T_649001

การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

ดาริกา วสุนธรากุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยทักษิณ
2550

1898/50

RECEIVED
BY JM DATE 28/12/50

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

A Study of Microorganisms Involving in Organic fertilizer Production Processes from Biofertilizer Plant at Takam Subdistrict Administrative Organization Hat Yai District, Songkhla Province.

ดาริกา วสุนธรากุล

Darika Vasoontarakul

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยทักษิณ
2550

Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Science degree in Biology
Thaksin University
2007

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยทักษิณ

ชื่อวิทยานิพนธ์ : การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

ชื่อ-ชื่อสกุลผู้ทำวิทยานิพนธ์ : นางสาวดาริกา วสุนธรากุล

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมภพ อินทสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมภพ อินทสุวรรณ)

..... กรรมการเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร. เปลื้อง สุวรรณมณี)

..... กรรมการเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร. อรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์)

มหาวิทยาลัยทักษิณอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยทักษิณ

.....
(รองศาสตราจารย์ประดิษฐ์ มีสุข)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

สำเร็จการศึกษาเมื่อวันที่ ..26.. เดือน..กันยายน..พ.ศ. 2550

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยทักษิณ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ของโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพ องค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และเทคนิคทางชีวโมเลกุลคือเทคนิค 16S rRNA clone library analysis ผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าปริมาณของจุลินทรีย์แตกต่างกันไปในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตโดยเฉพาะในขั้นผ่านเครื่องอบแห้งพบจุลินทรีย์มากที่สุดคือแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยสีทจำนวน 8.8±0.06, 4.5±0.06 และ 8.6±0.1 log CFU/กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลจากการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการนับเซลล์โดยตรงเมื่อย้อมด้วยสีเรืองแสง 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้เท่ากับ 9.2 ± 0.05 และ 8.5± 0.06 Log เซลล์ต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนมากกว่าการศึกษาโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ ส่วนผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่ศึกษาโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบเป็นกลุ่มที่ชอบความเค็ม (Halophilic bacteria) คือ แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Salinicoccus* ร้อยละ 97 ของจำนวนโคลนทั้งหมดในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Halomonas* คิดเป็นร้อยละ 64 ของจำนวนโคลนทั้งหมดในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้และขั้นตอนนี้พบแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทคือ แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Dietzia* คิดเป็นร้อยละ 71 ของจำนวนโคลนทั้งหมด พบแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Uncultured bacterium) ร้อยละ 2 และ 14 ของจำนวนโคลนทั้งหมดใน 2 ขั้นตอนตามลำดับ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อเนื่องจากไม่พบแบคทีเรียนี้ แต่ผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis พบไม่หลากหลายมากนักเนื่องจากปัจจัยสภาพแวดล้อมในกระบวนการผลิตปุ๋ยที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น นอกจากนี้อาจเป็นเพราะวิธีการสกัดดีเอ็นเอ จำนวนรอบของการทำ PCR สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ที่มากเกินไปและไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาไม่ครอบคลุมแบคทีเรียทุกชนิดที่มีอยู่ในขั้นตอนการผลิต อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตและการนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ไปใช้ในการพัฒนาปุ๋ยอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

Abstract

The study of microorganisms involving in organic fertilizer production processes from Biofertilizer Plant at Takam Subdistrict Administrative Organization Hat Yai District, Songkhla Province was conducted by using two techniques, namely, culture-dependent method and 16S rRNA clone library analysis technique. The results of culture-dependent method showed the numbers of microorganisms varied from different production processes. The number of bacteria, fungi and actinomycetes were found dominantly in organic fertilizer baking step (8.8±0.06 , 4.5±0.06 and 8.6±0.1 log CFU/g, respectively). However, the number of total bacteria in raw material mixture step and finished fertilizer product enumerated by direct count with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining were 9.2 ± 0.05 and 8.5± 0.06 Log cell/g, respectively which were higher than when enumerated by culture-dependent method. The 16S rRNA clone library analysis was found the halophilic bacteria were the most dominant group, namely *Salinicoccus* (97% of total clones in raw material mixture step) and *Halomonas*, (64% of total clones in finished fertilizer product). In addition, it was also found genus *Dietzia* in the actinomycetes clone library analysis from finished fertilizer product (71% of total clone). It was found some uncultured bacteria in clones, 2 and 14 of total clones in raw material mixture step and finished fertilizer product which were difference from culture-dependent method. The result of 16S rRNA clone library analysis showed low bacterial diversities which may be due to some environmental factors (such as temperature and salinity) and some limitation of analysis procedures (such as DNA extraction, PCR cycle and primers used in this study etc.) However, the result obtained from this study can be benefitial for studing the biodiversity of microorganisms in organic fertilizer production as well as the development of organic fertilizer production by adding some useful microorganisms.

ประกาศคุณูปการ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_649001

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุกูล อินทระสังขา ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ การเขียนวิทยานิพนธ์ตลอดจนตรวจแก้วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมภพ อินทสุวรรณ กรรมการที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์และตรวจทานรูปแบบให้ถูกต้องตามเกณฑ์ของบัณฑิตวิทยาลัย

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. เปลื้อง สุวรรณมณี และ อาจารย์ ดร. อรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณองค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและข้อมูลที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์การศึกษาและพัฒนาพิกุลทอง อำเภอเมือง จังหวัดนราธิวาส ที่ช่วยวิเคราะห์คุณสมบัติและธาตุอาหารพืชบางประการในปุ๋ย

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมืออุปกรณ์ สารเคมี และสนับสนุนทุนในการทำวิจัยบางส่วน

ขอขอบคุณคุณดอกรัก ชัยสาร ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคทางชีวโมเลกุล คุณมาณี แก้วชนิด ที่ให้ความสะดวกในการเบิกยืมอุปกรณ์และสารเคมี คุณพรศิลป์ จันทวีเมือง ที่อนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชคือ *Erwinia* sp. และ *Sclerotium rolfsii* คุณเวลาวี ไชยพันธ์ คุณเกยูร คำคง คุณลัดดาวรรณ จันทโหม และคุณปิยะ ส่งแสง ที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษาและให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจเสมอมา

ดาริกา วสุนธรากุล

กันยายน 2550

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	ปุ๋ยอินทรีย์	4
	ความสำคัญของปุ๋ยอินทรีย์	6
	ธาตุอาหารพืช	8
	กระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์	10
	จุลินทรีย์ในปุ๋ยอินทรีย์	11
	เทคนิคการศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์	13
	เทคนิค 16S rRNA clone library analysis	17
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
3	วิธีดำเนินการวิจัย	23
	อุปกรณ์และเครื่องมือ	23
	สารเคมี	23
	วิธีการทดลอง	25
4	ผลการวิจัยและอภิปรายผล	38
	การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของปุ๋ย	38
	การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ	39
	การศึกษาแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล	45
5	สรุปผลและข้อเสนอแนะ	61
	สรุปผล	61
	ข้อเสนอแนะ	62

สารบัญ (ต่อ)

บรรณานุกรม 63
ภาคผนวก 71
ภาคผนวก ก 72
ภาคผนวก ข 75
ประวัติย่อผู้วิจัย 81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยเคมีที่มีต่อดินและพืช	5
2	ธาตุอาหารพืชที่อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้และหน้าที่ของธาตุแต่ละชนิด	9
3	รอบการทำงานของการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีท	35
4	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	37
5	ผลการศึกษาปริมาณธาตุอาหาร อุณหภูมิ และความชื้นในปุ๋ย (จำนวน 3 ซ้ำ Mean ± Standard deviation)	39
6	การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต NP5	45
7	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ศึกษาด้วยสีเรืองแสง DAPI (Mean ± Standard deviation)	46
8	ผลการหาลำดับเบสของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	55
9	ผลการหาลำดับเบสของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่พบในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	55

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	การใช้เทคนิค Full-cycle rRNA approach ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์	18
2	ขั้นตอนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา	26
3	จำนวนจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากตัวอย่างใน 5 ขั้นตอนของกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์	41
4	การยับยั้งการเจริญของ *Erwinia* sp. ด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต St 11 และไอโซเลต St 1	42
5	การยับยั้งการเจริญของ *Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต St 1 และไอโซเลต S 2	43
6	การทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหาร NBRIP ของแบคทีเรียไอโซเลต NP 5	44
7	ภาพถ่ายเซลล์แบคทีเรียในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่ผ่านการกรองที่ศึกษาด้วยสีเรืองแสง DAPI ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้และภาพถ่ายในลักษณะการเกิด Autofluorescence จากตัวอย่างปุ๋ยที่ไม่ผ่านการกรองที่ศึกษาด้วยสีเรืองแสง DAPI ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	46
8	เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ที่ศึกษาด้วยสีเรืองแสง DAPI และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Plate count).....	47
9	แถบดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	48
10	ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ที่ได้จากการทำ PCR	49
11	บริเวณบางส่วนของยีน16S rRNA ที่เป็นบริเวณจำเพาะของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	50

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	รูปแบบของตัวแทนแต่ละ OTU ที่ได้จากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16SrRNA ของแบคทีเรียในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	51
13	จำนวนร้อยละของสมาชิกในแต่ละ OTU ที่ได้จากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp*1 ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	52
14	รูปแบบของตัวแทนแต่ละ OTU ที่ได้จากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp* 1 ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	53
15	จำนวนร้อยละของสมาชิกในแต่ละ OTU ที่ได้จากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp*1 ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	53
16	Phylogenetic tree ของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในปุ๋ยอินทรีย์จาก Clone library ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสจำนวน 700 เบสด้วยโปรแกรม MEGA 3.1	56
17	Phylogenetic tree ของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในปุ๋ยอินทรีย์จาก Clone library ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสจำนวน 700 เบสด้วยโปรแกรม MEGA 3.1	57
18	Phylogenetic tree ของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทจากClone library ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสจำนวน 300 เบสด้วยโปรแกรม MEGA 3.1	58

คำย่อ

BLAST	Basic local alignment search tool
CFU	Colony forming unit
CTAB	Cetyltrimethyl – ammonium bromide
DAPI	4',6 – Diamidino – 2 – phenylindole
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid disodium salt – 2 – hydrate
FISH	Fluorescence *in situ* hybridization
MPN	Most probable number
NBRIP	National botanical research institue's phosphate growth medium
OTU	Operational taxonomic units
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Potato dextrose agar
PFA	Paraformaldehyde
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSCP	Single strand conformation polymorphism
TGGE	Thermal gradient gel electrophoresis
T-RFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism
TSA	Trypic soy agar

บทที่1
บทนำ

1.1 ภูมิหลัง

ปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรเพิ่มสูงขึ้นและส่วนใหญ่ต้องนำเข้าปุ๋ยเคมีจากต่างประเทศทำให้สูญเสียเงินออกนอกประเทศจำนวนมาก รายงานจากสำนักงานวิจัยธุรกิจธนาคารกรุงไทยจำกัด (มหาชน) (2550) พบว่าประเทศไทยนำเข้าปุ๋ยเคมีในปี พ.ศ.2549 ปริมาณ 3.74 ล้านตันมูลค่า 37, 400 ล้านบาท ซึ่งนอกจากจะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศแล้ว ผลจากการใช้ปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นเวลานานหรือใช้ไม่ถูกต้องขาดความระมัดระวังยังส่งผลกระทบในด้านลบต่อสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะกับทรัพยากรดินซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการทำการเกษตร

จากปัญหาดังกล่าวคณะรัฐมนตรีจึงมีมติเมื่อวันที่ 22 มิถุนายน พ.ศ. 2547 เสนอแนวทางการรณรงค์การผลิตและการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพให้แพร่หลายโดยให้ถือเป็นวาระแห่งชาติเรื่องเกษตรอินทรีย์เพื่อสนับสนุนและส่งเสริมให้เกษตรกรผลิตและใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพในการเกษตรให้มากขึ้น นอกจากนี้รัฐบาลมีแผนส่งเสริมการสร้างโรงงานปุ๋ยอินทรีย์กว่า 7,000 แห่งทั่วประเทศเพื่อผลิตปุ๋ยจำหน่ายแก่เกษตรกรในชุมชน (กรมพัฒนาที่ดิน. 2547) โดยใช้วัตถุดิบจากวัสดุเหลือใช้ในชุมชนมาผลิตโดยวิธีการผลิตนั้นได้นำต้องอาศัยภูมิปัญญาท้องถิ่นผสานกับความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทั้งในและต่างประเทศควบคู่กัน

โรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพองค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้ามตั้งอยู่ที่หมู่ 4 บ้านเกาะปลัก ตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เป็นโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพตัวอย่างในระดับตำบลที่สร้างจากเงินกองทุนมิยาซาวาที่รัฐบาลในสมัยนายชวน หลีกภัย เป็นนายกรัฐมนตรีจัดสรรให้แก่หมู่บ้านละ 1 ล้านบาท เมื่อปี พ.ศ. 2546 โรงงานแห่งนี้ตั้งขึ้นในรูปแบบสหกรณ์ที่เกิดจากการรวมกลุ่มของเกษตรกรในหมู่บ้านที่ประกอบอาชีพทำสวนยางพาราและทำนาซึ่งกระบวนการผลิตของโรงงานแห่งนี้ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีภายในหมู่บ้านคือรำละเอียด รำหยาบ ขี้ไก่ แกลบเผา และแกลบหมักนำมาผสมกับสารปรับปรุงดินคือผงซิลิกอนและโดโลไมต์ นอกจากนี้ใช้น้ำหมักชีวภาพที่ผลิตขึ้นเองและหัวเชื้อจุลินทรีย์ พด. 1 ของกรมพัฒนาที่ดินมาผสมด้วยจากนั้นนำวัสดุต่าง ๆ ที่ผสมกันเข้าเครื่องอัดเม็ดแล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส นำปุ๋ยอัดเม็ดที่ได้ตากทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน แล้วบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้

เมื่อพิจารณาจากลักษณะของวัสดุที่นำมาใช้ในการผลิตและกระบวนการผลิตพบว่าปุ๋ยของโรงงานแห่งนี้ควรจะเรียกว่า "ปุ๋ยอินทรีย์" มากกว่าปุ๋ยชีวภาพเนื่องจากวัสดุที่นำมาใช้ผลิตส่วนใหญ่เป็นอินทรียสารที่ช่วยเพิ่มปริมาณของอินทรียวัตถุในดินไม่ใช่ "ปุ๋ยชีวภาพ" ที่หมายถึงจุลินทรีย์ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มธาตุอาหารหลักของพืชตามความหมายทางวิชาการแต่โรงงานแห่งนี้อาจเป็นโรงงานปุ๋ยชีวภาพที่มีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ก็เป็นได้ ดังนั้นจึงเป็นประเด็นที่น่าศึกษาเกี่ยวกับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยของโรงงานแห่งนี้ โดยทั่วไปวิธีการศึกษาจุลินทรีย์ในปุ๋ยนั้นใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture-dependent method) ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ในดินหรือปุ๋ยพบเพียงร้อยละ 1 เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Kirk et al. 2004) ต่อมาเป็นที่ยอมรับกันมากขึ้นว่าเทคนิคทางชีวโมเลกุลใช้ศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ได้โดยไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่อาศัยข้อมูลจากลำดับเบสของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA)เนื่องจากมีความสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตซึ่งไม่ว่าจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้ดีหรือไม่ดีก็ยังคงตรวจพบ rRNA ที่ใช้เป็นยีนเครื่องหมายทำให้สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบและหาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อจะศึกษาจุลินทรีย์ 4 ประเภทคือ แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท รา และยีสต์ ส่วนเทคนิคทางชีวโมเลกุลจะศึกษาแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีท ซึ่งเทคนิคที่ใช้ศึกษาคือ 16S rRNA clone library analysis ผลการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และการนำไปใช้พัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพต่อไปได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษากระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของปุ๋ย

1.2.2 เพื่อสำรวจและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.2.3 เพื่อศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis

1.2.4 เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.3.1 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพ

1.3.2 เพื่อเป็นการยืนยันวิธีการศึกษาจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลว่ามีความแม่นยำและให้ผลที่ถูกต้องกว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.3.3 เพื่อเป็นแนวทางในการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมไปใช้ในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพสูงต่อไป

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 ศึกษากระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ของโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพองค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของปุ๋ยในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้

1.4.2 นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นของกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ศึกษาแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชคือ *Erwinia* sp. และ *Sclerotium rolfsii* ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้และคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟต

1.4.3 ศึกษาแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลคือ การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเมื่อย้อมด้วยสีเรืองแสง 4',6 – Diamidino – 2 – phenylindole (DAPI) และศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis นอกจากนี้ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้จะศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีการใช้ปุ๋ยเคมีทางการเกษตรมากขึ้นเพื่อเพิ่มผลผลิตแต่ผลกระทบที่ตามมาคือ พื้นดินขาดความอุดมสมบูรณ์ทำให้ความสามารถในการเพิ่มผลผลิตพืชลดลง แนวทางหนึ่งที่จะทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์สามารถปลูกพืชให้ได้ผลผลิตสูงคือ การปรับปรุงดินโดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์ เพราะช่วยปรับปรุงคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ของดินให้ดีขึ้น เนื่องจากปุ๋ยอินทรีย์เป็นอินทรียสารที่ประกอบด้วยเศษซากพืชและซากสัตว์ที่เน่าเปื่อยผุพังโดยกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์หลายชนิดที่อยู่รวมกันและมีความสัมพันธ์ระหว่างกัน ซึ่งการศึกษาจุลินทรีย์เหล่านั้นในอดีตนิยมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดที่ทำให้ไม่สามารถศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยไม่ต้องใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อแต่อาศัยชิ้นส่วนสารพันธุกรรมซึ่งสามารถสกัดออกมาได้โดยตรงจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมทุกประเภทรวมถึงในปุ๋ยอินทรีย์

2.1 ปุ๋ยอินทรีย์

ปุ๋ยอินทรีย์คือ ปุ๋ยที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารอินทรีย์ต่าง ๆ ซึ่งได้มาจากซากพืช ซากสัตว์รวมทั้งสิ่งขับถ่ายจากสัตว์ เศษเหลือของสารอินทรีย์ต่าง ๆ เซลล์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จะเป็นประโยชน์ต่อพืชเมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์เสียก่อน ปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่ ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสด และปุ๋ยหมักชนิดต่าง ๆ (ธงชัย. 2546)

ปุ๋ยอินทรีย์มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับวัตถุที่นำมาใช้และกรรมวิธีการผลิตเช่น ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสด เป็นต้น สำหรับลักษณะของปุ๋ยอินทรีย์ที่มีการผลิตและจำหน่ายในปัจจุบันมีอยู่ 3 รูปแบบคือ

1. ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดหยาบหรือเป็นผงซึ่งพบในรูปของปุ๋ยหมัก หรือปุ๋ยคอก
2. ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดเม็ดที่ผ่านกระบวนการปั้นเม็ดเหมือนปุ๋ยเคมีหรือกระบวนการอัดเม็ดเหมือนอาหารสัตว์

3. ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดน้ำหรือปุ๋ยน้ำชีวภาพมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้มซึ่งได้มาจากกระบวนการหมักวัตถุดิบสด เช่น เศษผัก ผลไม้ เศษซากสัตว์หรือวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตรผสมกับกากน้ำตาลหรือน้ำตาลทรายแดงโดยผ่านกิจกรรมของจุลินทรีย์ซึ่งทำให้วัตถุดิบดังกล่าวสลายตัวเป็นธาตุอาหารพืช สารปรับปรุงบำรุงดิน สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช วิตามิน กรดอะมิโนต่างๆรวมไปถึงสารอินทรีย์ต่างๆ และสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยทั่วไปปุ๋ยอินทรีย์ชนิดน้ำผลิตจากวัตถุดิบหลักๆ คือ พืชผัก ผลไม้ ซากสัตว์ และจากการผสมระหว่างพืชผัก ผลไม้ และสัตว์ เมื่อเปรียบเทียบผลของปุ๋ยเคมีพบว่าปุ๋ยอินทรีย์มีผลในการช่วยปรับปรุงคุณภาพของดินให้เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าปุ๋ยเคมี (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยเคมีที่มีต่อดินและพืช

คุณสมบัติ	ปุ๋ยอินทรีย์	ปุ๋ยเคมี
1. ปริมาณธาตุอาหาร	ปริมาณธาตุอาหารต่ำกว่าแต่มีธาตุอาหารรองและจุลธาตุ	มีปริมาณธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูงกว่า
2. การให้ผลผลิตพืช	ระยะสั้นให้ผลผลิตต่ำกว่าแต่ระยะยาวให้ผลผลิตสูงกว่า	ระยะสั้นให้ผลผลิตสูงกว่าแต่ระยะยาวให้ผลผลิตต่ำกว่า
3. ผลต่อคุณสมบัติทางเคมีของดิน	ไม่มีผลกระทบต่อดิน	ปุ๋ยบางชนิดทำให้ดินเป็นกรด
4. ผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของดิน	อนุภาคดินจับตัวเป็นก้อน ไม่อัดแน่น อุ้มน้ำดี ถ่ายเทอากาศดี	ดินอัดตัวแน่นเมื่อดินแห้ง
5. ผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของดิน	แหล่งอาหารของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก	ปุ๋ยไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสส่งเสริมการเจริญของสาหร่ายหรือจุลินทรีย์บางชนิดแต่ปุ๋ยโพแทสเซียมมีผลน้อยกว่า
6. แหล่งที่มา	หาได้ตามท้องถิ่นหรือผลิตได้เอง	ซื้อ
7. ราคา	ถูก	ไม่แน่นอนอาจแพงหรือถูกขึ้นอยู่กับภาวะของตลาดและการเมือง
8. ปริมาณการใช้	มาก	น้อย

ที่มา : สำนักงานเลขานุการโครงการฉลากเขียว (2545)

2.2 ความสำคัญของปุ๋ยอินทรีย์

การใส่ปุ๋ยอินทรีย์เป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุในดินโดยเฉพาะดินในประเทศไทยมีอินทรียวัตถุต่ำเนื่องจากปัจจัยต่างๆ เช่น สภาพอากาศร้อนชื้นทำให้อัตราการย่อยสลายอินทรียวัตถุในดินเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว การทำการเกษตรติดต่อเป็นระยะเวลานานโดยไม่มีการเพิ่มอินทรียวัตถุให้แก่ดินอย่างเพียงพอ และการใช้ที่ดินอย่างไม่เหมาะสมตามสมรรถนะของพื้นที่ทำให้อินทรียวัตถุในดินลดลงเนื่องจากถูกชะล้าง (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548) ดินที่ใช้ในการเพาะปลูกส่วนใหญ่มีอินทรียวัตถุน้อยจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเพิ่มอินทรียวัตถุในรูปต่าง ๆ ลงสู่ดิน ปุ๋ยอินทรีย์จึงมีศักยภาพสูงในการปรับปรุงดินได้เนื่องจากมีประโยชน์ต่อคุณสมบัติของดินในด้านต่าง ๆ ดังนี้

2.2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของดิน

2.2.1.1 ช่วยลดการเกิดปัญหาดินแน่นและการชะล้างพังทลายของดิน

การศึกษาการซาบซึมของน้ำในดินที่มีอินทรียวัตถุในดินต่างกันทำให้ทราบว่าอัตราการซาบซึมน้ำเป็นไปได้ดีและต่อเนื่องในดินที่มีอินทรียวัตถุสูง เมื่อการระบายอากาศและการซาบซึมน้ำของดินดีขึ้นทำให้ระบบรากของพืชสามารถแผ่กระจายในดินได้อย่างกว้างขวางสามารถดูดธาตุอาหารได้มาก(ธวัชชัย. 2533)

2.2.1.2 ช่วยเพิ่มช่องว่างและลดความหนาแน่นรวมของดิน

ปุ๋ยอินทรีย์ที่ใส่ลงไปจะถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายและสังเคราะห์สารบางชนิดขึ้นมาซึ่งเป็นตัวเชื่อมอนุภาคของดินให้เกาะกันเป็นก้อนทำให้ดินทรายสามารถอุ้มน้ำได้ดีขึ้น ในดินเหนียวอินทรียวัตถุจะทำให้ดินมีช่องว่างเพิ่มมากขึ้นทำให้สะดวกในการไถพรวนมากขึ้น (อำนาจ. 2548)

2.2.1.3 ช่วยป้องกันการระเหยของน้ำในดิน

มุกดา (2548) รายงานว่าอินทรียวัตถุสามารถอุ้มน้ำได้ 7 เท่าของน้ำหนักอินทรียวัตถุเนื่องจากอนุภาคของอินทรียวัตถุจะแทรกหรือเคลือบที่ผิวของอนุภาคดินและในช่องว่างระหว่างอนุภาคดินทำหน้าที่ดูดซับน้ำ นอกจากนั้นเมื่อปริมาณอินทรียวัตถุในดินชั้นบนเพิ่มขึ้นจะมีผลต่อความเสถียรของเม็ดดินสูงขึ้นทำให้ลดความรุนแรงของการสูญเสียหน้าดิน

2.2.2. คุณสมบัติทางเคมีของดิน

2.2.2.1 เป็นแหล่งอาหารของพืช

เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายของอินทรียสารที่ได้จากปุ๋ยอินทรีย์จะปลดปล่อยธาตุอาหารพืชออกมาโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินทั้งธาตุอาหารหลักและธาตุอาหาร

รองแม้ว่าปริมาณธาตุอาหารพืชได้จากการสลายตัวของอินทรียวัตถุจะมีน้อยแต่พืชสามารถนำธาตุอาหารไปใช้ได้อย่างต่อเนื่องโดยค่อย ๆ ปลดปล่อยให้เป็นประโยชน์ต่อพืชในระยะยาว

2.2.2.2 เพิ่มความสามารถในการดูดซับประจุบวก

อินทรียวัตถุเป็นสารที่มีขนาดเล็กและพื้นที่ผิวมากโดยสมบัติทางเคมีของอินทรียวัตถุมีหมู่ที่ทำหน้าที่ (Functional groups) มากเช่น กรดอินทรีย์ กรดคาร์บอนิก เป็นต้น เมื่อเกิดกระบวนการแตกตัวของสาร (Dissociation) ทำให้เกิดไอออนลบขึ้นบริเวณพื้นที่ผิวอินทรียวัตถุ (มุกดา. 2544) ทำให้ธาตุอาหารพืชที่ใส่ลงไปในรูปปุ๋ยเคมีหรือธาตุอาหารพืชถูกดูดซับไว้ไม่ให้สูญเสียไปโดยกระบวนการชะล้างซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการใช้ธาตุอาหารของพืชดียิ่งขึ้น

2.2.3. คุณสมบัติทางชีวภาพของดิน

2.2.3.1 เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ในดิน

อินทรียสารที่อยู่ในดินจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งผลที่ได้จากการย่อยสลายคือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์ต่าง ๆ สารประกอบที่เป็นเมือก และธาตุอาหารต่าง ๆ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นเมื่อรวมกับน้ำในดินจะเกิดเป็นกรดคาร์บอนิกและกรดอินทรีย์ซึ่งจะช่วยละลายธาตุอาหารพืชบางชนิดในดินให้เป็นประโยชน์ต่อพืชมากยิ่งขึ้น เช่น ฟอสฟอรัส แคลเซียม เหล็ก และแมงกานีส เป็นต้น เมื่อจุลินทรีย์ในดินได้รับธาตุอาหารเพิ่มขึ้นจะดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ทำให้เกิดการแปรสภาพของอินทรียสารโดยจุลินทรีย์บางชนิดในดิน การเปลี่ยนรูปแอมโมเนียมซึ่งเป็นรูปที่พืชนำไปใช้ได้ยากให้อยู่ในรูปของไนไตรท์และไนเตรทซึ่งพืชนำไปใช้ได้ง่ายหรือการแปรสภาพของสารอนินทรีย์โดยจุลินทรีย์บางชนิดที่ผลิตกรดละลายธาตุอาหารในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช

2.2.3.2 ช่วยควบคุมโรคพืชบางชนิดในดิน

เสียงแจ่ว และวรรณลดา (2540) พบว่าการใช้ปุ๋ยอินทรีย์มีแนวโน้มที่สามารถลดความรุนแรงของเชื้อ *Rhizoctonia solani* ซึ่งทำให้เกิดโรคเน่าคอดิน (Damping off) ในพืชผักและผลไม้หลายชนิด เนื่องจากปุ๋ยอินทรีย์จะช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในดินและเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นบางชนิดมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมปริมาณและกิจกรรมของเชื้อราดังกล่าว

2.3 ธาตุอาหารพืช

ปัจจัยที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยทั่วไปคือ พันธุกรรม และสภาพแวดล้อม ได้แก่ แสงสว่าง ความชื้น ชนิดและปริมาณของก๊าซต่าง ๆ ในบรรยากาศ ความเป็นกรด-ด่างในดิน โรค และแมลงศัตรูพืชและชนิดของปริมาณธาตุอาหาร โดยพืชจะต้องได้รับธาตุอาหารที่จำเป็น (Essential elements) ต่อการเจริญเติบโตครบทุกธาตุในปริมาณสัดส่วนเหมาะสมจึงจะเจริญเติบโตอย่างปกติและธาตุอาหารต่าง ๆ เหล่านี้ต้องอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (ตารางที่ 2) ซึ่งธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืชชั้นสูงมี 16 ชนิด ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน เหล็ก แมงกานีส สังกะสีทองแดง โบรอน โมลิบดินัม และคลอรีน นอกจากนี้เป็นธาตุอาหารที่พืชบางชนิดเท่านั้นที่ใช้โดยธาตุอาหารที่ได้จากอากาศ และ น้ำ คือ คาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจน โดยคาร์บอนอยู่ในรูปคาร์บอนไดออกไซด์ได้จากอากาศเข้าทางปากใบ ออกซิเจนอยู่ในรูปก๊าซเข้าทางปากใบและผิวราก และไฮโดรเจนได้จากน้ำ ส่วนอีก 13 ธาตุได้มาจากดิน ปุ๋ยอินทรีย์ หรือปุ๋ยเคมี ซึ่งธาตุอาหารพืชจากดินทั้ง 13 ธาตุนี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทคือ

1. ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient elements) คือธาตุอาหารที่พืชต้องการปริมาณมาก ความเข้มข้นของธาตุโดยน้ำหนักแห้งเมื่อพืชเจริญเต็มวัยสูงกว่า 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ยงยุทธ. 2543) ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม

2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrient elements) คือธาตุอาหารที่พืชต้องการปริมาณน้อย ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และกำมะถัน

3. ธาตุอาหารเสริม (Trace elements) คือธาตุที่พืชต้องการในปริมาณน้อย แต่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของพืช หากขาดธาตุเหล่านี้พืชไม่สามารถเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตแต่ถ้ามีมากเกินไปจะเป็นพิษต่อพืช ซึ่งธาตุอาหารเหล่านี้ได้แก่ แมงกานีส สังกะสี ทองแดง โบรอน โมลิบดินัม เหล็ก และคลอรีน

ตารางที่ 2 ธาตุอาหารพืชที่อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้และหน้าที่ของธาตุแต่ละชนิด

ธาตุ	รูปที่พืชนำไปใช้	หน้าที่
ไนโตรเจน	NO_3^-, NH_4^+	องค์ประกอบของโปรตีน กรดอะมิโน คลอโรฟิลล์
ฟอสฟอรัส	$H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}	มีบทบาทเกี่ยวกับเมแทบอลิซึมของคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน รวมทั้งระบบการการหายใจและสังเคราะห์แสง
โพแทสเซียม	K^+	เป็นตัวควบคุมการปิด เปิดปากใบและสังเคราะห์แสง มีความสำคัญต่อการเกิดแป้ง การเปลี่ยนเป็นน้ำตาล ความต้านทานต่อเชื้อ การสร้างคลอโรฟิลล์ เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์บางชนิด
แคลเซียม	Ca^{2+}	เป็นองค์ประกอบของ Ca-pectate ควบคุมเมแทบอลิซึม มีความสำคัญต่อโครงสร้างของผนังเซลล์ การแบ่งเซลล์
แมกนีเซียม	Mg^{2+}	เป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ โปรตีน มีส่วนสำคัญในการนำพลังงานไปใช้งาน
กำมะถัน	SO_4^{2-}	เป็นองค์ประกอบของโปรตีน กรดอะมิโน วิตามิน มีความสำคัญต่อระบบการหายใจ
เหล็ก	Fe^{3+}, Fe^{2+}	เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ในการสังเคราะห์แสง
โบรอน	H_3BO_3	มีบทบาทในการสร้างผนังเซลล์ การออกดอก ติดผล
โมลิบดินัม	MoO_4^-	มีบทบาทในการตรึงไนโตรเจน
ทองแดง	Cu^{2+}, Cu^+	เป็นองค์ประกอบของโปรตีน เอนไซม์ มีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์แสง
สังกะสี	Zn^{2+} , Zinc chelate	กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ การสังเคราะห์ทริปโตแฟน ซึ่งเป็นสารหลักในการสร้างฮอร์โมนออกซิน
คลอรีน	Cl^-	ช่วยในการเจริญเติบโตของรากและยอด การสร้างน้ำตาลในพืช เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในขบวนการ Oxidative phosphorylation
แมงกานีส	Mn^{2+}	ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ การถ่ายทอดอิเลกตรอน มีบทบาทในการสร้างกรดอะมิโน

ที่มา : นฤมล และเยาวภา (2546)

2.4 กระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์

การผลิตปุ๋ยอินทรีย์เป็นความรู้ที่เกษตรกรสามารถผลิตได้ทั่วไปและนิยมผลิตมากขึ้นในระบบการผลิตพืชแบบอินทรีย์เนื่องจากสามารถนำวัตถุดิบต่าง ๆ ที่หาง่ายและพบมากในท้องถิ่นมาผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้ การผลิตปุ๋ยอินทรีย์มีความก้าวหน้ามากขึ้นนอกจากการผลิตปุ๋ยหมักแบบกองพื้นในลักษณะปุ๋ยผงที่นิยมแต่เดิมแล้ว ปัจจุบันมีการพัฒนารูปแบบของปุ๋ยให้มีลักษณะเป็นเม็ดตรงตามความต้องการของเกษตรกรมากขึ้นเนื่องจากสะดวกในการนำไปใช้ ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อหว่านลงแปลง เก็บรักษาไว้ได้นาน เป็นต้นซึ่งมีกระบวนการผลิตดังนี้

1. การเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตจะใช้วัตถุดิบเช่นเดียวกับการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ทั่วไปคือ มูลสัตว์ เศษซากพืชและสัตว์รวมทั้งเศษขยะจากบ้านเรือนโดยใช้เดี่ยว ๆ หรือผสมผสานกัน ซึ่งการเลือกวัตถุดิบมาผลิตปุ๋ยอัดเม็ดนั้นต้องคำนึงถึงธาตุอาหารต่าง ๆ ในวัตถุดิบเป็นสำคัญและนำไปอิงกับความต้องการธาตุอาหารของพืชที่จะนำปุ๋ยอินทรีย์ไปใช้ การเตรียมวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดมีหลักการดังนี้

1.1 การหมักวัตถุดิบ

วัตถุดิบก่อนการผลิตเป็นเม็ดต้องย่อยสลายโดยสมบูรณ์ก่อนซึ่งต้องมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) อยู่ในช่วงไม่เกิน 20 : 1 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับดิน (สมบูรณ์. 2549) โดยทั่วไปวัตถุดิบต่าง ๆ ก่อนการหมักจะมีค่า C/N ratio แตกต่างกันไปซึ่งสามารถลดค่าดังกล่าวให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมได้ด้วยวิธีการหมักให้มีการย่อยสลายเมื่อหมักสมบูรณ์จะไม่มีความร้อนเกิดขึ้นนอกจากการหมักให้สมบูรณ์แล้ววัตถุดิบก่อนการหมักต้องสะอาดไม่มีเชื้อโรคหรือสิ่งเจือปนอื่น ๆ

1.2 การบดวัตถุดิบ

ปุ๋ยที่จะผลิตเป็นเม็ดได้ต้องมีขนาดเล็กถ้ามีขนาดใหญ่เมื่อใช้งานการย่อยสลายจะช้าไปด้วยและเป็นปัญหาในขั้นตอนการอัดเม็ดดังนั้นควรบดให้มีลักษณะเหมือนผงแป้ง

2. การผสมวัตถุดิบ

นำวัตถุดิบแต่ละชนิดใส่ลงในเครื่องผสมเพื่อคลุกเคล้าวัตถุดิบให้เข้ากัน พรมสารละลายหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงในถังผสมวัตถุดิบเพื่อเพิ่มความชื้นเมื่อผสมเข้ากันดีแล้วตรวจสอบความชื้นของปุ๋ยให้อยู่ในระดับร้อยละ 40-50 (เมธี. 2542)

3. การอัดเม็ด

นำวัตถุดิบที่ผสมเข้ากันแล้วไปผ่านกระบวนการอัดด้วยเครื่องประเภทบดเนื้อสัตว์ บดอาหารสัตว์ซึ่งจะบดและอัดไปพร้อมกัน ปุ๋ยจะออกมาเป็นเส้นจากรูตะแกรงของแป้นจากนั้นนำมาปาดหรือตัดด้วยใบมีดจากเครื่องแล้วนำไปตากแดด อบ หรือ ตากลมเพื่อให้ปุ๋ยแห้งเหลือความชื้นร้อยละ 10-15 ไม่มีเชื้อรา เก็บรักษาไว้ได้นาน เม็ดปุ๋ยจากการอัดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร หรือ 5-6 มิลลิเมตรขนาดจะขึ้นกับขนาดของรูเครื่องอัดตามมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์จะมีขนาดไม่เกิน 12.5 x 12.5 มิลลิเมตร (ไพฑูรย์. 2549)

4. การอบแห้ง

นำปุ๋ยที่อัดเม็ดขึ้นสายพานเข้าสู่เครื่องอบที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสก่อนผ่านเข้าสู่เครื่องเป่าลมเย็นเพื่อไล่ความชื้นที่อยู่ในเม็ดปุ๋ยจากขั้นตอนการอัดเม็ด

5. การบรรจุกระสอบ

บรรจุปุ๋ยลงกระสอบขนาด 50 กิโลกรัมหรือตามความต้องการของลูกค้าก่อนนำไปเก็บในโรงเก็บปุ๋ยเพื่อรอจำหน่าย

2.5 จุลินทรีย์ในปุ๋ยอินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในปุ๋ยอินทรีย์มักได้จากดินที่อุดมสมบูรณ์หรือวัสดุประเภทต่าง ๆ ที่ใช้ทำปุ๋ย นอกจากนี้อาจมาจากหัวเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้าหรือจากหน่วยงานของรัฐบาล เช่น กรมพัฒนาที่ดินที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้เป็นตัวเร่งการเจริญและขยายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ชนิดต่างๆ ที่มีในปุ๋ยซึ่งชนิดของจุลินทรีย์แตกต่างกันขึ้นอยู่กับการจัดการในกระบวนการผลิตโดยส่วนใหญ่พบจุลินทรีย์ 3 กลุ่มด้วยกันดังนี้

1. แบคทีเรีย (Bacteria)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้พบมากที่สุดและมีบทบาทมากเนื่องจากสามารถเจริญได้เร็วรวมทั้งเป็นกลุ่มที่ทนอุณหภูมิสูงได้ดีและพบมากทั้งในวัสดุที่ย่อยสลายยากเช่น ขี้เลื่อย กากอ้อย แกลบ ขุยมะพร้าว เป็นต้นและในวัสดุที่ย่อยสลายง่ายเช่น ฟางข้าว ผักตบชวา ถั่วลิสง เป็นต้น (พิทยากรและฉวีวรรณ. 2540) ซึ่งแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยส่วนใหญ่คือ แบคทีเรียทั่วไปที่พบอยู่ในดิน ได้แก่ *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* และ *Bacillus* ซึ่ง *Bacillus* พบมากกว่าชนิดอื่นโดยเฉพาะกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูงได้แก่ *B.subtilis* และ*B. stearothermophilus*

แบคทีเรียที่พบในปุ๋ยส่วนใหญ่คือชนิดที่สามารถช่วยเพิ่มธาตุอาหารพืชโดยเฉพาะไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส ตัวอย่างแบคทีเรียที่ช่วยเพิ่มไนโตรเจนเช่น *Rhizobium*, *Azotobacter*,

Azomonas, *Nitrosomonas* และ *Nitrosospira* เป็นต้น มีรายงานว่า *Nitrosomonas* และ *Nitrosospira* ที่พบในมูลสุกรซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์มีผลทำให้กระบวนการ Nitrification ในดินเพิ่มขึ้น (Ceccherini et al. 1998) นอกจากนี้ Cakmakci et al(2006) รายงานว่า *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Pseudomonas putida* RC06 และ *Rhodobacter capsulatus* นอกจากจะตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้แล้วยังสามารถเพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุในดินให้สูงขึ้นเมื่อใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตปุ๋ย

สำหรับแบคทีเรียที่ช่วยในการย่อยสลายฟอสฟอรัสเช่น *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Thiobacillus* เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้พบทั่วไปในปุ๋ยอินทรีย์ประเภทต่าง ๆ โดยเฉพาะ *Bacillus* ซึ่งนอกจากย่อยสลายฟอสฟอรัสได้แล้วยังสามารถย่อยสลายวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส ลิกนิน และ เฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าแบคทีเรียในสกุลอื่นๆ (Vargas-Garcia et al. 2006) และพบว่า *Bacillus* บางสายพันธุ์สามารถควบคุมโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจได้อีกด้วย (นลินี และคณะ. 2537)

2. แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes)

เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีรูปร่างคล้ายราคือ มีรูปร่างเป็นกลุ่มเส้นใยที่แตกแขนงและสร้างสปอร์ที่ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้แต่แอคติโนมัยสีทถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกับแบคทีเรียเนื่องจากลักษณะของเส้นใยเดี่ยว ๆ หรือเซลล์ของแอคติโนมัยสีทมีความกว้าง 0.5 ถึง 1.2 ไมครอน และมีขนาดใกล้เคียงกับแบคทีเรียมากกว่ารานอกจากนี้พบว่าผนังเซลล์ของแอคติโนมัยสีทประกอบด้วยไขมันไม่มีไคตินและเซลลูโลสเหมือนรา (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548) แอคติโนมัยสีทพบมากรองจากแบคทีเรียแต่เจริญช้ากว่าแบคทีเรียและราโดยเจริญในสภาพที่มีการถ่ายเทอากาศได้ดี ชอบอุณหภูมิสูงสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 65 องศาเซลเซียส และ pH เป็นกลางหรือด่างเล็กน้อย ลักษณะของแอคติโนมัยสีทเมื่อเจริญเป็นกลุ่มบนวัสดุที่ใช้ทำปุ๋ยจะสังเกตเห็นเป็นจุดสีขาวคล้ายผงปูน (ธงชัย. 2546) พบหลังจากอุณหภูมิขึ้นถึงจุดสูงสุด ชนิดที่พบโดยทั่วไปได้แก่ *Streptomyces*, *Thermoactinomycetes* และ *Thermomonospora*

เนื่องจากแอคติโนมัยสีทเจริญช้ากว่าแบคทีเรียทั่วไปและรา จุลินทรีย์ชนิดนี้จึงพัฒนาตัวเองเพื่อการอยู่รอดให้สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่น ๆ โดยปรับตัวให้สามารถใช้สารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างง่ายๆ จนถึงโครงสร้างซับซ้อนเช่น กรดอินทรีย์ น้ำตาล ไคติน และ เซลลูโลส เป็นต้น มีรายงานว่า *Thermomonospora* ที่พบในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักสามารถย่อยสลายวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลสได้ดีเมื่ออุณหภูมิในกระบวนการผลิตสูงถึง 70 องศาเซลเซียส (George, Ahmad and Rao. 2000)

แอคติโนมัยสีทที่พบในปุ๋ยส่วนใหญ่เป็นชนิดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ(Antibiotics) เพื่อยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินเช่น *Aspergillus flavus*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* และ *Sclerotium rolfsii* เป็นต้น Zaitlin et al (2004) พบว่าแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium solani* ได้ดีกว่าแอคติโนมัยสีทในสกุลอื่น ๆ

3. เชื้อเห็ดรา (Fungi)

เชื้อเห็ดราเป็นจุลินทรีย์ที่พบน้อยกว่าแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีท มีบทบาทน้อยในการทำปุ๋ยเนื่องจากเชื้อเห็ดราไม่ทนอุณหภูมิสูงจึงพบในช่วงที่อุณหภูมิปานกลางและวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเป็นพวกเซลลูโลสและลิกนิน ชนิดที่พบ ได้แก่ *Mucor sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Talaromyces duponti*, *Chaetomium thermophilum* และ *Humicola grisea* เป็นต้น

บทบาทของเชื้อเห็ดราในปุ๋ยส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอินทรียวัตถุร่วมกับแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีท มีเชื้อเห็ดราหลายชนิดที่ย่อยสลายวัสดุที่ย่อยยากเช่น ลิกนิน และสารฮิวมิกได้ดีเชื้อราส่วนใหญ่อาจเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญหลายชนิดแต่ราบางชนิดที่พบในปุ๋ยสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้เช่น *Trichoderma asperellum* สายพันธุ์ T-34 ที่พบในกองปุ๋ยหมักสามารถยับยั้ง *Rhizoctonia solani* เชื้อสาเหตุของโรคเน่าคอดินของพืชจำพวกผักและผลไม้ (Trillas et al. 2006)

นอกจากนี้เชื้อเห็ดราบางชนิดเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินเช่น *Aspergillus*, *Penicillium* และ ราไมคอไรซา (Mycorrhiza) โดยเฉพาะราไมคอไรซาเป็นราที่อยู่บริเวณรอบรากพืชเส้นใยส่วนหนึ่งอยู่ในรากพืชอีกส่วนหนึ่งอยู่ในดินเส้นใยเหล่านี้สามารถดูดธาตุอาหารในดินให้แก่พืชได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุฟอสฟอรัส ดังนั้นพืชที่มีราไมคอไรซาอาศัยที่รากจึงได้รับธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณที่เพียงพอ จากการศึกษาของ Saini, Bhandari and Tarafdar (2004) พบว่าราไมคอไรซาทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสในดินเพิ่มขึ้นส่งผลต่อการลดใช้ปุ๋ยซุปเปอร์ฟอสเฟตได้ถึงร้อยละ 50

2.6 เทคนิคการศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์

การศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมประเภทต่าง ๆ เช่น ดิน น้ำ อากาศ น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมรวมถึงปุ๋ยอินทรีย์ซึ่งมีความซับซ้อนประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่อาศัยอยู่รวมกันและมีความสัมพันธ์ระหว่างกันต้องใช้เทคนิคที่ศึกษาเพื่อให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ เทคนิคที่ใช้ศึกษาส่วนใหญ่แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ เทคนิคที่อาศัยการ

เพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture-dependent method) และเทคนิคที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture-independent method)

2.6.1 เทคนิคอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาจุลินทรีย์โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีการศึกษาจุลินทรีย์ที่ปฏิบัติกันมานานโดยใช้ในการคัดเลือก นับจำนวนและศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ที่สนใจซึ่งวิธีที่ใช้ในการศึกษา เช่น วิธี Most probable number (MPN) การวิเคราะห์ทางชีวเคมี (Biochemical method) และการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารคัดเลือก (Selective media) เป็นต้น วิธีการดังกล่าวมีข้อดีคือ ต้นทุนต่ำ ได้เชื้อที่มีความจำเพาะตามที่ต้องการศึกษาแต่มีข้อจำกัดที่ทำให้ไม่สามารถศึกษาจำนวนจุลินทรีย์และเข้าใจถึงบทบาทหน้าที่การทำงานของจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจาก

1. อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไม่สามารถจำลองสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเหมือนในธรรมชาติได้จริง

2. อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อเอื้อต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้น เนื่องจากต้องปรับสภาพแวดล้อมของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น pH อุณหภูมิ แสงสว่าง เป็นต้น ซึ่งสภาพแวดล้อมดังกล่าวอาจเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้น (Tabacchioni et al. 2000)

3. จุลินทรีย์บางชนิดอยู่ในระยะพักตัวไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เหมือนในสภาพธรรมชาติ

4. จุลินทรีย์บางชนิดสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Trevors. 1998)

จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้จำนวนชนิดจริงมากเทียบเท่าจำนวนตามธรรมชาตินอกจากนี้จุลินทรีย์ที่เกาะแน่นอยู่บนอนุภาคดินหรือเม็ดปุ๋ยไม่สามารถดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์และนับจำนวนได้ มีการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ในดินไม่ถึงร้อยละ 1 เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Kirk et al. 2004) ซึ่งถือว่าเป็นจำนวนที่ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ทั่วไปที่มีอยู่ในดิน ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคนี้อาจศึกษาได้ไม่แม่นยำมากนัก

2.6.2 เทคนิคไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากข้อจำกัดของเทคนิคอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่กล่าวข้างต้นดังนั้นเทคนิคไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อหรือเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้ถูกพัฒนาและยอมรับมากขึ้นว่าเป็นเทคนิคที่

มีประสิทธิภาพในการศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์มากกว่าเทคนิคไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากสามารถศึกษาชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้และไม่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Uncultured microorganism) มากยิ่งขึ้นรวมถึงรายงานการวิจัยบางฉบับได้กล่าวถึงความสำคัญของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในการรักษาสมดุลของระบบนิเวศหรือเป็นสิ่งมีชีวิตสำคัญในการดำรงไว้ซึ่งการทำงานของระบบนิเวศดังเช่นการศึกษาของ Burrel, Keller and Backall (1998) ที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ แบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในระบบบำบัดไนโตรเจนในห้องทดลองโดย Nitrite-oxidizing bacteria

เทคนิคนี้อาศัยข้อมูลจากลำดับเบสของ rRNA เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพ (Biomarker) เพื่อใช้จำแนกและหาปริมาณของจุลินทรีย์ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ 16S rRNA ของแบคทีเรีย โดยทั่วไปเครื่องหมายทางชีวภาพที่ใช้ควรมีลักษณะสำคัญคือ สามารถสร้างความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มอย่างชัดเจน ไม่ซับซ้อนและสามารถใช้ตรวจสอบจุลินทรีย์ได้โดยตรงจากตัวอย่างที่ทำการศึกษาในกรณีที่เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เครื่องหมายทางชีวภาพที่ใช้ควรที่จะบอกถึงรายละเอียดของสายวิวัฒนาการของจุลินทรีย์นั้นเพื่อที่จะสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของสิ่งมีชีวิตอื่นได้

เหตุผลที่ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของ rRNA ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์เนื่องจากสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (DNA/RNA) จะไม่ได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตกล่าวคือไม่ว่าจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้ดีหรือไม่ดีก็ยังคงตรวจพบสารพันธุกรรมที่ใช้เป็นยีนเครื่องหมายแม้ว่าอาจมีผลกระทบในด้านปริมาณหรือความเข้มข้นแต่ในด้านองค์ประกอบทางเคมียังคงเหมือนเดิมทุกประการ (นุกูล. 2547) เพราะสิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องมีสารพันธุกรรมในรูปกรดนิวคลีอิกดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบและหาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้

rRNA มีบริเวณที่จำเพาะในแต่ละกลุ่มของสิ่งมีชีวิตและมีความแปรผันของลำดับเบสน้อยมากเมื่อเทียบกับลำดับเบสตำแหน่งอื่น ๆ บนสายดีเอ็นเอ ในส่วนของแบคทีเรียจะนิยมใช้ 16S rRNA และ 23S rRNA ปัจจุบันฐานข้อมูลสาธารณะที่รวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์เรียกว่า Ribosomal Database Project – II ซึ่งมีศูนย์รวมอยู่ที่ภาควิชานิเวศวิทยาจุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยแห่งรัฐมิชิแกน ประเทศสหรัฐอเมริกา (http://rdp.cme.msu.edu/html/index.html) ฐานข้อมูลในเวปไซต์ดังกล่าวจะเน้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA อย่างไรก็ตามในอนาคตมีแนวโน้มที่จะใช้ 23S rRNA เนื่องจากมีข้อมูลจากจำนวนนิวคลีโอไทด์มากกว่า (นุกูล. 2547)

ตัวอย่างเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมมีด้วยกันหลายเทคนิค เช่น

เทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) และเทคนิค Thermal gradient gel electrophoresis (TGGE) อาศัยหลักการที่ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันจะสามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยลำดับเบสที่ต่างกันซึ่ง DGGE จะทำการแยกสายดีเอ็นเอซึ่งเป็นสายเกลียวคู่ด้วยสารเคมี (ยูเรียหรือฟอร์มาไมด์) ในขณะที่ TGGE จะทำการแยกสายดีเอด้วยความร้อน โดยทั่วไปทั้งสองเทคนิคจะใช้ลำดับเบสของ 16S rRNA ประมาณ 200-500 เบสที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีเบส GC ยาว 40 เบสที่ปลาย 5′ ของไพรเมอร์เพียงเส้นเดียว (สุรินทร์. 2545) เมื่อทำการแยกสายดีเอ็นเอที่ได้บน Polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพเพิ่มขึ้นมากขึ้นเรื่อย ๆ ก็จะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันแต่ไม่ทำให้ดีเอ็นเอทั้งสองสายแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์จึงทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของสายดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันบน Polyacrylamide gel แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามการใช้ความยาวของเบสไม่เกิน 500 เบสอาจไม่เพียงพอต่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียอย่างละเอียดและเป็นการยากที่จะอธิบายถึงสมมุติฐานสำคัญของเทคนิคที่ว่า "One band-one species" เพราะชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือแบนด์ (Band) ที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดจากชิ้นยีนเดียวกันหรือต่างชิ้นยีนก็ได้ นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวก็อาจจะพบการเกิดแบนด์ได้มากกว่าหนึ่งแบนด์ (Schramm and Amann. 2000)

เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งส่วนใหญ่มาจาก 16S rRNA ของแบคทีเรียต่าง ๆ ที่รวบรวมในฐานข้อมูลเพื่อออกแบบดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) เพื่อใช้ตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมายโดยไม่จำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอออกมาแล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence หรือกล้อง Confocal scanning laser microscope (CLSM)

เทคนิค Single strand conformation polymorphism (SSCP)ใช้ในการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้อาจมีลำดับเบสบางลำดับไม่เหมือนกันซึ่งเป็นที่มาของหลักการ SSCP ที่ว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวในธรรมชาติ (Non-denaturing condition) จะมีการขดหรือพันกันภายในโมเลกุลเกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะที่ขึ้นอยู่กับลำดับเบสภายในสายดีเอ็นเอนั้น ๆ หรือที่เรียกว่ามี Conformation ที่จำเพาะซึ่งโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีเบสต่างกันแม้เพียงเบสเดียวก็จะเกิดโครงสร้างที่แตกต่างกันซึ่งจะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเลคโตรโฟรีซีสบน Non-denaturing

polyacrylamide gel ที่แตกต่างกัน ความไวของการตรวจสอบด้วยเทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับความยาวของสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ เนื่องจากเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีความละเอียดสูงโดยสามารถเห็นความแตกต่างได้แม้ดีเอ็นเอในสายต่างกันเพียง 1 เบส ดังนั้นถ้าสายดีเอ็นเอมีความยาวมากโอกาสตรวจพบน้อยยิ่งสายดีเอ็นเอมีความยาวมากขึ้นเท่าไรความไวในการตรวจพบ SSCP ก็ยิ่งน้อยลง ขนาดความยาวของสายดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมด้วยวิธีนี้คือไม่เกิน 200 นิวคลีโอไทด์ ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยวิธีนี้นั้นจะทำการติดฉลากไพรเมอร์ข้างหนึ่งด้วยสารเรืองแสงจากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมตามวิธี SSCP นำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบแบนด์ที่ได้ด้วยการตรวจสอบการเรืองแสงหรือวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automated sequencer โดยการอ่านปริมาณสารเรืองแสงที่ติดอยู่บนชิ้นดีเอ็นเอ

เทคนิค Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยการเพิ่มจำนวน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์เส้นหนึ่งที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงจากนั้นนำ PCR products ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วแยกด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสซึ่งอาศัยเครื่อง Automated sequencer ในการอ่านปริมาณสารเรืองแสงที่ติดอยู่บนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัด (Schramm and Amann. 2000)

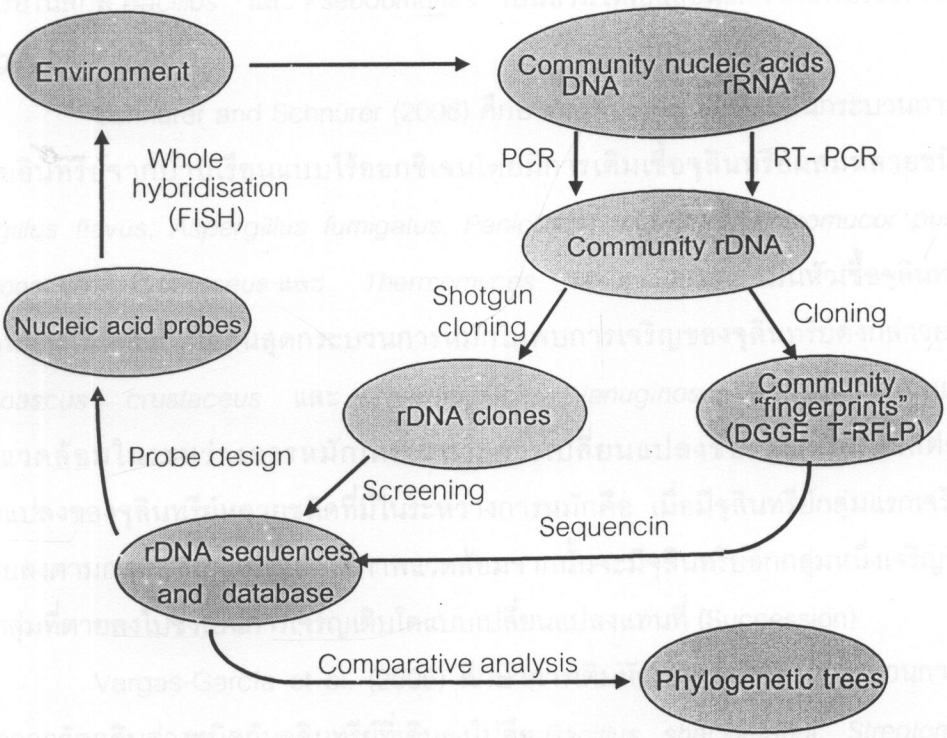
2.7 เทคนิค 16S rRNA clone library analysis

rRNA เป็นองค์ประกอบของไรโบโซมที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมของโปรคาริโอทมีขนาด 70S ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยคือ หน่วยย่อย 50S ซึ่งมีrRNA ชนิด 5S และ 23S ขนาดประมาณ 120 เบส และ 3 กิโลเบสตามลำดับ และหน่วยย่อย 30S ซึ่งมีโปรตีนรวมอยู่กับ rRNA ชนิด 16S ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส (Lewin. 2000)

16S rRNA มีโครงสร้างทุติยภูมิที่เรียกว่า "Stem and loop" ประมาณ 50 ชุด มีความสามารถในการจับกับโปรตีนจำเพาะหลายชนิดเพื่อรวมกันเป็นองค์ประกอบของไรโบโซมหน่วยย่อย 30S ส่วนปลายสุดทางด้านปลาย 3' ของ 16S rRNA มีลำดับเบส 6 เบสคือ 5'-CCUCCU-3' ทำหน้าที่เกาะกับลำดับ Shine-Dalgano sequence ตรงบริเวณปลาย 5' ของ mRNA ซึ่งอยู่ก่อนถึงตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น AUG ประมาณ 7 เบส ส่วนปลาย 3' บริเวณ 3' Major domain มีหน้าที่จับกับแอนติโคดอน tRNA ทั้งด้าน A-site และ P-site นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่ใช้จับกับ Initiation factor 3 (IF3) โดยการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมระหว่างโปรตีนกับอาร์เอ็นเอ (Cross

linkage) ในขณะที่อาร์เอ็นเอในไรโบโซมหน่วยย่อย 50S ซึ่งเกาะอยู่กับโปรตีนจำเพาะเช่นกัน ทำหน้าที่จับบริเวณปลาย 3'-CCA ของ tRNA (Lewin. 2000)

การนำยีน16S rRNA ของแบคทีเรียมาศึกษาสวมารถทำได้โดยเริ่มจากการสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียออกมาซึ่งอาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอแล้วนำมาเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิค PCR หรือ Reverse transcriptase PCR(RT-PCR) จากนั้นเพิ่มจำนวนยีนเหล่านั้นด้วยวิธีการที่เรียกว่า Cloning ซึ่งเป็นขั้นตอนเพิ่มจำนวนและการตัดต่อเฉพาะยีนที่เป็น 16S rRNA ไปไว้ในพลาสมิดของแบคทีเรียจากนั้นทำการแยกยีนดังกล่าวออกมาเพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะเพื่อเปรียบเทียบชนิดและสายวิวัฒนาการของแบคทีเรีย ข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ยังนำไปใช้ในการออกแบบเครื่องหมายทางชีวภาพที่เรียกว่า DNA probe เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบชนิดหรือกลุ่มแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ตามความสนใจในแหล่งเดิมของตัวอย่างนั้นได้ เรียกการศึกษาแบบนี้ว่า Full-cycle rRNA approach ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การใช้เทคนิค Full-cycle rRNA approach ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ (Amann, Ludwig and Schleifer. 1995)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8.1 การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

Hassen et al. (2001) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย ยีสต์ รา รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคคือ *Salmonella* , *Shigella* , *Escherichia coli* ในปุ๋ยหมักที่ทำจากขยะชุมชน ผลการศึกษาพบว่าเมื่ออุณหภูมิในการผลิตปุ๋ยสูงถึง 60 องศาเซลเซียส จำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดลดจำนวนลงยกเว้นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้เพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบคือ แบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะ *Micrococcus* และ *Bacillus*

Heerden et al. (2002) คัดแยกจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักที่ทำจากเศษซากพืชตระกูลมะนาว ส่วนใหญ่พบยีสต์ในวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิต ระหว่างระยะเวลาการหมักพบจุลินทรีย์กลุ่มที่ทนอุณหภูมิสูงคือ *Bacillus licheniformis, B. macerans, B. stearothermophilus, Aspergillus fumigatus, Penicillium diversum, Talaromyces thermophilus* และ *Thermomyces lanuginosus* แต่ไม่พบยีสต์เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตพบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นส่วนใหญ่และนอกจากนี้พบเชื้อราในสกุล *Aspergillus* จำนวนหนึ่ง

Schnürer and Schnürer (2006) ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อราในกระบวนการหมักของเสียอินทรีย์จากบ้านเรือนแบบไร้ออกซิเจนโดยมีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมหลายชนิดคือ *Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Penicillium roqueforti, Rhizomucor pusillus, Thermoascus crustaceus* และ *Thermomyces lanuginosus* เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักและเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวยกเว้น *Thermoascus crustaceus* และ *Thermomyces lanuginosus* เท่านั้นซึ่งอาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมในระหว่างการหมักโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีในระหว่างการหมักคือ เมื่อมีจุลินทรีย์กลุ่มแรกเจริญขึ้นและตายลงตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมจากนั้นจะมีจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งเจริญขึ้นมาแทนที่กลุ่มที่ตายลงไปซึ่งเป็นการเจริญเติบโตแบบเปลี่ยนแปลงแทนที่ (Succession)

Vargas-Garcia et al. (2006) ศึกษาการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักจากวัตถุดิบต่างชนิดกันจุลินทรีย์ที่เติมลงไปคือ *Bacillus shackletonni, Streptomyces thermovulgaris* และ *Ureibacillus thermosphaericus* เมื่อนำปุ๋ยหมักที่ผลิตได้ไปใช้เพาะปลูกพืชพบฮิวมัสในดินสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยหมักที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว ดังนั้นการ

พัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยโดยการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ควรใช้แทนการผลิตที่อาศัยประโยชน์จากวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตเพียงอย่างเดียว

2.8.2 การศึกษาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

Franke – Whittle, Klammer and Insam (2005) ออกแบบ Oligonucleotide probesที่มีความยาวประมาณ 17-25 bp ซึ่งมีความจำเพาะกับบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรีย เพื่อนำไปใช้ศึกษาชุมชนแบคทีเรียในปุ๋ยหมัก 15 ตัวอย่างที่ผลิตจากวัตถุดิบต่างชนิดกันพบ *Streptococcus*, *Acinetobacter iwoffii* และ *Clostridium tetani* ในปุ๋ยหมักทั้ง 15 ตัวอย่าง

Ishii, Fukui and Takii (2000) พบความหลากหลายของชุมชนจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักด้วยเทคนิค DGGE ซึ่งรูปแบบของแบนด์มีความแตกต่างกันในแต่ละระยะของการผลิตโดย *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่พบในทุกระยะของการผลิตและพบมากที่สุดในระยะที่อุณหภูมิในการผลิตสูงถึง 60 องศาเซลเซียส

Ntougias et al. (2004) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในวัตถุดิบที่ใช้ทำปุ๋ยหมักด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้ 14 กลุ่มแบ่งตามลักษณะของการตัดชิ้นส่วนยีนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (เรียกกลุ่มดังกล่าวว่า Operational taxonomic units,OTU) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกโดยมีจำนวนกลุ่มถึง 12 OTU พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Exiguobacterium*, *Staphylococcus*, *Desemzia*, *Carnobacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* และ *Microbacterium* อีก 2 OTU เป็นแบคทีเรียในสกุล *Camamonas* และ *Sphingobacterium*

Schloss et al. (2003) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชุมชนจุลินทรีย์ในระยะแรกของกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักด้วยเทคนิค 16S-23S rRNA clone library analysis พบ Lactic acid bacteria เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นเมื่อระยะเวลาการผลิตผ่านไป 1 วัน แต่วันที่ 3 ของการผลิตพบกลุ่มจุลินทรีย์ 5 OTU ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มในสกุล *Bacillus* และ *Weissella* แต่ไม่พบ Lactic acid bacteria ในระยะนี้เลย

Song et al. (2001) ศึกษาความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทที่ทนอุณหภูมิสูงในปุ๋ยกองปุ๋ยหมักหมักที่ใช้เพาะเห็ดด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis พบแอคติโนมัย-สีท 41 สายพันธุ์ โดยในจำนวน 25 สายพันธุ์เมื่อทำการจำแนกชนิดพบว่าอยู่ในสกุล *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* และ

Thermobifida ส่วนอีก16 สายพันธุ์อยู่ในสกุล *Thermoactinomyces* และใน 41 สายพันธุ์พบอยู่ใน สกุล *Streptomyces* และ *Thermoactinomyces* เป็นส่วนใหญ่

2.8.3 การเปรียบเทียบการศึกษาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

Blanc et al. (1999) ศึกษาชุมชนแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมัก ผลการศึกษาด้วยเทคนิค Most probable number (MPN) พบว่า *Thermus thermophilus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นแต่ผลการศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis พบ แบคทีเรียกลุ่มเด่นในกระบวนการผลิตคือ *Bacillus*

Dee and Ghiorse (2001) ศึกษาจำนวนชุมชนจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในช่วงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสของการผลิตปุ๋ยหมักพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ศึกษาด้วยสารเรืองแสงมีจำนวนเท่ากับ $6.4x10^{10}$เซลล์ต่อกรัม ศึกษาชนิดจุลินทรีย์กลุ่มเด่นด้วยเทคนิค Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) พบ *Aneurinibacillus* และ *Brevibacillus* ส่วนการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อมีจำนวนเท่ากับ $2.6 x10^{8}$ CFUต่อกรัม ไม่พบ *Aneurinibacillus* และ *Brevibacillus* แต่ *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเด่นที่พบจากการศึกษาด้วยเทคนิคดังกล่าว

Koschinsky et al. (1999) ศึกษาชุมชนแบคทีเรียในปุ๋ยหมักด้วยเทคนิค Single strand conformation polymorphism (SSCP) พบแบคทีเรียส่วนใหญ่คือ *Bacillus* ไม่สอดคล้องกับการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งพบ *Pseudomonas* เป็นส่วนใหญ่

Peace et al. (2003) ศึกษาความหลากหลายของ Bacterioplankton จากทะเลสาบน้ำจืดของทวีปแอนตาร์กติก ผลการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อพบความหลากหลายของ Bacterioplankton มีน้อยกว่าเทคนิค 16S rDNA clone library analysis คือ 6 ดิวิชัน 23 สกุล ส่วนเทคนิค 16S rDNA clone library analysis พบ 8 ดิวิชัน 24 สกุล และมีเพียง 5 สกุลเท่านั้นคือ*Corynebacterium, Cytophaga, Flavobacterium, Janthinobacterium* และ *Pseudomonas* ที่พบจากการศึกษาทั้งสองเทคนิค

Peter et al. (1999) ศึกษาชุมชนจุลินทรีย์ทุก ๆ 2 วันของกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อพบ *Bacillus, Pseudomonas* และ *Xanthomonas* เท่านั้น ส่วนเทคนิค Single strand conformation polymorphism (SSCP) พบ *Lactobacillus, Bacillus, Azotobacter, Xanthomonas, Clostridium, Microbispora, Streptomyces* และเชื้อยีสต์ในสกุล

Candida ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเทคนิค SSCP ศึกษาความหลากหลายและติดตามการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักได้ดีกว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

Smit et al. (2001) ศึกษาความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียในดินที่ปลูกข้าวสาลี พบแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่คือ *Micrococcus*, *Arthobacter* และ *Corynebacterium* จากการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis เนื่องจากไม่พบแบคทีเรียแกรมบวกแต่พบกลุ่ม *Acidobacterium*, *Flavobacterium*, *Nitrospira*, และ *Pseudomonas*

2.8.4 ข้อจำกัดของเทคนิค16S rRNA ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในปุ๋ยอินทรีย์

16S rRNA ใช้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในปุ๋ยอินทรีย์ได้ดีกว่าบางเทคนิค แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดที่ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้อย่างแม่นยำที่สุด ซึ่งข้อจำกัดเหล่านั้นมาจากหลายปัจจัยเช่น ลักษณะตัวอย่างที่นำมาศึกษา ความผิดเพี้ยน(bias)ในแต่ละขั้นตอนการศึกษา เป็นต้น

ปัจจัยที่กล่าวถึงข้างต้นส่งผลต่อความหลากหลายของแบคทีเรียในปุ๋ยอินทรีย์ได้ เนื่องจากปุ๋ยอินทรีย์มีแหล่งกำเนิดหลายทางด้วยกันเช่น การสลายตัวของซากพืชและสัตว์ การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรผลิตปุ๋ยอินทรีย์เพื่อการค้า ซึ่งวัสดุต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของปุ๋ยอินทรีย์นั้นก่อให้เกิดปัญหาในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียเช่น สารประกอบประเภท Polyphenol , กรดอินทรีย์บางชนิด และกรดฮิวมิก เป็นต้น สารประกอบเหล่านี้จะทำให้มีสีน้ำตาลปนเหลืองในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้

ในการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียในปุ๋ยอินทรีย์นั้นมีหลักการเหมือนกับการสกัดดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ คือ การทำให้เซลล์แตกและบริสุทธิ์ปราศจากสิ่งเจือปนอื่นแต่เนื่องจากแบคทีเรียนั้นเกาะติดกับอนุภาคของเม็ดปุ๋ย ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการที่ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้หลุดออกไป วิธีการที่นำมาใช้อาจทำได้โดยการเขย่าด้วยเม็ดแก้ว (Bead-beating) หรือด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonication) เป็นต้น จากนั้นใช้สารที่ช่วยลดลดการเกิดสีน้ำตาลปนเหลืองจากการสกัดเช่น อะลูมิเนียมซัลเฟต และโซเดียมฟอสเฟต เป็นต้น เนื่องจากพบว่าสารสีน้ำตาลปนเหลืองอาจทำให้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ไม่บริสุทธิ์จึงส่งผลต่อขั้นตอน PCR และพบว่าการทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ขึ้นนั้นจะทำให้ลดความหลากหลายของแบคทีเรียได้ (Kirk et al. 2004)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 การศึกษาทางจุลชีววิทยา

3.1.1.1 Ultrasonicator (Kubota, Insonator 201M, Japan)

3.1.1.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (WTBbinder, Germany)

3.1.1.3 ตู้ปลอดเชื้อ (Larmina air flow) (Faster, BHA48, Italy)

3.1.1.4 เครื่องเขย่า (Shaker) (IKA – VIBRAX – VXR, Germany)

3.1.1.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (OHAUS, ARB120, USA)

3.1.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, CH30, Japan)

3.1.2 การศึกษาทางชีวโมเลกุล

3.1.2.1 Centrifuge (Jouan, B4i, Germany)

3.1.2.2 Epifluorescence microscope (Olympus, BX51, Japan)

3.1.2.3 Gel electrophoresis system (Maxicell Primo, EC340, USA)

3.1.2.4 Micropipetter (Finnpipette, Thermo Labsystems, USA)

3.1.2.5 pH meter (Sartorius, PP50, Germany)

3.1.2.6 Thermocycler (GeneAmpPCRSystem 9700, USA)

3.1.2.7 UVtrans – illuminator (Bio – Rad, USA)

3.1.2.8 Waterbath (Optima, WB – 710M, USA)

3.2 สารเคมี

3.2.1 การศึกษาทางจุลชีววิทยา

3.2.1.1 Cyclohexamide

3.2.1.2 Motility – indole – lysine medium

3.2.1.3 National botanical research institue's phosphate growth medium

3.2.1.4 Oxidative – fermentative (O/F) glucose medium

3.2.1.5 Potato dextrose agar

3.2.1.6 Soil extract agar

3.2.1.7 Streptomyces agar

3.2.1.8 Streptomycin

3.2.1.9 Triple sugar iron agar

3.2.1.10 Trypic soy agar

3.2.1.11 Yeast malt extract agar

3.2.1.12 น้ำตาลชนิดต่าง ๆ สำหรับทดสอบทางชีวเคมี

3.2.1.13 น้ำยาสำหรับย้อมสีแบบ Gram's stain

3.2.1.14 น้ำยาสำหรับย้อมสีแบบ Acid fast

3.2.2 การศึกษาทางชีวโมเลกุล

3.2.2.1 Absolute ethanol

3.2.2.2 Agarose

3.2.2.3 Cetyltrimethyl – ammonium bromide (CTAB)

3.2.2.4 Chloroform

3.2.2.5 4',6 – Diamidino – 2 – phenylindole (DAPI)

3.2.2.6 dNTPs

3.2.2.7 Ethidium bromide

3.2.2.8 Ethylene diaminetetraacetic acid disodium salt – 2 - hydrate (EDTA)

3.2.2.9 Isoamylalcohol

3.2.2.10 Lysozyme

3.2.2.11 Magnesium chloride

3.2.2.12 Oligonucleotide primer

3.2.2.13 Paraformaldehyde (PFA)

3.2.2.14 Phosphate buffer saline (PBS)

3.2.2.15 Proteinase K

3.2.2.16 QIAGEN PCR cloning Kit (Germany)

3.2.2.17 QIAquick PCR Purification Kit (Germany)

3.2.2.18 Sodium chloride

3.2.2.19 Sodium dodecyl sulfate (SDS)

3.2.2.20 Taq DNA polymerase

3.2.2.21 TOPO TA cloning kit (Invitrogen, USA)

3.2.2.22 Tris - acetate

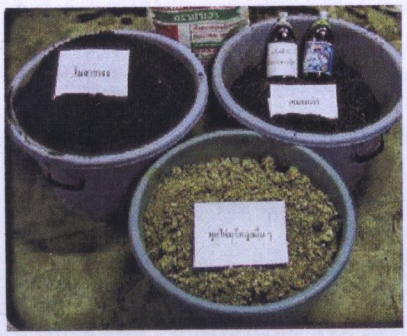
3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์

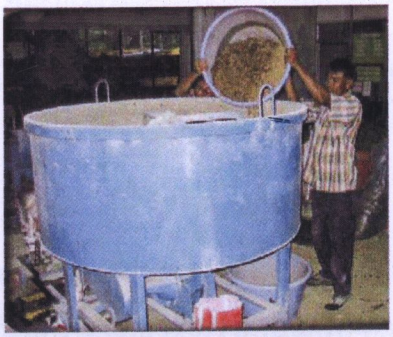
เก็บตัวอย่างจากกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น รำละเอียด รำหยาบ ขี้ไก่ แกลบเผา แกลบหมัก ผสมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ พด. 1 ของกรมพัฒนาที่ดิน นอกจากนี้ผสมสารปรับปรุงดินคือ ผงซิลิกอน และ โดโลไมต์ และผสมกับน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากเศษปลา น้ำหมักที่ผลิตได้จะผสมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ พด. 2 ของกรมพัฒนาที่ดิน นำวัสดุต่าง ๆ ดังกล่าวที่ผสมกันแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ด แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียสจากนั้นนำปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดที่ได้ตากทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน จึงบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (ภาพที่ 2)

การศึกษาครั้งนี้เลือกเก็บตัวอย่างจาก 5 ขั้นตอนของกระบวนการผลิตคือ

1. หัวเชื้อจุลินทรีย์
2. ขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม
3. ขั้นผ่านเครื่องอบแห้ง
4. ขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้
5. ปุ๋ยอินทรีย์ที่มีอายุหลังการผลิต 2 เดือน



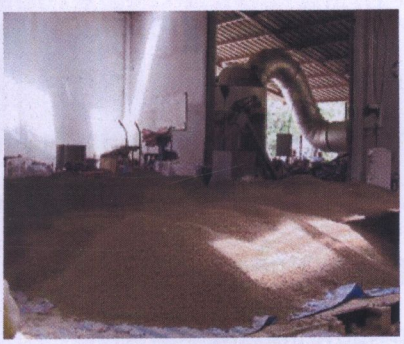
วัตถุดิบที่ใช้ทำปุ๋ยอินทรีย์



เครื่องผสม

เครื่องอัดเม็ด

เครื่องอบ



ตากแห้ง

บรรจุกระสอบ

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

3.3.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของปุ๋ย

นำตัวอย่างในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของปุ๋ยดังนี้

3.3.2.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติและธาตุอาหารพืชบางประการในปุ๋ย

ส่งตัวอย่างปุ๋ยไปวิเคราะห์คุณสมบัติและธาตุอาหารที่ศูนย์การศึกษาและพัฒนาพิกุลทอง อำเภอเมือง จังหวัดนราธิวาส พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าการนำไฟฟ้า (EC) อินทรียวัตถุ (Organic matter) ไนโตรเจนทั้งหมด (Total N) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Available P) โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable K) ปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable Ca and exchangeable Mg) วิธีการวิเคราะห์ดังนี้

(1) ความเป็นกรด-ด่าง ด้วย pH Meter (Cyberscan 510, Japan)

(2) การนำไฟฟ้า ด้วย Conductivity meter (Cyberscan 510, Japan)

(3) อินทรียวัตถุ โดยวิธี Walklay and Black (จำเป็น. 2546)

(4) ไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl method (จำเป็น. 2546)

(5) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โดยวิธี Bray II (จำเป็น. 2546) แล้ววัดปริมาณฟอสฟอรัสด้วยเครื่อง UV - visible (Shimadzu, Japan)

(6) โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ สกัดด้วยแอมโมเนียมอะซีเทต 1 โมลาร์ pH 7 (จำเป็น. 2546) แล้ววัดด้วยเครื่อง Flame photometer (Corning, USA)

(7) ปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ สกัดด้วยแอมโมเนียมอะซีเทต 1 โมลาร์ pH 7 (จำเป็น. 2546) แล้ววัดด้วยเครื่อง Atomic absorbtion spectrophotometer (GDC, Australia)

3.3.2.2 การศึกษาอุณหภูมิและความชื้นในปุ๋ย

วัดอุณหภูมิปุ๋ยด้วยเทอร์โมมิเตอร์และวิเคราะห์หาค่าความชื้นโดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยซึ่งต้องการหาความชื้น นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง หลังจากอบแห้งชั่งปุ๋ยอีกครั้งคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยใช้สูตร

$$\text{ความชื้นต่อน้ำหนักแห้ง (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักปุ๋ยก่อนอบ} - \text{น้ำหนักปุ๋ยหลังอบ})}{\text{น้ำหนักปุ๋ยหลังอบ}} \times 100$$

3.3.3 การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.3.3.1 การนับจำนวนจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำตัวอย่างใน 5 ขั้นของกระบวนการผลิตมานับจำนวนจุลินทรีย์ 4 ประเภท คือ แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท รา และยีสต์

(1) การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

โดยวิธี Pour plate ขั้นตอนละ 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำจะชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีสารละลาย 0.1% Peptone water จำนวน 45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonicator โดยปรับความถี่ที่ 50 Hz 50 W เป็นเวลา 1 นาที พัก 1 นาที ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 5 ครั้ง จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} เท่า จากนั้นเจือจางทีละ 10 เท่า (10 - Fold dilution) ตามความเหมาะสมแล้วทำการ Pour plate ด้วยอาหาร Trypic soy agar (TSA) ปรับให้มี pH ประมาณ 7.3 และเติมสารปฏิชีวนะ Cyclohexamide (ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อยับยั้งเชื้อรา จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน และนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง

(2) การนับจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด

โดยวิธีPour plate ขั้นตอนละ 3 ซ้ำในแต่ละซ้ำจะชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีสารละลาย 0.1% Peptone water จำนวน 45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonicator โดยปรับความถี่ที่ 50 Hz 50 W เป็นเวลา 1 นาที พัก 1 นาทีทำเช่นนี้ติดต่อกัน 5 ครั้ง จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} เท่า จากนั้นเจือจางทีละ 10 เท่า (10- Fold dilution) ตามความเหมาะสมแล้วทำการ Pour plate ด้วยอาหาร Soil extract agar (SEA) ปรับให้มี pH ประมาณ 6.6 และเติมสารปฏิชีวนะ Cyclohexamide (ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อยับยั้งเชื้อรา จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน และนับจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดในตัวอย่าง

(3) การนับจำนวนเชื้อราทั้งหมด

โดยวิธี Pour plate ขั้นตอนละ 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำจะชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีสารละลาย 0.1% Peptone water จำนวน 45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonicator โดยปรับความถี่ที่ 50 Hz 50 W เป็นเวลา 1 นาที พัก 1 นาที ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 5 ครั้ง จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1}

เท่า จากนั้นเจือจางทีละ 10 เท่า (10- Fold dilution)ตามความเหมาะสมแล้วทำการ Pour plate ด้วยอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ปรับให้มี pH ประมาณ 3.5 และเติมสารปฏิชีวนะ Streptomycin (ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-10 วัน และนับจำนวนเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่าง

(4) การนับจำนวนเชื้อยีสต์ทั้งหมด

โดยวิธี Pour plate ขั้นตอนละ 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำจะชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีสารละลาย 0.1% Peptone water จำนวน 45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonicator โดยปรับความถี่ที่ 50 Hz 50 W เป็นเวลา 1 นาที พัก 1 นาที ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 5 ครั้ง จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} เท่า จากนั้นเจือจางทีละ 10 เท่า (10 - Fold dilution) ตามความเหมาะสมแล้วทำการ Pour plate ด้วยอาหาร Yeast malt extract agar (YM) ปรับให้มี pH ประมาณ 4 เติมสารปฏิชีวนะ Streptomycin (ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน และนับจำนวนเชื้อยีสต์ทั้งหมดในตัวอย่าง

3.3.3.2 การศึกษาเชื้อแอคติโตมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชบางชนิด

นำตัวอย่างในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้เพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิดคือ *Erwinia* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ (Soft rot) มักเกิดกับพืชที่มีลักษณะอวบน้ำเช่น ผัก ผลไม้และไม้ดอกบางชนิดและ *Sclerotium rolfsii* เป็นเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า(Root and stem rot) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง และถั่วต่างๆ เป็นต้น ตัวอย่างปุ๋ยที่เก็บมาได้นำมาคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชบางชนิดมี วิธีการศึกษาดังนี้

(1) การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

ชั่งตัวอย่างจำนวน 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีสารละลาย 0.1% Peptone water 45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจะได้ระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง ultrasonicator โดยปรับความถี่ที่ 50 Hz 50 W เป็นเวลา 1 นาที พัก 1 นาที ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 5 ครั้ง จากนั้นเจือจางทีละ 10 เท่า (10 - Fold dilution) ตามความเหมาะสม แล้วทำการ Pour plate โดยใช้อาหาร 3 ชนิดคือ Soil extract agar, Streptomyces agar และ Yeast extract malt extract agar อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดปรับให้มี pH ประมาณ 6.6- 7.2 และเติมสารปฏิชีวนะ

Cyclohexamide (ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อยับยั้งเชื้อราจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-10 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อโดยเลือกเก็บเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีลักษณะของโคโลนีแตกต่างกันไปคือ สังเกตลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่าเลือกโคโลนีทึบแสงซึ่งอาจมีสีเทา เขียว ม่วง ชมพู แดง ส้ม หรือสีเหลืองที่มีลักษณะปุยคล้ายกำมะหยี่ หรือโคโลนีทึบแสงที่ผิวหน้าย่น ขรุขระและศึกษาลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

(2) การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิด

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละไอโซเลตได้แก่อาหาร Soil extract agar , Streptomyces agar และYeast extract malt extract agar โดยขีดเชื้อเป็นแนวตรงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 และ 5 วัน นำจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชคือ *Erwinia* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละและ *Sclerotium rolfsii* เป็นเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า เชื้อ 2 ชนิดนี้ได้รับอนุเคราะห์มาจากคุณพรศิลป์ จันทวีเมือง (ติดต่อส่วนตัว) จากภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยขีดเชื้อ *Erwinia* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยขีดในแนวตั้งฉากกับเชื้อแอคติโนมัยสีทแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน ดูการเจริญของเชื้อทดสอบโดยสังเกตตรงรอยขีดบริเวณที่เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบชนกับรอยขีดของเชื้อแอคติโนมัยสีท ถ้าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไม่เจริญในบริเวณดังกล่าวแสดงว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบดังกล่าวได้ ส่วนการคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Sclerotium rolfsii* ทำโดยเลี้ยงเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบๆ โคโลนี ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร นำวุ้นที่ตัดได้ไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวาง 2 จุดห่างจากเชื้อแอคติโนมัยสีทประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

3.3.3.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายฟอสเฟต

นำตัวอย่างในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขาย หรือนำไปใช้มาศึกษามีวิธีการศึกษาดังนี้

(1) การทดสอบการย่อยสลายฟอสเฟตเบื้องต้นเพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัมใส่ลงในฟลาสก์ที่มี 45 มิลลิลิตรของ 0.1% Peptone water จำนวน 45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonicator โดยปรับความถี่ที่ 50 Hz 50 W เป็นเวลา 1 นาที พัก 1 นาที ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 5 ครั้งจะได้ระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นเจือจางทีละ 10 เท่า (10- Fold dilution) ตามความเหมาะสมแล้วทำการ Spread plate และ Drop plate ลงบนอาหาร National botanical research institue's phosphate growth medium (NBRIP) ซึ่งมี Tricalcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) เป็นส่วนประกอบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-7 วัน เลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่สนใจโดยมีวิธีการสังเกตคือ ถ้าปรากฏเป็นวงใสรอบๆ โคโลนีแสดงว่าโคโลนีนั้นเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟอสเฟตได้เนื่องจากอาหาร NBRIP มีลักษณะขุ่นถ้าเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตได้หมายถึงเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างและปล่อยกรดออกมาย่อยฟอสเฟตและดูดไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ทำให้อาหารส่วนที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่นั้นมีวงใสรอบ ๆ โคโลนีให้เห็นอย่างชัดเจนถ้ามีความใสมากและเกิดเป็นบริเวณกว้างแสดงถึงความมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยฟอสเฟต

(2) การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตโดยวิธี Heavy point inoculation โดยใส่เชื้อเริ่มต้นในปริมาณมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-7 วัน วัดและบันทึกขนาดของวงใสซึ่งเกิดจากการย่อยสลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และดูประสิทธิภาพการย่อยสลายฟอสเฟตจากความใสของอาหารและขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น

(3) การหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้การวิเคราะห์ทางเคมี

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใส่เชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตรในอาหารเหลว NBRIP ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วันแล้วเก็บเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวปริมาณ 2 มิลลิลิตรทุก ๆ วันเว้นวันกระทั่งสิ้นสุดวันที่ 13 ของการเลี้ยงเชื้อนำเชื้อที่เก็บได้มาต้มฆ่าเชื้อแบคทีเรียจากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 g นาน 5 นาทีเก็บส่วนใสมาทดสอบปริมาณการย่อยสลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยเติมน้ำยา

ทำให้เกิดสีและสารละลายกรดแอสคอร์บิกลงไปอย่างละ 1 มิลลิลิตรซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงินเกิดขึ้น เติมน้ำกลั่นลงไป 2 มิลลิลิตรเขย่าและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์โดยใช้เวลาประมาณ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 820 นาโนเมตรเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟอสเฟตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้และเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

(4) การจำแนกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟต

จำแนกชนิดเบื้องต้นของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา การย้อมสีแบบแกรม การทดสอบทางชีวเคมีบางประการ เช่น การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron agar (TSI), Motility – indole – lysine (MIL) , Oxidative – fermentative (O/F) Glucose medium และการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นต้น โดยใช้แนวทางการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับสกุลตามแนวทางของ Norrell and Messley (2003)

3.3.4 การศึกษาแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

3.3.4.1 การศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยสีเรืองแสง4',6 – Diamidino – 2 – phenylindole (DAPI) (ดัดแปลงจาก John. 2001)

นำตัวอย่างในขั้นนำวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ศึกษาโดยนำตัวอย่างปุ๋ย 1 กรัม ผสม Ethanol จำนวน 1 มิลลิลิตรแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาทีทิ้งส่วนใสเติม Phosphate buffer saline (PBS) และ Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonicator โดยปรับความถี่ที่ 50 Hz 50 W เป็นเวลา 1 นาที พัก 1 นาที ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 5 ครั้ง หยดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตรใส่สไลด์หลุมเคลือบเทฟลอนที่ผ่านการเคลือบด้วยเจลาตินแล้วเกลี่ยให้ทั่วแล้วทำให้แห้งจากนั้นดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) ด้วย Ethanol ร้อยละ 50, 80 และ 100 ความเข้มข้นละ 3 นาทีตามลำดับ ย้อมสี DAPI (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) จำนวน 8-10 ไมโครลิตร ในที่มืดนาน 5 นาทีล้างด้วยน้ำกลั่นและ Ethanol ร้อยละ 70 ทำให้แห้งและย้อมด้วยน้ำยาลดการจางของสารเรืองแสง (Anti – fading solution) นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence นับเซลล์ที่เรืองแสงจำนวน 10 Fields และนำปริมาณเซลล์ที่ได้คำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ (เซลล์ต่อกรัม)} = \frac{A \times B}{C \times D \times E}$$

A = ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้

B = พื้นที่สไลด์ (ตารางมิลลิเมตร)

C = พื้นที่ Objective len (ตารางมิลลิเมตร)

D = ปริมาณตัวอย่าง (ไมโครลิตร)

E = อัตราการเจือจาง

3.3.4.2 การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library

นำตัวอย่างในขั้นนำวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เข้าเครื่องผสม และขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library สำหรับขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้จะศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทด้วย วิธีการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้มีบางขั้นตอนที่แตกต่างจากการศึกษาแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งมีวิธีการศึกษาดังนี้

(1) การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Zhou, Bruns and Tiedje (1996). โดยดัดแปลงเล็กน้อยคือนำตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 5 กรัม เติม 45 มิลลิลิตรของ Lysis buffer (0.1 โมลาร์ Na_2HPO_4, 0.1 โมลาร์ EDTA, 1.5 โมลาร์ NaCl และ CTAB ร้อยละ 1) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Ultrasonicator โดยปรับความถี่ที่ 50 Hz 50 W เป็นเวลา 1 นาที พัก 1 นาที ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 5 ครั้ง นำตัวอย่างไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 5 นำส่วนใสที่กรองได้มาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g นาน 10 นาทีจากนั้นทิ้งส่วนใสแล้วนำตะกอนที่ได้เติม 0.5 มิลลิลิตร ของ Lysis buffer ผสมกับ 0.1 มิลลิลิตร Proteinase K (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงจากนั้นเติม 0.2 มิลลิลิตร ของ SDS ร้อยละ 20 แล้วบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ใส่หลอดใหม่จากนั้นเติม Chloroform/isoamylalcohol (24 : 1) ในอัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นนำตัวอย่างปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g นาน 10 นาทีเก็บส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1 มิลลิลิตร ของ Isopropanol แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมงหรือค้างคืน นำตัวอย่างปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 16,000 g นาน 20 นาทีทิ้งส่วนใสเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol ร้อยละ 80 ที่เย็น

จำนวน 0.5 มิลลิลิตรแล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 16,000 g นาน 10 นาทีทิ้งส่วนใสและเติม 30 ไมโครลิตร TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM·EDTA) เติม RNase (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 3 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงจากนั้นตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน Tris-acetate (TAE; 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) ย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วตรวจสอบด้วยเครื่อง UV trans-illuminator

(2) **การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)**

เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 1 ด้วยการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27f และ 1492r (Lane. 1991) ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียและไพรเมอร์ 243f และ 513r ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน 16S rRNA ของแอคติโนมัยสีท (Heuer et al. 1997) ปฏิกิริยาประกอบไปด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 10-100 นาโนกรัม, PCR buffer (10x), $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 200 µM, 27f 0.45 µM , 1492r 0.45 µM ,243f 0.45 µM , 513r 0.45 µM , DNA polymerase1 U,น้ำและ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ร้อยละ 5 (สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน 16SrRNA ของแอคติโนมัยสีท) จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700) โดยมีรายละเอียดรอบการทำงานของการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 รอบการทำงานของการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีท

ตัวอย่างดีเอ็นเอ	รอบการทำงานของPCR	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา(นาที)
แบคทีเรีย	Pre - denaturation	94	3
	Denaturation	94	1
	Annealing	48	1
	Extension	72	2
	Final extension	72	10
แอคติโนมัยสีท	Pre - denaturation	94	5
	Denaturation	94	1
	Annealing	63	1
	Extension	72	2
	Final extension	72	10

เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA โดยใช้รอบการทำงานของ PCR จำนวน 30 รอบในการทำปฏิกิริยาจากนั้นตรวจสอบขนาดของ PCR products ด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน Tris-acetate ย้อมดีเอ็นเอด้วย Ethidium bromide ตรวจสอบด้วยเครื่อง UV trans-illuminator ทำ PCR products ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick PCR Purification Kit ตรวจสอบอีกครั้งด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1

(3) **การโคลนยีน** 16S rRNA

นำ PCR products ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดชุดโคลนของ TOPO TA Cloning (Invitrogen) หรือ QIAGEN PCR cloning Kit ตามวิธีการของผู้จำหน่ายโดยเติม Ligation buffer (Fresh PCR product, Salt solution, Vector และน้ำ) ลงไป 2 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันแล้วแช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาทีแล้วนำออกมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเติม SOC medium จำนวน 0.25 มิลลิลิตรเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงนำเลี้ยงบนอาหาร Luria–Bertani (LB agar) ที่มี 5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) และ Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมงเลือกโคโลนีสีขาวนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจสอบโคลนที่ได้โดยการทำ PCR

(4) การจัดกลุ่มโคลนด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

ทำ PCR เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA แล้วตัดชิ้นยีนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp*1 (BioLabs) โดยเติม Digestion reaction mix (Buffer 2.5 ไมโครลิตร, *Hin*P1I 0.5 ไมโครลิตร, *Msp*1 0.5 ไมโครลิตร, H_2O 1.5 ไมโครลิตร) จำนวน 5ไมโครลิตรลงใน PCR products จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมงตรวจสอบ PCR products ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์โดยใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 3 จัดกลุ่มโคลนที่มีรูปแบบเหมือนกันให้เป็น OTU เดียวกันจากนั้นเลือกตัวอย่างโคลนในแต่ละ OTU ไปหาลำดับเบสของยีน

(5) การหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA บางส่วนโดยเพิ่มจำนวนยีนของตัวแทนในแต่ละ OTU ด้วยเทคนิค PCR ทำความสะอาด PCR products ด้วยชุด QIAquick PCR Purification Kit เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปตรวจด้วยเครื่อง DNA sequencer (ABI, Prism377) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(6) การวิเคราะห์ลำดับเบส

ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะ GenBank โดยใช้วิธี Basic local alignment search tool (BLAST) แล้ววิเคราะห์ Phylogenetic ของข้อมูลที่ได้โดยใช้ชุดโปรแกรมและฐานข้อมูลสาธารณะเพื่อสร้าง Phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์จากความแตกต่างด้านวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 3.1 (Kumar, Tamura and Nei. 2004)

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Name	*E. coli* rRNA position	Sequence5'-3'
27f	8-27	AGAGTTGATCCTGCTCAG
243f	226-243	GGATGAGCCCGCGGCCTA
513r	513-528	CGGCCGCGGCTGCTGGCACGTA
530f	515-530	GTGCCAGCMGCCGCGG
1492r	1492-1513	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
M13f	-	GTAAAACGACGGCCAG
M13r	-	CAGGAAACAGCTATGAC
GW1	-	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC
GW2	-	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นของกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ลองกลุ่มที่มีความสำคัญในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์คือเชื้อแอคติโนมัยสีทเพื่อศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชบางชนิดคือ *Erwinia* sp. และ *Sclerotium rolfsii* และเชื้อแบคทีเรียเพื่อศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟต และใช้เทคนิคที่ไม่ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อคือเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้โดยใช้เทคนิคการนับโดยตรงเมื่อย้อมด้วยสีเรืองแสง 4',6 – Diamidino – 2 – phenylindole (DAPI) และศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้โดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

4.1 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของปุ๋ย

นำตัวอย่างปุ๋ยในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ศึกษาปริมาณธาตุอาหาร อุณหภูมิ และความชื้นพบว่าผลการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่นำมาศึกษาทั้ง 2 ขั้นของกระบวนการผลิตมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ (ตารางที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานของการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ (สำนักงานเลขานุการโครงการฉลากเขียว. 2545) เนื่องจากมีค่า pH อยู่ระหว่าง 5.5-8.5 ถือว่าเหมาะแก่การเจริญของจุลินทรีย์และพืชในสภาวะ pH เป็นกลางถึงด่างเล็กน้อย ธาตุอาหารหลักและรองคือไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมมีค่ามากกว่าร้อยละ 0.5 ส่วนแคลเซียมและแมกนีเซียมมีค่ามากกว่าร้อยละ 1 ความชื้นในปุ๋ยมีค่าไม่เกินร้อยละ 35 โดยเฉพาะในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้มีความชื้นอยู่ระหว่างร้อยละ 10-15 ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้แต่ปริมาณอินทรียวัตถุของปุ๋ยทั้ง 2 ขั้นการผลิตอยู่ในระดับต่ำคือน้อยกว่าร้อยละ 35 นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 2 ขั้นนั้นมีค่าความเค็มสูงเมื่อพิจารณาโดยอ้อมจากค่าการนำไฟฟ้าเนื่องจากค่าการนำไฟฟ้าในปุ๋ยสูงกว่า 3.5 เดซิซีเมนต่อเมตรหรือมีความเข้มข้นของเกลือทั้งหมดประมาณร้อยละ 2 (สมศักดิ์. 2538) เมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยเคมีแล้วพบว่ามีธาตุอาหารหลักค่อนข้างต่ำแต่ปุ๋ยอินทรีย์ของโรงงานแห่งนี้ใช้วัสดุส่วนเสริมในกระบวนการผลิตทำให้แตกต่างจากปุ๋ยอินทรีย์ทั่วไปคือ โดโล-

ไมต์ซึ่งเป็นสารปรับปรุง pH ให้อยู่ในระดับเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชและซิลิกอนที่ช่วยเสริมความแข็งแรงของผนังเซลล์ของใบทำให้ไม่ถูกทำลายได้ง่ายโดยเชื้อโรคหรือแมลง

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาปริมาณธาตุอาหาร อุณหภูมิ และความชื้นในปุ๋ย (จำนวน 3 ซ้ำ คิดเป็นค่า Mean ± Standard Deviation)

คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของปุ๋ย	ขั้นตอนการผลิต		ค่ามาตรฐานการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ *
	วัตถุดิบเข้าเครื่องผสม	บรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	
ความเป็นกรด-ด่าง	8.4±0.15	7.8±0.15	5.5-8.5
การนำไฟฟ้า (เดซิซีเมนต่อเมตร)	4.47±0.82	5.06±0.98	<3.5
อินทรียวัตถุ (ร้อยละ)	20±3.21	12.43±0.88	>35
ไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)	0.9±0.06	0.9±0.05	>0.5
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (ร้อยละ)	2.76±0.36	2.4±0.04	>0.5
โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (ร้อยละ)	1.79±0.07	1.0±0.08	>0.5
แคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (ร้อยละ)	28.75±1.26	36.81±1.38	>1
แมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (ร้อยละ)	7.46±0.54	7.25±0.39	>1
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30.8±0.35	54.3±1.18	-
ความชื้น (ร้อยละ)	20±0.57	12±0	10-15

* ที่มา : สำนักงานเลขานุการโครงการฉลากเขียว (2545)

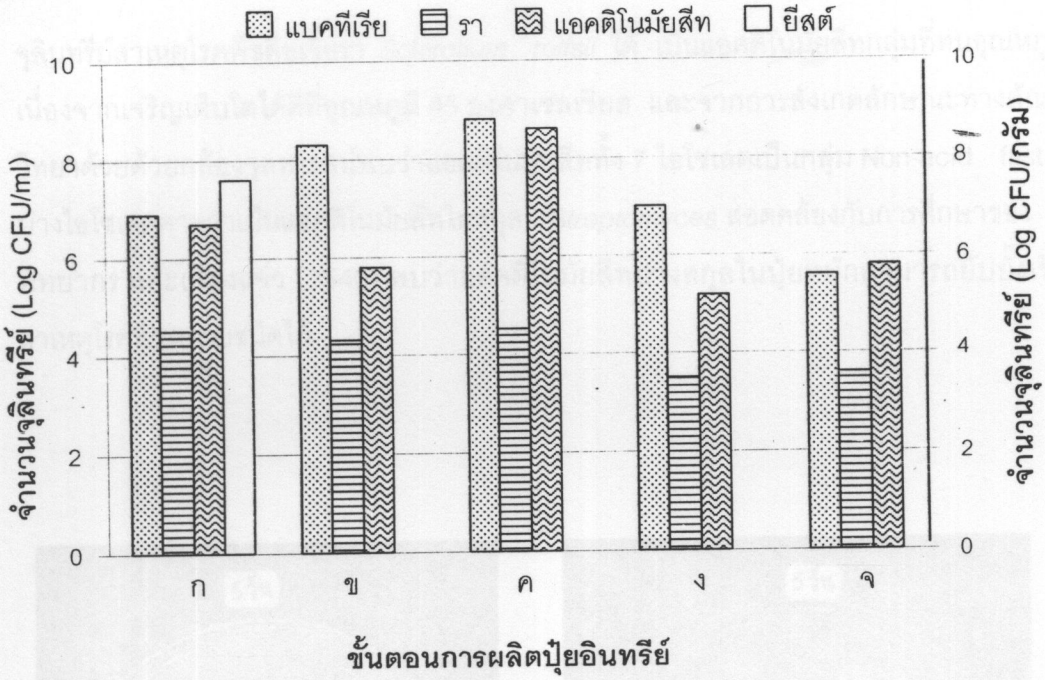
4.2 การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

4.2.1 การนับจำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดทั้ง 5 ขั้นของกระบวนการผลิต

ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์คือ แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยสีท และยีสต์ จากตัวอย่างใน 5 ขั้นตอนของกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ โดยภาพรวมพบว่าจุลินทรีย์มีจำนวนเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละขั้นของการผลิต (ภาพที่ 3) จุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่คือแบคทีเรีย รองลงมาคือแอคติโนมัยสีทและราพบจำนวนน้อยที่สุดสอดคล้องกับการศึกษาของพิทยากร และ ฉวีวรรณ (2540) พบแบคทีเรียมากที่สุดในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ประเภทต่าง ๆ สำหรับยีสต์พบในน้ำหมักชีวภาพมีจำนวนมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นคือ 7.6±0.1 log CFU/มิลลิลิตร แต่ไม่พบในขั้นอื่น ๆ ของกระบวนการผลิตส่วนแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยสีทพบในปริมาณ 6.7±0.05 , 4.5±0.06

และ 6.6±0.1 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขั้นผ่านเครื่องอบแห้งซึ่งใช้อุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียสจะพบจุลินทรีย์แต่ละชนิดมากกว่าขั้นตอนอื่น ๆ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่พบในปุ๋ยอินทรีย์ส่วนใหญ่อาจเป็นจุลินทรีย์ที่ทนหรือชอบความร้อน (thermoduric หรือ thermophilic microorganism) โดยพบแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยสีทจำนวน 8.8±0.06 , 4.5±0.06 และ 8.6±0.1 log CFU/กรัม ตามลำดับ จุลินทรีย์ที่พบในขั้นนี้โดยเฉพาะแบคทีเรียอาจเป็นชนิดที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้เช่นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* หรือเป็นเอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมแห้งแล้งและอุณหภูมิสูงได้ซึ่งมีรายงานว่าในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงมากกว่า 80 องศาเซลเซียสจะพบเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นส่วนใหญ่ (Beffa et al. 1996)

ตัวอย่างปุ๋ยจากขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้พบแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยสีทจำนวน 7±0.08, 3.5±0.06 และ 5.2±0.06 log CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมที่พบจำนวน 8.3±0.06, 4.3 และ 5.8±0.05 log CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งเป็นเพราะขั้นก่อนการบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้นั้นต้องผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส ทำให้จุลินทรีย์ที่ไม่ทนความร้อนเจริญอยู่ได้และขั้นตอนปุ๋ยอินทรีย์ที่มีอายุหลังการผลิต 2 เดือนพบว่าจำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดลดลงและมีจำนวนที่น้อยกว่าขั้นตอนอื่น ๆ เนื่องจากสารอาหารที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ลดปริมาณลง นอกจากนี้อาจเป็นเพราะว่าวัสดุที่นำมาใช้ผลิตปุ๋ยอินทรีย์เป็นวัสดุที่ย่อยสลายยากซึ่งมีค่าอัตราส่วน C/N กว้างจึงยากต่อการย่อยสลายของจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ (Tiquia, Tam and Hodgkiss. 1995) ผลจากการศึกษาพบว่าปัจจัยสภาพแวดล้อมในกระบวนการผลิตโดยเฉพาะอุณหภูมิทำให้จำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่พบในแต่ละขั้นตอนการผลิตเปลี่ยนแปลงไป แต่อุณหภูมิสามารถทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคที่มาจากวัสดุที่นำมาใช้ในการผลิตทำให้ปุ๋ยที่ผลิตได้มีคุณภาพดีขึ้น จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่พบในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตมีบทบาทและความสำคัญต่อการเป็นประโยชน์ต่อปุ๋ยเช่น สามารถย่อยสลายวัสดุที่นำมาใช้ผลิตให้กลายเป็นอินทรียวัตถุหรือเพิ่มธาตุอาหารหลักแก่พืชดังนั้นผลจากการศึกษาสามารถนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ไปใช้ในการพัฒนาการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 3 จำนวนจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากตัวอย่างใน 5 ขั้นตอนของกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ (ก) น้ำหมักชีวภาพ (ข) ขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม (ค) ขั้นผ่านเครื่องอบแห้ง (ง) ขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (จ) ปุ๋ยอินทรีย์ที่มีอายุหลังการผลิต 2 เดือน

4.2.2 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืชบางชนิด

นำตัวอย่างปุ๋ยมาคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทผลการศึกษาพบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อแอคติโนมัยสีทเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 124 ไอโซเลตสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทด้วยการสังเกตลักษณะภายนอกของโคโลนีด้วยด้วยตาเปล่าและศึกษาลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 36 ไอโซเลต นำเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 36 ไอโซเลตมาคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia* sp.พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีททุกไอโซเลตไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia* sp.ได้ แต่เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 7 ไอโซเลตจาก 36 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของ *Sclerotium rolfsii* ได้โดยมี 3 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* เมื่อบ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทเพียง 3 วัน คือ St1 , S5 และ Y23 มี 4 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* เมื่อบ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทครบ 5 วัน คือ St12, S2, S7 และ S23 แอคติโนมัยสีททั้ง 7 ไอโซเลตที่ยับยั้ง

จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชคือเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ได้ เป็นแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ทนอุณหภูมิสูง เนื่องจากเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และจากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าแอคติโนมัยสีททั้ง 7 ไอโซเลตเป็นกลุ่ม Non-acid fast และบางไอโซเลตคาดว่าเป็นแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* สอดคล้องกับการศึกษาของ พิทยากร และเสียงแจ่ว (2540) พบว่าแอคติโนมัยสีทบางสกุลในปุ๋ยหมักสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดได้

ก ข

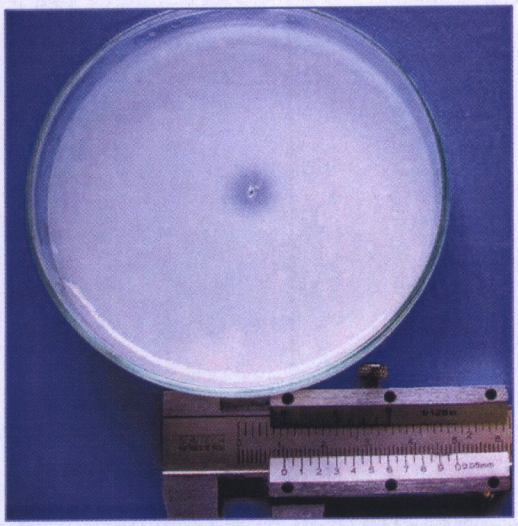
ภาพที่ 4 การยับยั้งการเจริญของ *Erwinia* sp. ด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต St 11 เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (ก) และไอโซเลต St 1 เป็นเวลา 5 วัน (ข)

ก ข

ภาพที่ 5 การยับยั้งการเจริญของ *Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต St 1 เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน (ก) และไอโซเลต S 2 เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (ข)

4.2.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายฟอสเฟตจากปุ๋ยอินทรีย์

สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP โดยวิธี Spread plate และ Drop plate ได้จำนวน 37 ไอโซเลตซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีบริเวณใสขนาดใหญ่จำนวน 13 ไอโซเลตเพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBRIP โดยวิธี Heavy point inoculation เพื่อตรวจการสร้างบริเวณใสพบเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลตสามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้โดยการสร้างบริเวณใสบนอาหารโดยไอโซเลต NP5 แสดงการเกิดบริเวณใสกว้างที่สุด (ภาพที่ 6) เชื้อแบคทีเรียอีก 3 ไอโซเลตคือ NP8, NP10 และ NP12 ส่วนเชื้อแบคทีเรียอีก 9 ไอโซเลตไม่พบการเกิดบริเวณใส



ภาพที่ 6 การทดสอบการย่อยสลายฟอสเฟตบนอาหาร NBRIP ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต NP

การทดสอบการย่อยสลายฟอสเฟตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพบว่าไอโซเลต NP5 สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้มากกว่าไอโซเลตอื่น ๆ ปริมาณการละลายเท่ากับ 19.396 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดสอบการย่อยสลายฟอสเฟตของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต NP5 สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดจึงจำแนกชนิดของไอโซเลตนี้ในระดับสกุลโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์และผลการทดสอบทางชีวเคมี (ตารางที่ 6) สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต NP5 อยู่ในสกุล *Pseudomonas* sp. (Norrell and Messley. 2003) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hameeda et al. (2006) ที่รายงานว่า *Pseudomonas* ที่คัดแยกจากปุ๋ยหมักมีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตได้ดีกว่าแบคทีเรียสกุลอื่น ๆ จึงเหมาะต่อการนำไปพัฒนาให้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเติมลงในปุ๋ยอินทรีย์ แต่แบคทีเรียชนิดนี้ไม่พบในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้เนื่องจากกระบวนการผลิตปุ๋ยที่มีการอบที่อุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียสก่อนการบรรจุกระสอบทำให้ *Pseudomonas* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ทนอุณหภูมิสูงไม่สามารถเจริญได้

ตารางที่ 6 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต NP5

การทดสอบทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
TSI	K/A
MIL	-/-/+
Glucose	+
Lactose	-
Sucrose	+
Mannitol	+
O/F test	O
Catalase	+

4.3 การศึกษาแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

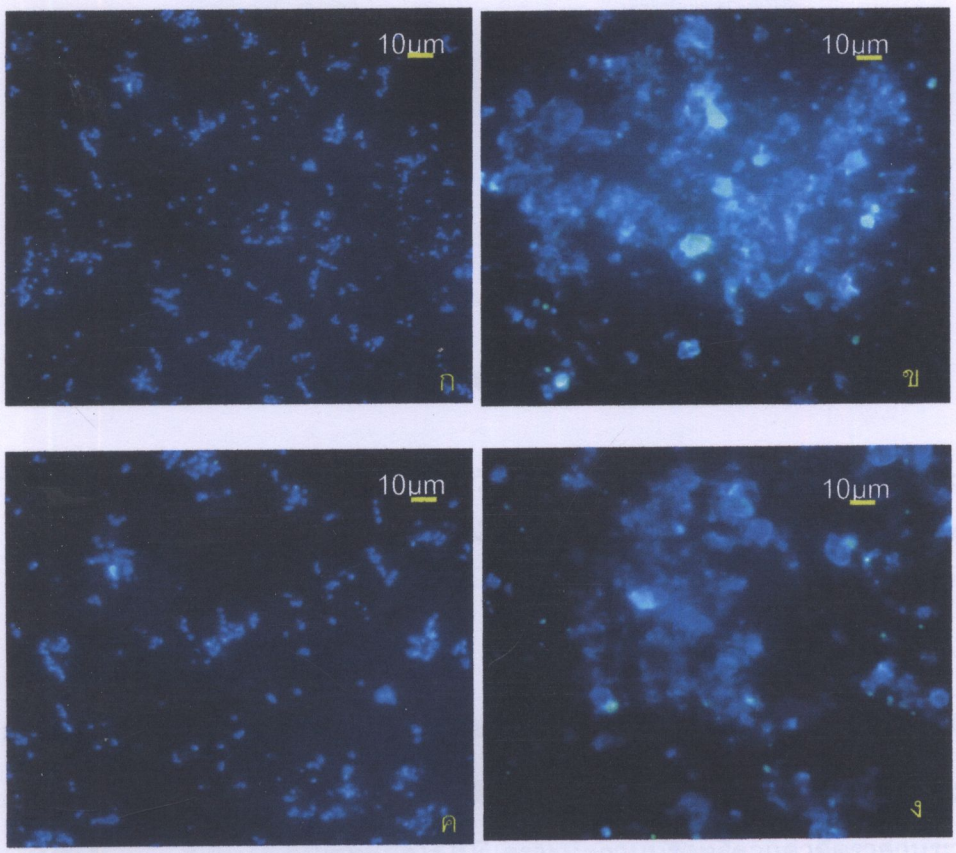
4.3.1 การศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยสีเรืองแสง 4',6 – Diamidino – 2 – phenylindole (DAPI)

ผลการศึกษาพบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมเท่ากับ 9.2 ± 0.05 Log เซลล์ต่อกรัม มากกว่าขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 8.5 ± 0.06 Log เซลล์ต่อกรัม (ตารางที่ 7 และภาพที่ 7ก และ ค) เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาจำนวนแบคทีเรียด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและด้วยสีเรืองแสง DAPI พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ศึกษาด้วยสีเรืองแสง DAPI มีมากกว่าที่ศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 8) เนื่องจากการศึกษาจำนวนแบคทีเรียด้วยสีเรืองแสง DAPI เป็นการศึกษาจำนวนแบคทีเรียโดยตรงจากสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่นอกจากนี้สามารถศึกษาแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่การศึกษาด้วยเทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดเกี่ยวกับลักษณะของตัวอย่างที่นำมาศึกษาเนื่องจากการเกิดการเรืองแสงของตัวอย่างที่เรียกว่า Autofluorescence (ภาพที่ 7ข และง) ทำให้ไม่สามารถศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่มีในปุ๋ยได้อย่างแม่นยำนักซึ่งจากงาน วิจัยของ Li, Dick and Tuovinen (2003) พบว่าสารอินทรีย์เช่น เซลลูโลส และกรดฮิวมิก เป็นต้น หรือธาตุอาหารเช่น ฟอสฟอรัส ทำให้เกิด Autofluorescence ได้และทำให้การนับจำนวนแบคทีเรียบางส่วนที่เกาะแน่นติดอยู่บนเม็ดปุ๋ยผิดพลาดไปได้

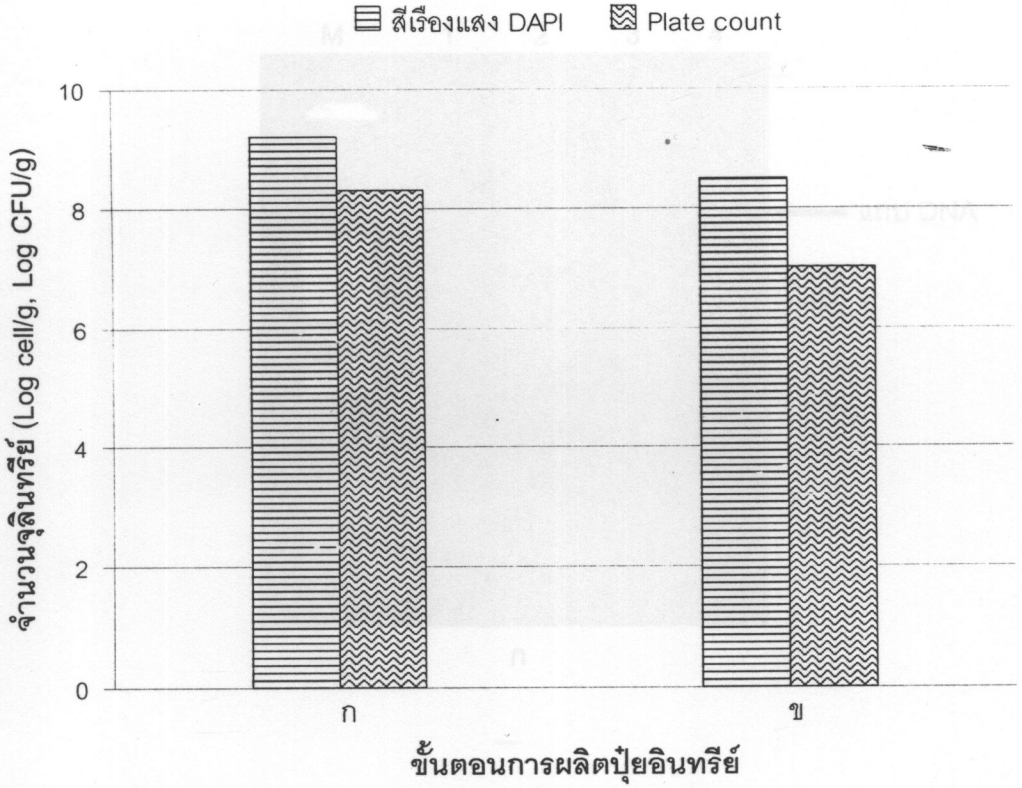
ตารางที่ 7 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ศึกษาด้วยสีเรืองแสง DAPI (Mean ± Standard deviation)

ขั้นตอนการผลิต	จำนวนแบคทีเรีย (Log เซลล์ต่อกรัม)
วัตถุดิบเข้าเครื่องผสม	9.2±0.05
บรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้	8.5±0.06

หมายเหตุ จำนวน 3 ซ้ำ



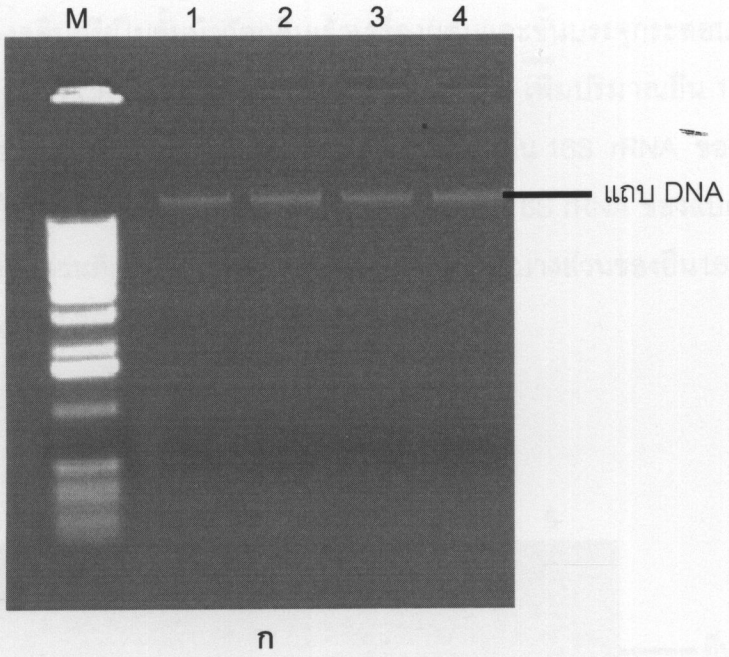
ภาพที่ 7 ภาพถ่ายเซลล์แบคทีเรียในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่ผ่านการกรองที่ศึกษาด้วยสีเรืองแสง DAPI ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม (ก) ขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (ค) และภาพถ่ายในลักษณะการเกิด Autofluorescence จากตัวอย่างปุ๋ยที่ไม่ผ่านการกรองที่ศึกษาด้วยสีเรืองแสง DAPI ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม (ข) และขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (ง)



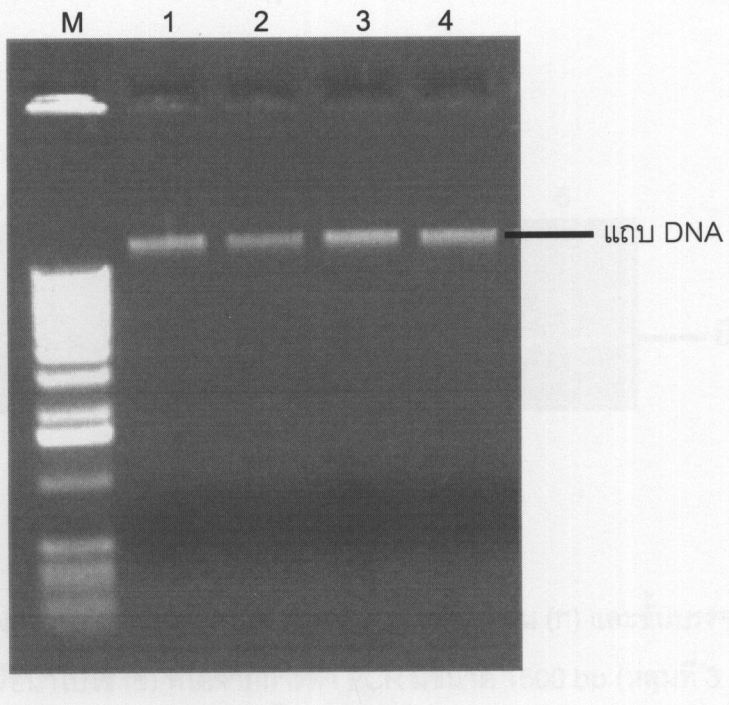
ภาพที่ 8 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม (ก) และขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (ข) ที่ทำการนับจำนวนโดยตรงด้วยสีเรืองแสง DAPI และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Plate count)

4.3.2 การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis

สกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ได้ เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์จากค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280} พบว่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้มีค่าเท่ากับ 1.54 และ 1.66 (ภาพที่ 9) ซึ่งค่าดังกล่าวน้อยกว่า 1.8 จึงอาจมีโปรตีนปนเปื้อนแต่สามารถนำไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR ได้



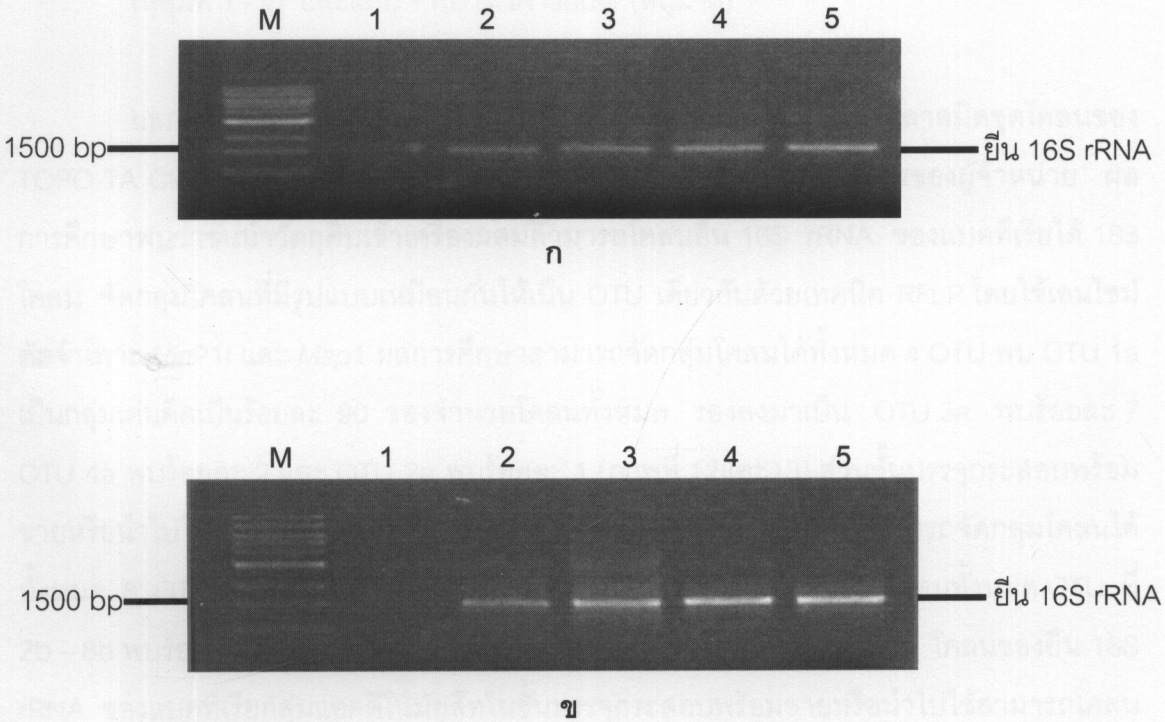
ก



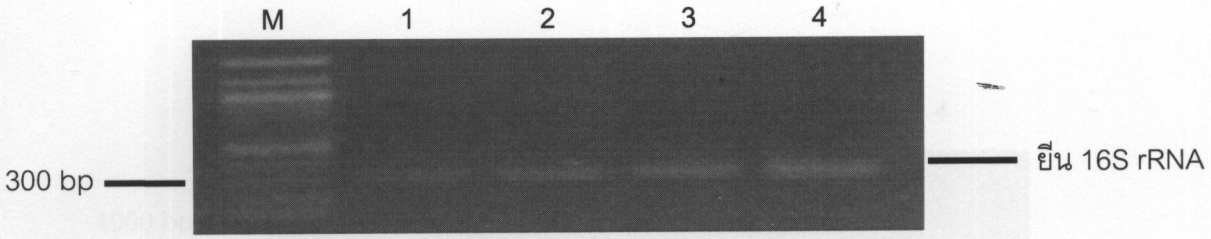
ข

ภาพที่ 9 แถบดีเอ็นเอ (หลุมที่ 1-4) ของจุลินทรีย์ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม (ก) และขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (ข) และแถบ 1 Kb DNA ladder (หลุม M)

นำดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขาย หรือนำไปใช้ที่สกัดได้มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27f และ 1492r เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1500 bp ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไป (ภาพที่ 10) และใช้ไพรเมอร์ 243f และ513r เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทพบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 300 bp ซึ่งเป็นบริเวณบางส่วนของยีน16S rRNA ที่เป็นบริเวณจำเพาะของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท (ภาพที่ 11)

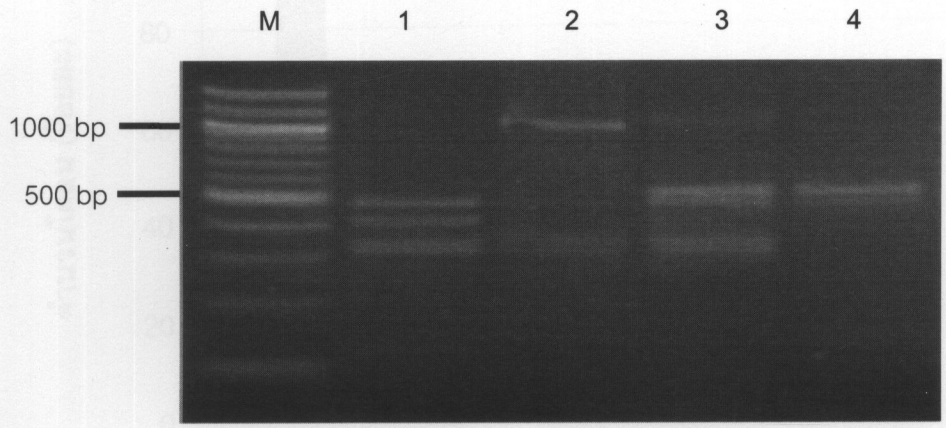


ภาพที่ 10 ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม (ก) และขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (ข) ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาด 1500 bp (หลุมที่ 3 - 5) Negative control (หลุมที่ 1) Positive control (หลุมที่ 2) และแถบ 1 Kb DNA ladder (หลุม M)

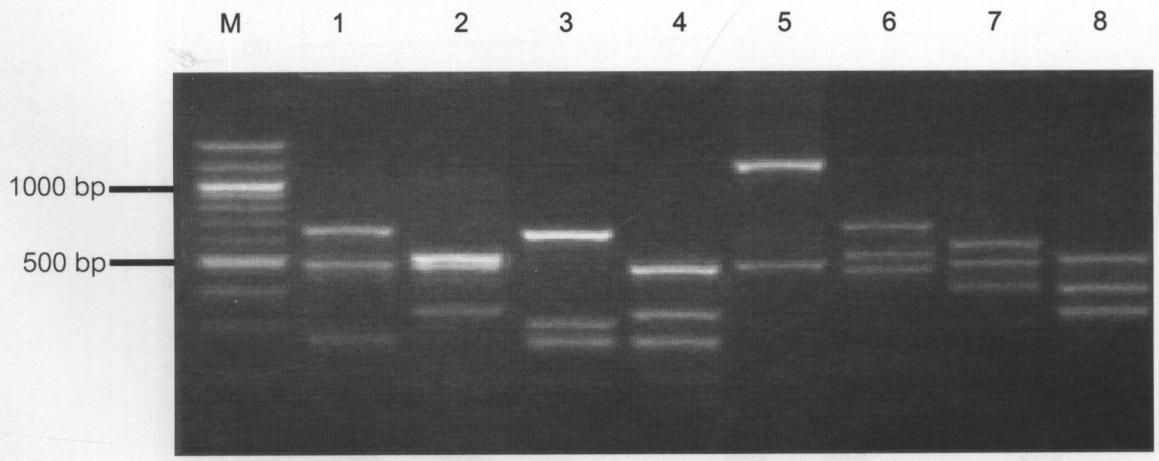


ภาพที่ 11 บริเวณบางส่วนของยีน16S rRNA ที่เป็นบริเวณจำเพาะของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัย-สีทในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาด 300 bp (หลุมที่ 1 - 4) และแถบ 1 Kb DNA ladder (หลุม M)

ผลการนำยีน 16S rRNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดชุดโคลนของ TOPO TA Cloning (Invitrogen)หรือ QIAGEN PCR cloning Kit ตามวิธีการของผู้จำหน่าย ผลการศึกษาพบว่าขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมสามารถโคลนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียได้ 183 โคลน จัดกลุ่มโคลนที่มีรูปแบบเหมือนกันให้เป็น OTU เดียวกันด้วยเทคนิค RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp*1 ผลการศึกษาสามารถจัดกลุ่มโคลนได้ทั้งหมด 4 OTU พบ OTU 1a เป็นกลุ่มเด่นคิดเป็นร้อยละ 90 ของจำนวนโคลนทั้งหมด รองลงมาเป็น OTU 3a พบร้อยละ 7 OTU 4a พบร้อยละ 2 และ OTU 2a พบร้อยละ 1 (ภาพที่ 12และ13) ส่วนขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้สามารถโคลนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียได้ 84 โคลนสามารถจัดกลุ่มโคลนได้ทั้งหมด 8 OTU พบ OTU 1b เป็นกลุ่มเด่นคิดเป็นร้อยละ 48 ของจำนวนโคลนทั้งหมด OTU ที่ 2b – 8b พบร้อยละ 14, 5, 3, 14, 8, 3 และ 5 ตามลำดับ (ภาพที่ 12 และ13) โคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้สามารถโคลนได้ 114 โคลนจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 2 OTU พบ OTU 1c เป็นกลุ่มเด่นคิดเป็นร้อยละ 71 ของจำนวนโคลนทั้งหมดและ OTU 2c พบร้อยละ 29 ของจำนวนโคลนทั้งหมด (ภาพที่ 14 และ 15)

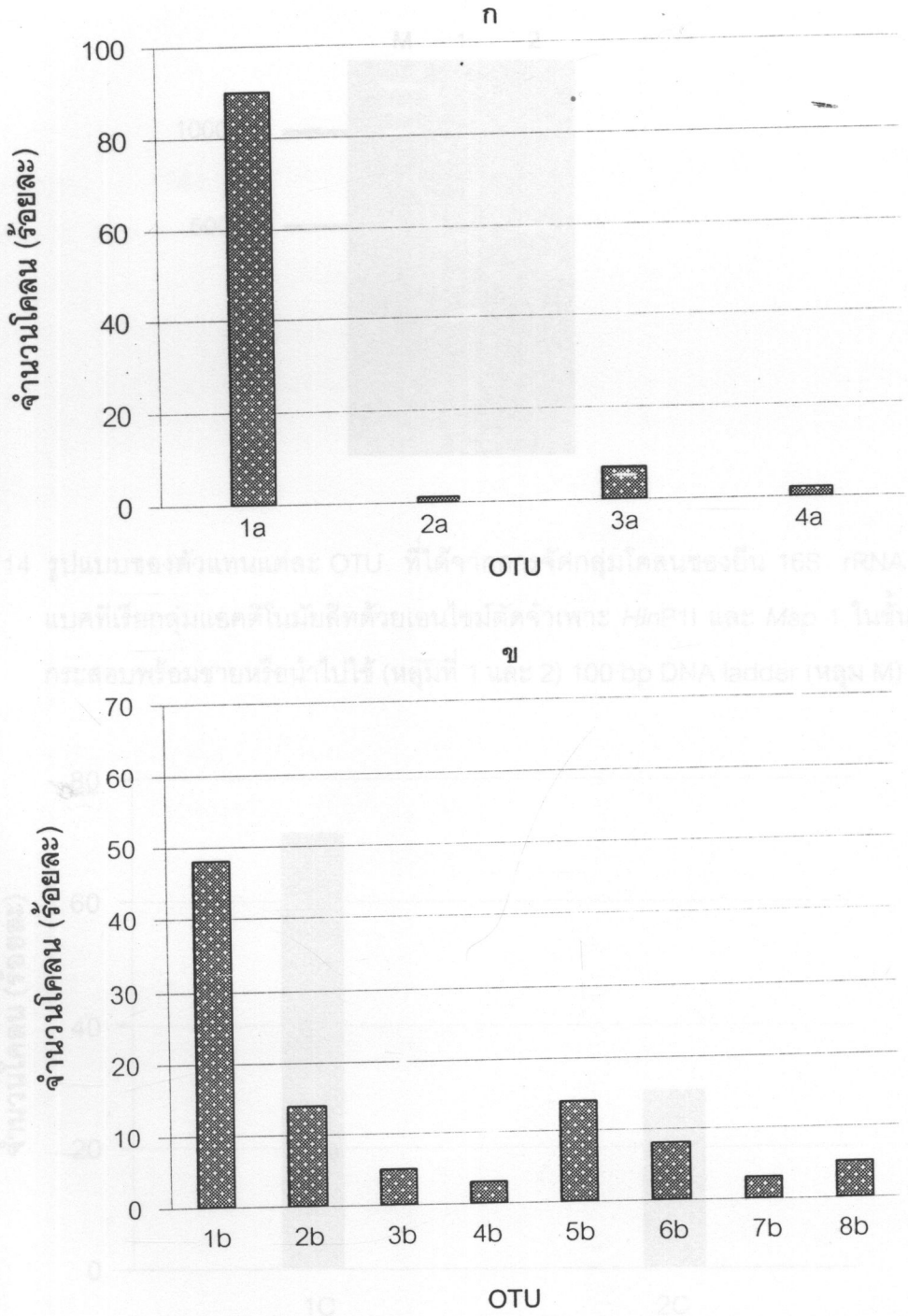


ก

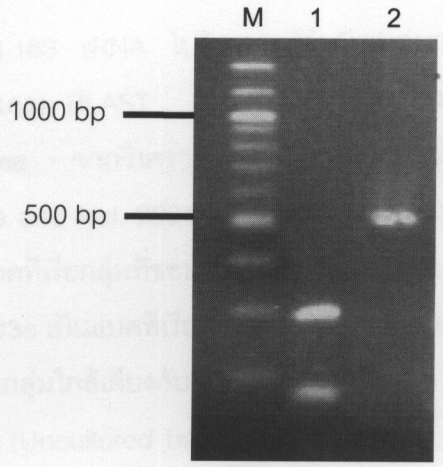


ข

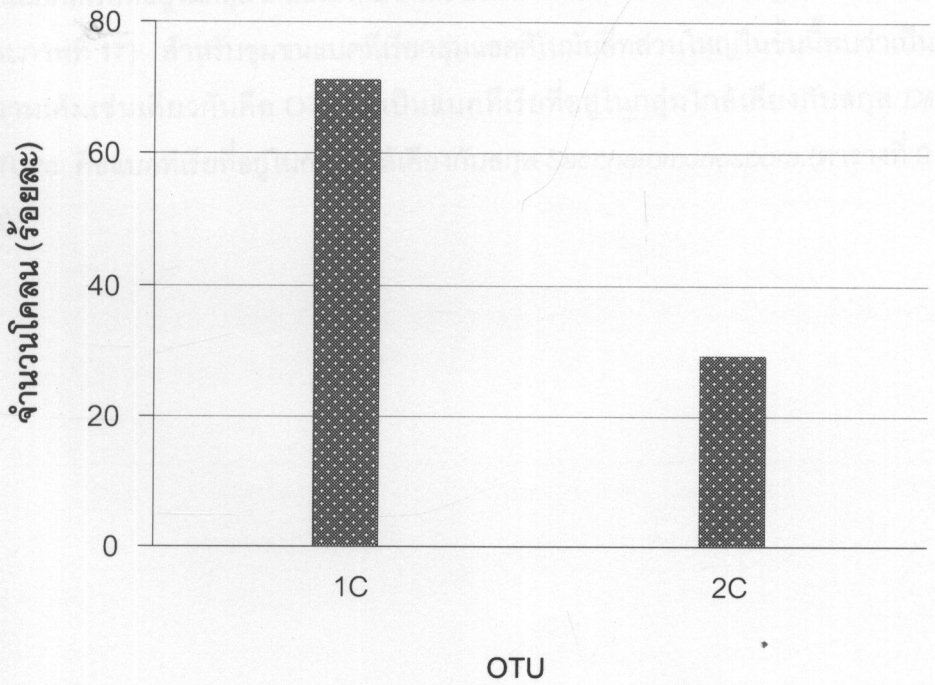
ภาพที่ 12 รูปแบบของตัวแทนแต่ละ OTU ที่ได้จากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp*1 ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม (ก) (หลุมที่ 1-4) และขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (ข) (หลุมที่ 1-8) 100 bp DNA ladder (หลุม M)



ภาพที่ 13 จำนวนร้อยละของสมาชิกในแต่ละ OTU ที่ได้จากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp*1 ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม (ก) และขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (ข)



ภาพที่ 14 รูปแบบของตัวแทนแต่ละ OTU ที่ได้จากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp* 1 ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ (หลุมที่ 1 และ 2) 100 bp DNA ladder (หลุม M)



ภาพที่ 15 จำนวนร้อยละของสมาชิกในแต่ละ OTU ที่ได้จากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp*1 ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้

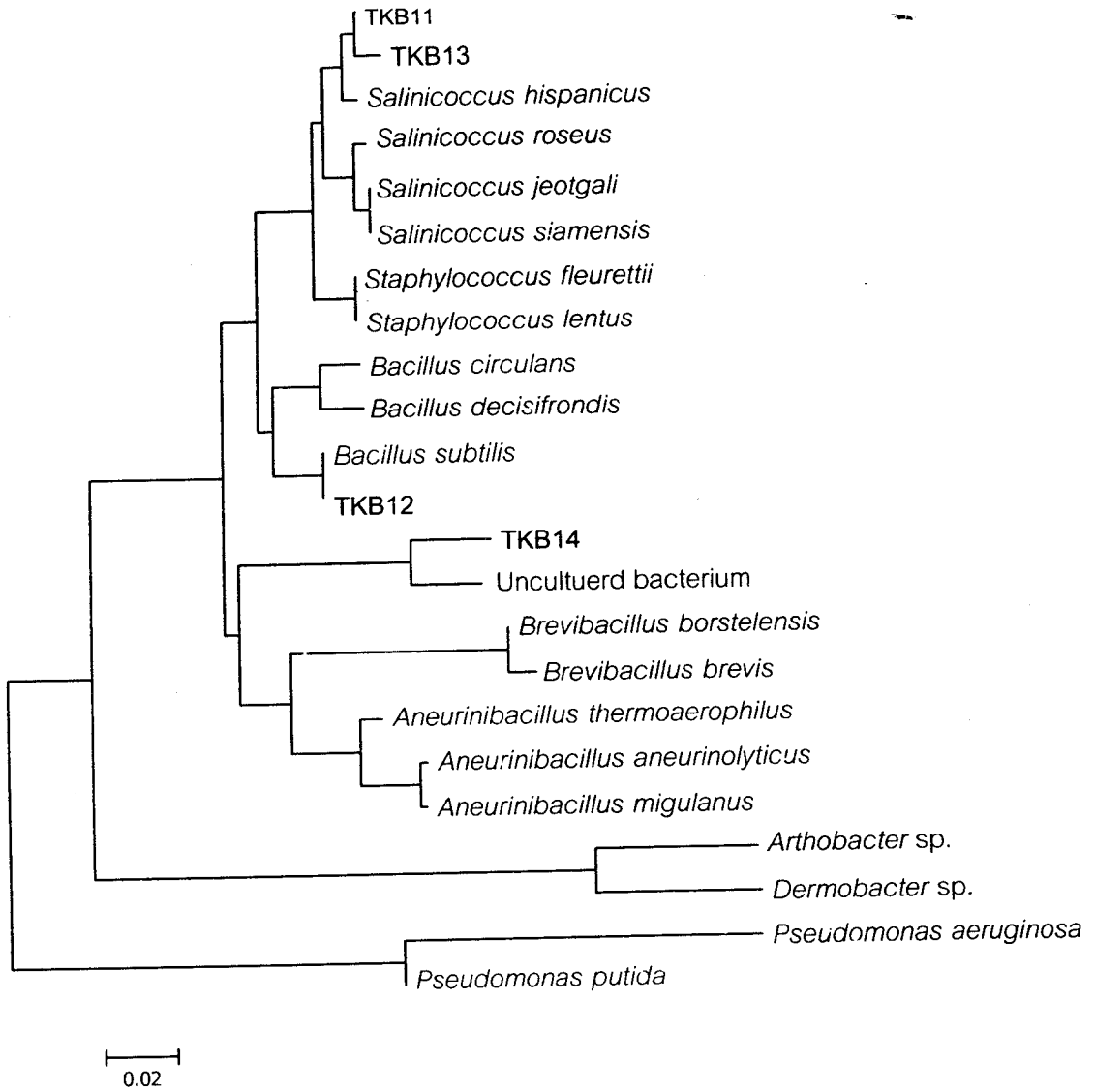
เมื่อนำยีน 16S rRNA ไปวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะด้วยโปรแกรม BLAST และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อสร้าง Phylogenetic tree จากวิเคราะห์ความแตกต่างด้านวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 3.1(Kumar, Tamura and Nei. 2004) พบว่าโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียส่วนใหญ่ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ชอบความเค็ม (Halophilic bacteria) โดย OTU1a ที่พบมากถึงร้อยละ 90 และ OTU3a เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Salinicoccus* ส่วน OTU2a เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Bacillus* OTU4a เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Uncultured bacterium) (Brodie et al. 2007)(ตารางที่ 8 และภาพที่ 16) เช่นเดียวกับโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ที่พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ชอบความเค็มคือ OTU1b, OTU3b, OTU4b และ OTU6b เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Halomonas* OTU2b เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Amphibacillus* OTU8b เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Gracilibacillus* ส่วน OTU5b เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Abulencia et al. 2006) และ OTU7b เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับโคลน Bacterium zf-IIRht1 (Zhang et al. 2006) (ตารางที่8 และภาพที่ 17) สำหรับชุมชนแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ในขั้นนี้พบว่าเป็นกลุ่มที่ชอบความเค็มเช่นเดียวกันคือ OTU1c เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Dietzia* ส่วน OTU2c คือแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Saccharomonospora* (ตารางที่ 9 และภาพที่ 18)

ตารางที่ 8 ผลการหาลำดับเบสของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสม และขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้

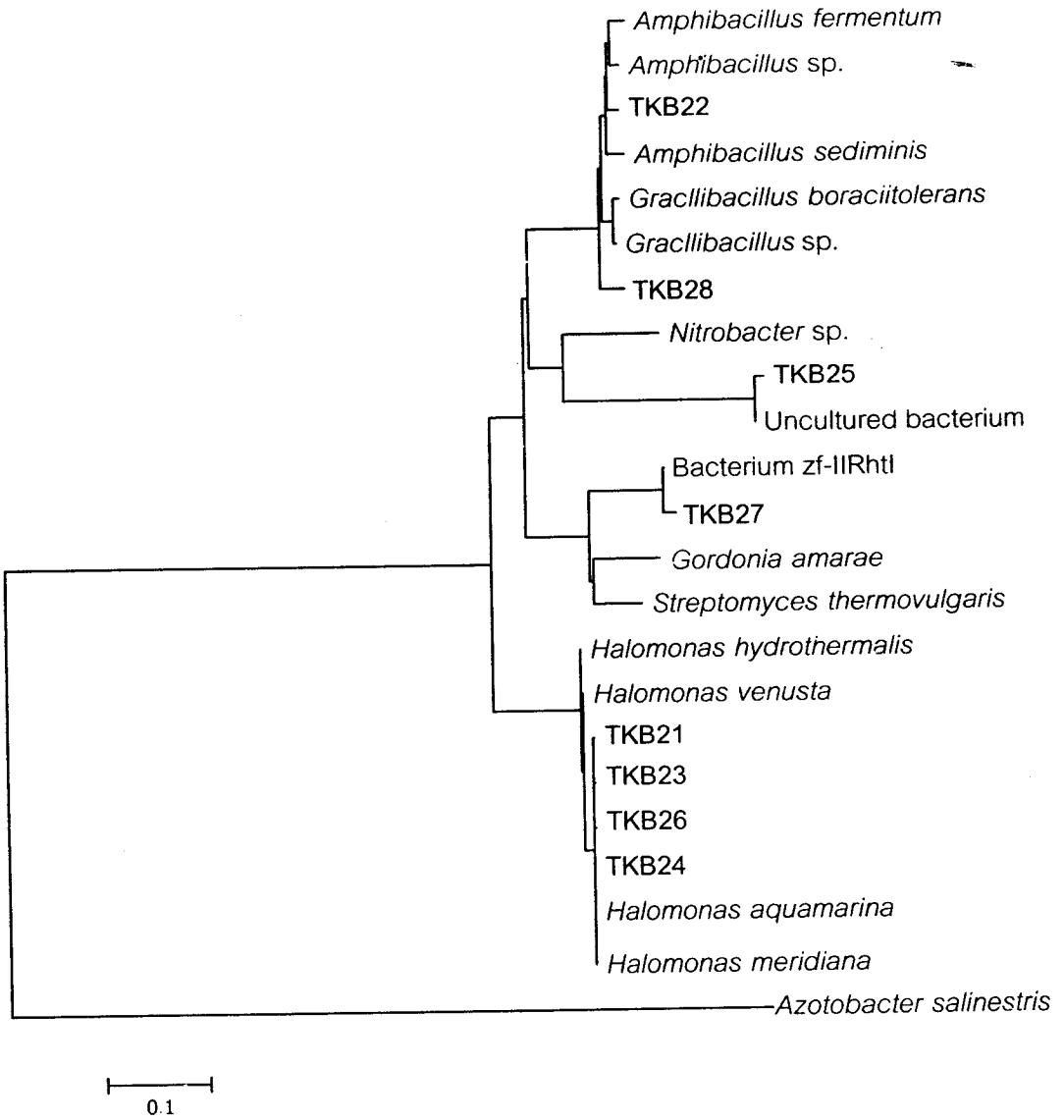
ขั้นตอนการผลิต	OTU	Clone ID	GenBank accession no.	Closet relative based on partial sequence	%Similarity
วัตถุดิบที่ใช้ใน	1a	TKB11	AY028927	*Salinicoccus* – like bacteria	96
กระบวนการ	2a	TKB12	AB196471	*Bacillus* – like bacteria	96
ผลิตปุ๋ยอินทรีย์	3a	TKB13	AY028927	*Salinicoccus* – like bacteria	96
เข้าเครื่องผสม	4a	TKB14	DQ129377	Uncultured bacterium	95
บรรจุกระสอบ	1b	TKB21	DQ372908	*Halomonas* – like bacteria	98
พร้อมขายหรือ	2b	TKB22	DQ432399	*Amphibacillus* – like bacteria	95
นำไปใช้	3b	TKB23	DQ372908	*Halomonas*- like bacteria	98
	4b	TKB24	EF017037	*Halomonas* – like bacteria	98
	5b	TKB25	DQ404676	Uncultured eubacterium	98
	6b	TKB26	DQ372908	*Halomonas* – like bacteria	98
	7b	TKB27	DQ223669	Bacterium zf-IIRht1	97
	8b	TKB28	AB189327	*Gracilibacillus* – like bacteria	95

ตารางที่ 9 ผลการหาลำดับเบสของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่พบในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้

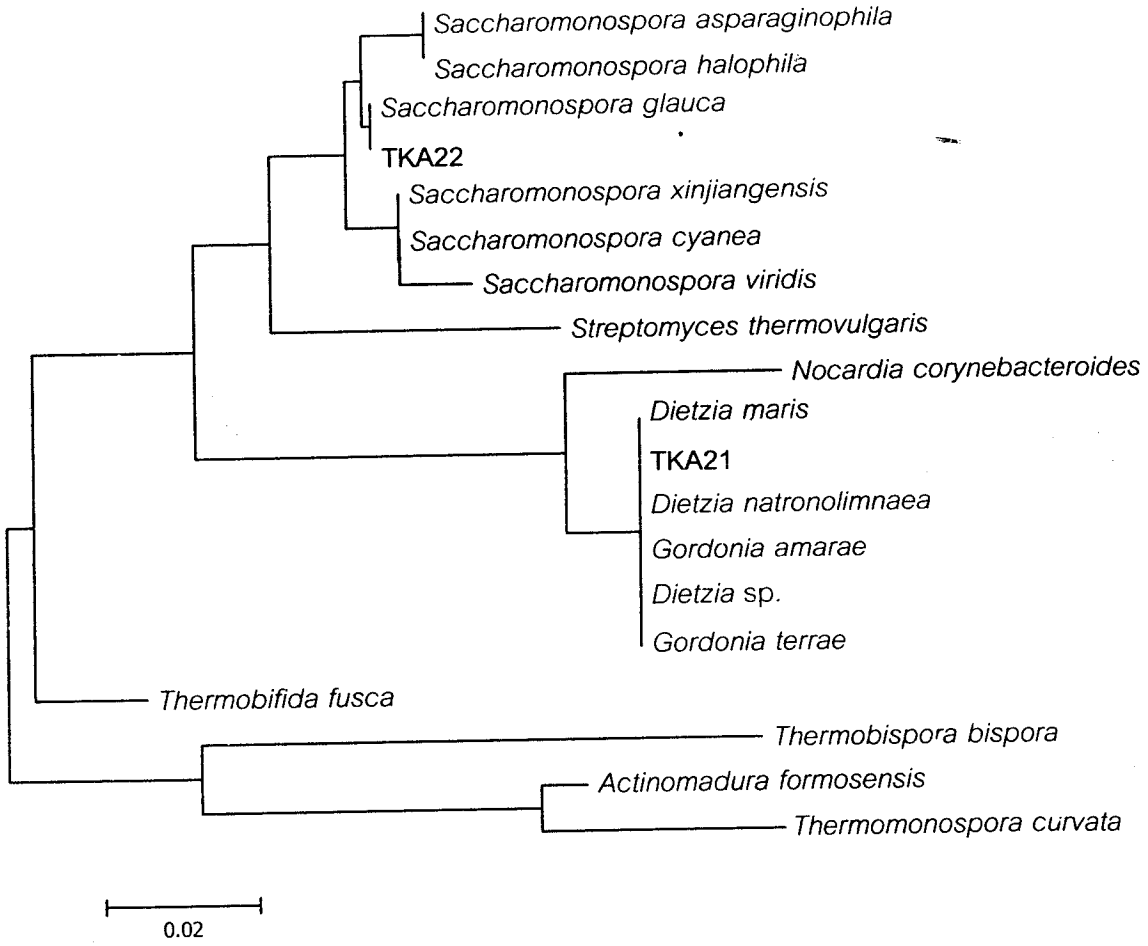
OTU	Clone ID	GenBank accession no.	Closet relative based on partial sequence	%Similarity
1c	TKA21	AM697568.1	*Dietzia*– like bacteria	99
2c	TKA22	AF252315.1	*Saccharomonospora*– like bacteria	99



ภาพที่ 16 Phylogenetic tree ของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในปุ๋ยอินทรีย์จาก Clone library ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสจำนวน 700 เบสด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 บาร์สเกล 0.02 แสดงระยะห่างของการเปลี่ยนแปลงต่อนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 17 Phylogenetic tree ของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในปุ๋ยอินทรีย์จาก Clone libraryใน ขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสจำนวน 700 เบส ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 บาร์สเกล 0.1 แสดงระยะห่างของการเปลี่ยนแปลงต่อนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 18 Phylogenetic tree ของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทในปุ๋ยอินทรีย์จาก Clone libraryในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบส จำนวน 300 เบสด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 บาร์สเกล 0.02 แสดงระยะห่างของการเปลี่ยนแปลงต่อนิวคลีโอไทด์

จากผลการศึกษาพบว่าในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ไม่พบแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในปุ๋ยอินทรีย์ประเภทต่าง ๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าในขั้นก่อนการบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้นั้นต้องผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียสทำให้ *Bacillus* ไม่สามารถทนอุณหภูมิของกระบวนการผลิตได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Mutzel et al.(1996) พบว่า *Bacillus stearothermophilus* ที่เป็นสายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักสามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 75 องศาเซลเซียสเท่านั้น

ถึงแม้ว่า *Bacillus* จะเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งและอุณหภูมิสูงได้แต่เทคนิค 16S rRNA clone library analysis ไม่สามารถศึกษาเอนโดสปอร์ได้ (Koschinsky et al. 1999) จึงทำให้ไม่พบแบคทีเรียดังกล่าวในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้

โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียส่วนใหญ่ใน 2 ขั้นของกระบวนการผลิตเป็นกลุ่มที่ชอบความเค็มซึ่งอาจเป็นเพราะคุณสมบัติของปุ๋ยที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงคือมากกว่า 3.5 เดซิซีเมนต่อเมตรหรือมีค่าความเข้มข้นของเกลือทั้งหมดประมาณร้อยละ 2 (สมศักดิ์. 2538) ซึ่งคาดว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตโดยเฉพาะขี้ไก่อาจมีส่วนทำให้ปุ๋ยมีค่าการนำไฟฟ้าสูง แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบจึงเป็นกลุ่มที่ชอบความเค็มไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่พบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเนื่องจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวซึ่งเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้เนื่องจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไม่สามารถจำลองสภาวะที่เหมาะสมเหมือนในธรรมชาติที่จุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ ได้ นอกจากนี้ต้องปรับสภาพแวดล้อมของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น pH อุณหภูมิ แสงสว่าง ความชื้น เป็นต้น ซึ่งสภาพแวดล้อมดังกล่าวอาจเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้น (Tabacchioni et al. 2000) ทำให้ไม่สามารถศึกษาจุลินทรีย์ทุกชนิดที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมนั้น ๆ ได้ในเวลาเดียวกัน

ผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis ใน 2 ขั้นของกระบวนการผลิตพบว่าโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียไม่มีความหลากหลายมากนัก เนื่องจากตัวอย่างปุ๋ยใน 2 ขั้นของกระบวนการผลิตนั้นอาจจะมีความหลากหลายของแบคทีเรียน้อยเป็นเพราะปัจจัยสภาพแวดล้อมในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องนั้นอาจจะส่งเสริมหรือลดความหลากหลายของแบคทีเรียได้ ปัจจัยหลักที่มีผลต่อโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในขั้นตอนของกระบวนการผลิตของโรงงานแห่งนี้คือคุณสมบัติทางเคมีของปุ๋ยโดยเฉพาะค่าการนำไฟฟ้าซึ่งเป็นค่าความเค็มของปุ๋ยนั้นอยู่ในระดับที่เกินค่ามาตรฐานและจัดว่าปุ๋ยนั้นมีความเค็ม ดังนั้นทำให้โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ชอบความเค็มเท่านั้น นอกจากนี้มีหลายสาเหตุที่ทำให้ผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในขั้นตอนของกระบวนการผลิตไม่มีความหลากหลายมากนักอาจเป็นเพราะวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ทำโดยการนำตัวอย่างปุ๋ยกรองผ่านกระดาษกรองจึงทำให้แบคทีเรียบางส่วนติดอยู่บนกระดาษกรองและขั้นตอนของการทำ PCR ที่เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA โดยใช้รอบการทำงานของ PCR จำนวน 30 รอบซึ่งมากเกินไปส่งผลต่อความหลากหลายของแบคทีเรียได้ (Macrae. 2000) จากการศึกษาของ

Acinas et al. (2005) ที่เปรียบเทียบจำนวนรอบของการทำ PCR สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNAของแบคทีเรียระหว่าง 18 และ 35 รอบพบว่าจำนวน 18 รอบของการเพิ่มปริมาณยีนสามารถศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียได้มากกว่าการเพิ่มปริมาณยีนที่ 35 รอบ นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาไม่ครอบคลุมแบคทีเรียทุกชนิดที่มีอยู่ในขั้นตอนของกระบวนการผลิตซึ่งพบจากการศึกษาครั้งนี้คือ การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรียทั่วไปคือ 27f และ 1492r พบว่าโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียเป็นกลุ่มที่มีองค์ประกอบของเบส Guanine (G) และ Cytosine (C) ต่ำ ไม่พบแบคทีเรียในกลุ่มที่มีองค์ประกอบของเบส G และ C สูง เช่น แอคติโนมัยสีทที่คาดว่าน่าจะพบจากการศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์นี้เนื่องจากในขั้นตอนนี้จะพบการเจริญของแอคติโนมัยสีทที่มีลักษณะเป็นจุดสีขาวคล้ายผงปูนบนกองปุ๋ย (ธงชัย. 2546) และเป็นเกณฑ์บ่งชี้ว่าปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตนั้นสามารถนำไปบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ได้แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์ 243f และ 513r สามารถศึกษาแอคติโนมัยสีทได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Peter et al. (1999) พบว่าการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรียทั่วไปไม่สามารถศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียได้มากนักสาเหตุดังกล่าวอาจทำให้ไม่พบความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียในขั้นตอนของกระบวนการผลิตปุ๋ยได้มากนักซึ่งความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียในขั้นตอนของกระบวนการผลิตอาจจะมากกว่านี้ถ้าลดจำนวนรอบของการทำ PCR และเลือกใช้ไพรเมอร์หลายคู่เพื่อศึกษาเนื่องจากไพรเมอร์ 27f และ 1492r อาจไม่สามารถศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียได้ครอบคลุมแบคทีเรียทุกชนิดหรือใช้เทคนิคอื่นเข้ามาช่วยศึกษาความหลากหลายเช่น เทคนิค DGGE

แม้ว่าผลการศึกษาจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิค 16S rRNA clone library analysis จะไม่สอดคล้องกันเพราะข้อจำกัดของแต่ละเทคนิคแต่ผลการศึกษาที่ได้จากสองเทคนิคทำให้พบความหลากหลายของแบคทีเรียมากกว่าการเลือกศึกษาเพียงเทคนิคเดียวและผลการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และเป็นแนวทางในการพัฒนาหรือปรับปรุงกระบวนการผลิตเช่นควรนำจุลินทรีย์ที่มีบทบาทและความสำคัญที่พบจากการศึกษาครั้งนี้คือ *Pseudomonas* และแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชมาใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตได้แต่แบคทีเรียดังกล่าวไม่พบในปุ๋ยอินทรีย์พร้อมขายหรือนำไปใช้ ดังนั้นอาจต้องปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อให้แบคทีเรียดังกล่าวพบอยู่ในปุ๋ยอินทรีย์พร้อมขายหรือนำไปใช้เพราะจะเป็นประโยชน์เมื่อนำไปใช้กับพืช

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากโรงงานผลิตปุ๋ยขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิคทางชีวโมเลกุล ผลการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีจำนวนเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละขั้นของการผลิต จุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่คือแบคทีเรียซึ่งพบจำนวน 8.8 ± 0.05 Log CFUต่อกรัม และราพบจำนวนน้อยที่สุดคือ 4.5 ± 0.08 Log CFUต่อกรัม ในน้ำหมักชีวภาพที่ใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์พบยีสต์เป็นจำนวนที่มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ แต่ไม่พบยีสต์ในทุกขั้นของการผลิต และพบจุลินทรีย์แต่ละชนิดมากในขั้นนำปุ๋ยอินทรีย์ออกจากเครื่องอบ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่พบในปุ๋ยอินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่ทนหรือชอบความร้อน ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้สามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ 7 ไอโซเลตที่ยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชคือเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ได้ นอกจากนี้แบคทีเรีย 13 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมสามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้ซึ่งไอโซเลตที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุดคือ แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* แบคทีเรียสกุลดังกล่าวเหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากการนับเซลล์โดยตรงเมื่อย้อมด้วยสีเรืองแสง DAPI ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมและขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้เท่ากับ 9.2 ± 0.05 และ 8.5± 0.06 Log เซลล์ต่อกรัมตามลำดับ ส่วนผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลคือ เทคนิค 16S rRNA clone library analysis ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมพบว่าโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียส่วนใหญ่ในขั้นนี้เป็นแบคทีเรียที่ชอบความเค็มคือ แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Salinicoccus* โดยพบร้อยละ 97 ของจำนวนโคลนทั้งหมด เช่นเดียวกับผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้ที่พบว่าโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ชอบความเค็มคือ แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Halomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในขั้นตอนนี้โดยพบร้อยละ 64 ของจำนวนโคลนทั้งหมด สำหรับโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ในขั้นนี้พบว่าเป็นกลุ่มที่ชอบความเค็มเช่นเดียวกันคือ แบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Dietzia* โดยพบร้อยละ 71 ของจำนวนโคลนทั้งหมด ผลจากการศึกษาโดยใช้เทคนิค 16S

rRNA clone library analysis ไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากไม่พบแบคทีเรียกลุ่มที่ชอบความเค็มซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นจากการศึกษาโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis ซึ่งอาจเป็นเพราะอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว นอกจากนี้ในขั้นนำวัตถุดิบเข้าเครื่องผสมพบแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตได้แต่ผลจากการศึกษาโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis ในขั้นตอนนี้ไม่พบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว ดังนั้นผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค 16S rRNA clone library analysis พบว่าไม่สามารถศึกษาได้หลากหลายมากนักซึ่งเป็นเพราะปัจจัยสภาพแวดล้อมในกระบวนการผลิตปุ๋ยที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น นอกจากนี้เป็นเพราะวิธีการสกัดดีเอ็นเอและจำนวนรอบของการทำ PCR ที่มากเกินไปและไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาไม่ครอบคลุมแบคทีเรียทุกชนิดที่มีอยู่ในขั้นตอนการผลิต ดังนั้นในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์อาจจะต้องลดจำนวนรอบของการทำ PCR และเลือกใช้ไพรเมอร์หลายคู่ในการศึกษาอย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และการนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ไปใช้ในการพัฒนาการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาจุลินทรีย์จากวัตถุดิบแต่ละชนิดที่นำมาใช้ในการผลิตเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในกระบวนการผลิตส่งผลต่อการพัฒนากระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

5.2.2 ควรนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตซึ่งมีบทบาทและความสำคัญต่อการเป็นประโยชน์ต่อปุ๋ยในด้านต่าง ๆ เช่น การเพิ่มธาตุอาหารพืช หรือ การผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์

5.2.3 ควรปรับปรุงกระบวนการผลิตปุ๋ยให้มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟอสเฟตคือ *pseudomonas* ในขั้นบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้เนื่องจากจะทำให้ปุ๋ยมีประโยชน์มากยิ่งขึ้นเมื่อนำไปใช้กับพืช

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กรมพัฒนาที่ดิน. (2547). "กรมพัฒนาที่ดินเดินหน้ายุทธศาสตร์การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ปี 48," จดหมายข่าวหมอดิน. 1(6), 1-7.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. (2548). ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำเป็น อ่อนทอง. (2546). คู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์ดินและพืช. สงขลา : คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธงชัย มาลา. (2546). ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ : เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธวัชชัย ณ นคร. (2533). ปฐพีกายภาพ. กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นฤมล วชิรปัทมา และเยาวภา จิระเกียรติกุล. (2546). การศึกษาองค์ประกอบของธาตุอาหารในน้ำสกัดชีวภาพที่ได้มาจากวัตถุดิบต่างชนิด. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

นุกูล อินทระสังขา. (2547)."เทคนิคการศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ," ใน การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 3, 28-30 มกราคม 2547. ณ โรงแรมบีพีแกรนด์ทาวเวอร์ จังหวัดสงขลา.

นลินี จาริกภากร พาณี หนูนิ่ม โสพนา วรฉัตรวิทยา อุทิศ ดวงสุวรรณ และ มนูญ เอนกชัย. (2537). "การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวในสภาพไร่โดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ NSRS 89-26," วารสารวิชาการเกษตร. 12, 111-114.

พิทยากร ลิ่มทอง และฉวีวรรณ เหลืองวุฒิวิโรจน์. (2540). "ระดับธาตุอาหารพืชในปุ๋ยหมัก," ใน คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องการปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ, กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พิทยากร ลิ่มทอง และเสียงแจ่ว พิริยพฤนต์. (2540)."จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายและประโยชน์บางประการในการกองปุ๋ยหมัก," ใน คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องการปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ, กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ไพฑูรย์ พูลสวัสดิ์. (2549). "การผลิตปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด," เกษตรกรรมธรรมชาติ. 3(9), 23-27.

มุกดา สุขสวัสดิ์. (2544). ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

มุกดา สุขสวัสดิ์. (2548). ปุ๋ยอินทรีย์. กรุงเทพฯ : บ้านและสวน.

เมธี มณีวรรณ. (2542). "มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์," วารสารพัฒนาที่ดิน. 36, 12-22.

ยงยุทธ โอสถสภา. (2543). ธาตุอาหารพืช. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบูรณ์ ประภาพรรณพงศ์. (2549). "ทำไมต้องเป็นปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด," เกษตรกรรีวิมธรรมชาติ. 3(9), 14-16.

สมศักดิ์ มณีพงศ์. (2538).คู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์ดินและพืช. สงขลา : คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสียงแจ่ว พิริยพฤนต์ และวรรณลดา สุนันทพงศ์ศักดิ์. (2540). "อินทรียวัตถุกับการควบคุมเชื้อโรคพืชบางชนิดในดินโดยชีววิธี," ใน คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องการปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ, กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานวิจัยธุรกิจ ธนาคารกรุงไทย จำกัด (มหาชน). (2550). ปุ๋ยเคมี : แนวโน้มพอใช้. สืบค้นเมื่อวันที่ 6 พฤษภาคม 2550 จาก http://www.cb.ktb.co.th/prod/brnew.nsf

สำนักงานเลขานุการโครงการฉลากเขียว. (2545). ข้อกำหนดสลากเขียวสำหรับปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ. กรุงเทพฯ : กองส่งเสริมและฝึกอบรม สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย.

อำนาจ สุวรรณฤทธิ์. (2548). ปุ๋ยกับการเกษตรและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abulencia, C. B., Wyborski, D. L., Garcia, J. A., Podar, M., Chen, W., Chang, S. H., Chang, H. W., Watson, D., Brodie, E. L., Hazen, T. C. and Keller, M. (2006). "Environmental whole – genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments," Applied and Environmental Microbiology. 72(5), 3291-3301.

Acinas, S. G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V. and Polz, M. F. (2005). "PCR-induced sequence artifacts and bias : insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample," Applied and Environmental Microbiology. 17, 8966-8969.

Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995). "Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation," Microbiology Reviews. 59, 143-169.

Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P., Vogt, G., Marchiani, M. and Fischer, J. L. (1996). "Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 °C)," Applied and Environmental Microbiology. 62(5), 1723-1727.

Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T. and Aragno, M. (1999). "Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods," FEMS Microbiology Ecology. 28,141-149.

Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Parker, J. P., Zubietta, I. X., Piceno, Y. M. and Andersan, G. L. (2007). "Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations," Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104(1), 299-304.

Burrel, P. C., Keller, J. and Backall, L. L. (1998). "Microbiology of a nitrite oxidizing bioreactor," Applied and Environmental Microbiology. 64, 1878-1883.

Çakmakçi, R., Dönmez, F., Aydin, A. and Sahin, F. (2006). "Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions," Soil Biology&Biochemistry. 38, 1482-1487.

Ceccherini, M. T., Castaldini, M., Piovanelli, C., Hastings, R. C., McCarthy, A. J., Bazzicalupo, M. and Miclaus, N. (1998). "Effects of swine manure fertilization on autotrophic ammonia oxidizing bacteria in soil," Applied Soil Ecology. 7, 149-157.

Dee, P. M. and Ghiorse, C. (2001). "Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA," FEMS Microbiology Ecology. 35, 207-216

Franke-Whittle, I. H., Klammer, S. H. and Insam, H. (2005). "Design and application of an oligonucleotide microarray for the investigation of compost microbial communities," Journal of Microbiological Methods. 62, 37-56.

George, S. P., Ahmad, A. amd Rao, M. B. (2001). "Studies on carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycetes," Bioresource Technology. 77, 171-175.

Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P. and Reddy, G. (2006). "Growth promotion of maize by phosphate – solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna," Microbiological Ressearch. 11, 358-356.

Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M. and Boudabous, A. (2001). "Microbial characterization during composting of municipal solid waste," Bioresource Technology. 80, 217-225.

Heerden, I. V., Cronjé, C., Swart, S. H. and Kotzé, J. M. (2002). "Microbial chemical and physical aspects of citrus waste composting," Bioresource Technology. 81, 71-76.

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Welling, E. (1997). "Analysis of actinomycetes communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients," Applied and Environmental Microbiology. 63(8), 3233-3241.

Ishii, K., Fukui, M. and Takii, S. (2000). "Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis," Journal of Applied Microbiology. 89, 768-777.

John, H. P. (2001). "Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with rRNA-targeted Oligonucleotide probes," Methods in Microbiology, London : Academic Press.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H. and Trevors, J. T. (2004). "Methods of studying soil microbial diversity," Journal of Microbiological Methods. 58, 169-188.

Koschinsky, S., Peter, S., Schwieger, F. and Tebbe, C. C. (1999). "Applying molecular techniques to monitor microbial communities in composting processes," Microbial Ecology. 47, 205-208

Kumar, S., Tamura, K . and Nei, M. (2004). "MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment," Bioinformatics. 5, 150 -163.

Lane, D. J. (1991). "16S/23S rRNA sequencing," Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, Chichester : Academic Press.

Lewin, B. (2000). "Protein synthesis," Gene VII, New York : Oxford University Press.

Li, Y., Dick, W. A. and Tuovinen, O. H. (2003). "Evaluation of fluorochromes for imaging bacteria in soil," Soil Biology & Biochemistry. 35, 737-744.

Macrae, A. (2000). "The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology," Journal of Microbiology. 31, 77-82.

Mutzel, A., Reinscheid, U. M., Antranikian, G. and Müller, R. (1996). "Isolation and characterization of a thermophilic bacillus strain, that degrades phenol and cresols as sole carbon source at 70°C," Applied Microbiology and Biotechnology. 46(5), 593-596.

Norrell, S. A. and Messley, K. E. (2003). "Methods for examination of microorganisms," Microbiology Laboratory Manual : Principles and Applications, London : Prentice – Hall.

Ntougias, S., Zervakis, G. I., Kavroulakis, N., Ehaliotis, C. and Papadopoulou, K. K. (2004). "Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by amplified rDNA restriction analysis and sequencing of cultivated isolates," Systematic and Applied Microbiology. 27, 746-754.

Peace, D. A., Gast, C. J., Lawley, B. and Ellis-Evans, J. C. (2003). "Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture – dependent and culture – independent techniques," FEMS Microbiology Ecology. 45, 59-70.

Peter, S., Koschinsky, S., Schwieger, F. and Tebbe, C. C. (1999). "Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation-polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes," Applied and Environmental Microbiology. 66(3), 930-936.

Saini, V. K., Bhandari, S. C. and Tarafdar, J. C. (2004). "Comparison of crop yield, soil microbial C, N and P, N – fixation, nodulation and mycorrhizal infection in

inoculated and non – inoculated sorghum and chickpea crops," Field Crops Research. 89, 39-47.

Schloss, P. D., Hay, A. G., Wilson, D. B. and Walker, L. P. (2003). Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting," FEMS Microbiology Ecology. 46, 1-9.

Schnürer, A. and Schnürer, J. (2006). "Fungal survival during anaerobic digestion of organic household waste," Waste Management. 26, 1205-1211.

Schramm, A. and Amann, R. (2000). "Nucleic acid – based techniques for analyzing the diversity, structure, and dynamics of microbial communities in wastewater treatment," Biotechnology – Environmental Processes, Bremen : Wiley – VCH.

Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., Broek, J., Mil, S. and Wernars, K. (2001). "Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods," Applied and Environmental Microbiology. 67(5), 2284-2291.

Song, J., Weon, H.,Yoon, S., Park, D., Go, S. and Suh, J. (2001). "Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. Isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis," FEMS Microbiology Letters. 202, 97-102.

Tabacchioni, S., Chiarini, L., Bevivino, A., Cantale, C. and Dalmastri, C. (2000). "Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population," Microbial Ecology. 40, 169-176.

Tiquia, S. M., Tam, N. F. Y.and Hodgkiss, I. J. (1995). "Microbial activities during composting of spent pig manure sawdust litter at different moisture contents," Bioresource Technology. 55, 201-206.

Trevors, J. T. (1998). "Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically – contaminated soils," Water Air Soil Pollution. 101, 45-67.

Trillas, M. I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C. and Avilés, M. (2006). "Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T –

34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings," Biological Control. 39, 32-38.

Vargas – García, M. C., Suárez – Estrella, F. F., López, M. J. and Moreno, J. (2006). "*In vitro* studies on lignocellulose degradation by microbial strains isolated from composting processes," International Biodeterioration & Biodegradation. 8, 322-328.

Vargas – García, M. C., Suárez – Estrella, F. F., López, M. J. and Moreno, J. (2006). "Influence of microbial inoculation and co – composting material on the evolution of humic – like substances during composting of horticultural wastes," Process Biochemistry. 41, 1438-1443.

Zaitlin, B., Turkington, K., Parkinson, D. and Clayton, G. (2004). "Effect of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycete communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes," Applied Soil Ecology. 26, 53-62.

Zhang, S., Hou, S., Ma, X., Qin, D. and Chen, T. (2006). "Culturable bacteria in Himalayan ice in response to atmospheric circulation," Biogeosciences Discussions. 3, 765 - 778.

Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. (1996). "DNA recovery from soils of diverse composition," Applied and Environmental Microbiology. 62, 316-322.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบ

1) Motility - indole- lysine medium (MIL)

Agar	15.0	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
L-lysine HCl	5.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2) National botanical research institute's phosphate growth medium (NBRIP medium)

Agar	15.0	กรัม
$Ca_3(PO_4)_2$	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$MgCl_26H_2O$	5.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.1	กรัม
$MgSO_47H_2O$	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

3) Oxidative – fermentative (O/F) glucose medium

Agar	15.0	กรัม
Bromthymol blue	0.03	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Peptone	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

4) Potato dextrose agar (PDA)

Agar	15.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
มันฝรั่ง	200.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

5) Soil extract agar (SEA)

Agar	15.0	กรัม
Cycloheximide	10.0	มิลลิลิตร
Glucose	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Soil extract	400	มิลลิลิตร

วิธีเตรียมน้ำสกัดจากดิน (Soil extract)

นำดินสวน 500 กรัม เติมน้ำประปา 500 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะที่เหมาะสมแล้วนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส หลังจากทิ้งให้เย็นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.2 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำประปา

วิธีเตรียม Cycloheximide

ละลาย Cycloheximide 40 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีการกรอง

6) Streptomyces agar

Agar	15.0	กรัม
Beef extract	4.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
Peptone	4.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

7) Triple sugar iron agar

Agar	15.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	3.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Meat extract	3.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
NaS_2O_3	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Tryptone	14.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

8) Trypic soy agar (TSA)

Agar	15.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	17.0	กรัม
Soy bean meal	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

9) Yeast malt extract agar (YM)

Agar	15.0	กรัม
Glucose	3.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

10) **น้ำยาสำหรับย้อมสีแบบ** Gram's stain

สี Crystal violet

สารละลายไอโอดีน

95 % Ethanol

สี Safranin O

11) **น้ำยาสำหรับย้อมสีแบบ** Acid fast

สี Carbol fuchsin

Acid alcohol

Methylene blue

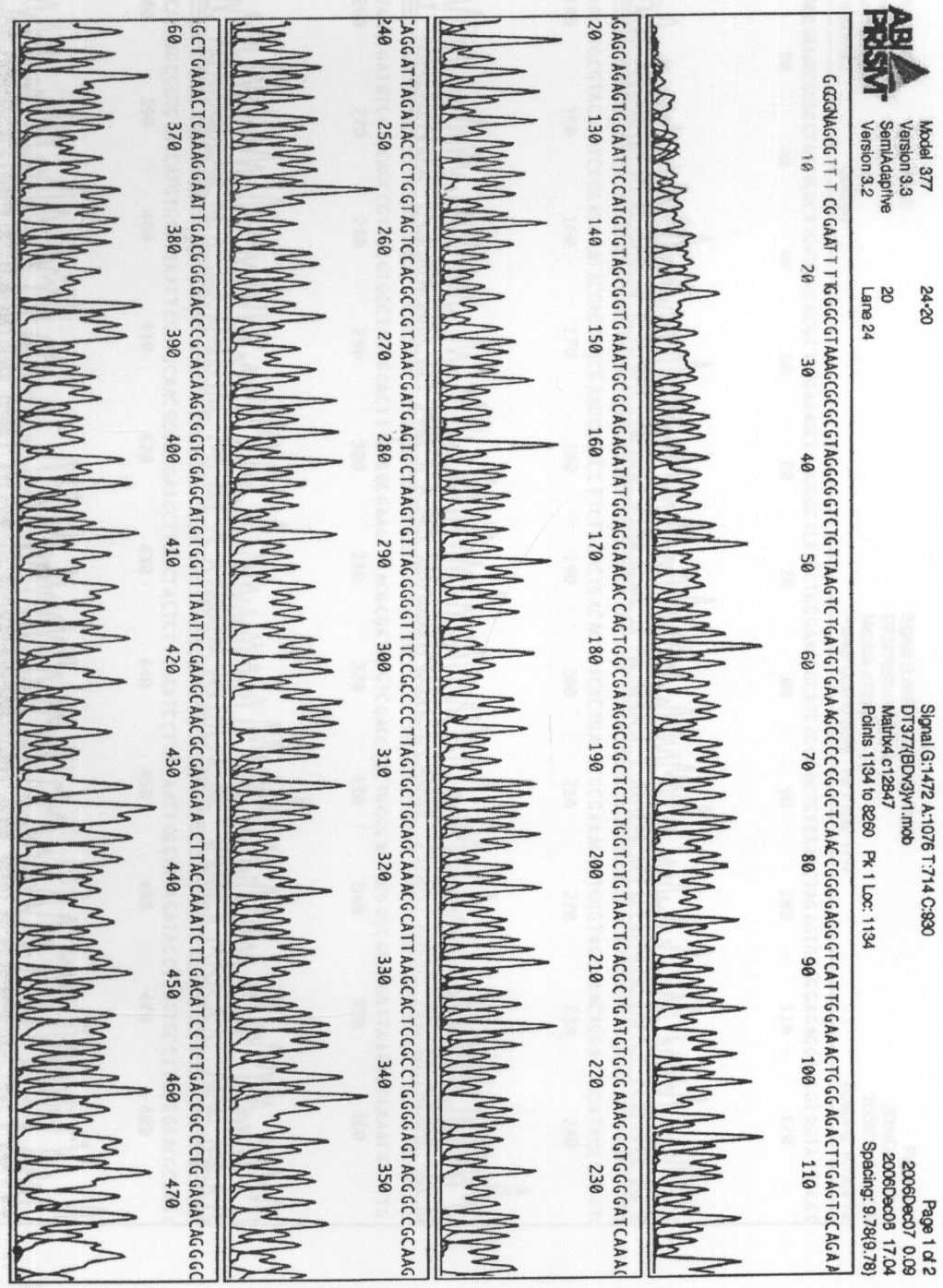
12) **น้ำยาลดการจางของสารเรืองแสง** (Anti – fading solution)

p – phenylenediamine	100	มิลลิกรัม
0.5 M $NaCO_3$ (pH 9)	10	มิลลิลิตร
Glycerol	90	มิลลิลิตร

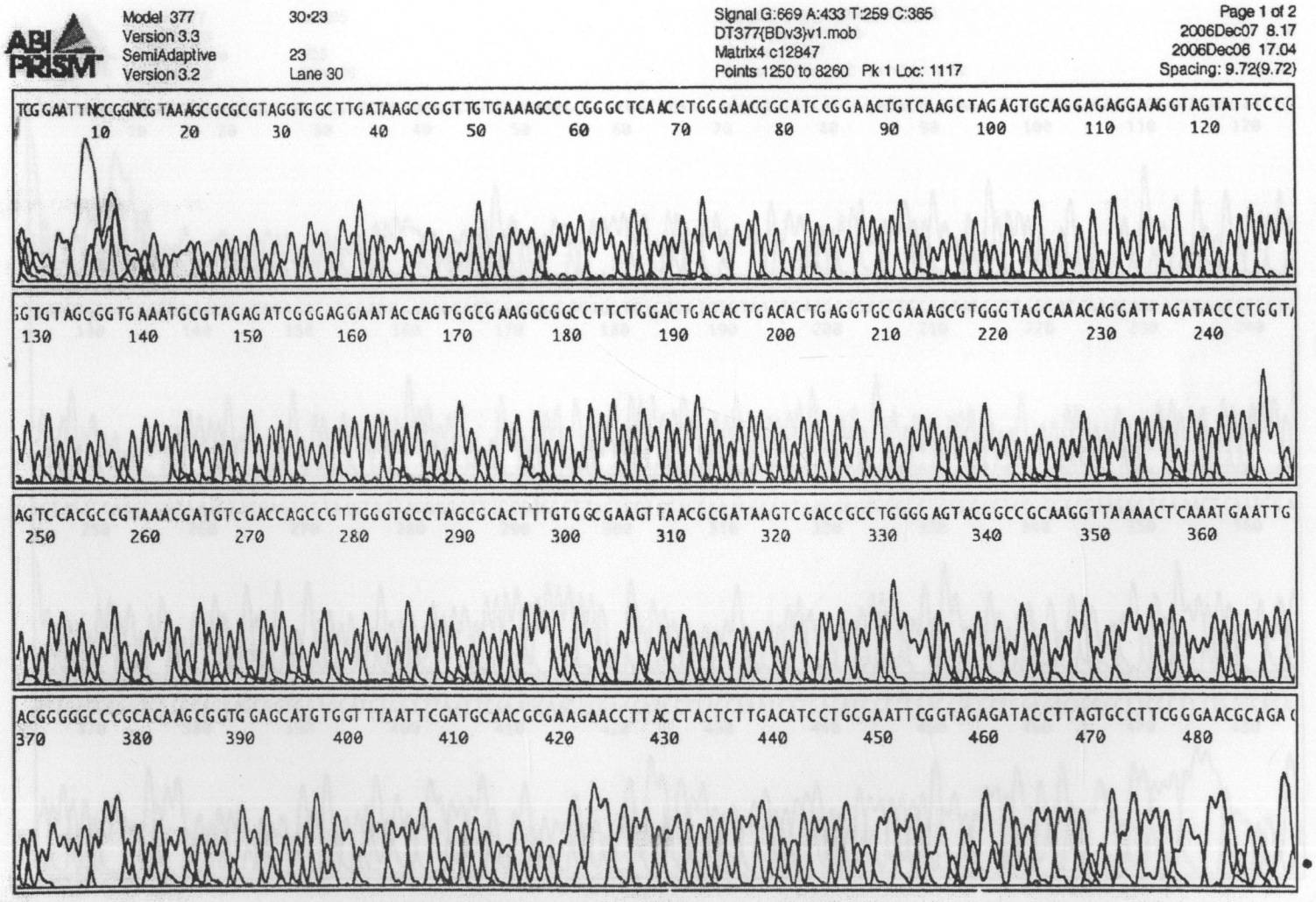
ภาคผนวก ข

ภาพโครมาโตแกรมจากการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA จากการศึกษาครั้งนี้

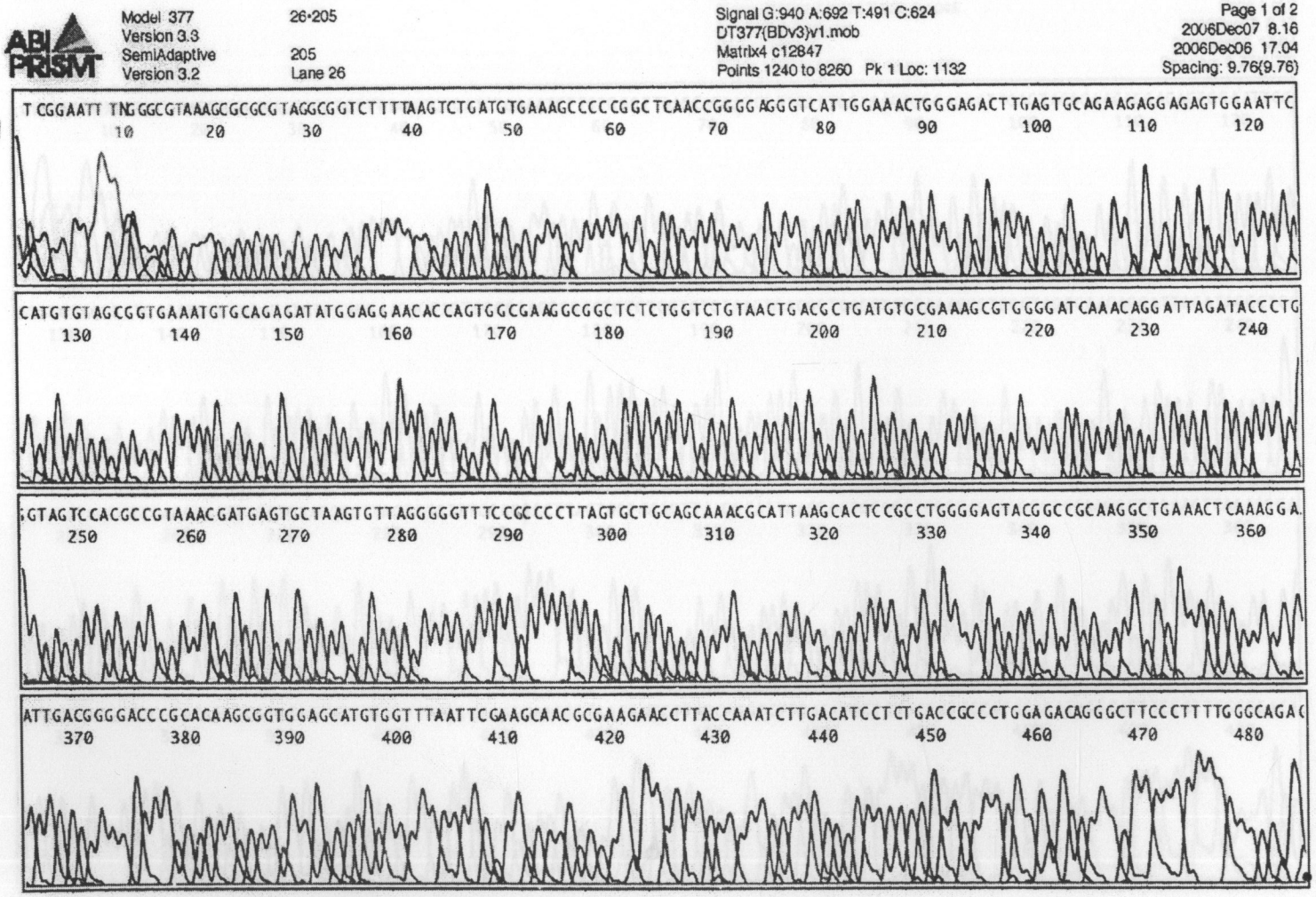
1) ภาพโครมาโตแกรมของ TKB11



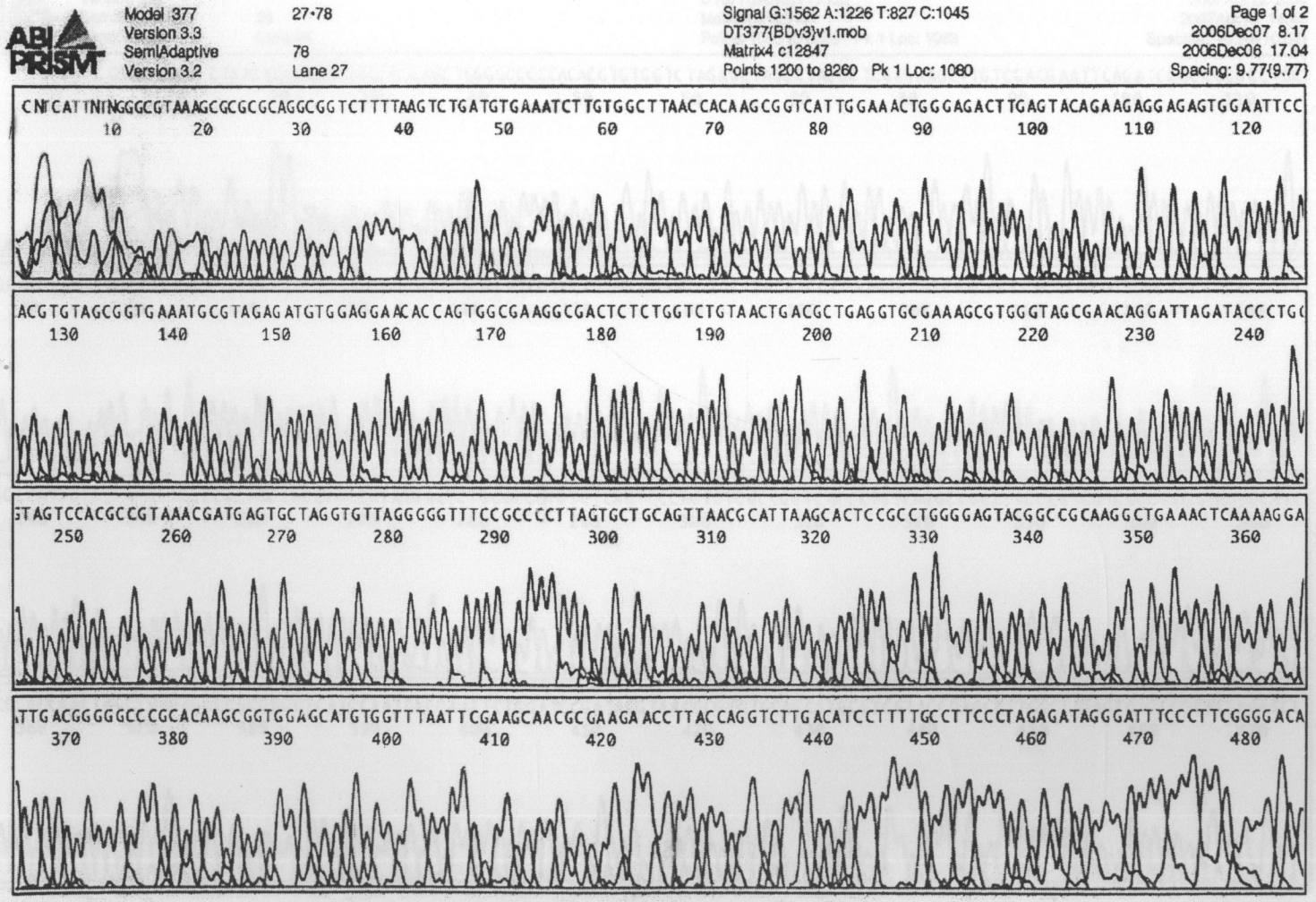
2) ภาพโครมาโตแกรมของ TKB12



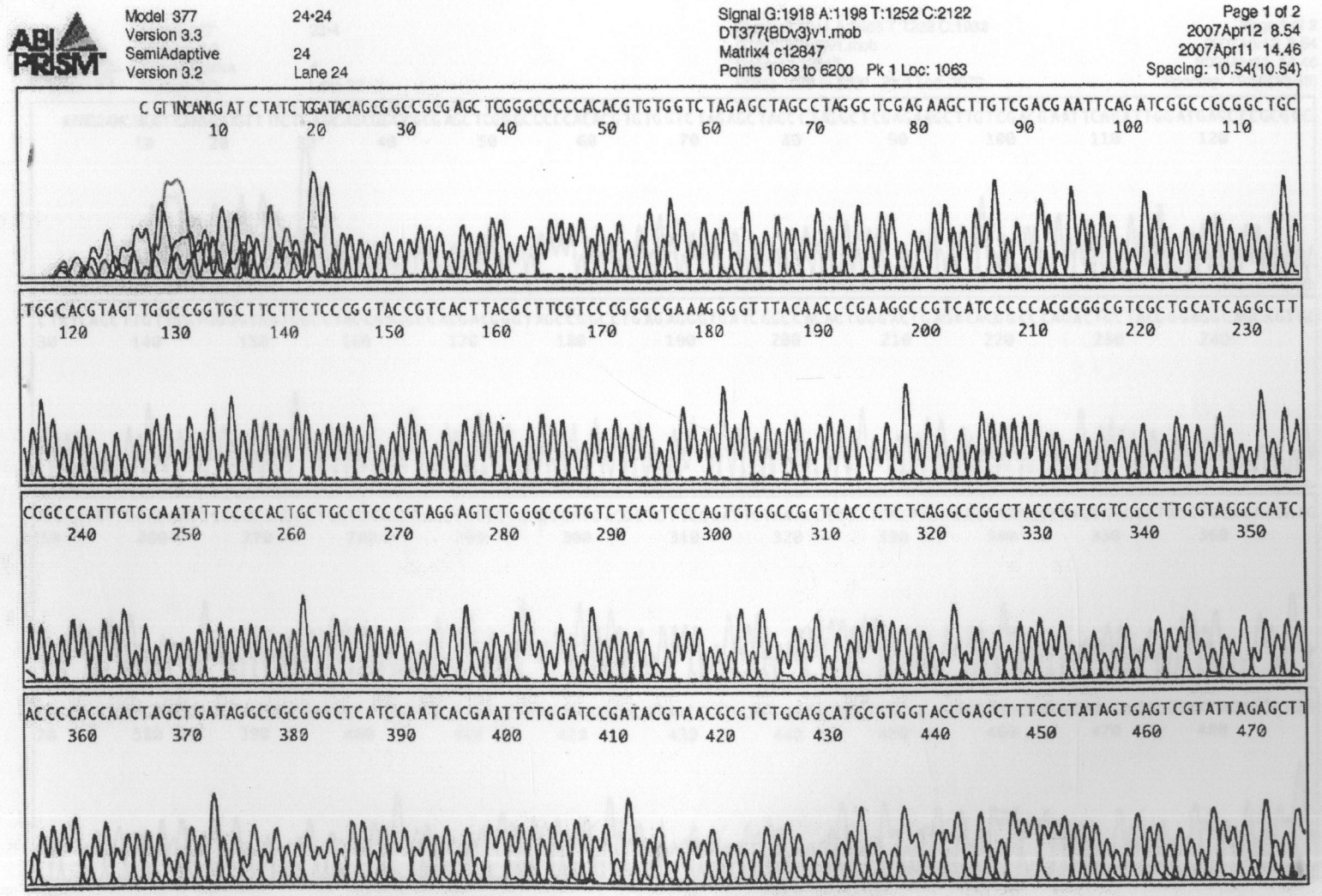
3) ภาพโครมาโตแกรมของ TKB13



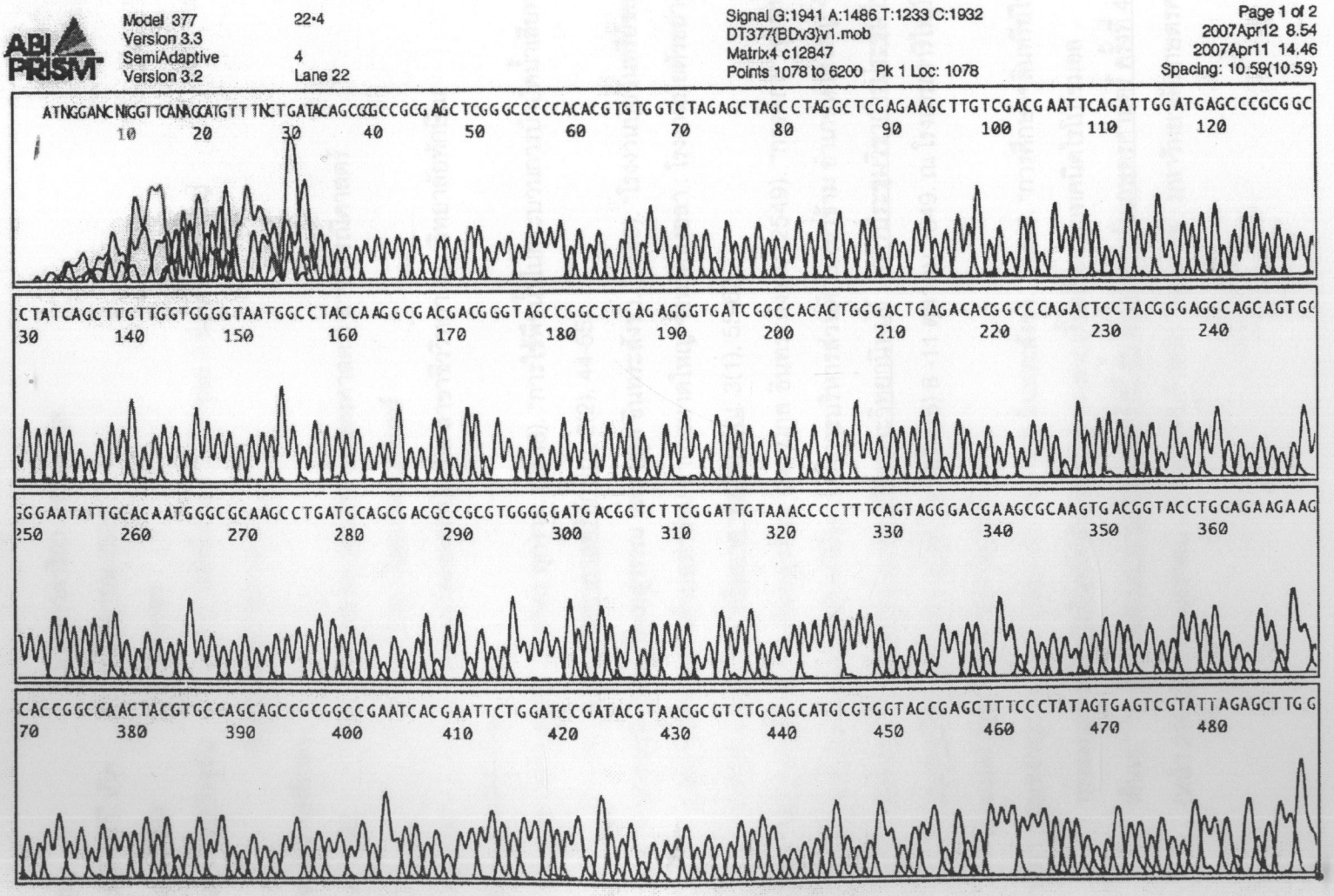
4) ภาพโครมาโตแกรมของ TKB14



5) ภาพโครมาโตแกรมของ TKA21



6) ภาพโครมาโตแกรมของ TKA22



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวดาริกา วสุนธรากุล

วัน เดือน ปี เกิด 3 กันยายน 2524

สถานที่เกิด กรุงเทพฯ

สถานที่อยู่ปัจจุบัน 48/3 ถ. นิพัทธ์สงเคราะห์ 2 ซอย 2 อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2546 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาธรณีศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พ.ศ. 2550 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ

ผลงานทางวิชาการ

ดาริกา วสุนธรากุล และ สุดสาคร พุกงาม. (2548). "การใช้พืชน้ำในกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ," วารสารวิทยาศาสตร์ทักษิณ. 2(2), 44-55.

ดาริกา วสุนธรากุล สมภพ อินทสุวรรณ และ นุกูล อินทระสังขา. (2549). "โรงงานปุ๋ยอินทรีย์ขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา : โรงงานปุ๋ยตัวอย่างระดับตำบล," วารสารวิทยาศาสตร์ทักษิณ. 3(1), 55-62.

ดาริกา วสุนธรากุล สมภพ อินทสุวรรณ และ นุกูล อินทระสังขา. (2549). "การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา," ใน บทคัดย่อโครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ : การประชุมวิชาการประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 10, (หน้า15) 8 -11 ตุลาคม 2549. ณ โรงแรมมาริไทม์ ปาร์ค แอนด์ สปา รีสอร์ท จังหวัดกระบี่.

ดาริกา วสุนธรากุล สมภพ อินทสุวรรณ และ นุกูล อินทระสังขา. (2550). "การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิคไรโบโซมอลเอ็นเอ," ใน เรื่องเต็มการประชุมวิชาการครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45, (หน้า 216-222) 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2550. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.