1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

กิจกรรมย่อย : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตรูปแบบเชื้อผสม

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : ศึกษาการผลิตจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปแบบหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในสภาพ ห้องปฏิบัติการ

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) :

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางภาวนา ลิกขนานนท์

ผู้ร่วมงาน : นางสุปรานี มั่นหมาย

: นายอธิปัตย์ คลังบุญครอง

: นางสาวธูปหอม พิเนตรเสถียร

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ด้าน

6. คำนำ

กรมวิชาการเกษตรได้ผลิตผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ เพื่อการจำหน่ายจ่ายแจกแก่เกษตรกรไว้ใช้ประโยชน์ในการทำปุ๋ยหมัก หัวเชื้อจุลินทรีย์ฯประกอบด้วย จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่และเป็นจุลินทรีย์พวกที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) โดยใช้ดินพีทเป็นวัสดุพา จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซิส จากการเก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสตามกิจกรรมการสำรวจรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ดินที่ผ่านมา ได้จุลินทรีย์จำนวนหนึ่ง ที่มีประสิทธิภาพ และมีจุลินทรีย์ที่แสดงกิจกรรมการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส โปรตีนและไขมัน ประกอบกับการที่ไม่สามารถหาดินพีทที่มีคุณภาพมาใช้เป็นวัสดุพาเชื้อในขั้นตอนการผลิตได้ จึงทำให้มีความจำเป็นต้องพัฒนาการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์เพื่อใช้ช่วยในขั้นตอนการทำปุ๋ยหมัก และเพื่อให้ได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ฯที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่นการผลิตปุ๋ยอินทรีย์น้ำ การย่อยสลายตอซังข้าว ฯลฯ

ในสภาพธรรมชาติจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ก่อให้เกิดกระบวนการย่อยสลาย ซึ่งมักจะเป็นเศษวัสดุพืชเป็นส่วนมาก กระบวนการเป็นปุ๋ยหมัก (composting) เป็นกระบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ของวัสดุอินทรีย์ในรูปที่เป็นของแข็ง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายในสภาพใช้อากาศและต้องผ่านระยะที่อุณหภูมิขึ้นสูง (Finstein and Morris, 1975) มีการศึกษาจำนวนมากที่ชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่เฉพาะเจาะจงที่มีอยู่ในกองปุ๋ยหมักมีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของปุ๋ยหมักหรือมีผลเร่งอัตราการย่อยสลายเป็นปุ๋ยหมัก (Nakasaki and Uehara, 1996; Requena et al., 1996; Kuo-Shu et al., 1998; Badr El-Din et al., 2000) จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสซึ่ง

เป็นสารประกอบที่มีมากในพืชได้ โดยผ่านกระบวนการทางเอนไซม์เซลลูเลสที่จุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่นเกิดจากกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง ซึ่งส่วนมากคือแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* spp. (Strom, 1985) เชื้อราและแอคติโนมัยซิสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลส ลิกนิน และวัสดุที่ย่อยสลายยากอื่นๆ เชื้อแอคติโนมัยซิสสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้เพียงเล็กน้อยและย่อยสลายได้น้อยกว่า เชื้อรา แต่จะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เชื้อรามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสมากกว่า 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 แล้วทำการเขี่ยเชื้อแบบ 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

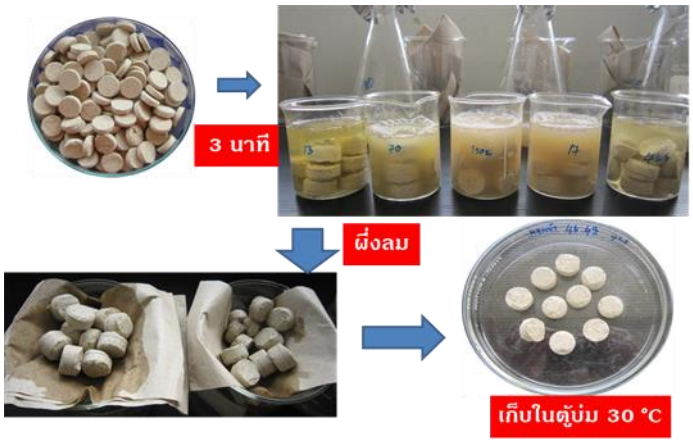
จำนวน 12 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 7 สายพันธุ์ และแกรมลบ จำนวน 5 สายพันธุ์ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 สายพันธุ์ รวบรวมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ และจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection

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

คัดเลือกได้จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส จำนวน 6 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก 1 ไอโซเลท เป็นรา 4 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซิส 1 ไอโซเลท จุลินทรีย์ย่อยสลายไซแลน จำนวน 1 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 ไอโซเลท ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

รูปที่ 1 จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส และจุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน

ศึกษาวิธีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบเม็ด คัดเลือกวัตถุดิบที่จะใช้ในการทดลองทำเม็ด ได้แก่ ยิปซัม หินฟอสเฟต ปุ๋ยหมักบดละเอียด สารสกัดจากข้าวสาลี (wheat gluten) และอื่นๆ แล้วทดลองทำเม็ดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตรด้วยแผ่นอะคลิลิคเจาะรู จากนั้นเลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ของกรมวิชาการเกษตร คือ DC 013 B 017 B 046.6 B 070 B และ 1102 B นำเม็ดวัสดุแช่ในสารละลายเชื้อ นาน 3 นาที ผึ่งลม แล้วเก็บในตู้บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ครบกำหนด 0 3 7 15 30 60 90 120 150 180 และ 360 วัน ทำการนับปริมาณเซลล์มีชีวิต



ปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในการแช่เม็ดวัสดุ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในการแช่เม็ดวัสดุ

แบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิต (cfu/ml.)
DC 013 B	10.0×10^{7}
DC 017 B	4.0×10^{7}
DC 046.6 B	1.2×10^{7}
DC 070 B	214.0×10^{7}
DC 1102 B	32.0×10^{7}

ปริมาณแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสในเม็ดวัสดุขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตรที่ระยะเวลาบ่มต่างๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณ DC 013 B, 017 B, 046.6 B, 070 B และ 1102 B ที่มีชีวิตในเม็ดวัสดุ

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

ปริมาณเซลล์มีชีวิตของจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส 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 และมีแนวโน้มลดลดตามระยะเวลา และยังคงมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์

ศึกษาวิธีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในรูปแบบผง นำจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ คือ DC 013 B 017 B 046.6 B 070 B และ 1102 B มาผลิตในรูปแบบผง โดยเพาะเลี้ยงแล้วผสมกับวัสดุคือ ยิปซัม และแป้งมันสำปะหลัง บดให้เป็นผงแล้วบรรจุถุง แล้วซีลปิดปากถุง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และความสามารถในการย่อยสลายวัสดุ วัสดุอินทรีย์ที่ 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 และยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

ตารางที่ 2 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 017 B	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
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

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส จำนวน 6 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก 1 ไอโซเลท เป็นรา 4 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซิส 1 ไอโซเลท จุลินทรีย์ย่อยสลายไซแลน จำนวน 1 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมัน จำนวน 3 ไอโซเลท ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพเบื้องต้นในสภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถนำไปผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตต่อไป

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