

รายงานเรื่องเต็มผลการทดลอง ปีงบประมาณ 2556

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ
 ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร
กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในการจัดการดิน
กิจกรรมย่อย : การพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์

3. **ชื่อการทดลอง** : ศึกษาการผลิตจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปแบบหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์
 ในสภาพ ห้องปฏิบัติการ

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	: นางภาวณา ลิกขนานนท์	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	: นางสุปรานี มั่นหมาย	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	: นายอธิปัติย์ คลังบุญครอง	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	: นางสาวธูปหอม พิเนตรเสถียร	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ด้านการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ เก็บตัวอย่างดินและปุ๋ยหมัก ต่าง ๆ จำนวน 80 ตัวอย่าง และคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและไขมัน และทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส และไขมัน ได้จุลินทรีย์ จำนวน 45 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายกระดาษกรอง Whatman No. 1 ภายในระยะเวลา 7 วัน จำนวน 12 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 7 สายพันธุ์ และแกรมลบ จำนวน 5 สายพันธุ์ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 สายพันธุ์ รวบรวมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ และจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อการทดลองการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบเม็ด และแบบผง จำนวน 6 ไอโซเลท คือ DC 013 B, DC 017 B, DC 046.6 B, DC070 B และ DC 1102 B เป็นแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแอกติโนมัยซิส 1 ไอโซเลท จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 1 ไอโซเลท และ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 ไอโซเลท

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบเม็ด วัตถุประสงค์ที่จะใช้ในการทดลองทำเม็ด ได้แก่ ยิปซัม หินฟอสเฟต ปุ๋ยหมักบดละเอียด สารสกัดจากข้าวสาลี (wheat gluten) ที่ระยะเวลาบ่ม 60 วัน เซลล์มี

ชีวิตของจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลล์ DC 70 B และ DC1102 B เหลือปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ 10^6 cfu/เม็ด ส่วนสายพันธุ์อื่นมีชีวิตรอดต่ำ

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบผง โดยเฉพาะเลี้ยงแล้วผสมกับวัสดุคือ ยิปซัม และแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาบ่ม 60 วัน เซลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลล์ DC 013 B, 017 B, 046.6 B, 070 B และ 1102 B เหลือปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ 10^6 cfu/กรัม

6. คำนำ

กรมวิชาการเกษตรได้ผลิตผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ เพื่อการจำหน่ายแจกแก่เกษตรกรไว้ใช้ประโยชน์ในการทำปุ๋ยหมัก หัวเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วย จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลล์เป็นส่วนใหญ่และเป็นจุลินทรีย์พวกที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) โดยใช้ดินพิทเป็นวัสดุพา จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลล์เป็นส่วนประกอบที่เรีย รา และแอคติโนมัยซิส จากการเก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลล์ตามกิจกรรมการสำรวจรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ดินที่ผ่านมา ได้จุลินทรีย์จำนวนหนึ่ง ที่มีประสิทธิภาพ และมีจุลินทรีย์ที่แสดงกิจกรรมการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส โปรตีนและไขมัน ประกอบกับการที่ไม่สามารถหาดินพิทที่มีคุณภาพมาใช้เป็นวัสดุพาเชื้อในขั้นตอนการผลิตได้ จึงทำให้มีความจำเป็นต้องพัฒนาการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์เพื่อใช้ช่วยในขั้นตอนการทำปุ๋ยหมัก และเพื่อให้ได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่นการผลิตปุ๋ยอินทรีย์น้ำ การย่อยสลายตอซังข้าว ฯลฯ

ในสภาพธรรมชาติจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ก่อให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย ซึ่งมักจะเป็นเศษวัสดุพืชเป็นส่วนมาก กระบวนการเป็นปุ๋ยหมัก (composting) เป็นกระบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ของวัสดุอินทรีย์ในรูปที่เป็นของแข็ง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายในสภาพใช้อากาศและต้องผ่านระยะที่อุณหภูมิสูงขึ้น (Finstein and Morris, 1975) มีการศึกษาจำนวนมากที่ชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่เฉพาะเจาะจงที่มีอยู่ในกองปุ๋ยหมักมีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของปุ๋ยหมักหรือมีผลเร่งอัตราการย่อยสลายเป็นปุ๋ยหมัก (Nakasaki and Uehara, 1996; Requena et al., 1996; Kuo-Shu et al., 1998; Badr El-Din et al., 2000) จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลล์ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีมากในพืชได้ โดยผ่านกระบวนการทางเอนไซม์เซลลูเลสที่จุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่นเกิดจากกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง ซึ่งส่วนมากคือแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* spp. (Strom, 1985) เชื้อราและแอคติโนมัยซิสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเซลล์ ลิกนิน และวัสดุที่ย่อยสลายยากอื่นๆ เชื้อแอคติโนมัยซิสสามารถย่อยสลายเซลล์ได้เพียงเล็กน้อยและย่อยสลายได้น้อยกว่า เชื้อรา แต่จะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เชื้อรามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลล์มากกว่า เชื้อแบคทีเรีย เชื้อแอคติโนมัยซิสที่มักพบจากกองปุ๋ยหมักอยู่ในจีนัส *Streptomyces* spp. และ *Thermoactinomyces* spp. ส่วนเชื้อราอยู่ในจีนัส *Aspergillus* spp. (Strom, 1985) ดังนั้นหากมีการศึกษาถึงแนวทางการลดปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช การศึกษาถึงความหลากหลายและกิจกรรมของเชื้อ จุลินทรีย์ในดินและหาแนวทางเพื่อเพิ่มจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ รวมถึงการเร่งให้เกิดกระบวนการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ ก็อาจจะเป็นแนวทางที่ยั่งยืนในการจัดการดินทางชีวภาพเพื่อเพิ่มผลิตภาพของดิน

7. วิธีดำเนินการ

นำจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ที่เก็บรวบรวมไว้จากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรและที่ทำการแยกเชื้อใหม่จากแหล่งของเชื้อ เช่นจากกองปุ๋ยหมักที่ระยะ mesophilic และ thermophilic มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อปลดปล่อยออกมาโดยวิธีการทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายกระดาษกรอง Whatman No. 1 ตามวิธีการของ Mandels and Weber (1969) แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944) คำนวณปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส การวัดอัตราการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ที่มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบเช่น เศษพืชจากแปลง โดยตรวจสอบการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำหนักเศษพืชที่หายไป แล้วคัดเลือกจุลินทรีย์โดยประเมินจากกิจกรรมที่เกิดขึ้น

ทดสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมไว้ในกิจกรรมการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาเนส โดยจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายไซแลนที่เป็นองค์ประกอบที่พบมากในเฮมิเซลลูโลส โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Somogyi-Nelson คำนวณปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

ทดสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการใช้ไขมันโดยการเลี้ยงขยายเชื้อจนมีอายุได้ 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการเสียดเชื้อแบบ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติม tributyrin ความเข้มข้น 1% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง ถ้ามีการย่อยไขมันจะเกิดวงใส (Clear zone) รอบโคโลนีเชื้อ (Michael and Pelezar, 1995)

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างดินและปุ๋ยหมัก ต่าง ๆ ได้ตัวอย่าง จำนวน 80 ตัวอย่าง และคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและไขมัน และทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส และไขมัน ได้จุลินทรีย์จำนวน 45 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายกระดาษกรอง Whatman No. 1 ภายในระยะเวลา 7 วัน จำนวน 12 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 7 สายพันธุ์ และแกรมลบ จำนวน 5 สายพันธุ์ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 สายพันธุ์ รวบรวมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ และจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection

เลือกเชื้อแบคทีเรีย ย่อยสลายเซลลูโลส จำนวน 2 สายพันธุ์ มาใช้ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ โดย หาสูตรวัสดุพาที่เหมาะสม และสามารถทำเป็นรูปแบบเม็ด 2 รูปแบบ และตรวจสอบการมีชีวิตอยู่รอดของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ในวัสดุพานี้ โดยรูปแบบที่ 1 ปั้นเม็ดที่มีส่วนผสมของวิทกลูเต็น 0.05 0.5 0.1 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมซีโอไลท์ ตามลำดับ พบว่าวิทกลูเต็น 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำเป็นเม็ดได้ดี และมีปริมาณจุลินทรีย์รอดชีวิตอยู่ในช่วง 5.1×10^6 cfu/g ถึง 2.7×10^6 cfu/g รูปแบบที่ 2 ใช้ยิปซัมผสมหินฟอสเฟต แล้วอัดเม็ดโดยใช้พิมพ์อกลีติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ยาว 0.5 เซนติเมตร

คัดเลือกได้จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส จำนวน 6 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก 1 ไอโซเลท เป็นรา 4 ไอโซเลท และแอกติโนมัยซิส 1 ไอโซเลท จุลินทรีย์ย่อยสลายไซแลน จำนวน 1 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรม

บวก และ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 ไอโซเลท ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก



รูปที่ 1. จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส และจุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน

แบคทีเรีย	แบคทีเรียเริ่มต้น (cfu/ml.)	ปริมาณแบคทีเรียมีชีวิต (cfu/เม็ด)								
		0	3	7	15	30	60	90	120	150
DC 013 B	10.0×10^7	8.3×10^6	6.0×10^4	8×10^4	5.3×10^3	3.3×10^2	5.3×10^1	-	-	-
DC 017 B	4.0×10^7	2.3×10^5	8×10^4	4×10^4	7.2×10^3	-	-	-	-	-
DC 046.6B	1.2×10^7	5.2×10^6	6×10^6	6.7×10^5	4.5×10^5	3.8×10^5	3.5×10^5	4.8×10^4	3.5×10^4	3.8×10^4
DC 070 B	214×10^7	1.8×10^7	1.9×10^7	2.2×10^6	3.0×10^6	4.4×10^6	3.1×10^6	4.2×10^6	3.5×10^5	3.2×10^5
DC 1102 B	32.0×10^7	1.3×10^7	8.7×10^5	1.5×10^6	3.6×10^6	1.9×10^6	3.5×10^6	2.2×10^5	2.6×10^4	1.1×10^4

ปริมาณเซลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลล์โลส DC 013 B DC 017 B DC 046.6 B DC 70 B และ DC 1102 B มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาบ่ม โดยเฉพาะแบคทีเรีย DC 017 B ซึ่งเป็นแบคทีเรียในสกุล Streptomyces และแบคทีเรีย DC 070B ที่ไม่พบแบคทีเรียมีชีวิตที่ระยะเวลาบ่ม 30 วัน แบคทีเรีย DC 013 B ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในสกุล Pseudomonas มีปริมาณเซลล์ ลดลงเหลือเพียง 330 DC 1102 B และที่ระยะเวลา 60 วัน เหลือเพียง 53 cfu/เม็ด ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าเม็ดวัสดุมีแนวโน้มไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์รูปแบบเม็ด เพราะให้ปริมาณเซลล์ต่ำ และเชื้อมีชีวิตอยู่รอดไม่นาน ส่วน DC 046.6B DC 070 B DC 1102 B เชื้อมีชีวิตรอดที่ระยะเวลา 150 วัน ประมาณ $10^4 - 10^5$ cfu/เม็ด และมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลา และยังคงมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์

ศึกษาวิธีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบผง นำจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์คือ DC 013 B 017 B 046.6 B 070 B และ 1102 B มาผลิตในรูปแบบผง โดยเฉพาะเลี้ยงแล้วผสมกับวัสดุคือ ยิปซัม และแป้งมันสำปะหลัง บดให้เป็นผงแล้วบรรจุลง แล้วซีลปิดปากถุง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และความสามารถในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ที่ 0 3 7 15 30 60 90 120 150 180 และ 360 วัน เบื้องต้นพบว่าที่ 150 วัน DC 013 B 017 B 046.6 B 070 B และ 1102 B ในรูปแบบผงเซลล์ยังมีชีวิตประมาณ $10^4 - 10^5$ cfu/เม็ด และยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลล์โลส

ตารางที่ 3. ปริมาณ DC 013 B, 017 B, 046.6 B, 070 B และ 1102 B ที่มีชีวิตในรูปแบบผง

แบคทีเรีย	แบคทีเรียเริ่มต้น (cfu/ml.)	ปริมาณแบคทีเรียมีชีวิต (cfu/เม็ด)								
		0	3	7	15	30	60	90	120	150
DC 013 B	10.0×10^7	5.3×10^6	2.6×10^5	2.5×10^5	5.3×10^5	3.3×10^5	5.3×10^5	3.7×10^5	4.2×10^4	2.8×10^4
DC	4.0×10^7	2.7×10^5	4.2×10^5	3.4×10^5	2.2×10^5	2.9×10^5	2.2×10^4	3.0×10^5	3.4×10^4	2.1×10^4

017 B										
DC 046.6B	1.2×10^7	2.2×10^6	3.6×10^6	6.7×10^5	4.5×10^5	3.8×10^5	3.5×10^5	4.8×10^4	3.5×10^4	3.8×10^4
DC 070 B	214×10^7	3.8×10^7	2.9×10^7	2.2×10^6	3.0×10^6	3.4×10^6	3.1×10^6	4.2×10^6	3.5×10^5	3.2×10^5
DC 1102 B	32.0×10^7	5.3×10^7	8.7×10^5	2.5×10^6	3.6×10^6	2.9×10^6	3.5×10^6	2.2×10^6	2.6×10^5	2.1×10^5

9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายจำนวน 6 ไอโซเลท คือ DC 013 B, DC 017 B, DC 046.6 B, DC070 B และ DC 1102 B เป็นแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแอคติโนมัยซิส 1 ไอโซเลท จุลินทรีย์ย่อยสลายไซแลน จำนวน 1 ไอโซเลท และ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 ไอโซเลท เชลลูโลส จำนวน 6 ไอโซเลท

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบเม็ด วัตถุประสงค์ที่จะใช้ในการทดลองทำเม็ด ได้แก่ ยิปซัม หินฟอสเฟต ปุ๋ยหมักบดละเอียด สารสกัดจากข้าวสาลี (wheat gluten) ที่ระยะเวลาบ่ม 60 วัน เชลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ย่อยสลายเชลลูโลส DC 70 B และ DC1102 B เหลือปริมาณเชลล์ที่มีชีวิตที่ 10^6 cfu/เม็ด ส่วนสายพันธุ์อื่นมีชีวิตรอดต่ำ

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบผง โดยเฉพาะเลี้ยงแล้วผสมกับวัสดุคือ ยิปซัม และแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาบ่ม 60 วัน เชลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ย่อยสลายเชลลูโลส DC 013 B, 017 B, 046.6 B, 070 B และ 1102 B เหลือปริมาณเชลล์ที่มีชีวิตที่ 10^6 cfu/กรัม

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพเบื้องต้นในสภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง

- Mandels, M and J. Weber. 1969. Cellulase and their application. Advances in Chemistry Series. 95: p.391
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Soomogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380