหร่าย

ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ในดินที่ปลูกมันสำปะหลังเมื่อใช้ One-way ANOVA พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า MPN ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ ($F_{df=2} = 20.117$; $p < 0.05$)

ตารางที่ 1 MPN จำนวนเซลล์ soil water EPS capsular EPS และคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของดินที่บ่ม

ค่าที่วัด	ระยะเวลาบ่มดิน (วัน)	สายพันธุ์สาหร่าย			
		จำนวนควม	<i>Anabaena</i> sp.	<i>N. commune</i>	<i>N. paludosum</i>
MPN (No. cells $\times 10^3$ g ⁻¹ soil)	14	0.0 $\pm$ 0.0	14 $\pm$ 1.3 ^a	9 $\pm$ 1.3 ^a	3 $\pm$ 0.3 ^b
MPN cell counts (No. cells $\times 10^3$ g ⁻¹ soil)	14	0.0 $\pm$ 0.0	18 $\pm$ 0.58 ^a	9.0 $\pm$ 0.22 ^b	7.0 $\pm$ 0.58 ^b
Soil water EPS (mg g ⁻¹)	14	0.0 $\pm$ 0.0	22.98 $\pm$ 0.85 ^a	8.54 $\pm$ 0.21 ^b	27.22 $\pm$ 0.98 ^a
Capsular PS (mg g ⁻¹ fresh cells)	14	0.0 $\pm$ 0.0	0.51 $\pm$ 0.01 ^a	3.31 $\pm$ 0.47 ^b	1.14 $\pm$ 0.38 ^c
Total carbohydrates in soil (mg g ⁻¹ soil)	14	0.16 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.02
Total carbohydrates in soil (mg g ⁻¹ soil)	72	0.16 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.03 ^a	0.82 $\pm$ 0.02 ^b	0.68 $\pm$ 0.01 ^a

ค่าในแถวเดียวกันที่ไม่มีเครื่องหมายด้วยกแสดงว่ามีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha = 0.05$)

Post hoc tests แสดงให้เห็นว่า *Anabaena* sp. and *N. paludosum* were significant from *N. commune*. The MPN of *Anabaena* sp. was significant similar to *N. commune*.

มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ ($F_{df3} = 307.063$; $p < 0.001$). Post hoc tests แสดงให้เห็นว่า จำนวนเซลล์ *Anabaena* sp. มากกว่า *Nostoc* ทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) และมากกว่า 2 เท่า (ตารางที่ 6)

พอลิแซ็กการไรดในน้ำดิน

พอลิแซ็กการไรดในน้ำดินที่บ่มด้วย *Anabaena* sp., *N. commune* and *N. paludosum* มีค่า 22.98, 8.54 และ 27.22 ตามลำดับ ไม่ได้วัดค่านี้จากจำนวนควมมีการแปลงค่าไปเป็น natural log เพื่อให้ได้ equality of variance เพราะมีค่าความแปรปรวนที่ไม่ปกติจึงตั้งค่าความคลาดเคลื่อนที่ 0.01 แทน 0.05 Post Hoc Tests แสดงให้เห็นว่า ($F_{df=2} = 357.325$; $p < 0.001$) พอลิแซ็กการไรดในน้ำดินที่มี *Anabaena* sp. และ *N. paludosum* ไม่มีความแตกต่างกัน ($P = 0.33$). ส่วนการเปรียบเทียบเป็นคู่ ๆ ของคู่อื่น ๆ พบความแตกต่างกัน ($p < 0.001$) ดังนั้นจัดเรียงลำดับค่าพอลิแซ็กการไรดในน้ำดินได้ดังนี้ $N. paludosum = Anabaena$ sp. > *N. commune*.

แคปซูลาร์พอลิแซ็กการไรด์

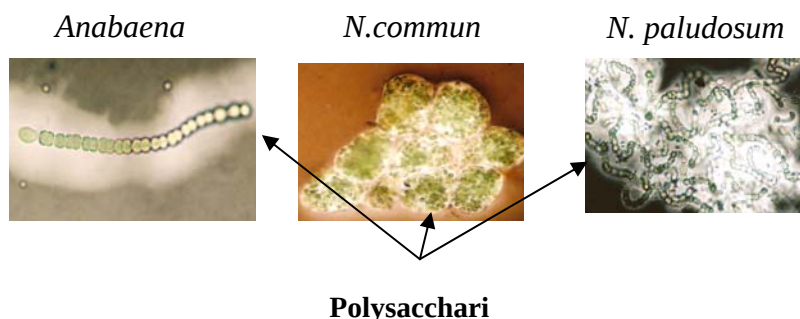
ค่าของแคปซูลาร์พอลิแซ็กการไรด์ ของ *Anabaena* sp., *N. commune* และ *N. paludosum* 0.51, 3.31 and 1.14 mg g⁻¹ ของเซลล์สด แปลงค่าข้อมูลและตั้งค่าความคลาดเคลื่อนที่ 0.01 แทน 0.05 Post Hoc Tests ($F_{df=2} = 14.692$; $p=0.01$) แสดงให้เห็นว่าการผลิต แคปซูลาร์พอลิแซ็กการไรด์ ของ *Anabaena* sp. แตกต่างจาก *N. commune* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การผลิตแคปซูลาร์พอลิแซ็กการไรด์ของทั้ง *Anabaena* sp. และ *N. commune* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ *N. paludosum*.

คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดิน

คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดินของ *Anabaena* sp., *N. commune* และ *N. paludosum* มีค่า 0.18, 0.25, และ 0.26 mg g⁻¹ ดินตามลำดับ(ตารางที่ 6) การเจริญของในดิน 14 วัน ไม่มีผลต่อค่าของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดิน และทั้ง 3 สายพันธุ์กับงานควบคุมแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{df3} = 3.002$; $p=0.095$) ที่เวลา 72 วันคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดินงานควบคุม และ *Anabaena* sp., *N. commune* และ *N. paludosum* มีค่า 0.16, 0.67, 0.82 และ 0.68 mg g⁻¹ ของดินตามลำดับ One-way ANOVA แสดงให้เห็นว่า natural log ของ คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดินถูกแปลงค่าเพื่อให้แน่ใจว่าความแปรปรวนเป็นปกติ ดังนั้นตั้งค่าความคลาดเคลื่อนที่ 0.01 แทนที่ 0.05 คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดินของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ ($F_{df2} = 215.903$; $p<0.001$) Post Hoc Test's แสดงให้เห็นว่า คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในดินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *Anabaena* sp. นเหมือนกับ *N. paludosum* ทั้ง *Anabaena* sp. และ *N. paludosum* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ *N. commune*.

ชนิดของชีท (type of sheath)

หลังจากที่สาหร่ายอยู่ในดินตัวอย่างนาน 14 วัน ใช้สีดำของอินเดียนช้อมสีสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะสังเกตชีทหรือพอลิแซ็กการไรด์ได้ชัดเจนขึ้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ย้อม *Anabaena* sp. (x400), *N. commune* (x100) และ *N. paludosum* (x200) ด้วยหมึกอินเดียหลังจากบ่มในดินนาน 14 วัน บริเวณสีขาวคือพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ของสาหร่าย

การใช้กล้องจุลทรรศน์สังเกตเซลล์สาหร่ายที่กำลังขยาย x 40 หลังจากบ่มสาหร่ายไว้ในดิน 14 วัน พบความแตกต่างของบริเวณที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Anabaena* sp. 2 สายพันธุ์ของ *Nostoc*. ที่ผนังเซลล์ของสาหร่ายเป็น murein (peptidoglycan) เหมือนที่พบในแบคทีเรียที่แท้จริง (Eubacteria) ส่วนชั้นนอกเป็นชั้นของไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lypopolysaccharide) เซลล์ฝังตัวอยู่ในชีทที่เป็นเมือก (Hoek, Mann, & Jahns, 1995) ชีทของ *Anabaena* sp. เป็นบริเวณสีขาวที่บ่ออยู่รอบ ๆ เส้นสายดังรูปที่ จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์แบบ watery sheath สำหรับ *N. commune* เป็นโคโลนี (ประมาณ 10-11 โคโลนี) ที่จับกลุ่มกันมีพอลิแซ็กคาไรด์ล้อมรอบเป็นก้อนกลม โคโลนีเหล่านี้มีขนาดใหญ่กว่าที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *N. paludosum* มีรูปร่างของเซลล์แตกต่างออกไปจากสาหร่าย 2 สายพันธุ์ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ธรรมดา, เซลล์เฮเทอโรซิสต์ (vegetative cells, heterocyst cells) บริเวณสีขาวที่บ่อเป็นบริเวณกว้างและล้อมรอบกลุ่มเส้นสายไว้ พอลิแซ็กคาไรด์ของทั้ง *N. commune* และ *N. paludosum* ถูกจัดเป็น capsular polysaccharide หรือ firm sheath ดังแสดงที่ภาพ 2

5. สรุปการทดสอบความมีชีวิตของสาหร่ายในดิน

สาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์มีชีวิตและเจริญได้ในดินที่มีความชื้นแม้ว่าดินนั้นจะมีความอุดมสมบูรณ์ที่ต่ำ *Anabaena* sp. มีชีวิตอยู่รอดและเจริญในดินมีจำนวนเซลล์มากที่สุด แคปซูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ในน้ำดินจากสาหร่าย *Anabaena* sp. มากกว่าสาหร่ายอีก 2 สายพันธุ์ที่เวลา 14 วัน แต่ที่ 72 วัน *N. commune* มีค่าคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดมากที่สุดดังตารางที่ 2 ดังนั้นสามารถใช้คุณสมบัติของสาหร่าย 3 สายพันธุ์นี้ทำการวิจัยเพื่อใช้เป็นสารปรับสภาพดินในครั้งต่อไปได้ทั้งในเรือนเพาะชำและภาคสนาม

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่าต่าง ๆ ที่วัดได้จากการทดสอบความมีชีวิตของสาหร่ายในดิน

	<i>Anabaena</i> sp.	<i>N. commune</i>	<i>N. paludosum</i>
Soil experiments			
Cell count	*	NS	NS
Capsular EPS	*	*	*
Polysaccharide (soil water EPS)	*	*	*
Total carbohydrate in soil (72 day)	NS	*	NS

* แตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



6. อภิปรายผลการทดลอง

1. ความมีชีวิตอยู่รอดของสาหร่ายและการผลิตพอลิแซ็กการไรรัดในดิน

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้หลังจากใส่ลงไปดิน นอกจากนี้ยังเจริญเติบโตและผลิตพอลิแซ็กการไรรัดลงสู่ดินในเวลาอันสั้น 14 วัน ในสภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการ จำนวนเซลล์ที่นับได้มากกว่ารายงานของ Drew and Anderson (1977) ในรายงานกล่าวว่าการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ของเชื้อผสมของสาหร่ายในท้องถิ่น (indigenous algae) ที่อายุ 14 วันมีค่า $3.2 \times 10^5 \text{ cell g}^{-1}$ ของดินที่ความเข้มของแสง 1000 ลักซ์ และ $2.1 \times 10^4 \text{ cell g}^{-1}$ ที่ความชื้นของดิน 100 % การศึกษาครั้งนี้แสดงว่าสาหร่าย 3 สายพันธุ์จากนาข้าว ในจังหวัดนครสวรรค์มีประสิทธิภาพในการปรับตัวอยู่ในดินของอำเภอดงขี้เหล็กที่เป็นดินจากแปลงปลูกมันสำปะหลัง ซึ่งดินนี้แตกต่างจากดินที่ปลูกข้าวเป็นอย่างมาก

2. ค่าคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

ที่ 14 วัน คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจากงานที่มี *Anabaena* sp., *N. commune* และ *N. paludosum* มีค่า 0.18, 0.25 และ 0.26 mg g^{-1} ดินตามลำดับ ค่าเหล่านี้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการบ่มดินเป็น 0.67, 0.82 0.2 and 0.68 mg g^{-1} ดิน ที่ 72 วัน การเจริญของสาหร่ายที่ 14 วันจนถึง 72 วัน มีผลต่อค่าของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นดังตารางที่ 6 ค่าดังกล่าวจาก 2 ช่วงของเวลานั้นมีค่าสูงกว่าที่มี Rogers and Burns (1994) ที่รายงานว่าได้ใช้ *Nostoc muscorum* บ่มลงดินที่ไม่สเตอไรล์ เป็นดินที่ไม่มีโครงสร้างแบบ silt loam soil (1:2.5 ดิน:น้ำ) มีอัตราที่ต่ำ ($1.61 \times 10^5 \text{ cell g}^{-1}$ น้ำหนักแห้งของดิน) และอัตราที่สูง ($4.04 \times 10^5 \text{ cell g}^{-1}$ น้ำหนักแห้งของดิน) นาน 300 วัน วัดค่าคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด มีค่า 0.01 mg g^{-1} ดินของอัตราที่ต่ำ และ 0.01 mg g^{-1} ดินอัตราที่สูงตามลำดับ ค่านี้ไม่มีความแตกต่างกัน



รายการอ้างอิง

- Anon. (1998). *Upland Soil : Report of the management for growing main economic crops*. Nakhonsawan: Ministry of Agriculture.
- Andersen, R. A. (2005). *Algal culturing techniques*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Cupac, S., & Gantar, M. (1992). Chemical composition and morphological structure of the mucilaginous sheath of the cyanobacterium *Nostoc* D. *Biomedical Letters*, 47, 133-138.
- de Caire, G. Z., de Cano, M. S., de Mule, M. C. Z., Palma, R. M., & Colombo, K. (1997). Exopolysaccharide of *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria) in the aggregation of soil particles. *Journal of Applied Phycology*, 9, 249-253.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Fischer, D., Schlosser, U. G., & Pohl, P. (1997). Exopolysaccharide production by cyanobacteria grown in closed photobioreactors and immobilized using white cotton towelling. *Journal of Applied Phycology*, 9, 205-213.
- Hill, D. R., Keenan, T. W., Helm, R. F., Potts, M., Crowe, L. M., & Crowe, J. H. (1997). Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane during desiccation. *Journal of Applied Phycology*, 9, 237-248.
- Hoek, v. d. C., Mann, D. G., & Jahns, H. M. (1995). *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Huang, Z., Liu, Y., & Paulsen, B. S. (1998). Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: Comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *Journal of Phycology*, 34, 962-968.
- Moore, B. G., & Tischer, R. G. (1964). Extracellular polysaccharide of algae : effect on life support systems. *Science*, 145, 586-587.
- Painter, T. J. (1993). Review paper carbohydrate polymers in desert reclamation: the potential of microalgal biofertilizers. *Carbohydrate Polymers*, 20, 77-86.



- Richmond, A. (2004). *Hand book of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. USA: Blackwell Science Ltd. .
- Rogers, S. L., & Burns, R. G. (1994). Changes in aggregate stabilit, nutients status, indigenou microbial populations and seedling imergences, following inoculation of soil with *Nostoc muscorum*. *Biology of Fertilized Soils*, 18, 209-215.
- Woomer, P. L. (1994). Most probable number counts. In R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai & A. Wollum (Eds.), *Methods of oil analysis part 2 microbiological and biochemical properties* (pp. 59-77). USA: Soil Science Society of America, Inc.
