ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพ สำหรับกระบวนการทำปุ๋ยหมักระยะสั้น

ผู้เขียน นางสาวนงลักษณ์ สายเทพ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. ชัยวัฒน์ จาติเสถียร ประธานกรรมการ
ผศ.ดร. อุราภรณ์ สะอาดสุด กรรมการ
อาจารย์ ดร. วสุ ปฐมอารีย์ กรรมการ

บทคัดย่อ

การแยกและคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส จากตัวอย่างดิน ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยน้ำชีวภาพ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สำหรับกระบวนการหมักปุ๋ย พบจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีบนอาหาร carboxy methyl cellulose agar จำนวน 20 ไอโซเลท จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีบนอาหาร starch agar จำนวน 12 ไอโซเลท จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีบนอาหาร skimmed milk agar จำนวน 10ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีบนอาหาร tributyrin agar จำนวน 11 ไอโซเลท จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง ในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวด้วยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงมี 4 ไอโซเลทคือ LHE 10 (0. 1277 U mL^{-1}) LHE 3 (0. 1152 U mL^{-1}) LHE 12 (0. 0784 U mL^{-1}) และ LPA 15 (0. 0775 U mL^{-1}) เชื้อที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงได้แก่ไอโซเลท GB 12 (0. 2559 $\times$ 10^{-3} U mL^{-1}) เชื้อที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงได้แก่ไอโซเลท BS 1 (0. 2508 U mL^{-1}) ส่วนเชื้อที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงได้แก่ไอโซเลท LPC 2 (97. 765 U mL^{-1}) จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท เมื่อนำไปศึกษาสัณฐานวิทยาและการทดสอบชีวเคมีรวมทั้งการหาลำดับเบสของยีนพบว่าไอโซเลท LHE 3, GB 12, BS 1 และ LPC 2 ทั้งหมดเป็นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท LPA 15 เป็นแอคติโนมัยซีสในสกุล *Streptomyces regensis* ไอโซเลท LHE 12 เป็นเชื้อราในสกุล *Aspergillus flavus* ส่วน ไอโซเลท LHE 10 เป็นเชื้อราที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเหล่านี้ถูกใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักปุ๋ย โดยทดลองผสมเชื้อ 3 สูตร คือ สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 ให้มีปริมาณกล้าเชื้อ 10^5, 10^6 และ 10^7 CFU g^{-1} ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกล้าเชื้อที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยใช้ฟางข้าวที่ฆ่าเชื้อแล้วเพียงอย่างเดียวเป็นตัวแทนของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร การทดลองนี้ทำในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณจุลินทรีย์และค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ที่ลดลงของชุดทดลองที่ใช้ กล้าเชื้อสูตร 3 มีประสิทธิภาพสูงกว่าสูตรอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามได้คัดเลือกกล้าเชื้อสูตร 2 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อปุ๋ยหมักในการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบการลดลงของค่า C/N พบว่าสูตร 2 ให้ค่า C/N ที่ลดลงเร็วกว่ากล้าเชื้อจากท้องตลาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและได้ตั้งชื่อว่า CMU

การทดลองในห้องปฏิบัติการได้ผสมวัสดุทำปุ๋ยโดยใช้ ฟางข้าว: มูลวัว: ปุ๋ยยูเรีย ในอัตราส่วน 100: 10: 0.2 ผสมกับกล้าเชื้อสูตร 2 (CMU) เปรียบเทียบกับกล้าเชื้อจากท้องตลาด โดยมีชุดทดลองที่ไม่ใส่กล้าเชื้อเป็นตัวควบคุม ปรับความชื้นที่ประมาณร้อยละ 70 โดยการเติมน้ำกลั่น และควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าการเจริญของแบคทีเรีย รา แอคติโนมัยซีสและจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ทนร้อนทั้งหมดในชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ CMU และกล้าเชื้อจากท้องตลาด มีปริมาณสูงกว่าชุดทดลองที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดระยะเวลาการทดลอง ส่วนการเจริญของ ราและแอคติโนมัยซีสที่ทนร้อนทั้งหมดของชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อ CMU มีปริมาณที่สูงกว่าชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อจากท้องตลาดเล็กน้อยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนการเจริญของแบคทีเรียและจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสที่ทนร้อนใกล้เคียงกัน ระหว่างชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อทั้งสอง ชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อ CMU ให้ค่า C/N ตั้งแต่วันที่ 60 ของการทดลองเหมาะสมสำหรับใช้เป็นปุ๋ยได้เร็วกว่าการทดลองที่เติมกล้าเชื้อจากท้องตลาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ค่า pH เป็นกลางเร็วกว่าการทดลองชุดอื่นๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทดลองหมักปุ๋ยด้วยกล้าเชื้อ CMU ให้ความเป็นปุ๋ยได้เร็วกว่าการทดลองที่เติมกล้าเชื้อจากท้องตลาด

การทดลองในภาคสนาม ใช้ปริมาณของวัสดุหมัก (ขี้เลื่อย มูลวัว และปุ๋ยยูเรีย) ในแต่ละกองจำนวน 1 ตัน โดยการทดลองมี 3 กรรมวิธี ได้แก่กองปุ๋ยหมักที่เติมกล้าเชื้อ CMU และกล้าเชื้อจากท้องตลาด โดยมีกองที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อเป็นชุดควบคุม ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ปรับความชื้นเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณร้อยละ 70 ทำการพลิกกลับกองปุ๋ยเมื่อระยะเวลาหมักผ่านไปทุกๆ 7 วัน จากผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ใกล้เคียงกันระหว่างการหมักโดยเติมกล้าเชื้อ CMU และกล้าเชื้อจากท้องตลาด อัตราการเจริญของ แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยซีส และจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสทั้งพวกทนร้อนและพวกที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลางในกองปุ๋ยที่เติมกล้าเชื้อทั้งสองใกล้เคียงกัน แต่เจริญได้ดีกว่ากองปุ๋ยที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้ออย่างมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณความชื้นในกองปุ๋ยที่เติมกล้าเชื้อทั้งสองลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับกองที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ อุณหภูมิในกองปุ๋ยที่เติมกล้าเชื้อทั้งสองเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 60-65 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 2 วันของการหมัก และหลังจาก 60 วันของการทดลอง อุณหภูมิภายในกองปุ๋ยที่เติมกล้าเชื้อ CMU ลดลงเท่ากับอุณหภูมิภายนอกกองปุ๋ย ที่ 29 องศาเซลเซียส เร็วกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ pHในกองปุ๋ยที่เติมกล้าเชื้อ CMU ลดลงถึง pH 7 เร็วกว่ากองอื่น และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าการทดลองอื่น สำหรับพารามิเตอร์อื่นๆได้แก่ อินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม การนำไฟฟ้า และดัชนีการงอก ของกองปุ๋ยที่เติมกล้าเชื้อทั้ง CMU และกล้าเชื้อจากท้องตลาดให้ค่าที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยของกรมพัฒนาที่ดิน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า กองปุ๋ยที่เติมกล้าเชื้อ CMU ใช้ระยะเวลาในการหมักปุ๋ยสั้นกว่ากรรมวิธีอื่น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาหมักที่ 80 วัน คุณภาพของปุ๋ยจากทุกกรรมวิธีสามารถนำไปใช้ทางการเกษตรได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Selection of Bio-Degrading Microorganisms for Short-Term Composting Process
Author	Miss Nonglak Saithep
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)
Thesis Advisory Committee	Asst.Prof. Dr. Chaiwat Jatisatienr Chairperson Asst.Prof. Dr. Uraporn Sardsud Member Dr. Wasu Pathom-aree Member

ABSTRACT

The isolation and screening of microorganisms producing cellulase, amylase, protease and lipase activities from soil, commercial compost and liquid bio-fertilizer at 50° C for composting process were carried out. Microorganisms with high cellulase activity on carboxy methyl cellulose agar, amylase activity on starch agar, protease activity on skimmed milk agar and lipase activity on tributyrin agar were 20, 12, 10 and 11 isolates, respectively. Quantitatively enzymatic assays of selected isolates showed that LHE 10, LHE 3, LHE 12 and LPA 15 gave the highest cellulase activities of 0.1277, 0.0775, 0.1152 and 0.0784 U mL^{-1}, respectively. Isolate GB 12 had the highest amylase activity of 0.2559×10^{-3} U mL^{-1}. Isolate BS 1 had the highest protease activity of 0.2508 U mL^{-1} whereas isolate LPC 2 had the highest lipase activity of 97.765 U mL^{-1}. These isolates were subjected to morphological, biochemical characterizations in combination with gene sequence analysis. Isolates, LHE 3, GB 12, BS 1 and LPC 2, were identified as *Bacillus subtilis*. An actinomycete isolate LPA 15 was *Streptomyces regensis*. One mold isolate, LHE 12, could be identified as *Aspergillus flavus*. However, isolate LHE 10 was an unknown mold species.

All of these effective microorganisms were used as effective bio-degrading microorganisms. The compost inocula were set up using three different concentrations

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

of each effective microorganisms. They were 10^5 CFUg^{-1} for Formula 1, 10^6 CFUg^{-1} for Formula 2 and 10^7 CFUg^{-1} for Formula 3. Rice straw was used as model of plant material to compare the degradation efficiency of the three formulas using market brand as control. The temperature was controlled at 45°C in laboratory experiment. It was found that the microbial populations and C/N ratio of Formula 3 inoculum was higher than those of other treatments during the whole decomposing period. However, Formula 2 inoculum was chosen for use as compost inoculum in composting in laboratory and field experiment because its C/N ratio was statistically significant decreased faster than Market brand inoculum. This formula was named as CMU.

For the laboratory experiment, composting materials (rice straw:cow's manual:urea fertilizer in ratio 100:10:0.2) were mixed with each of compost inoculum, Market brand and CMU inoculum. Composting material with out compost activator was used as control. During composting process, the moisture content of 70% was maintained by adding sterile water and the temperature was controlled at 45°C. It was found that the counts of total thermophilic bacteria, fungi, actinomycetes and cellulose-degrading microorganisms in treatments with addition of inocula (Market brand and CMU) were significantly increased in numbers than control over the whole decomposing process. The growth of total thermophilic fungi and actinomycetes in decomposing with CMU inoculum was higher than that with Market brand inoculum but not significantly different. In addition, the growth of thermophilic bacteria and cellulose-degrading microorganisms were similar for both Market brand and CMU inocula. The maturity of C/N ratio from 60 days from CMU inoculum was significantly faster than with Market brand inoculum. Likewise pH change from alkaline to neutral level in decomposing treatment with CMU inoculum took precedence over the others. It implied that decomposition with CMU inoculum succeeded in maturity prior to the other treatments.

In field study, the quantity of raw material (sawdust, cow's manure and urea fertilizer) for each pile was 1 ton which was mixed with compost inoculum either CMU or Market brand. Composting material with out compost activator was used as control. A triplicate series of windrows were set up. The moisture content was adjusted to 70% before piling. Aeration was provided by turning the piles every 7 days. Similar trends of physical, chemical, and microbiological factors during composting

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

were observed between CMU and Market brand inocula. The growth rates of thermophilic and mesophilic bacteria, fungi, actinomycetes and cellulose-degrading microorganisms in the both compost piles with inocula were similar trend. These were significantly different from control piles over the composting period. The moisture content was gradually dropped faster than those of control piles during composting time. The temperatures throughout the piles with Market brand and CMU inocula rose very rapidly from ambient to 60-65°C within 2 days. The initially rapid rise in temperature of compost piles with Market brand and CMU inocula was relatively short-lived and after 60 days of composting, temperatures of compost piles with CMU inoculum was fallen to ambient temperature (29°C) significantly faster than those with Market brand inoculum. The pH in compost pile with CMU inoculum was rapidly entered level of 7 compared to other piles. Among the composting treatment, the cellulase activity was found to be higher in compost piles with CMU inoculum. At the end (80 days) of composting process, total organic carbon, total nitrogen, total phosphorus, total potassium, total calcium, total magnesium, electrical conductivity (EC) values and germination index of compost treatments with Market brand, CMU inoculum and control were conformed to compost standard of Land Development Department, Thailand. They could be used as fertilizer.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved