ลักษณะของน้ำหมักลูกยอป่า (*Morinda coreia* Ham) และผลต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Characteristics of Fermented Wild Forest Noni (*Morinda coreia* Ham) Juice and Its Effects on the Growth of Cherry Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill)

กาญจนา ขาวผ่อง

Kanchana Khowpong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology Prince of Songkla University 2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ลักษณะของน้ำหมักลูกยอป่า (*Morinda coreia* Ham) และผลต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี (*Lycopersicon esculentum* Mill)

ผู้เขียน นางสาวกาญจนา ขาวผ่อง

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……..

(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

……

(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)

คณะกรรมการสอบ

……..ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)

…….....กรรมการ
(นางนลินี จาริกภากร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

……..
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ลักษณะของน้ำหมักลูกยอป่า (*Morinda coreia* Ham) และผลต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี (*Lycopersicon esculentum* Mill)

ผู้เขียน นางสาวกาญจนา ขาวผ่อง

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2550

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจำนวนและประเภทจุลินทรีย์,คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพและปริมาณธาตุอาหารของพืชในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า (*Morinda coreia* Ham) เพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี ผลทดลองพบว่าในระหว่างกระบวนการหมัก จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียแลคติกและธาตุอาหารพืช (ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แมงกานีส และโบรอน) มีปริมาณสูงสุดเมื่ออายุการหมักได้ 14 วัน แต่ยีสต์มีปริมาณสูงสุดเมื่ออายุการหมักได้ 21 วัน หลังจากนั้นเมื่อสิ้นสุดการหมัก (56 วัน) พบว่าน้ำหมักมี pH 3.66 กรดอะซิติก 3.34 กรัมต่อลิตร เอทานอล 16.98 กรัมต่อลิตร และค่าการนำไฟฟ้า 14.5 มิลลิไซเมนต่อเซ็นติเมตร

ผลการเทียบเคียงโดยใช้วิธีการแบบดั้งเดิมพบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ในระหว่างกระบวนการหมักจากเมื่อเริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดลองคือ *Lactobacillus plantarum* จำนวน 99 ไอโซเลท (97%) และ *Lactobacillus pentosus* จำนวน 3 ไอโซเลท (3%) และยืนยันผลด้วยการทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ API 50CH system ซึ่งกรณีนี้ใช้ตัวแทน 14 ไอโซเลท และสำหรับยีสต์แยกได้ 84 ไอโซเลท เมื่อใช้วิธีการดั้งเดิมสามารถจัดได้เป็น 4 สกุล และเมื่อนำตัวแทนแต่ละสกุลไปเทียบเคียงสายพันธุ์ด้วยวิธี 26S rRNA gene sequence พบว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae* (32 ไอโซเลท: 38%) *Pichia anomala* (26 ไอโซเลท: 31%) *Pichia membranifaciens* (24 ไอโซเลท: 28.6%) และ *Rhodotorula mucilaginosa* (2 ไอโซเลท: 2.4 %)

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อพืชกับเมล็ดมะเขือเทศราชินี พบว่าการเจือจางน้ำหมักลูกยอป่า 64 เท่า สามารถผ่านเกณฑ์กำหนดปุ๋ยที่ปราศจากความเป็นพิษต่อพืชและเมื่อเจือจางน้ำหมัก 256 เท่า มีดัชนีการงอกสูงสุดถึง 157% สำหรับปริมาณธาตุอาหารพืชที่ยังไม่ได้เจือจางมี ไนโตรเจน 633 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัส 1210 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแทสเซียม 4356 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียม 693 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม 536 มิลลิกรัมต่อลิตร โบรอน 50.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสี 1.69 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีส 6.09 มิลลิกรัมต่อลิตร

อัตราส่วนระหว่างอินทรีย์คาร์บอนกับไนโตรเจน (C/N ratio) เท่ากับ 18 และในน้ำ

หมักมีฮอร์โมนจิบเบอเรลลินบางชนิด จากผลการทดลองแสดงว่าน้ำหมักลูกยอป่ามีศักยภาพในการใช้เป็นปุ๋ยน้ำได้

เพื่อทดสอบผลการใช้น้ำหมักลูกยอป่าอายุการหมัก 56 วัน ต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศราชินีทางด้านความสูงของลำต้น ความกว้างของทรงพุ่ม และเส้นรอบวงของลำต้น เป็นเวลา 90 วัน โดยทดลองในถุงพลาสติก 1 ต้นกล้าต่อ 1 ถุง (ดิน 10 กิโลกรัม) จาก 4 ชุดการทดลอง คือ ไม่ใส่ปุ๋ยเป็นชุดควบคุม (N) ปุ๋ยเคมีสูตร 15 – 15 - 15 (อัตราครั้งละ 8.25 กรัม/ถุง: C) น้ำหมัก (5 มิลลิลิตร/น้ำ 1 ลิตร ครั้งละ 100 มิลลิลิตร/ถุง: F) ปุ๋ยเคมีสูตร 15 -15 - 15 + น้ำหมัก (อัตราครั้งละ 4.125 กรัม + 2.5 มิลลิลิตร/น้ำ 1 ลิตร ครั้งละ 100 มิลลิลิตร/ถุง: CF) โดยใส่ปุ๋ยเคมีเมื่อเริ่มต้นปลูก และ วันที่ 15 30 และวันที่ 45 หลังย้ายปลูก และใส่น้ำหมักเมื่อเริ่มต้นปลูก และทุก 7 วัน พบว่าเมื่อมะเขือเทศมีอายุได้ 30 60 และ 90 วัน หลังจากย้ายลงปลูก ชุด F มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยพบว่าดินของชุด F และ CF มีความเป็นกรดน้อยกว่า (pH: 6.1 - 6.4) ชุด N (5.7 - 6.0) และชุด C (5.5 - 5.9) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.05$) และพบยีสต์ในชุดที่ได้รับน้ำหมักเท่านั้นคือดินชุดการทดลอง F และ CF โดยจำนวนที่พบที่ช่วงเวลาต่างๆ อยู่ในช่วง 3.3 - 3.4 log CFU/g

Thesis Title Characteristics of fermented wild forest noni (*Morinda coreia* Ham) juice and its effects on the growth of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Author Miss Kanchana Khowpong

Major Program Microbiology

Academic Year 2007

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate microbial populations, physicochemical properties and levels of plant nutrients in wild forest noni (*Morinda coreia* Ham) extracts during fermentation for promoting tomato growth. It was found that the highest amounts of total bacterial count, lactic acid bacteria and plant nutrients (P, Mg, Mn, and B) were found on date the fourteenth of fermentation. In contrast, the highest population of yeast was observed over 21 days. After 56 days, values of pH, acetic acid, ethanol and electrical conductivity in this finished product were 3.66, 3.34 g/L, 16.98 g/L and 14.47 mS/cm, respectively.

Lactic acid bacteria were isolated at varying days of fermentation. Based on the conventional method, 99 isolates (97%) were identified as *Lactobacillus plantarum* and the rest (3%) was *Lactobacillus pentosus*. This was confirmed by using API 50 CH system with 14 representative isolates. Whilst 84 yeast strains were isolated and identified into 4 genera by the conventional method. A representative yeast isolate from each genus was then selected for identification using 26S rRNA gene sequence and results were *Saccharomyces cerevisiae* (32 isolates: 38%), *Pichia anomala* (26 isolates: 31%), *Pichia membranifaciens* (24 isolates: 28.6%) and *Rhodotorula mucilaginosa* (2 isolates: 2.3 %).

Fermented wild forest noni extract required only 64-fold dilution to meet the minimum criterion of a phytotoxin-free fertilizer and 256 diluted extract gave the best germination index (157%) of cherry tomato seed. The undiluted extract comprised of following plant nutrients (in mg/L); N 633, P 1210, K 4356, Ca 693, Mg 536, B 50.6, Mn 6.09 and Zn 1.69. Besides, C/N ratio of the extract was 18 and some gibberellins

were also found. Therefore, the extract had the potential to use as a liquid fertilizer.

Effects of 56 days of the extract on the growth of cherry tomato based on stem height, bush width and stem circle were investigated by growing one tomato seedling in a plastic pot containing 10 kg soil for 90 days. There were 4 treatments as follows: control (no fertilizer: N), chemical fertilizer (8.25 g/pot: C), the extract (5 ml/L, 100 ml/pot: F) and chemical fertilizer + the extract (4.125 g/pot + 2.5 ml/L, 100 ml/pot: CF). The chemical fertilizer was added into the plants at days 0, 15, 30, and 45 while every 7 days for the extract. The results show that after seedlings were transferred for planting 30, 60 and 90 days, a F set had the best growth because of the less acidity soil detected in the F and CF sets (pH: 6.1 - 6.4). In contrast, soil pH in the sets of N and C was between 5.7-6.0 and 5.5 - 5.9, respectively. In addition, yeast was found only in sets of soil that treated with the extract (F and CF) and the yeast count was in a range of 3.3 - 3.4 log CFU/g.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบเท้าคุณพ่อและคุณแม่ที่เป็นผู้ให้ชีวิตจึงได้มีโอกาสศึกษาและเป็นครูคนแรก ทั้งยังคอยให้กำลังใจเพื่อให้สามารถผ่านอุปสรรคต่างๆ ไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ รองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉรา เพ็งหนู ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ ซึ่งเป็นประธานในการสอบและกรุณาให้คำแนะนำตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นางนลินี จาริกภากร กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณพี่และน้องที่คอยให้กำลังใจ ตลอดจนเพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่ห้อง NML 401 ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจและคอยให้คำปรึกษาตลอดมา

การวิจัยในครั้งนี้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ปีงบประมาณ 2549

กาญจนา ขาวผ่อง

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	28
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ อุปกรณ์	29
วิธีการทดลอง	32
3. ผลการทดลอง	46
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	83
5. สรุปผลการทดลอง	95
เอกสารอ้างอิง	97
ภาคผนวก ก	104
ภาคผนวก ข	112
ภาคผนวก ค	117
ประวัติผู้เขียน	139

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพและธาตุอาหารหลักของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตโดยเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ 7

2 ปริมาณธาตุอาหารรองและจุลธาตุของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตโดยเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ 8

3 ยีสต์ที่พบมีการปนเปื้อนซึ่งทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารและเครื่องดื่ม 10

4 ลักษณะความแตกต่างระหว่างจีนัส *Zymomonas* และจีนัสอื่นๆ ในกลุ่ม Gram negative aerobic rod 15

5 ระดับความเป็นกรดด่างของดิน 24

6 ระดับความเค็มของดินและอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืช 25

7 การทดสอบทางชีวเคมีของตัวแทนแบคทีเรียแลคติกจำนวน 14 สายพันธุ์เทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน 48

8 เปอร์เซ็นต์การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH test และ Program computer API Web Stand Alone V.1.1.0 49

9 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ กันของการหมัก 52

10 ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ กันของการหมัก 52

11 ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ กันของการหมัก 53

12 ความสามารถในการเจริญเติบโตและใช้สารชนิดต่างๆของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ กันของการหมัก 54

13 การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ที่แยกได้ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ในการหมักลูกยอป่า 55

14 อุณหภูมิในระหว่างกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง 57

15 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพบางประการของกากน้ำตาลและน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า 62

16 ปริมาณอินทรียวัตถุ อินทรีย์คาร์บอนและ C/N ratio ในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร 63

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

17 ปริมาณกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า อายุการหมัก 56 วัน 66
18 ผลการวิเคราะห์เนื้อดินที่ใช้ปลูกมะเขือเทศราชินี 68
19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารหลักในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี ในวันที่ 0 และวันที่ 90 หลังย้ายปลูกของแต่ละชุดการทดสอบ 72
20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีในวันที่ 0 และวันที่ 90 หลังย้ายปลูกของแต่ละชุดการทดสอบ 73
21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุแมงกานีส สังกะสีและโบรอนในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีในวันที่ 0 และวันที่ 90 หลังย้ายปลูกของแต่ละชุดการทดสอบ 74
22 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพและธาตุอาหารหลักที่ได้จากน้ำหมักลูกยอป่ากับน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ 87
23 เปรียบเทียบธาตุอาหารรองและจุลธาตุที่ได้จากน้ำหมักลูกยอป่ากับน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ 88

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะลำต้นของลูกยอป่าจากจังหวัดนครศรีธรรมราช	5
2	ลักษณะใบ ผล และช่อดอกของลูกยอป่าจากจังหวัดนครศรีธรรมราช	5
3	โครงสร้างของจิบเบอเรลลินที่สำคัญบางชนิด	16
4	โครงสร้างของออกซินสังเคราะห์ชนิดต่างๆ	18
5	ถังหมักขนาด 28 ลิตร ที่ใช้หมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า	32
6	ลักษณะของแปลงเพาะปลูกจำลอง ตั้งอยู่ที่ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	43
7	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์และแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการหมักลูกยอป่าตามช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก ในถังหมักขนาด 28 ลิตร	47
8	การเปลี่ยนแปลงค่า pH และค่าการนำไฟฟ้า (EC) ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร	56
9	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดและการเกิดกรดทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ	57
10	ปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด และโพแทสเซียม ในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆในถังหมักขนาด 28 ลิตร	58
11	ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียมในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร	59
12	ปริมาณธาตุสังกะสีและแมงกานีสในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร	60
13	ปริมาณโบรอนในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง	61
14	ฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน (gibberellins) จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า	64
15	ฮอร์โมนพืชออกซิน (auxin) จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า	65
16	ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อพืชของน้ำหมักลูกยอป่าที่อายุการหมัก 56 วัน ด้วยการทดสอบการงอกของเมล็ดมะเขือเทศราชินี	67
17	การเปลี่ยนแปลง pH ของดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่างๆกันของแต่ละชุดการทดสอบ	69
18	การเปลี่ยนแปลงค่าการนำไฟฟ้าของดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่างๆกันของแต่ละชุดการทดสอบ	70

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
19	ปริมาณอินทรียวัตถุในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี	75
20	การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี ที่ระยะเวลาต่าง ๆกันของแต่ละชุดการทดสอบ	76
21	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อราในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลา ต่าง ๆกันของแต่ละชุดการทดสอบ	77
22	การเปลี่ยนแปลงจำนวนยีสต์ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลา ต่าง ๆกันของแต่ละชุดการทดสอบ	78
23	ความสูงของต้นมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแต่ละชุดการทดสอบ	79
24	ความกว้างของทรงพุ่มต้นมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแต่ละชุดการทดสอบ	80
25	เส้นรอบวงของลำต้นมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแต่ละชุดการทดสอบ	81

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

B	=	Boron
ºC	=	Degree celcius
Ca	=	Calcium
CFU	=	Colony forming unit
C/N ratio	=	Total carbon / Total nitrogen ratio
dS	=	Decisiemens
EC	=	Electrical conductivity
GA_3	=	Gibberellic acid
g	=	Gram
IAA	=	Indole acetic acid
K	=	Potassium
L	=	Liter
Mg	=	Magnesium
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
Mn	=	Manganese
mS	=	Milisiemens
N	=	Nitrogen
P	=	Phosphorus
µm	=	Micrometer
µl	=	Microliter
Zn	=	Zinc

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยสี่ที่สำคัญต่อการดำรงชีพของมนุษย์ การเพิ่มจำนวนประชากรของโลกอย่างรวดเร็วมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบการทำการเกษตรกรรมเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาเกษตรกรรมแบบใหม่หรือเกษตรกรรมเคมี ด้วยการใส่ปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มธาตุอาหารให้กับดินในการที่จะเร่งอัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชซึ่งต้องผลิตเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีควบคุมและกำจัดวัชพืช ป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช และจากการเกษตรที่ผ่านมาเกษตรกรใช้ปุ๋ยเคมีและเคมีภัณฑ์เพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มผลผลิตและกำจัดศัตรูพืช โดยแช่เมล็ดพันธุ์ก่อนปลูก การใส่ลงในดินโดยตรง รวมทั้งการฉีดพ่นต้นพืชระหว่างการเพาะปลูกหรือก่อนการเก็บเกี่ยว ซึ่งการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างผิดวิธี เช่น ใช้ปุ๋ยเคมีเป็นแหล่งธาตุอาหารหลักโดยขาดธาตุอาหารรองและจุลธาตุอาหาร หรือใช้ในอัตราที่ไม่เหมาะสม รวมทั้งเคมีภัณฑ์ที่เกษตรกรใช้ นอกจากเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้สัมผัสสารเคมีโดยตรงแล้วยังทำให้มีสารเคมีเหล่านี้ตกค้างในพืชและดิน รวมถึงปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอื่นๆอีกด้วย ทั้งยังเป็นผลทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลงอย่างรวดเร็ว และในที่สุดทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของดินเสียไป เช่น ดินแน่นขึ้น การอุ้มน้ำลดลงทั้งปัญหาปริมาณสารเคมีตกค้างในพืชผักและเป็นพิษต่อมนุษย์ (นิพนธ์, 2544)

กระแสการรับรู้ถึงสารเคมีที่ตกค้างจากพืชผักในเมืองไทยขยายวงกว้างขึ้นคู่ขนานไปกับกลไกตลาดโลกที่นิยมบริโภคพืชผักปลอดสารพิษ ซึ่งกระแสนิยมพืชผักปลอดสารพิษพบว่าทั่วโลกกำลังขยายตัวอย่างรวดเร็วด้วยอัตราการเติบโตเฉลี่ยปีละ 15-20% มีมูลค่าตลาดกว่า 20,000 ล้านเหรียญสหรัฐ ตลาดในเอเชียที่สำคัญคือญี่ปุ่นและไต้หวัน (มูลนิธิสายใยแผ่นดิน, 2546) จากเหตุปัจจัยดังกล่าวนี้มีเกษตรกรกลุ่มหนึ่งหันมาทำการเกษตรอินทรีย์ ซึ่งความหมายของเกษตรอินทรีย์ ที่กำหนดโดยกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกาในปี คศ. 1981 หมายถึงระบบการผลิตทางการเกษตรที่หลีกเลี่ยงการใช้ปุ๋ยเคมีสังเคราะห์ สารเคมีกำจัดศัตรูพืช และฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและสัตว์ การเกษตรกรรมอินทรีย์ใช้หลักการควบคุมศัตรูพืชด้วยวิธีชีวภาพ อาศัยการปลูกพืชหมุนเวียน เศษซากพืช มูลสัตว์ พืชตระกูลถั่ว ปุ๋ยพืชสด การนำเศษซากพืชเหลือใช้ต่างๆนำมาผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ โดยที่ปุ๋ยอินทรีย์ได้จากการหมักซากพืชที่เหลือจากการเกษตรซึ่งเหลือตกค้างในพื้นที่เพาะปลูกกว่า 150 ล้านตันต่อปี (มูลนิธิสายใยแผ่นดิน, 2546) หากนำซากพืชเหล่านี้มาผลิตเป็นปุ๋ย

อินทรีย์ที่เกษตรกรสามารถนำกลับไปใช้ในพื้นที่ของเกษตรกร นอกจากจะช่วยประหยัดต้นทุนจากการซื้อปุ๋ยเคมีแล้ว ยังปลอดภัยทั้งเกษตรกรเองและผู้บริโภคอีกด้วย ซึ่งกระบวนการทำปุ๋ยอินทรีย์ ดังกล่าวอาศัยบทบาทของจุลินทรีย์ในการหมักและย่อยสลายซากพืชให้อยู่ในรูปสารอาหารที่ละลายน้ำและฮอร์โมน ซึ่งพืชสามารถดูดซึมเอาไปใช้ประโยชน์ได้ และการทำปุ๋ยอินทรีย์ในรูปของเหลวหรือที่เรียกว่าน้ำหมักชีวภาพ หรือปุ๋ยน้ำชีวภาพ หรือ น้ำสกัดชีวภาพซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกษตรกรสามารถทำใช้ได้เองในระดับเล็ก กลางและใหญ่กำลังเป็นที่นิยมมากขึ้นในปัจจุบันโดยเชื่อว่าของเหลวหรือน้ำหมักที่ได้มีจุลินทรีย์ธรรมชาติหลายชนิดรวมทั้งมีธาตุอาหารพืช ฮอร์โมนพืช ตลอดจนสารประกอบที่สกัดได้จากเซลล์พืช ได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรท เอนไซม์ และอื่นๆ อีกทั้งเกษตรกรสามารถใช้พืชสมุนไพรเพื่อการควบคุมศัตรูพืชได้ด้วย ซึ่งถ้านำน้ำหมักชีวภาพมาผลิตผักปลอดสารพิษ เช่น มะเขือเทศรับประทานสด หรือมะเขือเทศราชินี นอกจากจะปลอดภัยต่อผู้บริโภคแล้วยังจำหน่ายได้ในราคาสูงกว่ามะเขือเทศราชินีที่ปลูกโดยใช้สารเคมี

ปกติการปลูกมะเขือเทศราชินีสามารถปลูกได้ง่ายในฤดูหนาว แต่การบริโภคมะเขือเทศราชินีไม่ได้ถูกจำกัดเพียงฤดูเดียว ดังนั้นจึงมีความพยายามปลูกมะเขือเทศนอกฤดูในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน ซึ่งปัญหาที่สำคัญคือ อุณหภูมิสูงเกินไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเดือนมีนาคม เมษายน และ พฤษภาคม ทำให้ดอกมะเขือเทศร่วงไปไม่ติดผล แต่เนื่องจากราคาผลผลิตในช่วงปลายฤดูร้อนค่อนข้างสูง จึงมีเกษตรกรยอมเสี่ยงปลูก การแก้ปัญหาการไม่ติดผลของมะเขือเทศราชินีที่ปลูกในฤดูร้อนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ปลูกมะเขือเทศบนภูเขาสูงซึ่งปกติบนภูเขาสูงจะมีอุณหภูมิต่ำกว่าพื้นที่ราบ จึงมีการปลูกมะเขือเทศนอกฤดูกันมาก เช่น ที่จังหวัดเชียงราย เพชรบูรณ์ เป็นต้น แต่บนภูเขาสูงมักมีปัญหาแหล่งน้ำจำกัด อาจใช้ปลูกมะเขือเทศราชินีได้ไม่ตลอดฤดูปลูก หรือการใช้พันธุ์ทนร้อนร่วมกับการจัดการที่ดี พันธุ์มะเขือเทศราชินีทั่วไปจะไม่สามารถติดผลได้ถ้าอุณหภูมิกลางคืนสูงกว่า 22°C แต่พันธุ์ทนร้อนสามารถติดผลได้แม้ว่าอุณหภูมิกลางคืนสูงกว่า 23°C อย่างไรก็ดีถ้าอุณหภูมิกลางวันสูงเกินกว่า 32°C ก็ทำให้มะเขือเทศพันธุ์ทนร้อนติดผลได้ยาก (เกียรติเกษตร, 2541)

การปลูกมะเขือเทศในฤดูร้อน นอกจากจะใช้พันธุ์ทนร้อนแล้วจะต้องเอาใจใส่ดูแลรักษาอย่างดี โดยเฉพาะการให้น้ำ ทั้งนี้เพราะเมื่ออากาศร้อนและแห้ง ต้นมะเขือเทศต้องการน้ำมากกว่าในฤดูปลูกปกติถึง 2 เท่า นอกจาก 2 วิธีข้างต้นแล้วยังมีอีกวิธีที่สามารถแก้ปัญหาการไม่ติดผลของมะเขือเทศคือการฉีดพ่นสารฮอร์โมนช่วยเร่งการติดผลและอาหารเสริม การใช้ฮอร์โมน 4CPA (chlorophenoxy acetic acid) ความเข้มข้น 25-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยให้เปอร์เซ็นต์การติดผลของมะเขือเทศเพิ่มขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารฮอร์โมนดังกล่าวในการผลิตมะเขือเทศราชินีนอกฤดู การใช้นำหมักชีวภาพน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกร ซึ่งในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพต้องอาศัยบทบาทของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ นอกจากนี้จากการศึกษาของดวงพร และวิลาวัณย์ (2547) พบว่าน้ำ

หมักชีวภาพจากลูกยอป่ามีธาตุอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะธาตุโพแทสเซียมอยู่ในปริมาณสูง แต่ถึงแม้น้ำหมักชีวภาพจะเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ยังขาดข้อพิสูจน์และข้อมูลทางวิชาการในแง่ของบทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก รวมทั้งการได้มาซึ่งธาตุอาหารพืช ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ในการทำน้ำหมักชีวภาพจากลูกยอป่าและบทบาทของน้ำหมักชีวภาพต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศราชินี เพื่อตรวจ สอบถึงประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพและข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปสู่การปรับใช้น้ำหมักชีวภาพให้เกิดประโยชน์ยิ่งขึ้น

ตรวจเอกสาร

ยอ

ยอป่า มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Morinda coreia* Ham. อยู่ในวงศ์ Rubiaceae เช่นเดียวกับยอบ้าน เป็นต้นไม้ยืนต้นผลัดใบขนาดใหญ่ ลำต้นขดงอ เปลือกมีสีเทาแตกปริเป็นร่องลึก (รูปที่ 1) ใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงกันข้าม รูปรี ขนาดใบกว้าง 4-7 เซนติเมตร ยาว 10-14 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่อ โดยช่อดอกเกิดบริเวณซอกใบหรือปลายยอด ดอกย่อยมีสีขาว กลีบดอกหลอมเป็นหลอด ปลายแยกออกเป็น 5 กลีบ มีเกสรตัวผู้ 5 อันติดอยู่ที่กลีบดอก ผิวรังไข่ประสานติดกันเป็นก้อน แต่ละรังไข่มี 5 ช่อง ผลเป็นผลรวม ผิวนอกผลเป็นปุ่มปม (รูปที่ 2) มีนิเวศวิทยาและการแพร่กระจาย คือ เป็นพืชที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ พบขึ้นอยู่หลายประเทศทั่วโลก เช่น ไทย จีน อินเดีย หมู่เกาะแปซิฟิคทางตอนใต้ ฮาวาย มาเลเซีย ฯลฯ ในประเทศไทยพบขึ้นตามป่าเบญจพรรณแห้งแล้งและชื้นทั่วไปทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ในปัจจุบันมีการนำส่วนต่างๆ มาใช้ประโยชน์ เช่น แก่นและรากยอให้สีแดงใช้เป็นสีย้อมผ้าไหม ใบนำมาปรุงอาหาร ตลอดจนผลนำมาหมักเป็นน้ำหมักชีวภาพ จากการศึกษาน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากลูกยอป่าพบว่ามีค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity: EC) สูงซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกได้ถึงการละลายของเกลือแร่ หรือธาตุในสารละลายและยังพบธาตุโพแทสเซียมอยู่ในปริมาณ 800-900 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดวงพร และวิลาวัณย์, 2547) นอกจากนี้น้ำหมักลูกยอป่าที่มีอายุการหมัก 6 เดือน พบว่ามีผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ไม่ต่างจากยาปฏิชีวนะ รวมถึงแบคทีเรียแกรมลบอย่าง *Vibrio parahaemolyticus* และ *Salmonella* spp. ที่น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าให้ผลการยับยั้งพอๆ กับยาปฏิชีวนะ (ดวงพร และคณะ, 2548)

ยอบ้าน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Morinda citrifolia* Linn. เป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae เช่นเดียวกับยอป่า เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูง 1-6 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้าม รูปรี โคนและปลายของใบจะแหลม ขอบใบเป็นคลื่น ออกดอกเป็นช่อกลมเดี่ยวๆ ตามง่ามใบ ก้านช่อดอกยาว 3-4 เซนติเมตร ไม่มีก้านดอกย่อย กลีบดอกสีขาว ผลเป็นชนิดผลรวม มีขนาดเล็ก ภายในมี 1 เมล็ด เชื่อมติดกันเป็นผลขนาดใหญ่ ขนาดของผลกว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 3-10 เซนติเมตร ผิวเป็นตุ่มพอง ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่จะมีสีขาวอมเขียว เมื่อสุกมีสีเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีขาวในที่สุด ยอบ้านมีสรรพคุณด้านสมุนไพร คือ ผลแก่ ซึ่งมีรสเผ็ดร้อน ช่วยขับลมบำรุงธาตุ เจริญอาหาร อมแก้เหงือกเปื่อย ระดูเสีย ฟอกเลือด ขับน้ำคาวปลา แก้เสียงแหบแห้ง แก้ร้อนในอก แก้อาเจียน สารที่ออกฤทธิ์ คือ asperuloside โดยนำผลมาหมักหรือต้มรับประทาน บางครั้งใช้จิ้มกับน้ำผึ้งรับประทาน ส่วนรากของยอบ้าน (อายุ 3-4 ปี) แก้กระษัย เป็นยาระบาย นอกจากนี้ยอบ้านยังมีธาตุอาหารต่างๆ เช่น ใบยอ 100 กรัม มีเส้นใย

4 กรัม แคลเซียม 469 มิลลิกรัม เหล็ก 1.4 มิลลิกรัม วิตามินเอ 43333 IU วิตามินบีหนึ่ง 0.30 มิลลิกรัม วิตามินบีสอง 0.14 มิลลิกรัม ไนอาซีน 7.2 มิลลิกรัม วิตามินซี 3 มิลลิกรัม (มาโนช, 2540)

รูปที่ 1 ลักษณะลำต้นของลูกยอป่าจากจังหวัดนครศรีธรรมราช

รูปที่ 2 ลักษณะใบ ช่อดอก ผลอ่อน (ภาพซ้าย) และผลแก่ของลูกยอป่า (ภาพขวา) จากจังหวัดนครศรีธรรมราช

น้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักชีวภาพ หรือน้ำสกัดชีวภาพ หรือปุ๋ยอินทรีย์น้ำ คือ น้ำหมักที่ได้จากการหมักพวกพืช ผัก ผลไม้ วัชพืช สัตว์และเศษอาหาร ในสภาพที่ไม่มีอากาศ โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก ได้แก่ แบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count: TBC) แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria : LAB) รวมถึงเชื้อราและยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบตามธรรมชาติ โดยอาศัยกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อพืชและสัตว์ โดยอาศัยความเข้มข้นของน้ำตาลที่อยู่โดยรอบและเกิดกระบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เกิดเป็นอนุภาคที่เล็กลงและถูกปลดปล่อยออกมาในรูปของกรดอะมิโน กรดอินทรีย์ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง จุลธาตุ ฮอร์โมน ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ สำหรับกรดอินทรีย์ที่พบมากได้แก่ กรดแลกติกและกรดอะซิติก ซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์สร้างกรดแลกติกมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อรา (Blom และ Mortvedt, 1991) และแบคทีเรียที่เป็นโทษ (ดวงพร และคณะ, 2548) และจากการศึกษาของ วนิดา (2547) พบว่าจากน้ำผลไม้และน้ำผักชนิดต่างๆ มีแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สร้างกรด สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพไร้ออกซิเจนและมีออกซิเจน ซึ่งเป็นเชื้อ *Zymomonas* sp. และปัญหาในกระบวนการหมักเมื่อเกิดสภาวะที่เป็นกรด (pH ต่ำ) และขาดการควบคุมที่ดีส่งเสริมให้เชื้อราและยีสต์เจริญเติบโต โดยเชื้อราใช้กรดเพื่อการเจริญและเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ จึงมักเจริญอยู่ที่ผิวหน้าของถังหมัก ส่วนยีสต์สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไร้อากาศจึงสามารถพบได้เสมอในการหมัก

น้ำหมักชีวภาพ เป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่เกิดจากเกษตรกรนำเศษพืช สัตว์ ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ในท้องถิ่นไปหมักกับกากน้ำตาล และนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายท้องถิ่น ซึ่งแต่ละท้องถิ่นจะมีการผลิตและการนำน้ำหมักไปใช้แตกต่างกัน ทั้งในเรื่องของวัตถุดิบที่ใช้ กรรมวิธีในการหมัก ระยะเวลาที่หมัก ตลอดจนวิธีการใช้กับพืชและการใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆ พอจะแยกชนิดและอัตราส่วนในการผลิตตามวัสดุหลักที่ใช้ผลิตน้ำหมักชีวภาพได้ 2 ประเภท ดังนี้ คือ

1. น้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากพืช ได้แก่ ผักต่างๆ ผลไม้ วัชพืช ตลอดจนพืชสมุนไพร ใช้อัตราส่วน ผัก ผลไม้ วัชพืช พืชสมุนไพร 3 ส่วน กากน้ำตาล 1 ส่วน โดยนำวัสดุมาย่อยหรือสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ หรือบดให้ละเอียด คลุกเคล้ากับกากน้ำตาลให้เข้ากันในภาชนะโดยใส่ให้เกือบเต็ม ปิดฝา เก็บในที่ร่ม อากาศถ่ายเทดี เกษตรกรจะเริ่มนำของเหลวที่ได้จากการหมักมาใช้กับพืชหลังจากหมักไว้ประมาณ 7-10 วัน โดยกรองเอาแต่ส่วนของเหลวนำมาผสมน้ำอัตราส่วน 1:200 ถึง 1:1,000 ฉีดพ่นต้นพืชหรือราดลงดินบริเวณรากพืช (สุนันทา, 2546)

จากการศึกษาของดวงพร และวิลาวัณย์ (2547) พบว่าถ้าหมักโดยมีที่ว่างประมาณ 1/5 ของภาชนะ แล้วปิดทับด้วยถุงพลาสติกที่สะอาดใส่น้ำแล้วเอาส่วนปากถุงออกปิดทับด้วยฝาถังซึ่งเป็นการหมักแบบจำกัดปริมาณอากาศเริ่มต้นให้เหลือน้อยจะส่งเสริมการเจริญ

ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อย่างแบคทีเรียแลคติกให้เจริญได้ดีขึ้นและสามารถป้องกันการเกิดฟิล์มยีสต์ที่ผิวหน้าน้ำหมักได้

2. น้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากสัตว์ ได้แก่ ปลาเล็กปลาน้อย หอยเชอรี่ เปลือกกุ้ง กระดองปู แมลง เศษชิ้นส่วนของสัตว์ ฯลฯ ใช้อัตราส่วนของสัตว์ 3 ส่วน กากน้ำตาล 3 ส่วน โดยนำสัตว์หรือชิ้นส่วนสัตว์มาย่อยหรือสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ หรือบดให้ละเอียด คลุกเคล้ากับกากน้ำตาลให้เข้ากันในภาชนะ และมักมีการเติมน้ำหมักชีวภาพ น้ำหมักจุลินทรีย์ น้ำมะพร้าว หรือหัวเชื้อจุลินทรีย์ละลายน้ำลงไปด้วย 1 ส่วน ปิดฝาและนำไปเก็บในที่ร่มอากาศถ่ายเทดี มีการกวนบ้างเป็นบางครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีกลิ่นเหม็น สำหรับการหมักปลาไม่ปิดฝาและกวนวันละหลายๆ ครั้ง และเกษตรกรจะเริ่มนำของเหลวที่ได้จากการหมักมาใช้กับพืชหลังจากหมักไว้ 1 เดือนขึ้นไป หรือจนกว่าวัสดุที่ใช้หมักจะย่อยสลายดีแล้ว โดยกรองเอาแต่ของเหลวมาใช้กับพืชเช่นเดียวกันกับน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากพืช (สุนันทา, 2546)

จากการศึกษาของมะลิวัลย์ (2545) ที่สำรวจน้ำหมักชีวภาพที่หมักจากพืชชนิดต่างๆ รวมทั้งจากปลาและหอยเชอรี่โดยเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่พบว่ามีคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพและปริมาณธาตุอาหารต่างๆ ดังตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพและธาตุอาหารหลักของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตโดยเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่

วัตถุดิบ	pH	ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)	ไนโตรเจน (%)	ฟอสฟอรัส (%)	โพแทสเซียม (%)
กล้วย	3.79-4.14	0.24-4.96	0.015-0.15	0.01-0.04	0.6-4.07
ลำใย	3.54-4.18	3.01-6.22	0.093-0.16	0.03-0.06	0.89
สับปะรด	3.84	2.04	0.04	0.02	1.13
ลิ้นจี่	3.85	1.76	0.08	0.02	11.24
ฝรั่ง	3.31	1.68	0.03	0.01	1.09
ลูกหม่อน	4.59	1.38	0.01	0.002	0.34
มะละกอ	3.59	6.60	0.15	0.02	1.45
ผักบุ้ง	3.48-4.13	1.83-9.64	0.05-0.18	0.02-0.05	0.94-11.27
เห็ดหอม	5.04	3.31	0.33	0.14	3.26
ผักกาด	3.83	10.11	0.2	0.04	2.15
หอยเชอรี่	4.49-5.16	0.80-1.56	0.23-0.35	0.01-0.02	0.25
ปลา	4.11	1.09	0.61	0.17	2.69

ที่มา: มะลิวัลย์ (2545)

ตารางที่ 2 ปริมาณธาตุอาหารรองและจุลธาตุของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตโดยเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่

วัตถุดิบ	แร่ธาตุ (mg/L)					
	แคลเซียม	แมกนีเซียม	เหล็ก	ทองแดง	แมงกานีส	สังกะสี
กล้วย	22-60	152-555	9-26	0	14-33	5-9
ลำใย	30	204-280	2-52	0	10-19	5-10
สับปะรด	44	176	9	0	12	8
ลิ้นจี่	51	268	15	0	11	9
ฝรั่ง	40	140	15	0	14	5
ลูกหม่อน	22	12	21	0	10	5
มะละกอ	60	312	24	0	11	6
ผักบุ้ง	28-39	165-312	8-59	0	14-21	6-9
เห็ดหอม	40	376	34	0	21	15
ผักกาด	47	249	33	0	19	129
หอยเชอรี่	180-2,751	274-329	19	1-5	52-56	9-10
ปลา	1,224	690	51	0	29	10

ที่มา: มะลิวัลย์ (2545)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria : LAB)

เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในกระบวนการหมัก พบอยู่ทั่วไปตามชิ้นส่วนของพืช โดยจะเพิ่มจำนวนในระหว่างการเก็บเกี่ยวและการหมักพืช โดยพบจำนวนประชากรของแบคทีเรียแลคติกประมาณ 0.15-1.5% ของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมด (Buckenhu¨skes,1997) ซึ่งในระหว่างกระบวนการหมักจะมีการแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม หรือรูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่ผลิตเอนไซม์คาตาเลส ต้องการอาหารซับซ้อนในการเจริญเติบโต (complex medium) ต้องการอากาศน้อยๆ และใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน (Wood และ Holzapfel, 1995)

การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก เป็นสกุลต่างๆ ดังนี้ คือ *Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Carnobacterium, Enterococcus,*

Vagococcus, Aerococcus, Alloiococcus และ *Tetragenococcus* (Wood และ Holzapfel, 1995)

เมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติกสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ด้วยกัน (Wood และ Holzapfel, 1995)

1. Obligative homofermenter หมายถึง แบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ผลผลิตเป็นกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว (1 โมลของกลูโคสสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 2 โมล) ผ่าน Embden-Meyerhof pathway (EMP) โดยใช้เอนไซม์ aldolase เช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus ruminis* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดได้มากกว่า 85% จากน้ำตาล hexose คือน้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 6 อะตอม (C_6 sugar) เช่น กลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาล pentose คือน้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 5 อะตอม (C_5 sugar) เช่น xylose ได้

2. Facultative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลกติกได้ 50% กรดอะซิติกหรือเอธานอล 25% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 25% ผ่าน Phosphoketolase pathway กลุ่มนี้มีทั้งเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase สามารถผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose เช่น arabinose ribose และ xylose ได้ การที่เอนไซม์ใดจะทำหน้าที่ขึ้นกับสภาวะสิ่งแวดล้อมในแง่ของสับสเตรท โดยเอนไซม์ phosphoketolase ถูกยับยั้งในที่มีกลูโคสและขึ้นกับค่า oxidation-reduction potential (ORP) ด้วย สมาชิกในกลุ่มนี้ เช่น *Lactobacillus plantarum* และ *L. pentosus*

3. Obligative heterofermenter หมายถึง แบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมลแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลกติก 1 โมล กรดอะซิติกหรือเอธานอล 1 โมลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมล โดยใช้ Phosphoketolase pathway และไม่มีเอนไซม์ aldolase จึงไม่สามารถใช้น้ำตาลผ่านวิถี EMP ได้ ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่กลุ่มของ *Leuconostoc* และกลุ่มของ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus brevis* และ *L. buchneri* แบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้น้ำตาล hexose และ pentose ได้ดี

ยีสต์

ยีสต์มีความสำคัญในการหมักเช่นกัน ทั้งในแง่ประโยชน์และทำให้เกิดความเสียหายต่อการหมักได้ โดยยีสต์มีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ขนมปัง ไวน์ เบียร์ น้ำส้มสายชูหมัก และอาหารหมักพื้นเมืองบางชนิด ขณะเดียวกันยีสต์ทำให้อาหารต่างๆ เช่น น้ำผลไม้ น้ำเชื่อม น้ำผึ้ง แยม ผักดอง เนื้อสัตว์ และอาหารอื่นๆ เกิดการเน่าเสียได้เช่นกัน ซึ่งยีสต์ที่พบมีการปนเปื้อนและทำให้อาหารเน่าเสีย โดยสายพันธุ์ที่พบบ่อยๆ แสดงในตารางที่ 3 โดยยีสต์ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ ทั้งยังต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน โดยในสภาพที่ไม่มีอากาศยีสต์จะใช้

ประโยชน์จากน้ำตาลได้ผลผลิตเป็นเอธานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เหลือน้ำตาลสำหรับการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียแลคติกน้อยลง ส่วนในสภาพที่มีอากาศยีสต์หลายชนิดจะใช้ประโยชน์จากกรดแลกติกได้ผลผลิตเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ทำให้ pH ของผลิตภัณฑ์สูงขึ้น (Boekhout และ Robert, 2003) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักคือ ปริมาณของออกซิเจนและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ คือยีสต์จะมีชีวิตอยู่และสามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อมีออกซิเจนและจะตายถ้ามีกรดอะซิติกในปริมาณสูง (Thomas *et al*., 2002)

ตารางที่ 3 ยีสต์ที่พบมีการปนเปื้อนซึ่งทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารและเครื่องดื่ม

ยีสต์ที่พบมีการปนเปื้อนเสมอ	ชนิดของยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย	
Saccharomyces cerevisiae	*Brettanomyces*	*Pichia burlonii*
Debaryomyces hansenii	*intermeditus*	*Pichia fermentans*
Pichia anomala	*Candida dattila*	*Sporobolomyces roseus*
Pichia membranifaciens	*Candida globosa*	*Saccharomyces cerevisiae*
Rhodotorula glutinis	*Candida humicola*	*Schizosaccharomyces pombe*
Rhodotorula mucilaginosa	*Candida lipolytica*	*Toruaspola delbrueckii*
Toruaspola delbrueckii	*Candida parapsilosis*	*Trichosporon cultaneum*
Kluyveromyces marxianus	*Candida sake*	*Trycosporum pullnulans*
Issatchenkia orientalis	*Candida versatilis*	*Zygosaccharomyces bailii*
Zygosaccharomyces bailii	*Candida zeylanoides*	*Zygosaccharomyces bisporus*
Candida parapsilosis	*Candida holmii*	*Zygosaccharomyces rouxii*
Zygosaccharomyces rouxii	*Candida krusei*	
Candida guilliermondii	Cryptococcus *spp.*	
Candida albidus	*Debaryomyces hansenii*	
Candida tropicalis	*Hansenula anomala*	
Saccharomyces exiguous	*Hansenula subpelliculoxa*	
Pichia fermentans	*Kluyveromyces marxianus*	
Trichosporon pullutans	*Kloeckera apiculata*	
Hanseniapola uvarum	*Pichia membranifaciens*	
Candida zeylanoides		

ที่มา: Boekhout และ Robert (2003)

การจัดจำแนกยีสต์ในระดับสกุล (genus) สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาได้ แต่การจัดในระดับชนิด (species) ส่วนใหญ่มักต้องอาศัยลักษณะทางอณูวิทยา และสำหรับลักษณะที่ใช้ในการจำแนกประเภท (Classification) ของยีสต์ตามวิธีของ Walker (1998) มีดังนี้

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)
    - ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง
    - ลักษณะรูปร่างของเซลล์ในอาหารเหลว
    - การเพิ่มจำนวนและ/หรือการสืบพันธ์แบบอาศัยเพศ
    - รูปแบบของการสร้างสปอร์
        - ascospore
        - ballistospore
    - การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม
    - ลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว
        - แบบลอยเป็นฝ้า (Pellicle formation)
        - แบบตกตะกอน (Flocculation)
2. ลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological characteristic)
    - การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต
    - การใช้สารประกอบเป็นแหล่งคาร์บอน
    - การใช้สารประกอบเป็นแหล่งไนโตรเจน
    - การผลิตเม็ดสี (pigment)
    - การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง
    - อาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% 10% และ 16%
    - อาหารที่มีกลูโคสเข้มข้น 50% และ 60%
    - การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease)
    - การทนต่อ cycloheximide เข้มข้น 0.01% และ 0.10%
    - การทดสอบปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (diazonium blue B)
3. ลักษณะทางอณูวิทยา (Molecular characteristic)
    - DNA base composition (mole % G + C)
    - DNA hybridization
    - rRNA and rDNA phylogeny

บทบาทของแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ในผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบที่เป็นผักสดและผลไม้คือแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศ (Gram negative aerobic bacteria) และยีสต์ ในขณะที่แบคทีเรียแลคติกพบเป็นอันดับรองลงมา (Mundt *et al*., 1967; Mundt และ Hammer, 1968; Schneider, 1988 อ้างโดย Wood, 1998) แต่ถ้าวัตถุดิบอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน มีความชื้น ความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิที่เหมาะสม แบคทีเรียแลคติกจะมีบทบาทหลักในการหมัก ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่เกิดขึ้นในการหมักขึ้นอยู่กับลักษณะทางเคมีของพืช ความเข้มข้นของเกลือและ pH รวมทั้งชนิดของพืชและอุณหภูมิในการหมัก และในระหว่างการหมักเมื่อสภาวะในการหมักเปลี่ยนแปลงไปก็จะเปลี่ยนแปลงชนิดของแบคทีเรียแลคติกด้วย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากบทบาทของแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ในการหมักผลไม้และผัก เช่น แตงกวาดอง กะหล่ำปลีดอง และมะกอก เป็นต้น (Boekhout และ Robert, 2003)

แตงกวาดองเปรี้ยว (Cucumber for fermented pickle production)

ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในการหมักแตงกวาแบบธรรมชาติ ได้แก่ ความเข้มข้นของเกลือ อุณหภูมิของน้ำเกลือ ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ตั้งต้น ในระยะแรกของการหมัก (2-3 วัน) มีเกลือ 5-8% และอุณหภูมิในการหมัก 15-32°C พบจุลินทรีย์จำพวก *Bacillus* ราและยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ต้องการ ในขณะที่แบคทีเรียแลคติกที่ต้องการพบจำนวนน้อยกว่า แต่หลังจากนั้นแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus, Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus plantarum* และยีสต์จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการลดจำนวนลงและหายไปเมื่อปริมาณกรดเพิ่มขึ้น จากนั้นเมื่อ pH ลดลงเหลือ 4.5 พร้อมกับมีกรดอะซิติกเกิดขึ้นจะช่วยยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก เมื่อสิ้นสุดการหมักจะมีกรดแลกติกประมาณ 1.1% และ pH อยู่ในช่วง 3.3-3.5 หลังจากการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกเสร็จสิ้น อาจมีพวกยีสต์เจริญต่อไปได้ ซึ่งยีสต์ที่พบมี 2 กลุ่ม คือ เฟอร์เมนเททีฟยีสต์โดยจะหมักน้ำตาลที่เหลือให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แก่ *Hansenula anomala* (ปัจจุบัน คือ *Pichia anomala*), *Hansenula subpelliculosa*, *Saccharomyces bailli*, *S. delbrueckii*, *S. rosei*, *Torulopsis holmii* และ *T. verstilis* (Etchells และ Bell, 1950 อ้างโดย Wood, 1998) ส่วนยีสต์อีกพวกคือ ฟิล์มยีสต์ซึ่งจะเจริญที่ผิวหน้าของน้ำเกลือและใช้กรดแลกติกที่เกิดขึ้นโดยการออกซิไดซ์ทำให้ปริมาณกรดลดลงและ pH สูงขึ้น ทำให้ propionic acid bacteria เจริญเติบโตซึ่งทำให้เกิดการเน่าเสียได้ ฟิล์มยีสต์ที่พบได้แก่ *Candida krusei, Debaromyces hansenii, Pichia ohmeri* และ *Rhodotorula* spp. (Etchells *et al*., 1961 อ้างโดย Wood, 1998)

มะกอกดอง (Olives)

การดองมะกอกในน้ำเกลือเข้มข้น 5-7.5% โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทร่วมกันคือแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ โดยที่บทบาทของยีสต์ในการดองมะกอกจะมีบทบาทสำคัญมากกว่าแตงกวาดองในระหว่างกระบวนการดองโดยธรรมชาติแบคทีเรียแลคติกใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต ซึ่งได้แก่น้ำตาล glucose fructose และ mannitol จากวัตถุดิบในการผลิตกรด

เนื่องจากขั้นตอนเริ่มต้นการดองต้องมีการแช่ในน้ำด่าง (0.5-2% sodium hydroxide) เพื่อออกซิไดซ์ phenols ที่มีอยู่มากในเม็ดมะกอกและทำให้ได้มะกอกที่มีสีดำ ซึ่งจะไปลดจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ และทำให้ pH เพิ่มเป็น 7.5-8.5 ทั้งในระหว่างขั้นตอนการแช่ด้วยด่างต้องมีการล้างด้วยน้ำเกลือ 2-3 ครั้ง จึงไปลดสารอาหารและน้ำตาลที่ละลายออกมาในน้ำดองจึงทำให้ในช่วงเริ่มต้นการดองพบจุลินทรีย์ได้หลากหลาย ส่วนใหญ่เป็นพวกกลุ่มเชื้อที่ไม่ต้องการ ได้แก่ Gram negative aerobic bacteria (*Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp.) และรา นอกจากนี้อาจพบกลุ่ม coliforms (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella aerogenes* และ *Escherichia coli*) แต่เมื่อดองไปได้ 2-3 วัน pH ลดลงโดยการเจริญของแบคทีเรียแลคติกได้แก่ *Pediococcus Leuconostoc* และ *Lactococcus* ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ต้องการหายไป (Wood, 1998)

การดองมะกอกในช่วงที่สองสืบเนื่องจากช่วงต้นโดยบทบาทของแบคทีเรียแลคติกเป็นหลัก ได้แก่ lactobacilli (*Lactobacillus plantarum* ร่วมกับ *Lactobacillus delbrueckii*) และมียีสต์ร่วมด้วย จึงทำให้ pH ลดจาก 6.0 ไปเป็น 4.5 ระยะนี้ใช้เวลา 10-15 วัน โดยที่จำนวนของ lactobacilli มีปริมาณสูงสุดช่วง 10-15 วันของการดอง (Ruiz และ Jimenez, 1995)

ช่วงที่สาม pH จะลดจาก 4.5 และจะลดไปเรื่อยๆ จนกว่าคาร์โบไฮเดรตหมดไป ซึ่งมี *Lactobacillus plantarum* เป็นตัวหลัก ทั้งยังพบยีสต์กลุ่มเฟอร์เมนเททีฟ (fermentative yeast) และออกซิเดทีฟ (oxidative yeast) ในปริมาณสูง โดยยีสต์กลุ่มเฟอร์เมนเททีฟ (fermentative yeast) จะผลิต ethanol, ethyl acetate และ acetaldehyde ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีต่อผลิตภัณฑ์ แต่ออกซิเดทีฟยีสต์ (oxidative yeast) จะก่อให้เกิดความเสียหาย เพราะยีสต์กลุ่มนี้ใช้กรดแลกติกที่เกิดขึ้นโดยการออกซิไดซ์ทำให้ปริมาณกรดลดลงและ pH สูงขึ้นซึ่งจะทำให้เกิดการเน่าเสียในที่สุด (Wood, 1998) จากการศึกษาของ Garrido *et al*. (1995) ยีสต์ที่พบในช่วงนี้ได้แก่ *Hansenula anomala*, *Candida krusei*, *Saccharomyces chevalieri, Candida parasilopsis* และ *Hansenula subpelliculosa* ในรายงานของ Marquina *et al*. (1992) อ้างโดย Wood (1998) ระบุว่ายีสต์ที่พบคือ *Pichia* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* และ *Rhodotorula mucilaginosa*

น้ำหมักชีวภาพ

จากการศึกษาการหมักสาหร่ายผมนางและลูกยอป่าเป็นระยะเวลา 90 วัน ของ Kantachote และ Charernjiratrakul (2008) พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่พบในการหมักสาหร่ายผมนางและลูกยอป่าวันที่ 1-5 คือ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* และ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* แต่วันที่ 4 และ 5 พบ *Lactobacillus plantarum* ในการหมักลูกยอป่า สำหรับวันที่ 6-14 พบ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fementum* และ *Lactobacillus brevis* ในการหมักลูกยอป่า ส่วนในสาหร่ายผมนางมีเพียง *Lactobacillus brevis* เท่านั้นที่ไม่พบ และเมื่อหมักได้ 21-45 วัน เชื้อที่พบในน้ำหมักทั้ง 2 ชนิด คือ *L. plantarum* และ *L. brevis* โดยที่ *Lactobacillus coryniformis* พบเฉพาะในลูกยอป่า และเมื่อหมักได้ 60-90 วัน เชื้อที่พบในน้ำหมักทั้ง 2 ชนิด คือ *L. plantarum* และ *Lactobacillus* sp.

แบคทีเรีย *Zymomonas* spp.

Zymomonas สามารถเจริญเติบโตที่ pH 3.5-7.5 และทนต่อ 5% เอทานอลได้ จึงสามารถพบได้ในน้ำผลไม้หมัก เช่น น้ำแอปเปิลหมัก น้ำตาลหมัก และเบียร์ เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมลบ เคลื่อนที่ได้ โดยปกติจะพบอยู่กันเป็นคู่ ขนาดของเซลล์ 2-6 x 1-1.4 μm เป็น facultative anaerobe และผลการทดสอบ oxidase เป็นลบ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 25-30°C สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมล ได้เอทานอล 2 โมล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมล โดยใช้ Entner-Doudoroff pathway ทั้งยังเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 13% (w/v) จึงมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมผลิตเอทานอล โดยมีลักษณะความแตกต่างระหว่างจีนัส *Zymomonas* และจีนัสอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4 (John และ Nuel, 1984) *Zymomonas* มี 1 สปีชีส์ คือ *Zymomonas mobilis* ประกอบด้วย 2 subspecies คือ *Z. mobilis* subsp. *mobilis* และ *Z. mobilis* subsp. *pomaceae*

ตารางที่ 4 ลักษณะความแตกต่างระหว่างจีนัส *Zymomonas* และจีนัสอื่นๆ ในกลุ่ม Gram negative aerobic rod

Characteristic	*Zymomonas*	*Acetobacter*	*Aeromonas*	*Gluconobacter*	*Sphingomonas*
Gram variability occurs	-	+	-	+	-
Flagella arrangement					
Polar only	+	-	+	+	+
Peritrichous	-	+	-	-	-
Oxygen tolerance					
- Growth under both aerobic and anaerobic condition	+	-	+	-	-
- Growth under aerobic condition only	-	+	-	+	+
Oxidase	-	-	+	-	+
Carbohydrate metabolism					
- Fermentative and respiratory	+	-	+	-	-
- Respiratory only	-	+	-	+	+
Gas from D-glucose	+	-	D	-	-
1 mol of glucose fermented to 2 mol of ethanol and 2 mol of CO_2	+	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	+	-	-
Growth at pH 4.0	+	+	-	+	D
Inhibit by novobiotin	+	D	-	+	D
Mol% G + C of DNA	47.5-49.5	51-65	57-62	56-64	60-65.4

ที่มา: John และ Nuel (1984)

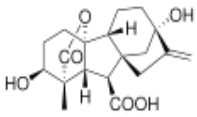
หมายเหตุ +, typically positive; - , typically negative; D, differs among species

ฮอร์โมนพืช

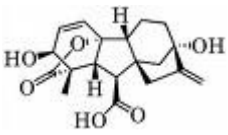
การยืดยาวของลำต้นและใบเป็นผลจากฮอร์โมน 2 ชนิดคือ จิบเบอเรลลิน (gibberellins) และออกซิน (auxins)

จิบเบอเรลลิน

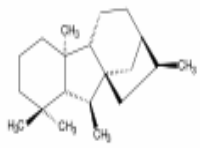
พบครั้งแรกในเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* และในพืชชั้นสูง ได้มีนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษสามารถสกัดสารนี้จากเชื้อราดังกล่าวตั้งชื่อสารสกัดนี้ว่า จิบเบอเรลลิกแอซิด (gibberellic acid หรือ GA_3) สารเหล่านี้จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการเพิ่มขนาดของเซลล์ตามยาว โดยกระตุ้นการขยายขนาดของใบและการยืดยาวของลำต้น (สมบูรณ์, 2535) และเพิ่มการแบ่งเซลล์ เร่งการเจริญของเมล็ด เร่งการออกดอก จิบเบอเรลลินเป็นสารที่ประกอบด้วยสารเทอพินอยด์ (terpiniods) มีโครงสร้างประกอบด้วยจำนวน 20 คาร์บอนอะตอม ซึ่งจำนวน 20 คาร์บอนอะตอมนั้นประกอบมาจากหน่วยของไอโซพรีนอยด์ (isopreniods) จำนวน 4 หน่วย ปัจจุบัน ได้ค้นพบสารจิบเบอเรลลินจากเชื้อราและในพืชชั้นสูงเป็นจำนวน 180 ชนิด จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์จิบเบอเรลลินได้ คือ เชื้อรา ได้แก่ *Fusarium heterosporum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Gibberella fujikuroi* และ *G. moniliformis* และรูปที่ 3 เป็นตัวอย่างของจิบเบอเรลลินบางชนิด



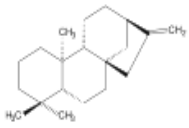
GA 1



GA 3



ent-Gibberellane



ent-Kaurene

รูปที่ 3 โครงสร้างของจิบเบอเรลลินที่สำคัญบางชนิด
ที่มา: http://en.wikipedia.org/

ออกซิน

ออกซินเป็นกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่สามารถชักนำให้เกิดการยืดตัวของเซลล์ของลำต้นเช่นเดียวกับจิบเบอเรลลิน และออกซินที่พบบ่อยคือ กรดอินดอลอะซิติก (Indole acetic acid: IAA) ซึ่งเป็นออกซินธรรมชาติที่พบในพืชโดยเฉพาะบริเวณปลายยอด ปลายรากและส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ออกซินเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางเคมีเป็นกรด มีโครงสร้างเป็นวงแหวนที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated ring) คำว่า auxin มาจากภาษากรีกว่า auxein หมายถึงการเจริญเติบโต ทั้งยังพบว่าในแบคทีเรียบางชนิดสามารถเปลี่ยน tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งให้เป็น indole ethanol ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายออกซิน เมื่อพืชได้รับ indole ethanol จะถูกเปลี่ยนให้เป็น indole- acetadehyde และ indole acetic acid (IAA) หรือออกซินในที่สุด (สัมพันธ์, 2526)

ชนิดของออกซินที่สามารถสังเคราะห์ได้แบ่งโดยอาศัยลักษณะทางเคมี ได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ และรูปที่ 4 เป็นโครงสร้างของออกซินสังเคราะห์ชนิดต่างๆ

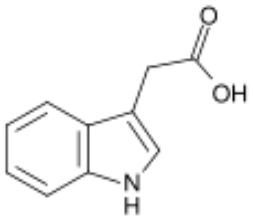
1) Indole acid ได้แก่ indole acetic acid (IAA), indole propionic acid (IPA), indolebutyric acid (IBA)

2) Naphthalene acid ได้แก่ naphthalene acetic acid (NAA), B-naphthoxyacetic acid (NOA)

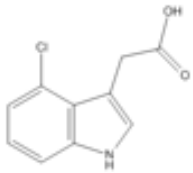
3) Chlorophenoxy acid ได้แก่ 2,4-D, MCPA, 2,4,5-T เป็นต้น

4) Benzoic acid ได้แก่ 2,3,6-TBA, 2,4,6-TBA, 2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid (dicamba) เป็นต้น

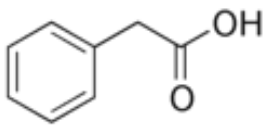
5) Picolinic acid ได้แก่ picloram เป็นต้น



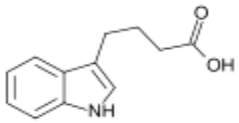
Indole-3-acetic acid (IAA)



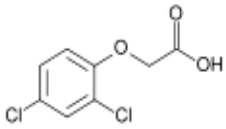
4-chloro-indoleacetic acid (4-Cl-IAA)



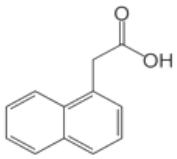
2-phenylacetic acid (PAA)



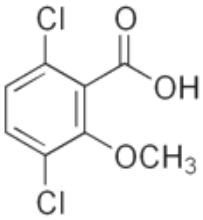
Indole-3-butyric acid (IBA)



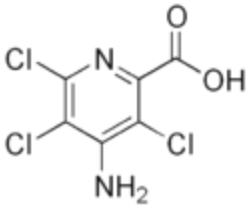
2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)



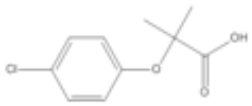
1-Naphthalene acetic acid (1-NAA)



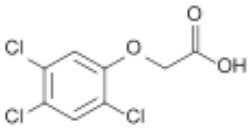
2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid (dicamba)



4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (tordon or picloram)



A-(p-Chlorophenoxy) isobutyric acid



2,4,5-Trichlorophenoxyacetic

รูปที่ 4 โครงสร้างของออกซินสังเคราะห์ชนิดต่างๆ
ที่มา: http://en.wikipedia.org/

จากการศึกษาของชวนพิศ และกัลยา (2539) อ้างโดย มะลิวัลย์ (2545) พบว่าในน้ำหมักชีวภาพมีสารคล้ายจิบเบอเรลลิคแอซิด (GA_3) โดยพบมีปริมาณต่ำในช่วงเริ่มต้น และพบมากขึ้นถ้าระยะเวลาการหมักนานขึ้นทั้งยังมีปริมาณสูงสุดถ้าเก็บน้ำหมักชีวภาพที่สิ้นสุดกระบวนการหมักไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 42 วัน

จากรายงานของสุนันทา และคณะ (2545) อ้างโดย มะลิวัลย์ (2545) พบว่าน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากผลไม้ เช่น มะละกอ กล้วย และฟักทอง ใช้อัตราส่วนของวัสดุหมักต่อกากน้ำตาลเท่ากับ 3 ต่อ 1 และใช้เวลาหมัก 7 วัน มีปริมาณ IAA น้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่พบ GA_3 แต่เมื่อหมักเป็นเวลา 1 เดือน ปริมาณ IAA ในน้ำหมักชีวภาพดังกล่าวเพิ่มเป็น 0.82 มิลลิกรัมต่อลิตร และมี GA_3 ประมาณ 33.46 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อหมักเป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณ IAA ในน้ำหมักชีวภาพดังกล่าวเหลือ 0.66 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่พบ GA_3 ในกรณีที่หมักเป็นระยะเวลา 1 ปี ปริมาณของสารเร่งการเจริญเติบโตคือ IAA และ GA_3 มีปริมาณ 0.51 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 18.27 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

มะเขือเทศ

มะเขือเทศ มีชื่อสามัญว่า tomato มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lycopersicon esculentum* Mill. จัดอยู่ในตระกูล Solanaceae (เกียรติเกษตร, 2541)

พันธุ์ของมะเขือเทศ

แบ่งตามลักษณะการออกดอกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. แบบไม่ทอดยอด (determinate type) ประกอบด้วยช่อดอกข้าง (axillary raceme) และช่อดอกปลายยอด (terminal raceme) ช่อดอกข้างจะออกดอกข้อเว้นข้อ ทรงพุ่มแน่น ไม่ต้องขึ้นค้าง ให้ผลผลิตเร็ว และอายุสั้น ใช้สำหรับทำมะเขือเทศแปรรูปส่งโรงงาน

2. แบบทอดยอด (indeterminate type) ประกอบด้วยช่อดอกข้างเท่านั้น ส่วนปลายยอดยังเจริญทางกิ่งก้านและใบ ช่อดอกข้างออกดอกช่อเว้นข้อ มีทรงพุ่มหลวม ต้นสูงต้องขึ้นค้าง ให้ผลผลิตช้า และช่วงการเก็บเกี่ยวผลยาวนาน

แบ่งมะเขือเทศตามลักษณะของการนำไปใช้ประโยชน์ แบ่งมะเขือเทศได้ 2 ชนิด ได้แก่

2.1 มะเขือเทศรับประทานสด (Table tomato) มีทั้งแบบผลเล็กและผลใหญ่ แบบผลใหญ่มักมีทรงผลกลมคล้ายแอปเปิ้ล ผลเมื่อสุกจะมีสีแดงเข้ม เนื้อหนาแข็ง เปลือกไม่เหนียว มีจำนวนช่องภายในผลมากและไม่กลวง รสชาติดี แต่จะมีปัญหาหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากเมื่อแป้งเปลี่ยนเป็นน้ำตาล ผลจะนิ่มเร็วภายใน 3-4 วัน

2.2 มะเขือเทศแปรรูป (Processing tomato) ช่องในผลจะน้อย ผลแข็ง กระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลจะช้า มี total soluble solid content สูง ใช้สำหรับโรงงานแปรรูป เช่น เนื้อมะเขือเทศเข้มข้น น้ำมะเขือเทศ ซอสมะเขือเทศ เป็นต้น

มะเขือเทศราชินี

สำหรับมะเขือเทศราชินี เป็นพันธุ์แบบทอดยอด (indeterminate type) มีลำต้นสูงเลื้อยทอดยอดต้องอาศัยค้างในการยึดเกาะ ผลมีขนาดเล็ก เพาะปลูกได้ดีในเขตกึ่งร้อน เริ่มออกดอกนับตั้งแต่วันย้ายลงปลูกใช้เวลา 40 วัน ดอกมีลักษณะเป็นช่อ และทยอยออกผลเมื่อ 75-80 วันนับจากวันปลูก ผลมีลักษณะรูปไข่ ยาวรี มะเขือเทศราชินีจะชอบดินร่วนปนทราย มีการระบายน้ำดี ถ้าเป็นดินเค็มเล็กน้อยจะดีมากและ pH ที่เหมาะสมประมาณ 6-7 ส่วนฤดูที่เหมาะสมที่สุดต่อการเติบโตของมะเขือเทศคือฤดูหนาว การปลูกมะเขือเทศในฤดูฝนมักประสบปัญหามาก เนื่องจากความชื้นของอากาศและอุณหภูมิที่สูงทำให้มีผลผลิตต่ำ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินีอยู่ระหว่าง 18-24°C อุณหภูมิที่เหมาะสมในการติดผลคืออุณหภูมิกลางคืน 15-20°C และอุณหภูมิกลางวัน 25-30°C ถ้าอุณหภูมิกลางคืนสูงกว่า 22°Cและอุณหภูมิกลางวันสูงกว่า 32°C การติดผลจะลดลง เพราะในสภาพอุณหภูมิสูงทำให้ต้นมะเขือเทศยืดยาวออกอย่างรวดเร็ว ขนาดของต้นผอมเล็ก ปริมาณท่อน้ำและท่ออาหารลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงยังทำให้ก้านชูเกสรตัวเมียยืดยาวสูงกว่าอับละอองเกสรตัวผู้ เมื่ออับละอองเกสรตัวผู้ไม่หุ้มยอดเกสรตัวเมียทำให้ยอดเกสรตัวเมียแห้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และถึงแม้ว่าจะมีการถ่ายละอองเกสรเกิดขึ้น แต่ก็ไม่เกิดการผสมเกสร และยังพบว่าอุณหภูมิที่สูงยังทำให้เกิดการร่วงของดอก

การขยายพันธุ์ของมะเขือเทศราชินี ใช้วิธีขยายพันธุ์ด้วยเม็ดหรือใช้วิธีแบบการเปลี่ยนยอด (Apical grafting) โดยใช้มะเขือม่วงเป็นต้นตอและใช้มะเขือเทศพันธุ์ต่างๆเป็นยอดพันธุ์เพื่อป้องกันโรคเหี่ยวเขียวหรือ Bacterial wilt มะเขือเทศราชินีที่นิยมปลูกในเมืองไทยมี 3 สายพันธุ์คือ พันธุ์จินทง พันธุ์จินยี่และพันธุ์แซนต้า ทั้ง 3 สายพันธุ์นำเข้าจากประเทศไต้หวัน และจากการสอบถามผู้จำหน่ายมะเขือเทศราชินีในตลาดค้าส่งหาดใหญ่ (กันยายน 2548) พบว่าราคาขายปลีกมะเขือเทศราชินีอยู่ที่กิโลกรัมละ 40-50 บาท ถ้าเป็นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเกษตรอินทรีย์ ราคาจะเพิ่มขึ้นประมาณ 10%

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ

โดยทั่วไปธาตุอาหารที่พืชต้องการมี 16 ชนิด (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541) ได้แก่

ธาตุอาหารหลัก (primary nutrient element) เป็นธาตุที่พืชต้องการเป็นปริมาณมาก ได้แก่ ไฮโดรเจน (H) คาร์บอน (C) ออกซิเจน (O) ซึ่งได้จากอากาศ ส่วนไนโตรเจน (N)

ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) พืชได้จากดินแต่เนื่องจากพืชต้องการในปริมาณมากแต่พืชได้รับจากดินจึงไม่ค่อยพอต่อความต้องการ

ธาตุอาหารรอง (secondary nutrient element) พืชต้องการในปริมาณมากเช่นกัน แต่ไม่มีความขาดแคลนเนื่องจากในดินมีปริมาณเพียงพอ ได้แก่ แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และกำมะถัน (S)

จุลธาตุ (micronutrient) ได้แก่ โมลิบดินัม (Mo) ทองแดง (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) คลอรีน (Cl) และโบรอน (B)

ธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศได้แก่

ไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุพื้นฐานทางชีวเคมีของพืช พืชจะดูดใช้ไนโตรเจนในรูป NH_4^+ หรือ NO_3^- เมื่อพืชขาดไนโตรเจนจะมีผลกระทบต่อการสังเคราะห์โปรตีนจากนั้นการเจริญเติบโตจะชะงัก ใบแก่จะถูกกระทบเป็นอันดับแรก โดยใบจะมีสีเหลืองซึ่งเป็นสาเหตุมาจากการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ถูกยับยั้ง สำหรับในมะเขือเทศไนโตรเจนจะส่งเสริมการเจริญเติบโตการออกดอกและการติดผล ถ้าไนโตรเจนมากเกินไปทำให้การแก่ของผลล่าช้าออกไป และลดขนาดของผลลง (Pujos และ Morard, 1997) พบว่าพืชที่ขาดไนโตรเจนจะมีออกซินภายในพืชระดับต่ำและลดกิจกรรมของจิบเบอเรลลินลง การเกิดโรคเน่าอย่างรุนแรงจะลดลงด้วยการเพิ่มไนโตรเจน แต่โรคปลายดอกเน่าเกิดเพิ่มขึ้นด้วยการเพิ่มระดับไนโตรเจน สำหรับไนโตรเจนที่พอดีจะเพิ่มคุณภาพของผล ขนาดของผล คุณภาพการเก็บรักษา สี และรสชาติ (สัมฤทธิ์, 2538)

ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่จำกัดการเจริญเติบโตของพืชเป็นอันดับสองรองจากไนโตรเจน พืชจะดูดใช้ฟอสฟอรัสในรูปของ $H_2PO_4^-$ (monobasic orthophosphate) และ HPO_4^{2-} (dibasicorthophosphate) ฟอสฟอรัสมีความจำเป็นในการสร้างพัฒนาการของรากและการใช้ประโยชน์ของน้ำและแร่ธาตุอย่างอื่นของต้นมะเขือเทศ มีผลกระทบอย่างเด่นชัดต่อจำนวนดอกที่พัฒนา ฟอสฟอรัสเมื่อร่วมกับไนโตรเจนและโพแทสเซียมจะปรับปรุงสีเปลือก รสชาติ ความแน่นของเนื้อผลและปริมาณของวิตามินซีและเร่งการแก่ของผล (Pujos และ Morard, 1997)

โพแทสเซียม

โพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อพืชรองจากไนโตรเจนและฟอสฟอรัส การขาดโพแทสเซียมจะเกิดกับพืชน้อยกว่าไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เนื่องจากธาตุโพแทสเซียมมีสะสมอยู่ในดินเป็นปริมาณมาก โพแทสเซียมเป็นที่ต้องการในฐานะเป็นองค์ประกอบร่วมของระบบเอนไซม์และพืชจะดูดใช้โพแทสเซียมในรูปของ K cation (K^+) ในมะเขือเทศพบว่าโพแทสเซียมมีผลต่อการเพิ่มขนาดของผล และแก้ไขความผิดปกติหลายอย่าง เช่น การสุกของผลที่เป็นแผล โดยตามรายงานของ Pujos และ Morard (1997) แสดงให้เห็นว่าผลที่เป็นแผลเป็นสาเหตุของการได้รับโพแทสเซียมระดับต่ำ ระดับการเพิ่มของโพแทสเซียมจะช่วยลดการเกิดผลรูปร่างผิดปกติ และโพแทสเซียมมีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดสีของผลมะเขือเทศและเพิ่มคาโรทีนอยด์ (carotenoid) โดยเฉพาะไลโคเปน (lycopene) ทั้งยังช่วยลดคลอโรฟิลล์ได้อีกด้วย ระดับของโพแทสเซียมจะมีอิทธิพลต่อระดับของการเผาผลาญกรดในมะเขือเทศ โดยมะเขือเทศที่ขาดโพแทสเซียมจะมีปริมาณเนื้อที่ละลายน้ำได้ต่ำ รวมทั้งปริมาณน้ำตาล กรดอินทรีย์ คาโรทีนอยด์ และ ไลโคเปน พบในระดับต่ำด้วย

แคลเซียม

แคลเซียมเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างที่สำคัญของผนังเซลล์ชั้นในโดยอยู่ในรูป calcium-pectate เป็นส่วนที่ทำให้พืชเจริญเติบโตโดยมีการแบ่งเซลล์ที่ปลายยอดและปลายราก ช่วยทำให้ลำต้นของพืชแข็งแรง พืชจะดูดใช้แคลเซียมในรูปของ Ca^{2+} ถ้ามะเขือเทศขาดแคลเซียมทำให้ยอดและรากพืชไม่เจริญ และมีอาการคือทำให้ปลายใบที่ขยายขนาดกลายเป็นสีเหลือง

แมกนีเซียม

พืชจะดูดใช้แมกนีเซียมจากสารละลายดินในรูปของ Mg^{2+} พืชต้องการแมกนีเซียมเพื่อเป็น co-factor ของเอนไซม์หลายระบบ เช่น ระบบเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และ citric acid cycle ซึ่งมีความสำคัญในการหายใจของเซลล์ นอกจากนี้แมกนีเซียมยังเป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ ในมะเขือเทศถ้าขาดแมกนีเซียมจะแสดงอาการใบล่างกลายเป็นสีเหลือง

กำมะถัน

พืชต้องการกำมะถันเพื่อสร้างโปรตีนและกรดอะมิโนบางชนิด เช่น cystine cysteine และ methionine ทั้งยังเป็นองค์ประกอบของการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ของพืช เมื่อพืชขาดกำมะถันจะมีใบสีเขียวอ่อนหรือเหลือง การเจริญเติบโตลดลง

โบรอน

โบรอนเป็นธาตุที่มีบทบาทในการสร้างเซลล์ การแบ่งเซลล์ การขยายของเซลล์ทางด้านยาวและมีความสำคัญต่อความสมบูรณ์ของดอกและการผสมติด การขาดโบรอนจะลดการเจริญเติบโตของราก การขยายขนาดของส่วนใต้ใบเลี้ยงและใบเลี้ยง ใบแตกง่ายและเกิดการตายของปลายยอด และการแตกของผลมะเขือเทศเนื่องมาจากการขาดโบรอน (Stoffella และ Kahm, 2001) และยังมีการแนะนำว่าทั้งต้นกล้าและพืชที่มีอายุควรจะพ่นด้วยสารที่มีโบรอน 0.3-0.4% พ่นครั้งแรกในแปลงเพาะก่อนย้ายปลูกและพ่นครั้งที่สองประมาณ 3-4 สัปดาห์หลังจากย้ายปลูก แต่ถ้ามีปริมาณโบรอนในดิน 10-20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อมะเขือเทศได้ โดยจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตและทำให้ผลผลิตลดลง (Aydin *et al.,* 2000) รูปของโบรอนในดินเปลี่ยนแปลงตามค่า pH โดย pH ต่ำกว่า 7 โบรอนอยู่ในรูปของกรดบอริก (H_3BO_3) ซึ่งเป็นรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ถ้า pH สูงกว่า 8 โบรอนอยู่ในรูปบอเรตหรือ $B(OH)_4^-$

สังกะสี

สังกะสีมีบทบาทเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนพืช และมีบทบาททางอ้อมในการสร้างคลอโรฟิลล์ มะเขือเทศที่ขาดสังกะสีจะมีการยืดของต้นช้าและในเล็กแคบ ไม่ออกผล พืชจะดูดใช้สังกะสีจากสารละลายดินในรูปของ Zn^{2+}

แมงกานีส

แมงกานีสมีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์แสงและเมื่ออยู่ร่วมกับเหล็ก จะเป็นตัวควบคุม oxidation reduction potential ทั้งยังเป็นตัวกระตุ้น (activation) ของเอนไซม์หลายชนิด เช่น choline esterase พืชที่ขาดแมงกานีสใบจะมีสีเหลือง (chlorosis) ตามระหว่างเส้นใบเพราะขาดคลอโรฟิลล์ พุ่มของใบจะน้อยเนื่องจากมีใบไม่สมบูรณ์ การเจริญเติบโตช้า ไม่ออกดอกออกผล พืชจะดูดใช้แมงกานีสจากสารละลายดินในรูปของ Mn^{2+}

โมลิบดินัม

โมลิบดินัมเป็นองค์ประกอบของ nitrogenase ซึ่งจำเป็นสำหรับการตรึงไนโตรเจน และเป็นองค์ประกอบของ nitrate reductase ซึ่งจำเป็นต่อการใช้ประโยชน์ของ NO_3^- ของพืชและจุลินทรีย์ ทั้งยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างคลอโรฟิลล์และเอนไซม์บางชนิด

ทองแดง

มีหน้าที่ทางอ้อมในการสร้างคลอโรฟิลล์ เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการออกซิเดชั่นต่าง ๆของพืช

เหล็ก

เหล็กเป็นองค์ประกอบและช่วยสร้างคลอโรฟิลล์ ช่วยในการดูดซึมธาตุอาหารอื่นๆ และเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด เช่น catalase ซึ่งช่วยลดความเป็นพิษของ H_2O_2

คลอรีน

คลอรีนมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและทำให้พืชแก่เร็วขึ้น

ความเป็นกรดและด่างของดิน (pH)

ความเป็นกรดและด่างของดินมีผลต่อความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารและควบคุมกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน เช่น ดินที่มี pH ต่ำกว่า 5.5 ทำให้ธาตุ โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ถูกชะละลายออกจากดินได้ง่ายทำให้พืชขาดธาตุทั้ง 3 ได้ง่าย เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส เมื่อ pH ของดินต่ำกว่า 5 ทำให้ฟอสเฟตถูกตรึงอยู่ในรูปที่พืชดูดไปใช้ได้ยาก และพืชแต่ละชนิดเจริญได้ดีในระดับ pH ที่แตกต่างกัน สำหรับมะเขือเทศราชินีจะเจริญได้ดีที่ pH 6-7 ซึ่งเป็นค่า pH ที่พืชส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดี การจำแนกความเป็นกรดและด่างของดินจำแนกดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ระดับความเป็นกรดด่างของดิน

ระดับ	ค่าของ pH
กรดจัดมาก	4.5
กรดจัด	4.5 - 5.0
กรดแก่	5.1 - 5.5
กรดปานกลาง	5.6 - 6.0
กรดเล็กน้อย	6.0 - 6.5
กลาง	6.6 - 7.3
ด่างอย่างอ่อน	7.4 – 7.8
ด่างปานกลาง	7.9 – 8.4
ด่างแก่	8.5 – 9.0
ด่างแก่มาก	9.0

ที่มา : กรมพัฒนาที่ดิน, 2536

ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (Electrical conductivity: EC)

ค่าการนำไฟฟ้าของดินเป็นดัชนีบ่งบอกถึงความเข้มข้นของเกลือ (ความเค็ม) ทั้งหมดในดิน ความเค็มของดินเกิดจากการมีอิออนของโซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ ซัลเฟต ไบคาร์บอเนตและไนเตรตอยู่หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง ถ้ามีค่าของเกลืออยู่ในสารละลายดินสูงมากเกินไปจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชและทำให้ผลผลิตลดลง โดยพืชจะเกิดอาการขาดน้ำและทำให้ปริมาณน้ำที่เป็นประโยชน์ที่รากพืชสามารถดูดไปใช้โดยผ่านแรงดันออสโมซิสลดลง (Ghassemi *et al*., 1995)

พืชโดยทั่วไปเจริญเติบโตได้น้อยลงเมื่อความเค็มของดินเพิ่มขึ้น และพืชทนเค็มเท่านั้นที่สามารถเจริญในดินเค็มได้ดี เนื่องจากดินมีการสะสมเกลือมากหรือน้อยแตกต่างกัน จึงมีผลต่อการเจริญของพืชแตกต่างกันด้วย การจำแนกระดับความเค็มของดิน โดยพิจารณาจากผลกระทบต่อพืชแสดงดังตารางที่ 6 สำหรับมะเขือเทศค่าการนำไฟฟ้าที่เหมาะสมในการเจริญคือ 8-12 เดซิซีเม็น/เมตร (dS/m) จากรายงานของ Adams และ Ho (1992) พบว่าเมื่อปลูกมะเขือเทศในดินที่มีค่าการนำไฟฟ้า 10 เดซิซีเม็น/เมตร (dS/m) ไม่ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อดินที่ปลูกมะเขือเทศ มีค่าการนำไฟฟ้า 15 เดซิซีเม็น/เมตร (dS/m) ทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 6 ระดับความเค็มของดินและอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืช

การนำไฟฟ้า (เดซิซีเม็น/เมตร)	ระดับความเค็ม	อิทธิพลต่อพืช
0 - 2	ไม่เค็ม	ไม่กระทบกระเทือนต่อพืช
2 – 4	เค็มน้อย	พืชที่ไวต่อความเค็มมีการเจริญเติบโตลดลงบ้าง
4 หรือสูงกว่า 4	เค็ม	
4 – 8	เค็มปานกลาง	จำกัดการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด
8 – 16	เค็มมาก	พืชทนเค็มเท่านั้นที่เจริญเติบโตได้
> 16	เค็มมากที่สุด	พืชทนเค็มบางชนิดเท่านั้นที่เจริญเติบโตได้ดี

ที่มา: คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2541)

จุลินทรีย์ดิน (Soil microorganisms)

จุลินทรีย์ในดินประกอบด้วย แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย โปรโตซัวและไวรัส โดยแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากที่สุด ส่วนใหญ่เป็นพวก Chemoorganotrophic หรือ Heterotroph ซึ่งใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน บทบาทของจุลินทรีย์ดินที่มีความสำคัญเช่น การย่อยสลายอินทรียวัตถุในดิน และพวก chemoautotroph มีบทบาทในการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ในดิน แบคทีเรียในดินที่พบมากได้แก่ *Arthrobacter* พบประมาณ 40% ของค่า Total plate count โดยเป็นเชื้อที่สามารถใช้อาหารได้กว้างและถ้ามีอาหารที่ย่อยง่าย เช่น น้ำตาลและกรดอะมิโน เชื้อกลุ่มนี้จะเจริญได้รวดเร็วกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ยังมี *Streptomyces* sp. *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. โดย *Streptomyces* sp. ที่พบในดินมีลักษณะการสืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์และการแตกแขนงของเส้นใย ติดสีแกรมบวก ออกซิไดซ์สารอินทรีย์ได้ ทนอยู่ได้ในดินที่แห้งแล้งได้น้อยกว่าเชื้อรา และไม่ทนในสภาวะที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ไปทำลายแบคทีเรียอื่นๆ ส่วน *Pseudomonas* spp. เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ใช้สารอินทรีย์ได้หลากหลายชนิด เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน แอลกอฮอล์ ไฮโดรคาร์บอน และฮูมิกแอสิด แบคทีเรียอีกกลุ่มคือ *Bacillus* spp. ติดสีแกรมบวกและเป็นพวก Gram variable รูปร่างเป็นแท่ง สร้าง endospore แบคทีเรียกลุ่มนี้ทนอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง -5 ถึง 75ºC ทน pH ได้ในช่วง 2-8 (ดวงพร, 2545)

แบคทีเรียที่พบในหน้าดินมีจำนวน 10^7 - 10^{10} เซลล์/ดินแห้ง 1 กรัม ซึ่งมีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ และที่พบอยู่ตามหน้าดินมากมีอยู่ 3 order (สมศักดิ์, 2528) ดังนี้

1. Order Pseudomonadales ได้แก่
   - Family Pseudomonadaceae เช่น *Pseudomonas*
2. Order Eubacteriales ได้แก่
   - Family Rhizobiaceae เช่น *Rhizobium, Agrobacterium* และ *Chromobacterium*
   - Family Achromobacteriaceae ได้แก่ *Acromobacter* และ *Flavobacterium*
   - Family Micrococcaceae ได้แก่ *Micrococcus* และ *Sarcina*
   - Family Corynebacteriaceae ได้แก่ *Corynebacterium* และ *Arthrobacter*
   - Family Bacillaceae ได้แก่ *Bacillus* และ *Clostridium*
3. Order Actinomycetales
   - Family Mycobacteriaceae ได้แก่ *Mycobacterium*

โดยพบว่า *Pseudomonas*, *Arthrobacter* และ *Bacillus* เป็นพวกที่มีอยู่มากที่สุดในดิน โดยมีบทบาทในการย่อยสารอินทรีย์ได้เป็น CO_2 แร่ธาตุ และน้ำ โดยใช้เอนไซม์ที่ปล่อยออกนอกเซลล์ เช่น โปรตีเอส ไลเปส และอะไมเลส

แอคติโนมายซีท พบปริมาณมากในดินโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง $10^5 - 10^8$ เซลล์/ดินแห้ง 1 กรัม และพบในกองปุ๋ยหมัก รวมทั้งวัตถุเน่าเปื่อยอื่นๆ ในดินที่พบบ่อยมีอยู่ 4 สกุล ดังนี้

Family Mycobacteriaceae ได้แก่ *Mycobacterium*

Family Actinomycetaceae ได้แก่ *Actinomyces* และ *Nocardia*

Family Streptomycetaceae ได้แก่ *Streptomyces* และ *Micromonospora*

Family Actinoplanaceae ได้แก่ *Actinoplanes* และ *Streptosporangium*

รา มีบทบาทในการย่อยสลายอินทรียวัตถุที่ยังอวบน้ำ เช่น ปุ๋ยพืชสด บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ phytase ในดินพบจำนวนน้อยกว่าแบคทีเรียและแอคติโนมายซีท เชื้อราในดินเจริญได้ดีในดินที่มี pH เป็นกลางแต่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดได้ดี pH ที่เชื้อราส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีอยู่ในช่วง 4-8 (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541) จึงมีบทบาทมากในดินกรด โดยเฉพาะเมื่อ pH ต่ำกว่า 5 ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะชะงักการเจริญเติบโต บทบาทของเชื้อราในดินเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอินทรียวัตถุร่วมกับแบคทีเรีย มีเชื้อราหลายชนิดที่ย่อยสลายวัสดุที่ย่อยยากอย่างลิกนินและสารฮิวมิกได้ กิจกรรมของเชื้อราเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเกิดโครงสร้างของดินและการเกิด mycorrhiza ในพืช ชนิดของเชื้อราที่พบในดิน คือ

Family Moniliaceae ได้แก่ *Aspergillus, Botrytis, Cephalosporium, Monilia, Penicillium Spicaria Trichoderma* และ *Verticillium*

Family Tuberculariaceae ได้แก่ *Cylindrocarpon* และ *Fusarium*

นอกจากนั้นยังพบ *Mucor, Rhizopus, Pythium* และ *Rhizoctonia* อีกด้วย

บทบาทของราและแอคติโนมายซีทในดินคือ ช่วยในการย่อยสลายเซลลูโลส ได้เป็น CO_2 และสารประกอบคาร์บอนของเซลล์ และเกิดกรดอินทรีย์ ซึ่งกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของแบคทีเรีย ทั้งกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นยังสามารถละลายฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้

ยีสต์ ปริมาณของยีสต์ในดินมีต่ำมาก พบอยู่ในดินปริมาณตั้งแต่ 200-20,000 เซลล์ต่อดินแห้ง 1 กรัม จึงเป็นกลุ่มที่มีบทบาทน้อยในดิน เป็นเพราะยีสต์เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่

ต้องการอาหารที่เฉพาะเจาะจง หรืออินทรียวัตถุที่ย่อยสลายได้ง่ายๆ ยีสต์ที่แยกได้จากดิน ได้แก่ *Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Hansenula, Lipomyces, Pichia, Pullularia, Rhodotorulla, Saccharomyces, Schizoblastosporion, Torula, Torulaspora, Torulopsis, Trichosporon* และ *Zygosaccharomyces* ถึงแม้ว่ายีสต์มีบทบาทในดินน้อยแต่พบว่าถ้าปรับปรุงดินโดยการเติมอินทรียวัตถุโดยเฉพาะเศษพืชลงในดิน เพื่อปรับสภาพดินให้เหมาะแก่การเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ ทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นโรคพืชลดจำนวนหรือกิจกรรมลง เพราะถูกแย่งอาหารและออกซิเจน (สมศักดิ์, 2528)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษา

1. การเปลี่ยนแปลงและบทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า
2. คุณสมบัติทางเคมี - กายภาพ และธาตุอาหารพืชของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า
3. ผลของน้ำหมักลูกยอป่าต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศราชินี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบประเภทและบทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักและการผลิตน้ำหมักลูกยอป่า
2. ทราบข้อมูลทางวิทยาศาสตร์อธิบายถึงผลของน้ำหมักลูกยอป่าต่อการเจริญของมะเขือเทศราชินี
3. ผลจากการศึกษาจะเป็นข้อมูลการใช้น้ำหมักชีวภาพที่ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และลดปัญหาวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)	บริษัทผู้ผลิต
de Man Rogosa and Sharp (MRS)	Difco
Plate count agar (PCA)	Difco
Potato dextrose agar (PDA)	Difco
Phenol-red broth base (PBB) for lactic acid bacteria	Merck
WL Differential Medium (WLD)	Difco
Malt yeast glucose peptone agar (YM agar)	Difco
Fermentation medium for yeast	Difco
Urea agar base	Difco
Yeast carbon base	Difco
Yeast nitrogen base	Difco

2. สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Bromocresol purple	Merck
Chloramphenicol	Sigma
Cyclohexamide	Sigma
Hydrochloric acid	BDH
Hydrogenperoxide (ร้อยละ 35 H_2O_2)	BHD
Sodium azide	Merck
Sodium chloride	BDH
Sodium hydroxide	Merck
Sodium hydrogen phosphate	Merck
Tetracycline	Fluka

3. น้ำตาล	บริษัทผู้ผลิต
D-Xylose	Fluka
Raffinose	Sigma
D-Maltose	Fluka
Inulin	Fluka
D-Glucose	Merck
D-Galactose	Difco
Sucrose	Merck
Lactose	Fluka
D-Cellobiose	Sigma
D-Trehalose	Fluka

4. เครื่องมือและอุปกรณ์	ยี่ห้อ
Autoclave	Tomy SS 325
Auto pipette	Eppendrof
Centrifuge	รุ่น Harrier 18/80
Electrical Conductivity meter	METTLER TOLEDO
Gas chromatography (GC)	HP5890 GC-HP5972 SD
Hot plate	Corning PC-420 D
Incubator	Termake
Inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy (ICP-AES)	Rerkin Elmar Optima 4300 DV
Lamina air flow cabinet	ISSCO BVT 125
Microscope	Olympus รุ่น CH 30
pH meter	METTLER TOLEDO
Vortex mixer	AS ONE รุ่น HM-1&HM-2

5. วัตถุดิบที่ใช้ทำน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าและการปลูกมะเขือเทศราชินี

ลูกยอป่า จากจังหวัดนครศรีธรรมราช

กากน้ำตาล จากร้าน ฟ.การเกษตร อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

ถังหมักขนาด 20 ลิตร

ถุงพลาสติกดำขนาด 12x12 นิ้ว

ตาข่ายพรางแสง

ท่อพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร

6. เชื้อแบคทีเรีย

Lactobacillus plantarum TISTR 862

วิธีการทดลอง

1. การหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

การทำน้ำหมักใช้อัตราส่วนผสมลูกยอป่า: น้ำ: กากน้ำตาล เท่ากับ 3:10:1 (w/v/w) คือ ใช้ลูกยอป่าที่แก่ทั้งผล (จากจังหวัดนครศรีธรรมราช) หลังจากล้างทำความสะอาดเรียบร้อยแล้วชั่งลูกยอป่า 4.5 กิโลกรัม ผสมลงในน้ำ 15 ลิตร ที่ผสมกับกากน้ำตาล 1.5 กิโลกรัม อย่างทั่วถึงหมักในถังพลาสติกขนาด 28 ลิตร ให้มีปริมาตร 3/4 ของถัง หมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง (29 ± 2°C) โดยไม่มีการเติมหัวเชื้อและใช้ถุงพลาสติกที่สะอาดปิดทับด้านบนของปากถัง โดยใส่น้ำในถุงเพื่อช่วยไล่อากาศ (ดวงพรและวิลาวัณย์, 2547) ปิดปากถังด้วยฝาถังพลาสติก ทำการหมักจำนวน 3 ถัง ถังพลาสติกที่ใช้หมักจะมีการติดตั้งก๊อกน้ำที่ด้านล่างของตัวถังระดับสูงจากก้นถัง 8 เซนติเมตร เพื่อความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง ดังรูปที่ 5

รูปที่ 5 ถังหมักขนาด 28 ลิตร ที่ใช้หมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

2. กระบวนการหมักและลักษณะของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการหมักซึ่งได้แก่ การตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count: TBC) การตรวจนับแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria: LAB) การตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย *Zymomonas* sp. และการตรวจนับจำนวนยีสต์และรา โดยตรวจน้ำหมักวันที่ 0 3 7 14 21 28 35 42 49 และวันที่ 56 ของการหมัก ซึ่งได้เก็บน้ำหมักจากก๊อกของถังหมักด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ ด้วยการใช้สำลีปราศจากเชื้อชุบ 70% แอลกอฮอล์ เช็ดบริเวณปากก๊อกของถังหมักให้สะอาด เปิดก๊อกทิ้งน้ำหมักช่วงแรกที่ค้างอยู่ในก๊อกประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดที่ปราศจากเชื้อเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

ส่วนการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางเคมี-กายภาพ ได้เก็บตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพวันที่ 0 14 28 42 และวันที่ 56 ของการหมัก ใส่ขวดฝาเกลียวที่สะอาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ทางเคมี-กายภาพ ได้แก่ การวิเคราะห์อินทรีย์คาร์บอนและอินทรียวัตถุ วิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด (ในรูปของไนเตรต) วิเคราะห์หาปริมาณของธาตุฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม โบรอน สังกะสี แมงกานีส หาค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity: EC) ตรวจวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) วัดปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) วัดอุณหภูมิ และตรวจวิเคราะห์หาฮอร์โมนพืช 2 ชนิด คือ จิบเบอเรลลิน (gibberellins) และออกซิน (auxins)

2.2 กระบวนการหมักของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

2.2.1 การตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมด

ใช้ sterile pipette ดูดตัวอย่างน้ำหมักจำนวน 25 มิลลิลิตร ใส่ใน sterile normal saline 225 มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อ 10 เท่าเป็นลำดับใน sterile normal saline 9 มิลลิลิตร จากนั้นดูดมา 0.1 มิลลิลิตร กระจายน้ำหมักบนอาหารแข็ง Plate Count Agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2.2 การตรวจนับแบคทีเรียแลกติก

การตรวจนับทำโดยดูดตัวอย่างน้ำหมักที่ทำการเจือจางเป็นลำดับในข้อ 2.2.1 มาจำนวน 1 มิลลิลิตร กระจายน้ำหมักด้วยวิธี pour plate ใน de Man Rogosa and Sharp (MRS) ที่เติม 0.04% bromocersal purple และ 5 mg% sodium azide บ่มที่

อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง แบ่งครึ่งโคโลนีที่มีสีเหลืองรอบๆโคโลนี นำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์คาตาเลส จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่มีสีเหลืองรอบๆโคโลนีและไม่ผลิตเอนไซม์คาตาเลส คัดเลือกโคโลนีที่มีขนาด รูปร่างและสีที่แตกต่างกัน ครั้งละ 10-15 โคโลนี ขึ้นกับความแตกต่างของเชื้อ ทำเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS agar และเก็บรักษาเชื้อไว้โดย stab เชื้อใน MRS agar แล้วเก็บที่ 4°C เพื่อทำการเทียบเคียงต่อไป

2.2.3 การตรวจนับ *Zymomonas* sp.

การตรวจนับ *Zymomonas* sp. โดยใช้วิธี pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ WL differential (Difco) + 2% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีสีเขียวและให้ผลการทดสอบ catalase (+) และ oxidase (-) ตามวิธีของ John และ Nuel (1984)

2.2.4 การตรวจนับยีสต์และเชื้อรา

การตรวจนับยีสต์และเชื้อราทำโดยดูดตัวอย่างน้ำหมักที่ทำการเจือจางเป็นลำดับดังข้อ 2.2.1 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร กระจายน้ำหมักบน Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ผสม tetracycline 500 µg/ml กับ chloramphenicol 500 µg/ml (สารละลาย antibiotic เตรียมโดยชั่งยา tetracycline 500 mg และ chloramphenicol 500 mg แยกละลายใน phosphate buffer pH 7.2 ที่ปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย antibiotic ที่ได้อย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Potato dextrose agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและกำลังหลอมเหลว 100 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของยีสต์และรา คัดเลือกโคโลนีที่มีขนาด รูปร่างและสีที่แตกต่างกัน ครั้งละ 3-13 โคโลนี ขึ้นกับความแตกต่างของเชื้อ ทำเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง PDA และเก็บรักษาเชื้อไว้โดย streak เชื้อใน PDA slant แล้วเก็บที่ 4°C เพื่อทำการเทียบเคียงต่อไป

2.2.5 การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลคติก โดยนำแบคทีเรียแลคติกซึ่งคัดเลือกจากข้อ 2.2.2 รวมทั้งหมด 102 โคโลนี ถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ streak บน MRS agar นำมาย้อมสีแกรม และเทียบเคียงแบคทีเรียแลคติกในระดับจีนัส โดยอาศัยลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ รูปร่างจากการย้อมสีแกรมและลักษณะทางสรีรวิทยา ด้วยการทดสอบดังนี้ (Axelsson, 1993)

2.2.5.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้น้ำตาล (phenol red broth base) ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 1% บ่มที่ 35ºC เป็นเวลา 18-24 ชม. สังเกตการสร้างกรด โดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบและดูการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออก-ไซด์ในหลอดดักก๊าซ ถ้ามีก๊าซจัดเป็น heterofermentative lactic acid bacteria ถ้าไม่มีก๊าซหรือมีก๊าซเล็กน้อย จัดเป็น homofermentative lactic acid bacteria

2.2.5.2 การทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกจำนวน 1 loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีคาร์โบไฮเดรตในปริมาณ 2% จำนวน 13 ชนิด ได้แก่ amygdalin arabinose cellobiose esculin gluconate mannitol melezitose melibiose raffinose ribose sorbitol sucrose และ xylose บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 18-24 ชม. บันทึกผลการใช้คาร์โบไฮเดรตโดยดูจากการเปลี่ยนสีของ 0.04% bromocresol purple ในอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

2.2.5.3 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลคติกโดยใช้ Identification kit (Lacto-bacillus API 50 CHL 50300 บริษัท Bio Me'rieux, France) ซึ่งประกอบด้วย API 50 CHL เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับชุดทดสอบ API 50 CH strip ในการศึกษากระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่า ทำการทดสอบได้โดยการเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง MRS agar ที่มีอายุ 48 ชั่วโมง ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยปรับให้มีความขุ่นมากกว่า 2 McFarland จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHL ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยถ่ายเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland ในอาหาร API 50 CHL จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียม 120 ไมโครลิตร ลงใน API 50 CH strip โดยพยายามไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC อ่านผลหลังการบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลุมแรกจะเป็น negative control ส่วนผลบวกจะเกิดเนื่องจากเชื้อมีการใช้น้ำตาลและผลิตกรดออกมามีผลทำให้ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง สังเกตการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากม่วงเป็นสีเหลือง โดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 862 เป็นตัวเปรียบเทียบ นำผลที่ได้มาเทียบเคียงชนิดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ API Web Stand Alone V. 1.1.0

2.2.6 การศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อยีสต์ในน้ำหมักลูกยอป่าเพื่อใช้ในการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ตามวิธีของ Barnett *et al*. (2003)

2.2.6.1 ลักษณะทาง microscopic และ macroscopic morphology

2.2.6.1.1 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง (YM agar) โดยการ streak เชื้อยีสต์ลงบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี ได้แก่ สี ขอบ รูปร่าง ความมัน ความด้าน ผิวหน้า และลักษณะเป็นเมือก

2.2.6.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยศึกษารูปร่างและขนาดของเซลล์ ด้วยการนำเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YM ที่มีอายุ 48 ชั่วโมง ย้อมด้วยสี methylene blue ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ วัดขนาดความกว้างและความยาวของเซลล์โดยใช้ micrometer วัดเซลล์ไม่น้อยกว่า 20 เซลล์ เพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.2.6.1.3 ลักษณะการสืบพันธุ์

2.2.6.1.3.1 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยนำเชื้ออายุ 48 ชั่วโมงจากอาหารเหลว YM สังเกตการสืบพันธุ์แบบต่างๆ เช่น การแบ่งตัวแบบ fission หรือการแตกหน่อแบบ unipolar หรือ bipolar หรือ multipolar budding โดยหยดสี methylene blue และทำ wet mount แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2.6.1.3.2 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ คือ การสร้าง ascospore โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นเอียง acetate agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง ติดตามดูรูปร่างและจำนวนของ ascospore/cell หลังจากวันที่ 3 และทุกสัปดาห์ จนครบ 6 สัปดาห์

2.2.6.2 คุณสมบัติทางสรีรวิทยา

2.2.6.2.1 ความสามารถในการหมักน้ำตาล (sugar fermentation) โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีอายุ 48 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง YM ลงในอาหารเหลว YM ให้มีความขุ่นเท่ากับ +2 (+2 คือ เมื่อเทียบความขุ่นกับกระดาษขาวที่ขีดเส้นสีดำสามเส้นแต่ละเส้นหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วมองเห็นเส้นไม่ชัด) ถ่ายเชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว Fermentation medium ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 2% ยกเว้นน้ำตาล raffinose ที่มีความเข้มข้น 4% (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน บันทึกการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรด โดยดูจากการเปลี่ยนสีของ bromothymol blue จากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองและดูผลการให้ก๊าซในหลอดดักก๊าซ โดยรายงานผลดังนี้

ผลบวก (+) คือ หมักน้ำตาลได้ก๊าซเต็มหลอดภายใน 7 วัน

Slow positive (S) คือ หมักน้ำตาลได้ก๊าซเต็มหลอดหลังจาก 7 วัน

ผลลบ (-) คือ ไม่หมักน้ำตาล

โดยน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ คือ D-xylose raffinose D-maltose inulin D-glucose D-galactose sucrose lactose D-cellobiose และ D-trehalose

2.2.6.2.2 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน (Assimilation of carbon compound) โดยถ่ายเชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบโดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีอายุ 48 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง YM ลงในอาหารเหลว YM ให้มีความขุ่นเท่ากับ +2 (+2 คือ เมื่อเทียบความขุ่นกับกระดาษขาวที่ขีดเส้นสีดำสามเส้นแต่ละเส้นหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วมองเห็นเส้นไม่ชัด) ถ่ายเชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว yeast nitrogen base (ภาคผนวก ก) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง

น้ำตาลที่ใช้ทดสอบในการทดลองนี้มีความเข้มข้น 2% ยกเว้นน้ำตาล raffinose ที่มีความเข้มข้น 4% น้ำตาลที่ใช้ทดสอบคือ maltose D-galactose D-sucrose lactose raffinose D-glucose xylose inulin D-cellobiose D-trehalose

นอกจากนี้ยังทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตและใช้สารชนิดต่างๆของยีสต์อีกดังนี้คือ ethanol และ methanol ความเข้มข้นละ 1.5% (ในอาหาร Assimilation of carbon compound ดังภาคภาคผนวก ก) NaCl ความเข้มข้น 10 และ 16% (ในอาหาร YM agar) 0.01% cyclohexamide 0.10% cyclohexamide (ภาคผนวก ก) citrate และ urea 2% (ภาคผนวก ก)

การอ่านผลการทดสอบ

โดยดูจากความขุ่นของอาหารโดยนำกระดาษที่ขีดเส้นสีดำหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร มาทาบด้านหลังของหลอดทดลอง แล้วบันทึกผลดังนี้

+1 คือ อาหารขุ่นแต่เห็นเส้นสีดำด้านหลังหลอดทดลองชัดเจนแสดงว่ามีการเจริญเติบโตของยีสต์น้อย

+2 คือ เห็นเส้นสีดำด้านหลังหลอดทดลองรางๆ แสดงว่าเชื้อเจริญได้ดี

+3 คือ ถ้ามองไม่เห็นเส้นแสดงว่าเชื้อเจริญได้ดีมาก

ผลลบ คือ เส้นสีดำชัดเจนและอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลได้

การรายงานผล

ผลบวก (+) คือ ใช้น้ำตาลได้ มีค่าความขุ่น +2 หรือ +3 ภายใน 7 วัน

Slow positive (S) คือ ใช้น้ำตาลได้ช้ามีค่าความขุ่น +2 หรือ +3 หลังจาก 7 วัน

ผลลบ (-) คือ ไม่สามารถใช้น้ำตาลได้

2.2.6.3 ลักษณะทางอณูวิทยาด้วยวิธี 26S rDNA sequencing โดยส่งตัวอย่างตรวจที่หน่วย MU-OU : CRC คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเลือก Single colony จาก YM agar เลี้ยงใน YM broth 6-12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35ºC ปั่นเก็บเซลล์เชื้อที่ 10000 rpm 5 นาที เทอาหารที่เหลือทิ้ง นำตัวเซลล์มาละลายใน TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วต้มเซลล์ในน้ำเดือด 10-15 นาที ปั่นตกตะกอนซากเซลล์ที่ความเร็ว 10000-12000 rpm 5 นาที เก็บสารละลาย DNA สำหรับใช้เป็น DNA Template เมื่อสกัด genomic DNA จากยีสต์ จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เฉพาะส่วนที่ต้องการ (26S rDNA) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดได้เป็นแม่แบบ ทำ Sequencing Reaction จากนั้นอ่านลำดับเบสของ DNA โดยนำ product ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencing นำลำดับเบสของ DNA ที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในอินเทอร์เนต เพื่อหาชนิดของเชื้อที่มีลำดับเบสของ DNA (ในที่นี้คือส่วน 26S rDNA) ใกล้เคียงกับเชื้อที่ศึกษามากที่สุด โดยเข้าไปที่เวบไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) จากนั้นเลือก BLAST แล้วเลือก Nucleotide-nucleotide BLAST (blast) จะขึ้นหน้าต่างใหม่ให้เราใส่ข้อมูลลงไป จากนั้น copy ลำดับเบสใส่ในช่อง Search กดปุ่ม BLAST! จะมีหน้าต่างใหม่เปิดขึ้นมา รอจนข้อมูลโหลดเสร็จเรียบร้อยดูผลของการ Blast ซึ่งลำดับของเชื้อที่ขึ้นในบรรทัดแรกจะมีความใกล้เคียงกับเชื้อที่นำมาเทียบที่สุด ความเหมือนจะลดลงจากบรรทัดบนลงไปบรรทัดล่างตามลำดับ

2.3 ลักษณะของน้ำหมักลูกยอป่า

2.3.1 การวิเคราะห์อินทรีย์คาร์บอนและอินทรียวัตถุในน้ำหมักชีวภาพโดยวิธี Walkley and Black method (จำเป็น, 2547)

การวิเคราะห์อินทรียวัตถุ โดยใช้ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าวันที่ 0 14 28 42 และ 56 จำนวน 2 มิลลิลิตร รายละเอียดการวิเคราะห์ดังภาคผนวก ข

2.3.2 ตรวจวัด pH และวัดอุณหภูมิ

เก็บตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าวันที่ 0 14 28 42 และ 56 จากถังหมักจำนวน 50 มิลลิลิตรใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร วัดอุณหภูมิของน้ำหมักโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ จากนั้นวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

2.3.3 ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity: EC)

นำตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่เก็บจากข้อ 2.3.2 ที่ระยะเวลาต่างๆ วัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง Electrical conductivity meter

2.3.4 ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity)

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าวันที่ 0 14 28 42 และ 56 จากตัวอย่างข้อ 2.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดโดยใช้วิธีการไตเตรตและคำนวณในรูปของกรดแลกติก (AOAC, 2002) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข

2.3.5 วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าวันที่ 0 14 28 42 และ 56 จากตัวอย่างข้อ 2.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของกลูโคสโดยใช้ phenol sulfuric method (Dubolis *et al*., 1956) (ภาคผนวก ข)

2.3.6 ไนโตรเจนทั้งหมด

วิเคราะห์โดยใช้ Crack Set 20 (MERCK) ซึ่งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนในตัวอย่างถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไนเตรตด้วยสารออกซิไดซ์และการย่อยสลายด้วยวิธีของ Koroleff โดยใช้ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าวันที่ 0 14 28 42 และ 56 ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำที่ปราศจากอิออน 10 มิลลิลิตร ใส่ R_1 reagent 0.1 กรัม (potassium peroxodisulphate, potassium carbonate) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นใส่ R_2 reagent (40% NaOH w/v) 6 หยด ให้ความร้อนในเครื่อง preheated thermoreactor TR 200 (MERCK) ที่อุณหภูมิ 120ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นวิเคราะห์ไนเตรตด้วยชุด Merckoquant® Nitrate test (MERCK) โดยใส่ reagent NO_3-1A 0.1 กรัม และ reagent NO_3-2A 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectroquant ® NOVA 60 (MERCK)

2.3.7 ฟอสฟอรัสทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในตัวอย่างด้วยชุด Phosphate test (MERCK) ด้วยการเปลี่ยนฟอสฟอรัสหรือฟอสเฟตในรูปต่างๆมาเป็น soluble orthophosphate (PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}, H_2PO^{4-}) โดยการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น จากนั้นทำให้เกิดสีด้วยวิธี Vannado molybdophosphoric acid โดยการวิเคราะห์ใช้

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าวันที่ 0 14 28 42 และ 56 ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากอิออน 10 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร นำไปย่อยในเครื่อง preheated thermoreactor TR 200 (MERCK) ที่อุณหภูมิ 120ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ดูดตัวอย่างที่ได้ 5 มิลลิลิตรผสมกับ reagent PO_4-1 1.2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 313 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectroquant ® NOVA 60 (MERCK)

2.3.8 วิเคราะห์หาปริมาณของธาตุ โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม โบรอน สังกะสีและแมงกานีส ใช้เครื่อง Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าวันที่ 0 14 28 42 และ 56 ทำการย่อยโดยใช้ตัวอย่างน้ำหมัก 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Vycor ตั้งบน hot plate เติมกรดไนตริกเข้มข้น 65% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เปิดไฟอ่อนๆ ในตู้ควันจนของเหลวระเหยหมด ทำจนครบ 3 รอบ ทิ้งให้เย็น นำมาละลายด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 10% แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นปรับให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ deionized water สารละลายกรดเจือจางที่มีแร่ธาตุละลายอยู่จะถูกดูดเข้าเครื่อง Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของแร่ธาตุ

2.3.9 การตรวจวิเคราะห์หาฮอร์โมนพืชในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

การทำแห้งด้วยการใช้น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าวันที่ 0 14 28 42 และ 56 ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ตัวอย่างเย็นตัวลงและแข็งตัวกลายเป็นน้ำแข็งด้วยการใช้เครื่อง Shell Freezer ที่อุณหภูมิ -10ºC แล้วเข้าสู่ระบบการทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze Dryer โดยอาศัยหลักการระเหิด คือ การเปลี่ยนแปลงของสารในสถานะของแข็งไปสู่สถานะก๊าซ ก๊าซที่ไม่สามารถควบแน่นได้ถูกดูดด้วย vacuum pump ส่วนก๊าซที่ควบแน่นได้จะถูกนำออกโดยระบบควบแน่น (condensing system) ซึ่งเป็นระบบเย็นที่จับโมเลกุลของน้ำออกจากสารตัวอย่าง เมื่อตัวอย่างแห้งดีแล้วนำออกมาเก็บในขวดพลาสติกและเก็บที่อุณหภูมิ 4-8ºC เพื่อตรวจหาฮอร์โมนพืช Gibberellins และ Auxins ดังนี้คือ

Gibberellins

ชั่งตัวอย่างน้ำหมักลูกยอป่าที่ผ่านการทำแห้งแล้ว 0.1 กรัม ละลายใน 80% methanol 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลายเข้ากันเป็นอย่างดี จากนั้นจุดตำแหน่งที่

จะหยดตัวอย่างบนแผ่น Silica gel thin layer chromatography ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ให้มีระยะห่างจากขอบด้านล่างประมาณ 1 นิ้ว หยดตัวอย่างที่ละลายดีแล้วลงบนแผ่น Silica gel thin layer chromatography 50 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งแล้วนำไปไว้ใน Solvent tank ที่มี isopropanol: น้ำ: แอมโมเนีย เท่ากับ 8: 1: 1 เป็นตัวพา ปล่อยให้ตัวอย่างเคลื่อนที่ด้วยตัวพาจนถึงระยะทาง 10 เซนติเมตร นำแผ่น Silica gel thin layer chromatography ออกมารอให้แห้งก่อนพ่นด้วยสารละลายโปแทสเซียมเปอร์แมงกาเนส 1% วัดอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปอยู่ เปรียบเทียบกับระยะทางที่ตัวพาเคลื่อนที่ไปจนสุด เพื่อคำนวณหาค่า Rf จากสูตร ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้หารด้วยระยะทางที่ตัวพาเคลื่อนที่ได้ แล้วเปรียบเทียบกับสารฮอร์โมนมาตรฐาน คือ gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร (Aroonrungsikul *et al*., 1993)

Auxins

ชั่งตัวอย่างน้ำหมักลูกยอป่าที่ผ่านการทำแห้งแล้ว 0.1 กรัม ละลายใน 80% methanol 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลายเข้ากันเป็นอย่างดี จากนั้นจุดตำแหน่งที่จะหยดตัวอย่างบนแผ่น Silica gel thin layer chromatography ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ให้มีระยะห่างจากขอบด้านล่างประมาณ 1 นิ้ว หยดตัวอย่างที่ละลายดีแล้วลงบนแผ่น Silica gel thin layer chromatography 50 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งแล้วนำไปไว้ใน Solvent tank ที่มี chloroform: methanol: water เท่ากับ 84: 14: 1 เป็นตัวพา ปล่อยให้ตัวอย่างเคลื่อนที่ด้วยตัวพาจนถึงระยะทาง 10 เซนติเมตร นำแผ่น Silica gel thin layer chromatography ออกมารอให้แห้งก่อนพ่นด้วย Van Urk-Salkowski reagent (Ehmann, 1977) (ภาคผนวก ก) วัดอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปอยู่ เปรียบเทียบกับระยะทางที่ตัวพาเคลื่อนที่ไปจนสุด เพื่อคำนวณหาค่า Rf จากสูตร ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้หารด้วยระยะทางที่ตัวพาเคลื่อนที่ได้ แล้วเปรียบเทียบกับสารฮอร์โมนมาตรฐาน คือ indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร

2.3.10 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อพืชของน้ำหมัก

หลังหมักลูกยอป่าได้ 56 วัน ได้ตรวจสอบความเป็นพิษต่อพืชด้วยการทดสอบการงอกของเมล็ดมะเขือเทศราชินีตามวิธีของ Wong *et al*. (2001) โดยการใช้น้ำหมักลูกยอป่าที่มีอายุการหมัก 56 วัน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที กรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ ใช้ตัวอย่างที่

ผ่านการกรองแล้ว 5 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.) ที่รองก้นด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วใส่เมล็ดมะเขือเทศราชินี 10 เมล็ด วางแบบกระจายลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (ทำ 3 ซ้ำ) บ่มไว้ในที่มืดและอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง คำนวณค่าดัชนีการงอก (germination index : GI) ตามสูตรของ Hoekstra *et al*. (2002) (ภาคผนวก ข) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

2.3.11 การหาปริมาณกรดอินทรีย์โดยใช้ Gas chromatography

น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่มีอายุการหมักได้ 56 วัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4ºC นำส่วนใสที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร แล้วฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography HP 6850 โดยใช้ column HP 6850, inlet temperature 240ºC, oven initial temperature 75ºC 1 นาที, ramp to 180ºC at 5ºC/min, ramp to 230ºC (5 min) at 15ºC/min และใช้ flame ionization detector ตามวิธีของ Yang และ Choong (2001)

3. น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศราชินี

1. การวางแผนการทดลอง

ทำการทดลองในถุงพลาสติกดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว และมีความสูง 12 นิ้ว จำนวนทั้งหมด 96 ถุง โดยแต่ละถุงบรรจุดิน 10 กิโลกรัม และเป็นการเก็บตัวอย่างแบบทำลาย (destructive sampling) ในการเก็บแต่ละครั้ง โดยมีชุดการทดสอบดังนี้

ชุดการทดสอบที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย (no fertilizer: N) เป็นชุดควบคุม

ชุดการทดสอบที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 8.25 กรัมต่อถุงต่อครั้ง หรืออัตรา 80 กิโลกรัมต่อไร่ (chemical fertilizer: CF) โดยใส่ปุ๋ยวันที่ 0 15 30 และ 45 หลังย้ายปลูก

ชุดการทดสอบที่ 3 ใส่น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่เจือจางในอัตรา 1: 200 (5 มิลลิลิตร/น้ำ 1 ลิตร) ในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อถุง (fermented wild forest noni extract: F) โดยใส่วันที่ 0 หลังย้ายปลูกและหลังจากนั้นทุกๆ 7 วัน เป็นจำนวน 12 ครั้ง

ชุดการทดสอบที่ 4 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 4.125 กรัมต่อถุงต่อครั้ง โดยใส่ปุ๋ยวันที่ 0 15 30 และ 45 หลังย้ายปลูกและใส่น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่เจือจางในอัตรา 1: 400 (2.5 มิลลิลิตร/น้ำ 1 ลิตร) ในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อถุง โดยใส่วันที่ 0 หลังย้ายปลูกและหลังจากนั้นทุกๆ

7 วัน เป็นจำนวน 12 ครั้ง (chemical fertilizer+fermented wild forest noni juice: CF)

2. การเตรียมดิน

นำตัวอย่างดินที่ใช้สำหรับปลูกมะเขือเทศราชินีซึ่งเป็นตัวอย่างดินจาก ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา มาย่อยเก็บเศษรากพืชออกจากดินให้หมด คลุกดินให้เข้ากันแล้วผึ่งแดดให้แห้ง ผสมดินตามชุดการทดสอบทั้ง 4 ชุด หลังจากนั้นบรรจุดินลงในถุง ถุงละ 10 กิโลกรัม

3. การวิเคราะห์เนื้อดิน

วิเคราะห์ร้อยละของทราย (Sand) ทรายแป้ง (Silt) และดินเหนียว (Clay) แล้วนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ มาแจกแจงประเภทของเนื้อดิน (soil textural class) โดยเปรียบเทียบกับชั้นเนื้อดินตามเกณฑ์ของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (United States Department of Agriculture textural class) (Soil Survey Division Staff, 1993)

4. การปลูกและการบำรุงรักษา

การปลูกมะเขือเทศราชินี

ในการทดลองครั้งนี้ปลูกในแปลงเพาะปลูกจำลองที่มีตาข่ายพรางแสงเย็บโดยรอบมีขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 2 x 15 x 2 เมตร และวางถุงปลูกมะเขือเทศแต่ละถุงซึ่งมีดินของชุดทดสอบแบบต่างๆ ทั้ง 4 ชุดการทดสอบโดยวางแบบสุ่มและปลูกต้นกล้ามะเขือเทศราชินีที่มีอายุ 30 วัน ดังรูปที่ 6

รูปที่ 6 ลักษณะของแปลงเพาะปลูกจำลอง ตั้งอยู่ที่ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

3.1 เมล็ดมะเขือเทศราชินี การปลูกใช้วิธีเพาะในกระบะเพาะต้นกล้าที่มีขนาด 45 x 60 เซนติเมตร ลึก 10 เซนติเมตร และเจาะรูระบายน้ำที่ด้านล่างของกระบะเพาะ ส่วนดินที่ใช้เพาะตากดินให้แห้งโดยใช้เวลา 3 อาทิตย์ จากนั้นร่อนดินที่ตากแห้งดีแล้ว 3 ส่วน ปุ๋ยคอก 1 ส่วน แกลบ 1 ส่วน คลุกเคล้าให้เข้ากันและปรับผิวหน้าดินให้เรียบ แล้วโรยเมล็ดมะเขือเทศราชินีให้เป็นแถวโดยใช้ไม้ทาบเป็นร่องเล็กๆ ระยะห่างกันระหว่างแถวประมาณ 5 เซนติเมตร แล้วกลบเมล็ดด้วยแกลบบางๆ รดน้ำให้ชุ่ม เมื่อต้นกล้าอายุได้ 15 วัน ย้ายลงใส่ถุงพลาสติกขนาด 4 x 6 นิ้ว ซึ่งบรรจุดินผสมอยู่ หลังจากมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 1 เดือน คัดเลือกต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกันย้ายลงปลูกในแต่ละถุงของแต่ละชุดการทดสอบ ถุงละ 1 ต้น

3.2 การใส่ปุ๋ยเคมีครั้งละ 8.25 กรัม (ชุดการทดสอบ 2) และครั้งละ 4.125 กรัม (ชุดการทดสอบ 4) โดยใส่จำนวน 4 ครั้ง คือ วันที่ 0 จะผสมคลุกเล้าให้เข้ากับดินก่อนปลูก แล้วหลังจากนั้นจะใส่ปุ๋ยวันที่ 15 30 และ 45 หลังจากย้ายลงปลูก

3.3 การใส่น้ำหมัก ใช้น้ำหมักที่เจือจางในอัตรา 1:200 ในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อถุง (ชุดการทดสอบ 3) และใส่น้ำหมักที่เจือจางในอัตรา 1: 400 ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ชุดการทดสอบ 4) เมื่อวันที่ 0 และรดที่โคนต้นทุกๆ 7 วัน เป็นจำนวน 12 ครั้ง (90 วัน ของการปลูก)

ทุกชุดการทดลองมีการรดน้ำวันละ 1 ครั้ง ในปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อถุง

5. การเก็บตัวอย่างดิน

ก่อนปลูกพืช เก็บตัวอย่างดินที่จะใช้ปลูกในแต่ละชุดการทดสอบด้วยการใช้ท่อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร เก็บดินในถุงแบบทแยงมุมจนถึงก้นถุง จากนั้นผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ใส่ในถุงพลาสติกประมาณ 0.5 กิโลกรัม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เนื้อดิน สมบัติทางจุลชีววิทยาและสมบัติทางเคมีของดิน (วันที่ 0)

ระหว่างที่ทำการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างดินทั้ง 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ตัวอย่าง ที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 วัน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางจุลชีววิทยาและสมบัติทางเคมีของดิน โดยมีรายละเอียดดังจะกล่าวต่อไป

6. จุลชีววิทยาของดิน

ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 25 กรัม ใส่ใน sterile normal saline 225 มิลลิลิตร เพื่อเจือจาง 10 เท่า และเจือจางครั้งละ 10 เท่า เป็นลำดับใน sterile normal saline 9 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามข้อ 2.2.1 วิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียแลกติก ตามข้อ 2.2.2 และวิเคราะห์หาปริมาณยีสต์และรา ตามข้อ 2.2.4

7. คุณสมบัติทางเคมี- กายภาพของดิน

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของดิน โดยตรวจวิเคราะห์ ค่า pH (ใช้อัตราส่วน ดิน:สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 1 โมลาร์ เท่ากับ 1:5) ค่าการนำไฟฟ้า (ใช้อัตราส่วน ดิน:น้ำ เท่ากับ 1:5) วิเคราะห์ปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมด ตามข้อ 2.3.6 ฟอสฟอรัสทั้งหมด ตามข้อ 2.3.7 โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส โบรอน สังกะสีตามข้อ 2.3.8 และอินทรียวัตถุโดย Walkley and Black method ตามข้อ 2.3.1 (ภาคผนวก ข)

8. การเจริญเติบโตของพืช

การบันทึกการเจริญเติบโตในวันแรกที่ย้ายลงปลูก หลังจากนั้นบันทึกในวันที่ 30 60 และวันที่ 90 ประกอบด้วย

8.1 ความสูงของลำต้น (เซนติเมตร) โดยวัดความสูงเป็นเซนติเมตรจากโคนต้นติดผิวดินถึงปลายยอดที่สูงที่สุด

8.2 ขนาดของทรงพุ่ม (เซนติเมตร) วัดความกว้างของทรงพุ่มในลักษณะธรรมชาติโดยไม่ยกปลายใบที่ย้อยลง

8.3 เส้นรอบวงของลำต้น (เซนติเมตร) ใช้เส้นเชือกวัดรอบลำต้น โดยวัดบริเวณลำต้นซึ่งสูงจากผิวดินประมาณ 5 เซนติเมตร แล้วนำไปทาบกับเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าดัชนีการงอก (Germination index) ใช้ One-Way Analysis of Variance จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Duncan's Multiple Comparison Test และการวิเคราะห์ ค่า pH ของดิน, ค่า EC ของดิน, ธาตุอาหารในดิน จุลินทรีย์ในดิน, การเจริญเติบของต้นมะเขือเทศราชินีทั้งด้านความสูง ขนาดของทรงพุ่มและขนาดของลำต้นโดยใช้เครื่องมือทางสถิติ คือ Multivariate General Linear Model เนื่องจากมีการวัดตัวแปรตามหลายตัวพร้อมกันและวัดซ้ำ (หลายครั้ง) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดสอบ โดยใช้ Duncan's Multiple Rang Test นำเสนอในรูปค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ผลสถิติใช้โปรแกรม SPSS version 10.1 สำหรับ Windows

บทที่ 3

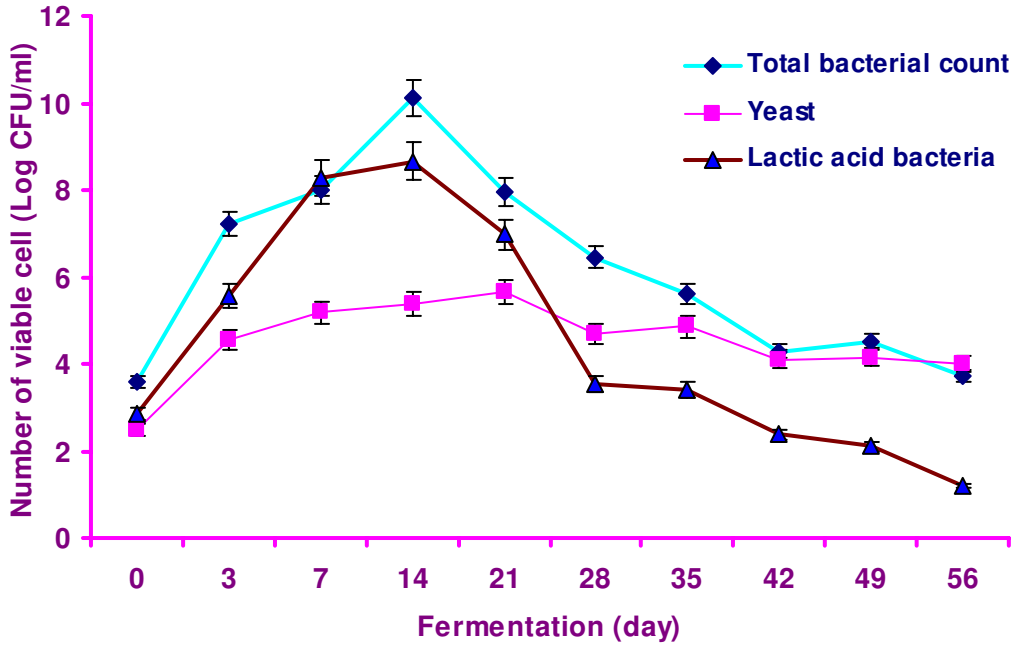
ผลการทดลอง

1. ผลของกระบวนการหมักและลักษณะของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

1.1 ผลทางจุลชีววิทยาในกระบวนการหมักของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

1.1.1 ผลการตรวจนับจุลินทรีย์

จากผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (TBC) และแบคทีเรียแลคติก (LAB) เริ่มต้นการหมักมีปริมาณ 3.59 และ 2.85 log CFU/ml ตามลำดับ ดังรูปที่ 7 ในวันที่ 3 ของการหมักพบว่ามีปริมาณเพิ่มอย่างรวดเร็ว คือ TBC เท่ากับ 7.22 log CFU/ml และ LAB เท่ากับ 5.54 log CFU/ml และมีปริมาณสูงสุดเมื่อน้ำหมักมีอายุได้ 14 วัน คือมีปริมาณ TBC เท่ากับ 10.11 log CFU/ml และ LAB เท่ากับ 8.65 log CFU/ml หลังจากนั้นวันที่ 21 มีปริมาณ TBC และ LAB ลดลงเหลือ 7.96 และ 6.96 log CFU/ml และเมื่อสิ้นสุดการหมัก (56 วัน: 8 สัปดาห์) มีปริมาณ TBC และ LAB เหลือ 3.71 และ 1.19 log CFU/ml ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของจำนวนยีสต์พบว่าเริ่มต้นมี 2.47 log CFU/ml หลังจากนั้นวันที่ 3 7 และวันที่ 14 มีปริมาณค่อยๆเพิ่มขึ้นเป็น 4.56 5.18 และ 5.37 log CFU/ml ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นแบบช้าๆ โดยมีปริมาณสูงสุดเมื่อน้ำหมักมีอายุได้ 21 วัน คือ 5.65 log CFU/ml และเมื่อวันที่ 28 กลับลดลงเหลือ 4.69 log CFU/ml เมื่อสิ้นสุดการหมัก (56 วัน) มีปริมาณยีสต์เหลือ 3.99 log CFU/ml เชื้อราพบเฉพาะเมื่อเริ่มต้นการหมัก มีจำนวน 2.88 log CFU/ml หลังจากนั้นตลอดการหมักตรวจไม่พบเชื้อรา ส่วนการตรวจนับจำนวน *Zymomonas* sp. ไม่พบตลอดระยะเวลาการหมัก



รูปที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์และแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการหมักลูกยอป่าที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

1.1.2 การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

การเทียบเคียงเพื่อระบุชนิดแบคทีเรียแลคติกที่ได้แยกจากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าตลอดระยะเวลาการหมักจำนวน 102 ไอโซเลท พบว่าทุกไอโซเลทย้อมติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนโดสปอร์ ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลสให้ผลเป็นลบแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแลคติก และพบว่าทุกไอโซเลทมีรูปร่างเป็นแท่ง เจริญได้ทั้งในสภาพมีอากาศและไม่มีอากาศ ดังนั้นทุกไอโซเลทเป็นสกุล *Lactobacillus* การตรวจสอบความสามารถในการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคสและทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต 13 ชนิด คือ amygdalin arabinose cellobiose esculin gluconate mannitol melezitose melibiose raffinose ribose sorbitol sucrose และ xylose เพื่อจัดกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้ง 102 ไอโซเลท พบว่าทุกไอโซเลทหมักน้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊สและจากผลทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ (ตารางที่ 7 และ ตารางภาคผนวก ค ที่ 1) จึงคัดเลือกจำนวน 14 ไอโซเลท ตามอายุการหมักที่ระยะเวลาต่างๆ คือ วันที่ 0 7 14 21 28 35 42 49 และ 56 มาเทียบเคียงในระดับ species ด้วยการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต โดย API 50 CHL test โดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR862 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบแล้วนำผลที่ได้ไปเทียบเคียงชนิดโดยใช้โปรแกรม คอมพิวเตอร์ API Web Stand

Alone V. 1.1.0 พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* (99.5% identity) 8 ไอโซเลท (WF0-1, WF7-1, WF14-1, WF14-3, WF21-1, WF35-1, WF49-1, WF49-9) เป็น *Lactobacillus plantarum* (99.9% identity) 5 ไอโซเลท (WF7-7, WF28-1, WF35-4, WF42-1, WF56-1) และเป็น *Lactobacillus pentosus* (99.9% identity) 1 ไอโซเลท (WF21-6) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 7 การทดสอบทางชีวเคมีของตัวแทนแบคทีเรียแลคติกจำนวน 14 สายพันธุ์ เทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

อายุการหมัก (วัน)	ไอโซเลต	ผลการทดสอบการใช้น้ำตาล												
		Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Gluconate	Mannitol	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose
0	WF0-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	WF7-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
14	WF14-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
21	WF21-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	WF28-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
35	WF35-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF35-4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
42	WF42-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
49	WF49-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF49-9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
56	WF56-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactobacillus plantarum TISTR862		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

หมายเหตุ: + = เติบโต

- = ไม่เติบโต

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลคติกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH test และ Program computer API Web Stand Alone V.1.1.0

Fermentation (day)	Number of isolate	Isolates	Specific LAB	% Identity
		L. plantarum TISTR 862*	*L. plantarum*	99.9%
0	10	WF0-1	*L. plantarum*	99.5%
7	10	WF7-1	*L. plantarum*	99.5%
		WF7-7	*L. plantarum*	99.9%
14	13	WF14-1	*L. plantarum*	99.5%
		WF14-3	*L. plantarum*	99.5%
21	15	WF21-1	*L. plantarum*	99.5%
		WF21-6	*L. pentosus*	99.9%
28	12	WF28-1	*L. plantarum*	99.9%
35	10	WF35-1	*L. plantarum*	99.5%
		WF35-4	*L. plantarum*	99.9%
42	12	WF42-1	*L. plantarum*	99.9%
49	10	WF49-1	*L. plantarum*	99.5%
		WF49-9	*L. plantarum*	99.5%
56	10	WF56-1	*L. plantarum*	99.9%

* สายพันธุ์ที่ใช้อ้างอิงหรือเปรียบเทียบ

1.1.3 ลักษณะบางประการของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่า

ลักษณะบางประการของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่าในช่วงเวลาต่างๆของการหมักคือ วันที่ 0 7 14 21 28 35 42 49 และ 56 จำนวน 84 ไอโซเลท เมื่อพิจารณาจากลักษณะ colony ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูจากรูปร่างและขนาดของเซลล์ การสืบพันธุ์ ความสามารถในการหมักและการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์สามารถแบ่งยีสต์ที่พบในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 32 ไอโซเลท (38%) ขนาดของเซลล์เฉลี่ย 5.5 x 7 µm ± SD 0.9 x 0.6 µm โดยที่ colony มีลักษณะกลม สีขาว ขอบเรียบ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อและมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore รูปร่างกลม จำนวน 1-4 ascospore ต่อ ascus ในอาหารแข็ง acetate agar เวลา 7 วัน (ตารางที่ 9) สามารถใช้และหมักน้ำตาล glucose sucrose cellobiose ได้เร็ว แต่ใช้และหมักน้ำตาล raffinose maltose galactose ได้ช้า ส่วนน้ำตาล xylose inulin lactose trehalose ยีสต์กลุ่มนี้ไม่สามารถใช้หรือหมักได้ นอกจากนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ใน ethanol และอาหารที่มีเกลือ (NaCl) 10% ทั้งยังสามารถใช้ citrate ได้ แต่ไม่เติบโตใน methanol อาหารที่มีเกลือ (NaCl) 16% cyclohexamide เข้มข้น 0.01% และ 0.10% ทั้งยังไม่สามารถใช้ urea ได้ (ตารางที่ 10 ตารางที่ 11 และตารางที่ 12) และผลการทดสอบยีสต์กลุ่มนี้จำนวน 1 ไอโซเลท ด้วยวิธี 26S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% และบ่งชี้ว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae* ดังรูปในภาคผนวก ค 1 และตารางที่ 13

กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 26 ไอโซเลท (31%) ขนาดของเซลล์เฉลี่ย 5 x 7.5 µm ± SD 0.9 x 0.7 µm โดยที่ colony มีลักษณะกลม สีขาว ผิวหน้าด้าน ขอบเรียบ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อและมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore รูปหมวก จำนวน 4 ascospore ต่อ ascus ในอาหารแข็ง acetate agar เวลา 28 วัน (ตารางที่ 9) สามารถใช้และหมักน้ำตาล maltose galactose sucrose raffinose glucose ได้อย่างเร็ว แต่ไม่สามารถใช้และหมักน้ำตาล xylose inulin lactose cellobiose ได้ ส่วนน้ำตาล trehalose ยีสต์กลุ่มนี้สามารถหมักได้อย่างช้าๆ นอกจากนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ใน ethanol และอาหารที่มีเกลือ (NaCl) 10% แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตใน Methanol อาหารที่มีเกลือ (NaCl)16% cyclohexamide เข้มข้น 0.01% และ 0.10% ทั้งยังไม่สามารถใช้ citrate และ urea ได้ (ตารางที่ 10 ตารางที่ 11 และตารางที่ 12) และเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี 26S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียงและบ่งชี้ว่าเป็น *Pichia anomala* ที่ระดับความเชื่อมั่น 100% ดังรูปในภาคผนวก ค 2 และตารางที่ 13

กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 24 ไอโซเลท (28.6%) ขนาดของเซลล์เฉลี่ย 4 x 6.5 µm ± SD 0.8 x 0.9 µm โดยที่ colony มีลักษณะกลม ผิวหน้าด้าน สีครีม ขอบเรียบ มีการสืบพันธุ์

แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อและมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore รูปหมวก จำนวน 4 ascospore ต่อ ascus ในอาหารแข็ง acetate agar เวลา 21 วัน (ตารางที่ 9) สามารถใช้น้ำตาล glucose ได้ แต่ไม่สามารถใช้และหมักน้ำตาล xylose raffinose maltose inulin galactose sucrose lactose cellobiose และ trehalose ได้ นอกจากนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ใน ethanol และ อาหารที่มีเกลือ (NaCl) 10% แต่ไม่เจริญเติบโตใน methanol อาหารที่มีเกลือ (NaCl) 16% cyclohexamide เข้มข้น 0.01% และ 0.10% ทั้งยังไม่สามารถใช้ citrate และ urea ได้ (ตารางที่ 10 ตารางที่ 11 และตารางที่ 12) และผลการทดสอบด้วยวิธี 26S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Pichia membranifaciens* ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% และบ่งชี้ว่าเป็น *Pichia membranifaciens* ดังรูปในภาคผนวก ค 3 และตารางที่ 13

กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 2 ไอโซเลท (2.4%) ขนาดของเซลล์เฉลี่ย 5 x 11 µm ± SD 0.9 x 1.7 µm โดยที่ colony มีลักษณะกลม สีชมพู ผิวหน้ามัน ขอบเรียบ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore (ตารางที่ 9) สามารถใช้น้ำตาล maltose galactose sucrose raffinose glucose xylose ได้เร็ว แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล lactose inulin cellobiose ได้ ยีสต์กลุ่มนี้ไม่สามารถหมักน้ำตาล xylose raffinose maltose inulin glucose galactose sucrose lactose cellobiose trehalose ได้ นอกจากนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ใน ethanol อาหารที่มีเกลือ (NaCl) 10% และ 16% cyclohexamide เข้มข้น 0.01% และ 0.10% ทั้งยังสามารถใช้ citrate และ urea ได้ แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตใน Methanol ได้ (ตารางที่ 10 ตารางที่ 11 และตารางที่ 12) และเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี 26S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียงและบ่งชี้ว่าเป็น *Rhodotorula mucilaginosa* ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ดังรูปในภาคผนวก ค 4 และตารางที่ 13

ตารางที่ 9 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ กันของการหมัก

คุณสมบัติ	ยีสต์			
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
จำนวนไอโซเลต	32	26	24	2
ลักษณะโคโลนี	สีขาว ผิวหน้ามัน ขอบเรียบ	สีขาว ผิวหน้าด้าน ขอบเรียบ	สีครีม ผิวหน้าด้าน ขอบเรียบ	สีชมพู ผิวหน้ามัน ขอบเรียบ
ขนาดเซลล์ (μm)	5.5 x 7	5 x 7.5	4 x 6.5	5 x 11
การสืบพันธุ์	ascospore	ascospore	ascospore	asexual spore

ตารางที่ 10 ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ กันของการหมัก

Sugar fermentation test	Isolate			
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Number of isolate	32	26	24	2
Xylose	-	-	-	-
Raffinose	S	+	-	-
Maltose	S	+	-	-
Inulin	-	-	-	-
Glucose	+	+	-	-
Galactose	S	+	-	-
Sucrose	+	+	-	-
Lactose	-	-	-	-
Cellobiose	+	-	-	-
Starch	+	-	-	-
Trehalose	-	S	-	-

หมายเหตุ (+) คือ หมักน้ำตาลได้ก๊าซเต็มหลอดภายใน 7 วัน

(S) คือ หมักน้ำตาลได้ก๊าซเต็มหลอดหลังจาก 7 วัน (Slow positive)

(-) คือ ไม่หมักน้ำตาล

ตารางที่ 11 ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ กันของการหมัก

Sugar assimilation test	Isolate			
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Number of isolate	32	26	24	2
Maltose	+	+	-	+
Galactose	+	+	-	+
Sucrose	+	+	-	+
Lactose	-	-	-	-
Raffinose	+	+	-	+
Glucose	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	+
Inulin	-	-	-	-
Cellobiose	+	-	-	-
Trehalose	-	-	-	+

หมายเหตุ (+) คือ เจริญและใช้สารต่างๆที่ทดสอบได้ ให้ความขุ่น +2 หรือ +3 ภายใน 7 วัน
(-) คือ ไม่เจริญและไม่สามารถใช้สารต่างๆที่ทดสอบได้

ตารางที่ 12 ความสามารถในการเจริญเติบโตและใช้สารชนิดต่างๆของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ กันของการหมัก

Substrates	Isolate			
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Number of isolate	32	26	24	2
1.5% Ethanol	+	+	+	+
1.5% Methanol	-	-	-	-
10% NaCl tolerance	+	+	+	+
16% NaCl tolerance	-	-	-	+
0.01% Cyclohexamide	-	-	-	+
0.10% Cyclohexamide	-	-	-	+
Citrate	+	-	-	+
2% Urea	-	-	-	+

หมายเหตุ (+) คือ เจริญเติบโตและใช้สารต่างๆที่ทดสอบได้ ให้ความขุ่น +2 หรือ +3 ภายใน 7 วัน

(-) คือ ไม่เจริญเติบโตและไม่สามารถใช้สารต่างๆที่ทดสอบได้

จากตารางที่ 13 เมื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากกระบวนการหมักตลอด ระยะเวลา 56 วัน จำนวน 102 ไอโซเลท ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL พบว่าเกือบทั้งหมดเป็น *Lactobacillus plantarum* (99 ไอโซเลท หรือ 97%) โดยพบตั้งแต่วันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 56 ของการหมักและมีเพียง 3 ไอโซเลท (3%) ที่เป็น *Lactobacillus pentosus* โดยพบเฉพาะวันที่ 21 ของการหมัก ในขณะที่การบ่งชี้ชนิดของยีสต์ในระดับโมเลกุลโดยการตรวจหาลำดับเบสของ 26S rRNA ที่คัดแยกจากกระบวนการหมักตลอดระยะเวลา 56 วัน จำนวน 84 ไอโซเลท พบว่าเมื่อเริ่มต้นการหมัก (t=0) เป็น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Rhodotorula mucilaginosa* โดย *S. cerevisiae* พบตลอดการหมักจนถึงวันที่ 49 ในขณะที่ *R. mucilaginosa* ตรวจไม่พบตั้งแต่วันที่ 7 ของการหมักและเป็นยีสต์ที่พบน้อยที่สุด ในขณะที่ *Pichia membranifaciens* เริ่มตรวจพบตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 35 จากนั้นวันที่ 42 ถึง 56 ตรวจไม่พบ ขณะเดียวกันยีสต์ *Pichia anomala* พบตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงวันที่ 56 และเป็นยีสต์เพียงชนิดเดียวที่ยังคงอยู่รอดได้ในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าเมื่อสิ้นสุดการหมักที่อายุ 56 วัน

ตารางที่ 13 การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ที่แยกได้ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ในการหมักลูกยอป่า

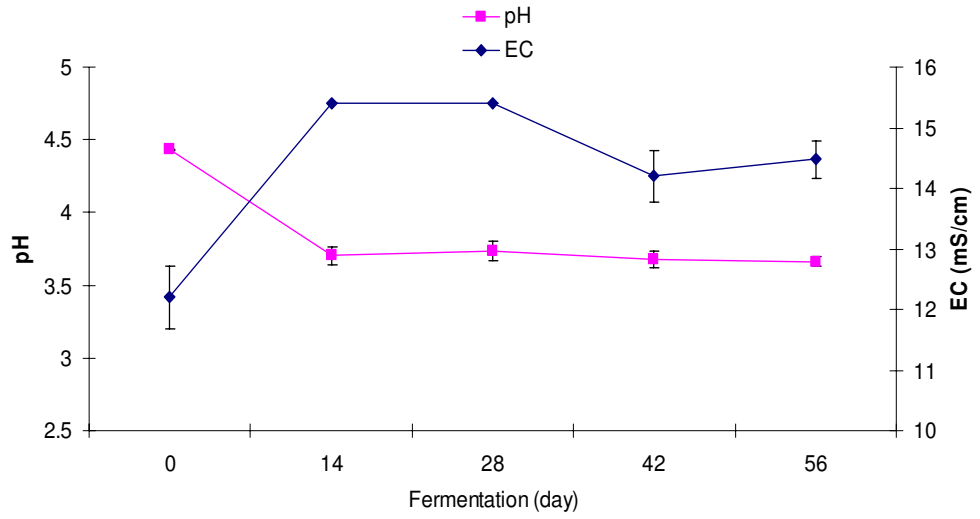
Fermentation day	Lactic acid bacteria		Yeast	
	Genus and species	Number of isolate	Genus and species	Number of isolate
0	*L. plantarum*	10	*S. cerevisiae* *R. mucilaginosa*	8 2
7	*L. plantarum*	10	*S. cerevisiae* *P. membranifaciens*	5 6
14	*L. plantarum*	13	*S. cerevisiae* *P. membranifaciens* *P. anomala*	5 5 2
21	*L. plantarum* *L. pentosus*	12 3	*S. cerevisiae* *P. membranifaciens* *P. anomala*	4 5 4
28	*L. plantarum*	12	*S. cerevisiae* *P. membranifaciens* *P. anomala*	3 4 5
35	*L. plantarum*	10	*S. cerevisiae* *P. membranifaciens* *P. anomala*	3 4 5
42	*L. plantarum*	12	*S. cerevisiae* *P. anomala*	2 3
49	*L. plantarum*	10	*S. cerevisiae* *P. anomala*	2 4
56	*L. plantarum*	10	*P. anomala*	3
Total		102	Total	84

1.2 ผลคุณสมบัติทางเคมี - กายภาพของน้ำหมักลูกยอป่า

1.2.1 การนำไฟฟ้า pH อุณหภูมิ ปริมาณกรด และปริมาณน้ำตาล

เมื่อเริ่มต้นการหมัก น้ำหมักมีค่า pH 4.43 แล้วลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 3.70 เมื่อหมักได้ 14 วัน หลังจากนั้นวันที่ 28 42 และ 56 ค่าของ pH ลดลงเพียงเล็กน้อยเหลือ 3.73 3.67 และ 3.66 ตามลำดับ ส่วนค่าการนำไฟฟ้า (EC) เริ่มต้นมีค่า 12.2 mS/cm วันที่ 14 มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 15.3 mS/cm หลังจากนั้นวันที่ 42 และ 56 ลดลงเป็น 14.2 และ 14.4 mS/cm ตามลำดับ ดังรูปที่ 8

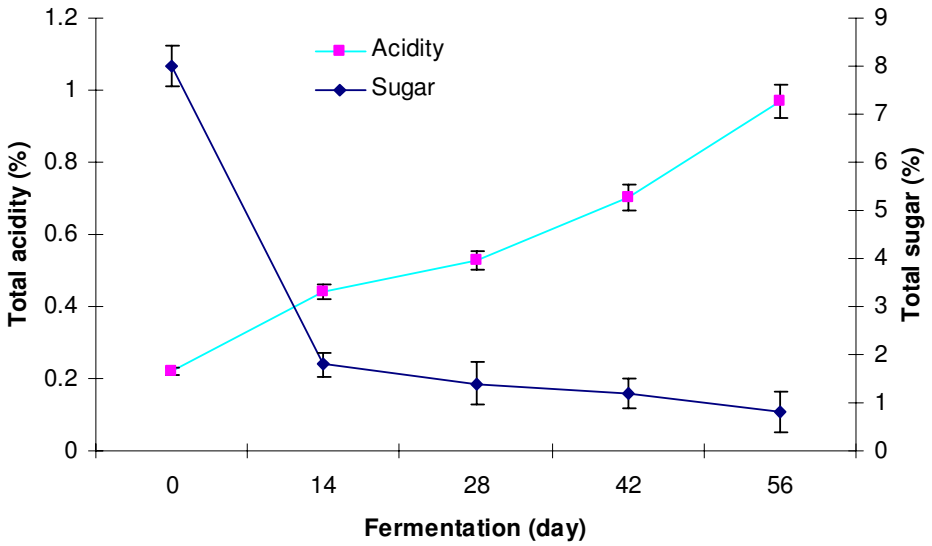
ส่วนการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการหมักพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ เมื่อหมักไปได้ 14 วัน อุณหภูมิในถังหมักเพิ่มขึ้น 1°C เมื่อเทียบกับอุณหภูมิห้อง (28°C) ดังตารางที่ 14 แต่หลังจากนั้นแทบไม่มีความแตกต่าง ในขณะที่การลดลงของน้ำตาลโดยเริ่มต้นมี 8% วันที่ 14 ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 1.8% หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลงลดเหลือ 1.4% 1.2% และ 0.8% เมื่อหมัก 28 42 และ 56 วันตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดเป็นไปในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลกล่าวคือ เริ่มต้นมีปริมาณกรด 0.22% แล้วมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 0.44% 0.52% 0.70% และ 0.96% เมื่อวันที่ 14 28 42 และ 56 ตามลำดับ ดังรูปที่ 9



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงค่า pH และค่าการนำไฟฟ้า (EC) ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 14 อุณหภูมิในระหว่างกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

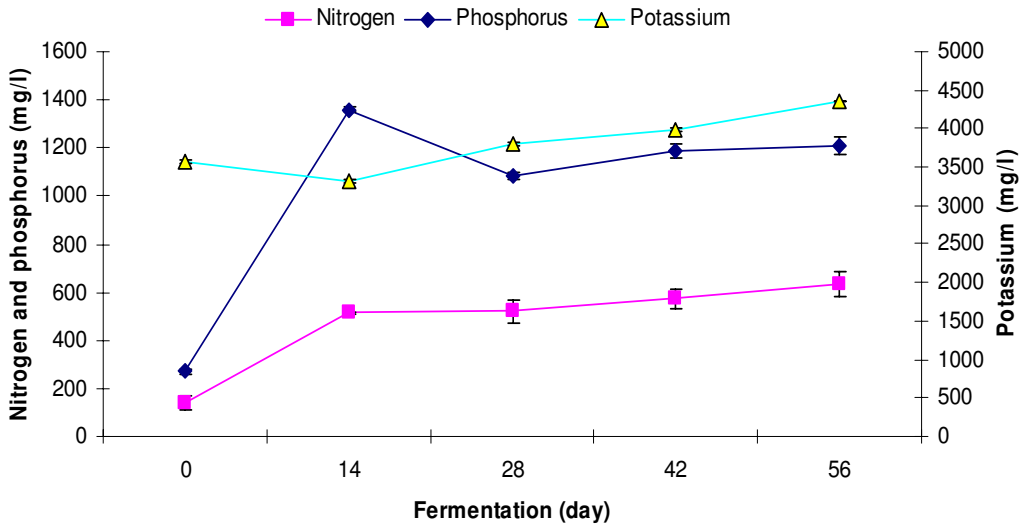
อายุการหมัก (วัน)	อุณหภูมิของน้ำหมัก (°C)	อุณหภูมิห้อง ภายนอกถังหมัก (°C)
0	31	31
14	29	28
28	29	29
42	29	30
56	28	28



รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดและการเกิดกรดทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

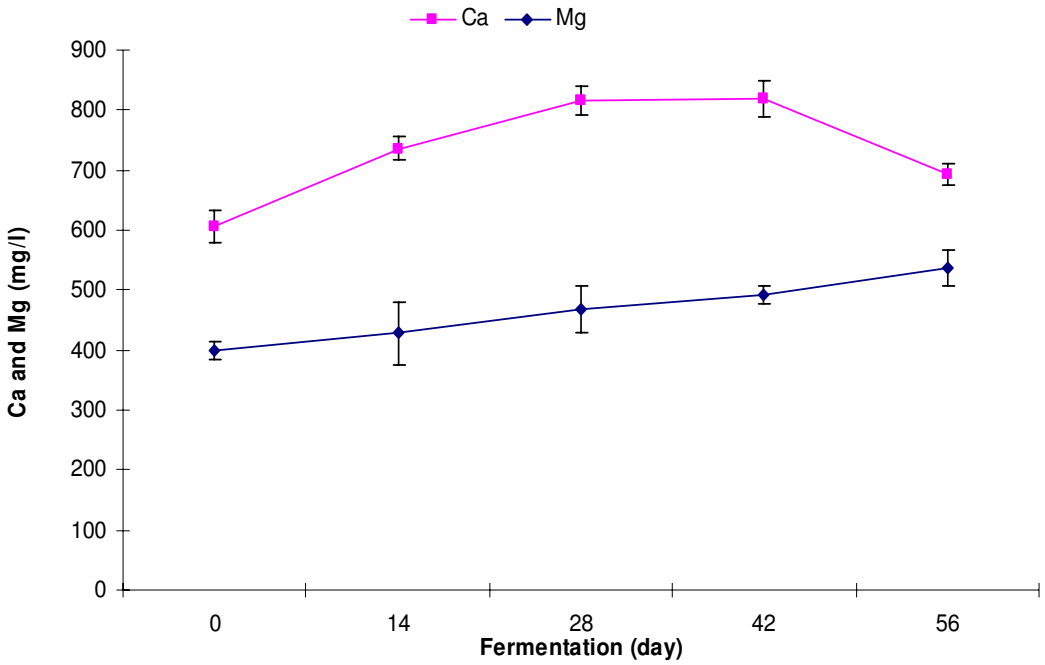
1.2. 2 ปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม โบรอน สังกะสีและแมงกานีส

ปริมาณธาตุอาหารหลัก (primary nutrient element) ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมของพืชที่เกิดในระหว่างการหมัก (รูปที่ 10) ก่อนการหมักมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเริ่มต้น 140 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก และมีปริมาณสูงสุดที่อายุการหมัก 56 วัน โดยมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 633 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนฟอสฟอรัสเริ่มต้นมี 270 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วพบว่ามีปริมาณสูงสุด 1360 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 หลังจากนั้นเมื่อวันที่ 28 42 และ 56 กลับมีปริมาณลดลงเหลือ 1086 1190 และ 1210 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในขณะที่โพแทสเซียมเริ่มต้นมี 3566 มิลลิกรัมต่อลิตร วันที่ 14 มีปริมาณลดลงเหลือ 3318 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่วันที่ 28 42 และ 56 มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 3796 3982 และ 4356 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อคิดเป็นอัตราส่วน N: P: K เท่ากับ 1: 1.9: 25, 1: 2.6: 6.6, 1: 2: 7.3, 1: 2: 6.9 และ 1: 1.9: 6.8 ที่ระยะเวลา 0 14 28 42 และ 56 ของการหมัก



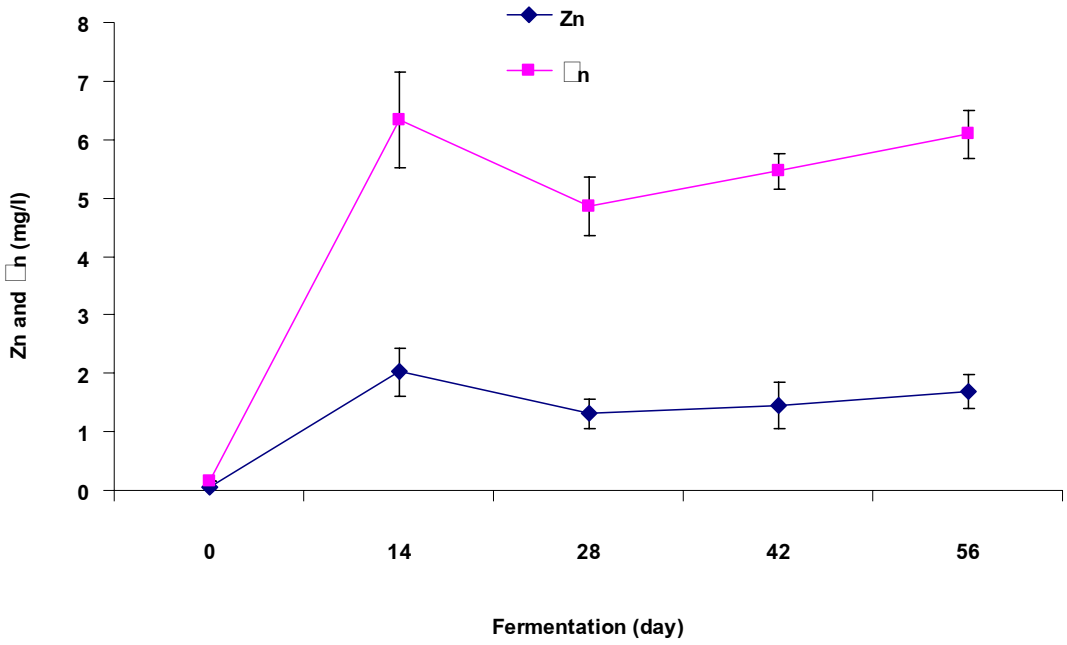
รูปที่ 10 ปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด และโพแทสเซียม ในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

ปริมาณธาตุอาหารรอง (secondary nutrient element) ได้แก่ แคลเซียมและแมกนีเซียม ในรูปที่ 11 พบว่าแคลเซียมเริ่มต้นหมักมี 605 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 736 816 และ 818 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวันที่ 14 28 และ 42 ตามลำดับ แต่เมื่อหมักได้ 56 วัน กลับมีปริมาณลดลงเหลือ 693 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแมกนีเซียมมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการหมัก คือเริ่มต้นมี 399 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการหมักมี 536 มิลลิกรัมต่อลิตร



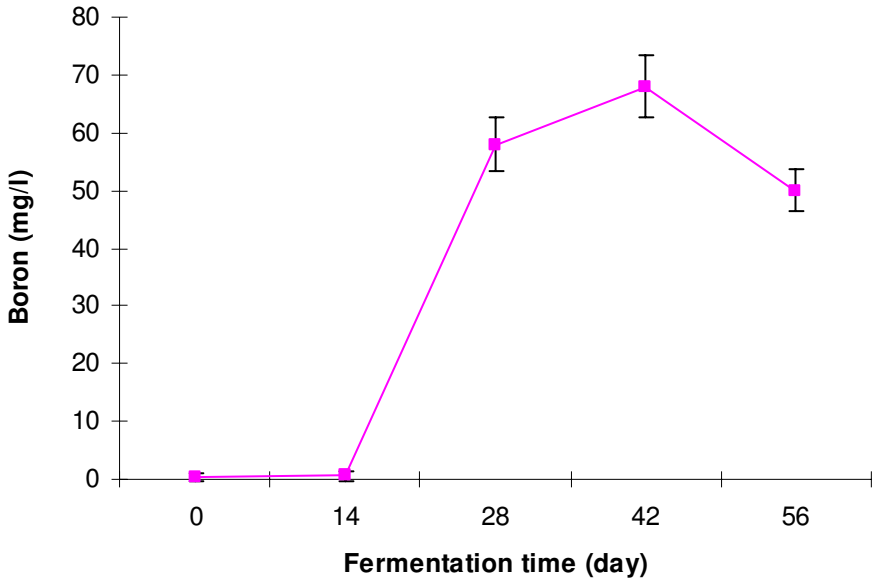
รูปที่ 11 ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียมในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

ในขณะที่จุลธาตุ (micronutrient) ได้แก่ แมงกานีส และสังกะสี ดังรูปที่ 12 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของแมงกานีสและสังกะสีมีรูปแบบคล้ายกันคือ เริ่มต้นมีปริมาณแมงกานีสและสังกะสี 0.16 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร วันที่ 14 มีปริมาณสูงสุดคือ 6.34 และ 2.02 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่วันที่ 28 กลับมีปริมาณลดลงเหลือ 4.85 และ 1.32 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นวันที่ 42 จนกระทั่งสิ้นสุดการหมักกลับมีปริมาณแมงกานีสเพิ่มขึ้นเป็น 5.45 และ 6.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณสังกะสีเพิ่มขึ้นเป็น 1.45 และ 1.69 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 12 ปริมาณธาตุสังกะสีและแมงกานีสในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของโบรอน (รูปที่ 13) เริ่มต้น 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มเป็น 0.53 เมื่อหมักได้ 14 วัน แต่วันที่ 28 42 และ 56 มีปริมาณ 57.6 68.0 และ 50.6 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 13 ปริมาณโบรอนในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ ของกากน้ำตาลซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการทำน้ำหมักชีวภาพในการทดลองครั้งนี้ เมื่อเจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำ 1:10 ตามสัดส่วนที่ใช้ทำน้ำหมักพบว่ามีค่าการนำไฟฟ้า 12.08 mS/cm, pH 5.81, Organic Matter 25.2 g/L, Organic carbon 14.6 g/L, C/N ratio เท่ากับ 115.6, Total N 126 mg/L, Total P 237 mg/L, Total K 3,652 mg/L, Total Ca 580 mg/L, Total Mg 381 mg/L, Total B 0.7 mg/L, Total Mn 0.3 mg/L และ Total Zn 0.5 mg/L และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหมักเมื่อเริ่มต้นคือเติมผลลูกยอป่าลงไปในกากน้ำตาลที่เจือจาง 10 เท่า กับน้ำหมักชีวภาพที่ได้เมื่อสิ้นสุดการหมัก (56 วัน) ดังตารางที่ 15 พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักมีปริมาณของธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 4.5 เท่า ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมเพิ่มขึ้น 4.48 และ 1.22 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ธาตุอาหารรองคือ แคลเซียมและแมกนีเซียมเพิ่มขึ้น 1.15 และ 1.34 เท่า ในขณะที่จุลธาตุ คือ แมงกานีสและสังกะสีเพิ่มขึ้น 38 และ 42 เท่า ส่วนโบรอนพบว่าเป็นธาตุที่มีปริมาณเพิ่มมาก

ที่สุดจากกระบวนการหมัก โดยมีปริมาณเพิ่มมากถึง 153 เท่า ค่า EC เพิ่มขึ้นจาก 12.2 mS/cm เป็น 14.4 mS/cm และค่า pH ลดลงจาก 4.43 เป็น 3.66 เมื่อสิ้นสุดการหมัก

ตารางที่ 15 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพบางประการของกากน้ำตาลและน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

คุณสมบัติ	กากน้ำตาลเจือจาง 1:10	น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า		สัดส่วนที่เพิ่ม t_{56}/t_0
		เริ่มต้นการหมัก (t = 0)	สิ้นสุดการหมัก (56 วัน)	
EC (mS/cm)	12.0	12.2	14.4	-
pH	5.81	4.43	3.66	-
Organic Matter (g/L)	25.2	23.5	19.2	-
Organic carbon (g/L)	14.6	13.6	11.1	-
C/N ratio	115.6	97.3	17.5	-
Total N (mg/L)	126	140	633	4.50
Total P (mg/L)	237	270	1,210	4.48
Total K (mg/L)	3,652	3,566	4,356	1.22
Total Ca (mg/L)	580	605	693	1.15
Total Mg (mg/L)	381	399	536	1.34
Total B (mg/L)	0.7	0.33	50.6	153
Total Mn (mg/L)	0.3	0.16	6.09	38
Total Zn (mg/L)	0.5	0.04	1.69	42

- คือ ไม่ได้คำนวณ

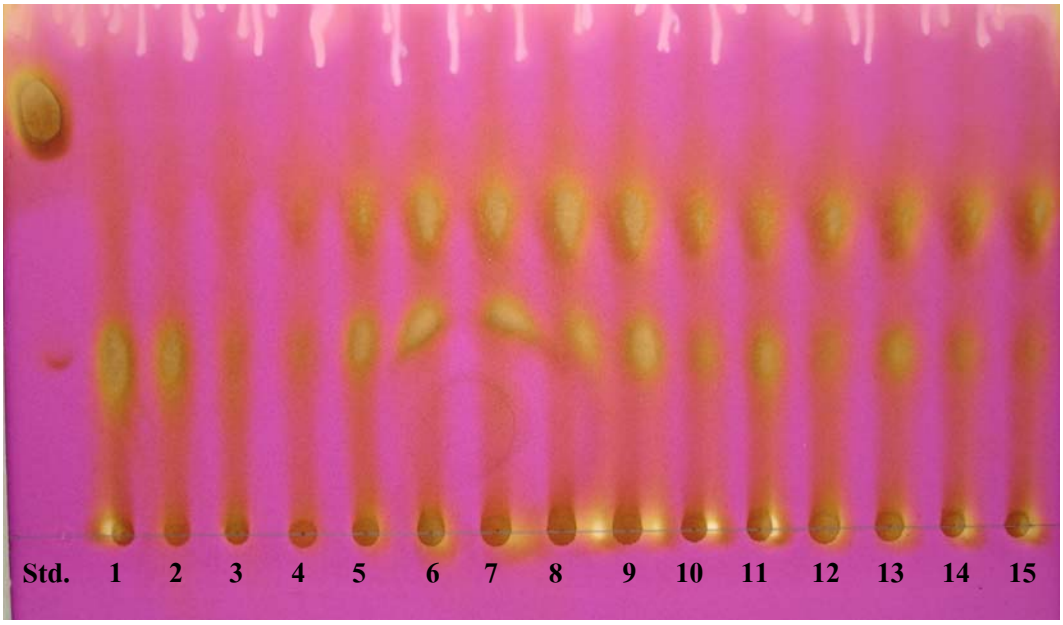
ผลของปริมาณอินทรียวัตถุพบว่าเมื่อเริ่มต้นการหมักมี 23.5 กรัมต่อลิตร มีอินทรีย์คาร์บอนเท่ากับ 13.63 กรัมต่อลิตรและมี C/N ratio เท่ากับ 97.3 เมื่อน้ำหมักมีอายุการหมักมากขึ้นปริมาณของอินทรียวัตถุ อินทรีย์คาร์บอนและ C/N ratio ลดลง เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 56 พบว่ามีปริมาณของอินทรียวัตถุ และอินทรีย์คาร์บอน เท่ากับ 19.2 และ 11.1 กรัมต่อลิตร และมี C/N ratio เท่ากับ 17.5 ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ปริมาณอินทรียวัตถุ อินทรีย์คาร์บอนและ C/N ratio ในระหว่างการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆ ในถังหมักขนาด 28 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

Fermentation (day)	Organic matter (g/L)	Organic carbon (g/L)	C/N ratio
0	23.5	13.6	97.3
14	22.5	13.1	25.4
28	22.2	12.9	24.7
42	19.4	11.3	19.6
56	19.2	11.1	17.5

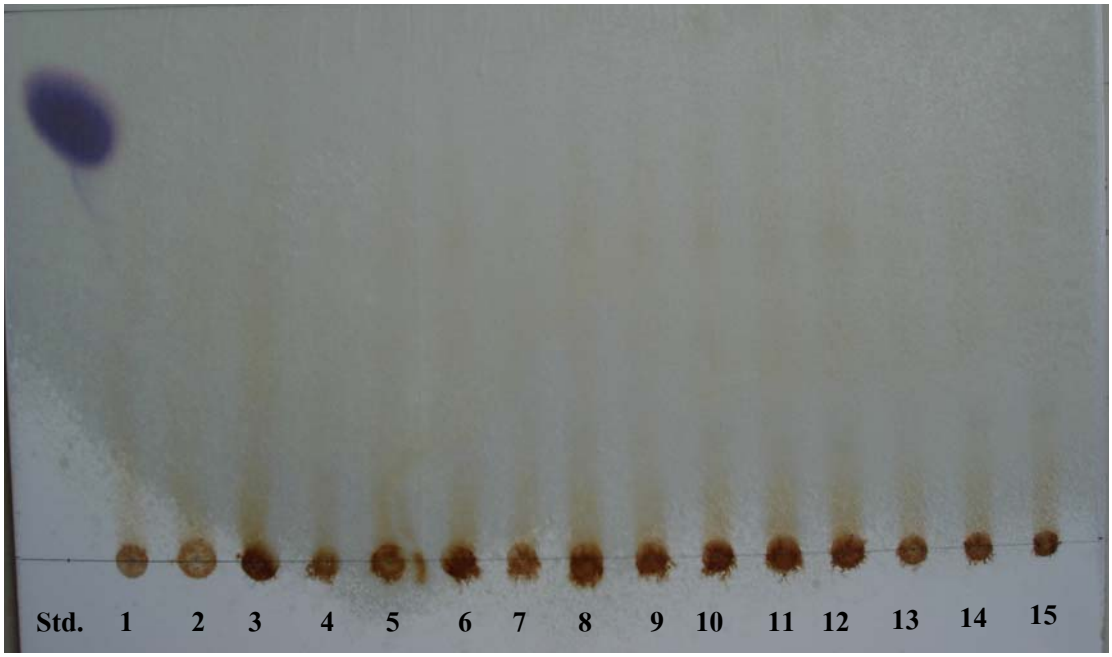
1.2.3 การตรวจวิเคราะห์หาฮอร์โมนพืชจิบเบอแรลลิน (Gibberellin) และออกซิน (Auxin)

สำหรับผลการทดสอบหาฮอร์โมนจิบเบอแรลลิน โดยใช้ gibberellic acid เป็นสารมาตรฐานของฮอร์โมน (Std.) ดังกล่าวซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.70 (จุดแรก) ในขณะที่ตัวอย่างน้ำหมักลูกยอป่าเมื่อเริ่มต้นการหมักวันที่ 0 (จุดที่ 1 ถึง 3) มีค่า Rf เพียงค่าเดียวเท่ากับ 0.35 แต่ตัวอย่างน้ำหมักวันที่ 14 (จุดที่ 4 ถึง 6) มีค่า Rf 2 ค่า คือ 0.53 และ 0.60 ทำนองเดียวกันกับตัวอย่างอื่นๆ เมื่ออายุการหมักมากขึ้นที่ให้ค่า Rf 2 ค่าเช่นกันและมีค่าไม่แตกต่างจากวันที่ 14 ของการหมัก แต่ไม่พบว่ามีค่า Rf เท่ากับสารมาตรฐาน (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 ฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลิน (gibberellins) จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า
จุดแรกคือ สารมาตรฐาน gibberellic acid , จุดที่ 1-3 น้ำหมักวันที่ 0 ,
จุดที่ 4-6 น้ำหมักวันที่ 14, จุดที่ 7-9 น้ำหมักวันที่ 28, จุดที่ 10-12 น้ำหมักวันที่ 42
และจุดที่ 13-15 น้ำหมักวันที่ 56

สำหรับผลการทดสอบหาฮอร์โมนออกซิน โดยใช้ indole-3-acetic acid (IAA) เป็นสารมาตรฐานของฮอร์โมน (Std.) ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.56 (จุดแรก) ดังรูปที่ 15 และน้ำหมักลูกยอป่าไม่มีตัวอย่างใดเลยที่สามารถหาค่า Rf ได้ ดังนั้นผลการทดสอบหาฮอร์โมนออกซินในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า พบว่าไม่มีฮอร์โมนออกซินตลอดระยะเวลาการหมัก



รูปที่ 15 ฮอร์โมนพืชออกซิน (auxin) จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า
จุดแรกคือ สารมาตรฐาน indole-3-acetic acid , จุดที่ 1-3 น้ำหมักวันที่ 0 ,
จุดที่ 4-6 น้ำหมักวันที่ 14, จุดที่ 7-9 น้ำหมักวันที่ 28, จุดที่ 10-12 น้ำหมักวันที่ 42
และจุดที่ 13-15 น้ำหมักวันที่ 56

1.2.4 ปริมาณกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก และกรดอะซิติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการหมักจากแบคทีเรียแลคติก และในกรณีของเอทานอลยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากยีสต์โดยเฉพาะ *Saccharomyces cerevisiae* จากน้ำหมักที่มีอายุการหมักได้ 56 วัน ซึ่งพบว่ามีปริมาณเอทานอลสูงถึง 1.7% เมทานอล 0.03% กรดอะซิติก 0.33% และตรวจไม่พบกรดแลกติก (ตารางที่ 17)

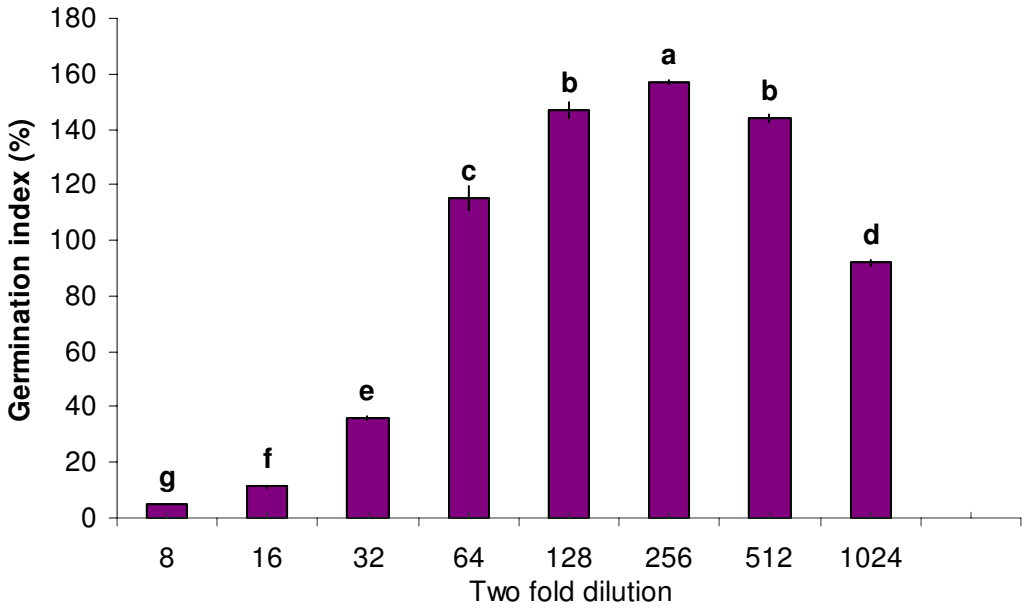
ตารางที่ 17 ปริมาณกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าอายุการหมัก 56 วัน

ชื่อตัวอย่าง	กรดอะซิติก (%)	กรดแลคติก* (%)	เอทานอล (%)	เมทานอล (%)
น้ำหมักลูกยอป่า	0.33	ไม่พบ	1.7	0.03

* ปริมาณที่สามารถวัดได้ต่ำสุดคือ 0.03%

1.2.5 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าต่อเมล็ดมะเขือเทศราชินี

การบ่งชี้ถึงปุ๋ยที่ปราศจากความเป็นพิษต่อพืช ด้วยการพิจารณาจากค่าดัชนีการงอก (Germination index) ต้องเกิน 50% (Zucconi et al., 1985) และสำหรับน้ำหมักลูกยอป่าอายุการหมัก 56 วัน เมื่อเจือจางน้ำหมัก 8 เท่า จนถึง 1024 เท่าพบว่าสามารถแบ่งผลของดัชนีการงอกได้เป็น 7 กลุ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) ดังรูปที่ 16 โดยเมื่อเจือจางน้ำหมัก 256 เท่า มีดัชนีการงอกสูงสุด 157% (a) เมื่อเจือจางน้ำหมัก 128 เท่า และ 512 เท่า มีดัชนีการงอก 147 และ 144% ตามลำดับ (b) เมื่อเจือจางน้ำหมัก 64 เท่า มีดัชนีการงอก 114% (c) แต่เมื่อเจือจางน้ำหมัก 1024 เท่า กลับมีดัชนีการงอกลดลงเหลือ 92% (d) และเมื่อเจือจางน้ำหมัก 8 16 32 เท่า พบว่ามีดัชนีการงอก 5.25% (g) 11.37% (f) และ 36.1% (e) ตามลำดับ



รูปที่ 16 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อพืชของน้ำหมักลูกยอป่าที่อายุการหมัก 56 วัน ด้วยการทดสอบการงอกของเมล็ดมะเขือเทศราชินี
ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

2. ผลของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศราชินี

จากการศึกษาทดลองผลของน้ำหมักลูกยอป่าต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี โดยมี 4 ชุดการทดลองดังนี้ คือ ชุดการทดลองที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย (N) ชุดการทดลองที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 8.25 กรัมต่อถุงปลูกต่อครั้ง (C) โดยใส่ปุ๋ยวันที่ 0 15 30 และ 45 หลังย้ายปลูก ชุดการทดลองที่ 3 ใส่น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่เจือจางในอัตรา 1: 200 (FW) ในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อถุงปลูก ในวันที่ 0 หลังย้ายปลูกและหลังจากนั้นทุกๆ 7 วัน เป็นจำนวน 12 ครั้ง ชุดการทดลองที่ 4 ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 4.125 กรัมต่อถุงปลูกต่อครั้ง โดยใส่ปุ๋ยวันที่ 0 15 30 และ 45 หลังย้ายปลูกและใส่น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่เจือจางในอัตรา 1: 400 (CF) ในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อถุงปลูก ในวันที่ 0 หลังย้ายปลูกและหลังจากนั้นทุกๆ 7 วัน เป็นจำนวน 12 ครั้ง

2.1 ผลการวิเคราะห์เนื้อดินของดินที่ใช้ปลูกมะเขือเทศราชินี

ผลการวิเคราะห์เนื้อดินของดินที่ใช้ปลูกมะเขือเทศราชินีในการทดลองนี้พบว่าเป็นดินทรายร่วน (Loamy sand) โดยประกอบด้วยทราย (sand) 84.19% ทรายแป้ง (silt) 8.58% และดินเหนียว (clay) 7.23% ดังตารางที่ 18

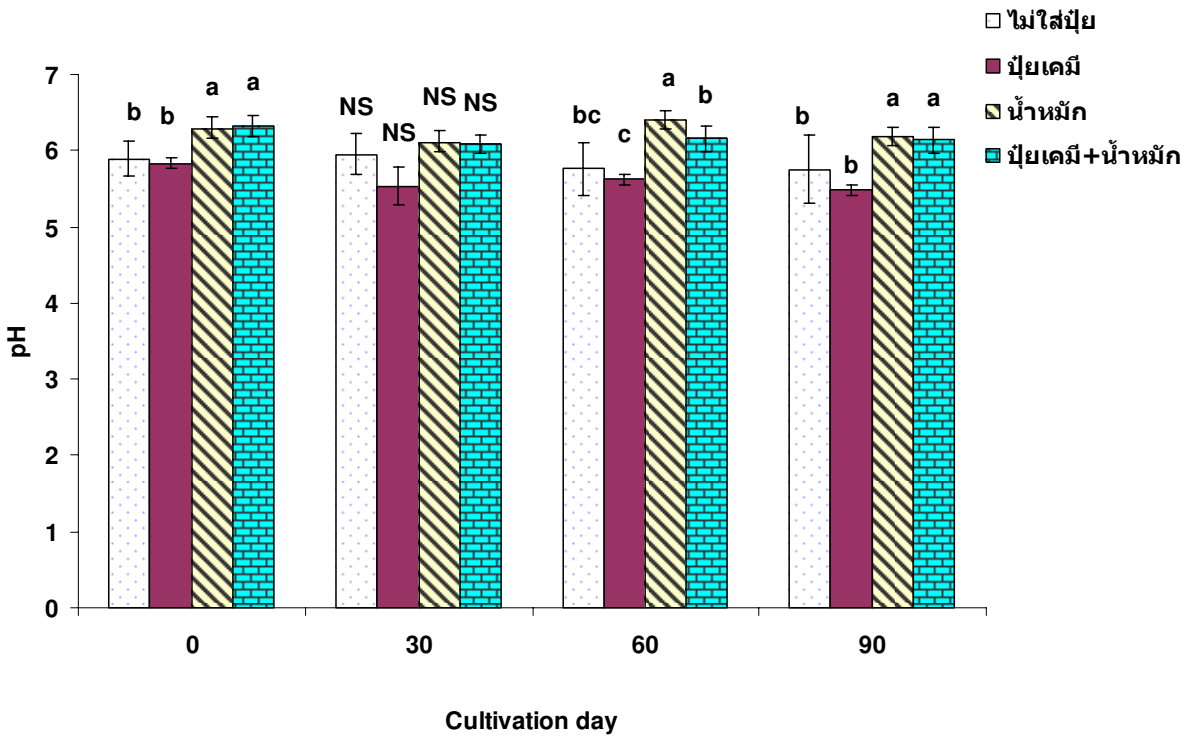
ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์เนื้อดินที่ใช้ปลูกมะเขือเทศราชินี

Composition	%
Sand	84.19
Silt	8.58
Clay	7.23
Texture	Loamy sand

2.2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี

เมื่อเริ่มต้นย้ายปลูก พบว่าดินมีค่าความเป็นกรดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือชุดที่ได้รับน้ำหมักมีค่า pH สูงกว่าชุดที่ไม่ได้รับปุ๋ย (ชุดควบคุม) และชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี แต่เมื่อผ่านไป 30 วัน ไม่พบความแตกต่าง แต่หลังจากนั้นมีความแตกต่างกันโดยเป็นไปในรูปแบบเดียวกับเมื่อเริ่มต้น กล่าวคือ ดินชุดที่ได้รับน้ำหมัก วันที่ 0 30 60 และ 90 หลังย้ายปลูก มี pH 6.29 6.11 6.40 และ 6.18 ตามลำดับ และชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักในดินวันที่ 0 30 60 และ 90 หลังย้ายปลูกมีค่า pH เท่ากับ 6.32 6.09 6.16 และ 6.14 ตามลำดับ

ในขณะที่ดินชุดควบคุมและชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีมีความเป็นกรดมากกว่า คือ วันที่ 0 30 60 และ 90 หลังย้ายปลูกดินชุดควบคุมมี pH 5.89 5.95 5.76 และ 5.75 ตามลำดับ ส่วนชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีมีความเป็นกรดมากกว่าทุกชุดการทดลองคือ ในวันที่ 0 30 60 และ 90 หลังย้ายปลูกมี pH 5.83 5.53 5.62 และ 5.48 ตามลำดับ ดังรูปที่ 17



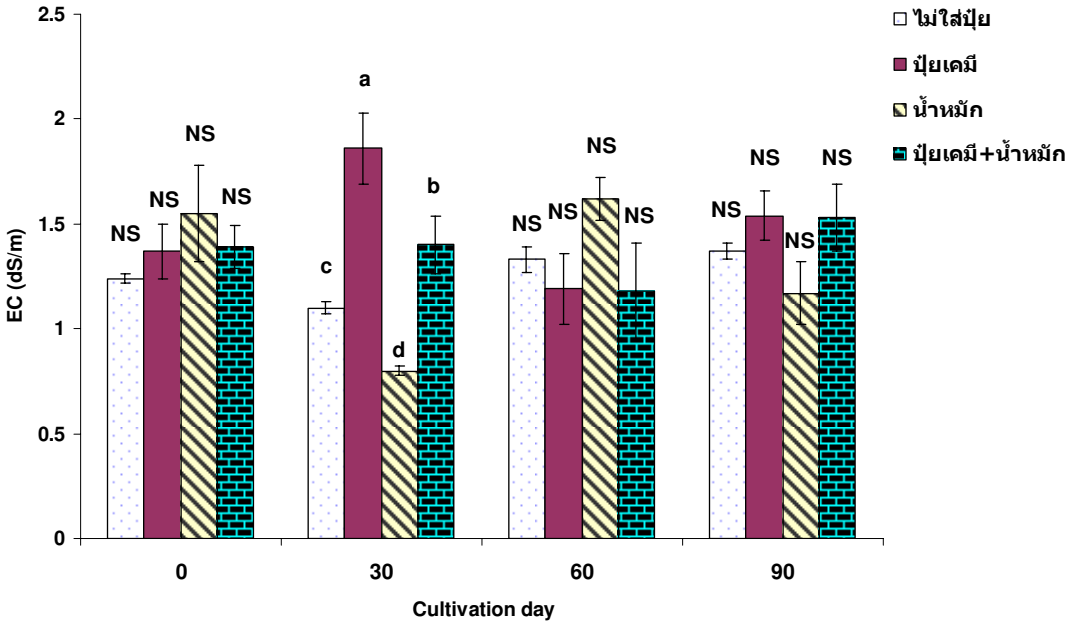
รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลง pH ของดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่างๆกันของแต่ละชุดการทดสอบ

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

2.3 การเปลี่ยนแปลงค่าการนำไฟฟ้าของดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี

จากการวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้าในดินโดยใช้อัตราส่วน ดิน: น้ำ เป็น 1:5 พบว่าดินทุกชุดในวันที่ 0 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูก มีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันต่างสถิติ คือมีค่าตั้งแต่ 1.17-1.86 dS/m ยกเว้นเฉพาะวันที่ 30 หลังย้ายปลูกเท่านั้นที่พบว่าดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีมีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุด คือ 1.86 dS/m รองลงมาคือ ชุดได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ ตามด้วยดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย และชุดที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพ ซึ่งมีค่าการนำไฟฟ้า 1.40 1.10 และ 0.8 dS/m ตามลำดับ โดยค่าการนำไฟฟ้ามีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงค่าการนำไฟฟ้าของดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่าง ๆกัน ของแต่ละชุดการทดสอบ

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

2.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารหลัก (Primary plant nutrient)

ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมดและโพแทสเซียม ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลักในดิน (ตารางที่ 19) วันแรกที่ย้ายต้นอ่อนมะเขือเทศลงปลูกในถุง พบว่าดินในชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย มีไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมดและโพแทสเซียมเท่ากับ 271 1,841 และ 114 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดินในชุดใส่ปุ๋ยเคมีมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมดและโพแทสเซียมเท่ากับ 397 983 และ 126 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ ขณะที่ดินในชุดน้ำหมักชีวภาพ มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมดและโพแทสเซียมเท่ากับ 251 1,178 และ 108 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และดินในชุดปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมดและโพแทสเซียมเท่ากับ 366 1,503 และ 123 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยพบว่าดินทั้ง 4 ชุดทดลองมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและโพแทสเซียมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดินชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย (ชุดควบคุม) มีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับดินในชุดใส่ปุ๋ยเคมี ชุดที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพและชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ

หลังจากมะเขือเทศมีอายุได้ 90 วันหลังย้ายปลูกพบว่าดินในทุกชุดการทดลองมีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลดลงจากวันที่ 0 โดยพบว่าดินในชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย มีไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมดเท่ากับ 137 และ 354 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดินในชุดใส่ปุ๋ยเคมี มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมดเท่ากับ 253 และ 220 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดินในชุดน้ำหมักชีวภาพมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด 174 และ 163 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และดินในชุดปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด 143 และ 315 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีมีปริมาณไนโตรเจนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของโพแทสเซียมกลับมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยดินในชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย ดินในชุดใส่ปุ๋ยเคมี ดินในชุดน้ำหมักชีวภาพและดินในชุดปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพมีปริมาณโพแทสเซียมเท่ากับ 125 188 165 และ 201 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพมีปริมาณโพแทสเซียมสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

ตารางที่ 19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารหลักในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีในวันที่ 0 และวันที่ 90 หลังย้ายปลูกของแต่ละชุดการทดสอบ

วันหลังย้ายปลูก	ปริมาณธาตุอาหารหลัก	ชุดการทดสอบ			
		ชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย	ชุดใส่ปุ๋ยเคมี	ชุดใส่น้ำหมักชีวภาพ	ชุดใส่ปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ
0	ไนโตรเจน (mg/kg)	271^{NS}	397^{NS}	251^{NS}	366^{NS}
	ฟอสฟอรัส (mg/kg)	1841 ^{a}	983 ^{b}	1178 ^{b}	1503 ^{ab}
	โพแทสเซียม (mg/kg)	114^{NS}	126^{NS}	108^{NS}	123^{NS}
90	ไนโตรเจน (mg/kg)	137 ^{c}	253 ^{a}	174 ^{b}	143 ^{c}
	ฟอสฟอรัส (mg/kg)	354 ^{a}	220 ^{c}	163 ^{d}	315 ^{b}
	โพแทสเซียม (mg/kg)	125 ^{d}	188 ^{b}	165 ^{c}	201 ^{a}

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)
ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

2.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารรอง (Secondary plant nutrient)

ธาตุอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีมีรายละเอียดดังนี้

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ในดินวันแรกที่ย้ายต้นอ่อนมะเขือเทศลงปลูกในถุงพบว่าดินทั้ง 4 กรรมวิธี คือดินชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย ดินในชุดใส่ปุ๋ยเคมี ดินในชุดน้ำหมักชีวภาพ และดินในชุดปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพมีปริมาณแร่ธาตุดังกล่าวไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยแคลเซียมมีค่าอยู่ระหว่าง 3374-3953 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และแมกนีเซียมมีค่าอยู่ระหว่าง 70-88 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 20)

หลังจากนั้นเมื่อมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 90 วันหลังย้ายปลูก กลับพบว่าดินทุกชุดมีปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมสูงกว่าวันที่ 0 หลังย้ายปลูก เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 4 ชุดการทดลอง พบว่าดินชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ยมีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมสูงกว่าทุกชุดการ

ทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) โดยมีปริมาณเท่ากับ 7235 และ 196 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ชุดที่ได้รับน้ำหมักมีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมสูงเป็นอันดับสอง โดยมีปริมาณ 5969 และ 167 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีมีปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียม เท่ากับ 5724 และ 122 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ พบว่ามีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมเท่ากับ 5788 และ 151 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีในวันที่ 0 และวันที่ 90 หลังย้ายปลูกของแต่ละชุดการทดสอบ

วันหลังย้ายปลูก	ปริมาณธาตุอาหารรอง	ชุดการทดสอบ			
		ชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย	ชุดใส่ปุ๋ยเคมี	ชุดใส่น้ำหมักชีวภาพ	ชุดใส่ปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ
0	แคลเซียม (mg/kg)	3627^{NS}	3374^{NS}	3751^{NS}	3953^{NS}
	แมกนีเซียม (mg/kg)	70^{NS}	78^{NS}	88^{NS}	85^{NS}
90	แคลเซียม (mg/kg)	7235^{a}	5724^{c}	5969^{b}	5788^{c}
	แมกนีเซียม (mg/kg)	196^{a}	122^{d}	167^{b}	151^{c}

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)
ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

2.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลธาตุ (□icronutrient) ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณจุลธาตุ ได้แก่ แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) และโบรอน (B) ในดินวันแรกที่ย้ายต้นอ่อนมะเขือเทศลงปลูกในถุงพบว่าดินทั้ง 4 กรรมวิธี คือดินชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย ดินในชุดใส่ปุ๋ยเคมี ดินในชุดน้ำหมักชีวภาพ และดินในชุดปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพมีปริมาณแร่ธาตุดังกล่าวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 21

หลังจากนั้นเมื่อมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 90 วันหลังย้ายปลูก กลับพบว่าดินทุกชุดมีปริมาณจุลธาตุสูงกว่าวันที่ 0 หลังย้ายปลูก เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 4 ชุดการทดลอง พบว่าดินชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ยมีปริมาณแมงกานีสสูงกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.05) โดยมีปริมาณเท่ากับ 53 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่ปริมาณสังกะสี 82 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีโบรอนต่ำกว่าทุกชุดการทดลองอื่นๆ คือพบ 3.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ชุดที่ได้รับน้ำหมักมีปริมาณ แมงกานีส สูงเป็นอันดับสอง โดยมีปริมาณ 51 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่กลับมีปริมาณสังกะสีและโบรอนสูงกว่าทุกชุดการทดลอง คือพบ 118 และ 4.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีมีปริมาณธาตุแมงกานีส สังกะสีและโบรอนเท่ากับ 42 80 และ 3.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ พบว่ามีปริมาณแมงกานีส สังกะสีและโบรอนเท่ากับ 39 69 และ 3.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุแมงกานีส สังกะสีและโบรอนในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีในวันที่ 0 และวันที่ 90 หลังย้ายปลูกของแต่ละชุดการทดสอบ

วันหลังย้ายปลูก	ปริมาณจุลธาตุ	ชุดการทดสอบ			
		ชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย	ชุดใส่ปุ๋ยเคมี	ชุดใส่น้ำหมักชีวภาพ	ชุดใส่ปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ
0	แมงกานีส (mg/kg)	20^{NS}	20^{NS}	24^{NS}	21^{NS}
	สังกะสี (mg/kg)	41^{NS}	36^{NS}	56^{NS}	45^{NS}
	โบรอน (mg/kg)	2.3^{NS}	2.9^{NS}	3.7^{NS}	3.3^{NS}
90	แมงกานีส (mg/kg)	53^{a}	42^{c}	51^{b}	39^{d}
	สังกะสี (mg/kg)	82^{b}	80^{c}	118^{a}	69^{d}
	โบรอน (mg/kg)	3.4^{c}	3.9^{b}	4.8^{a}	3.8^{b}

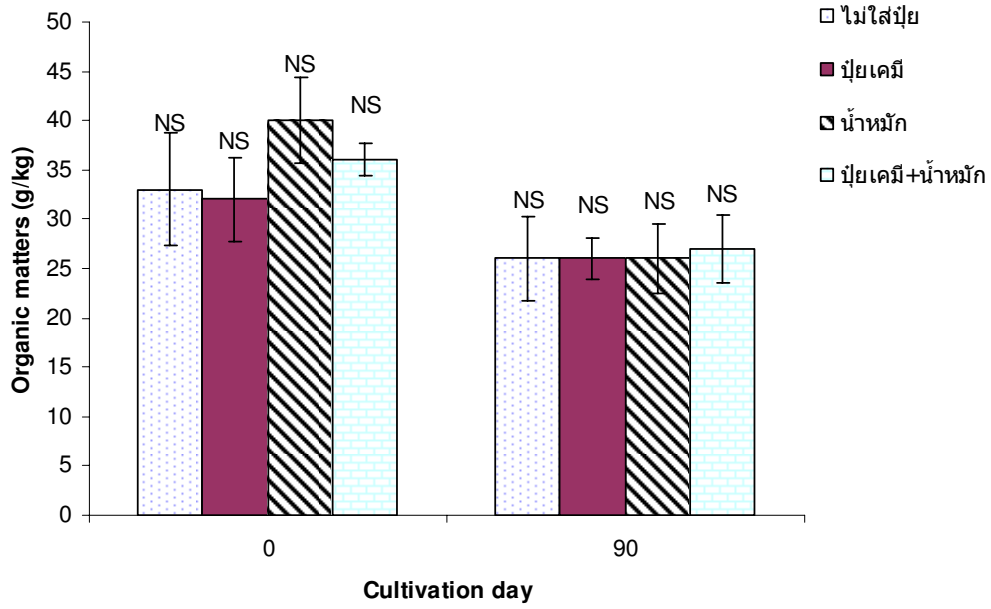
NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

2.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณอินทรียวัตถุในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุในดินวันแรกที่ย้ายต้นอ่อนมะเขือเทศลงปลูกในถุง พบว่ามีอินทรียวัตถุในดินใกล้เคียงกันคือ ดินในชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ยมีอินทรียวัตถุ 33 กรัมต่อกิโลกรัม ดินชุดที่ใส่ปุ๋ยเคมีมีอินทรียวัตถุ 32 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหมักชีวภาพมีอินทรียวัตถุ 40 กรัมต่อกิโลกรัม ปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพ มีอินทรียวัตถุ 36 กรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p=0.05) ดังรูปที่ 19

เมื่อมะเขือเทศมีอายุได้ 90 วันหลังย้ายปลูกพบว่า ดินทุกชุดมีปริมาณอินทรียวัตถุลดลง โดยดินชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย ดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี ดินชุดที่ได้รับน้ำหมักและดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักชีวภาพมีปริมาณอินทรียวัตถุ 26 26 26 และ 27 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับซึ่งพบว่าปริมาณอินทรียวัตถุในดินทุกชุดมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติดังรูปที่ 19

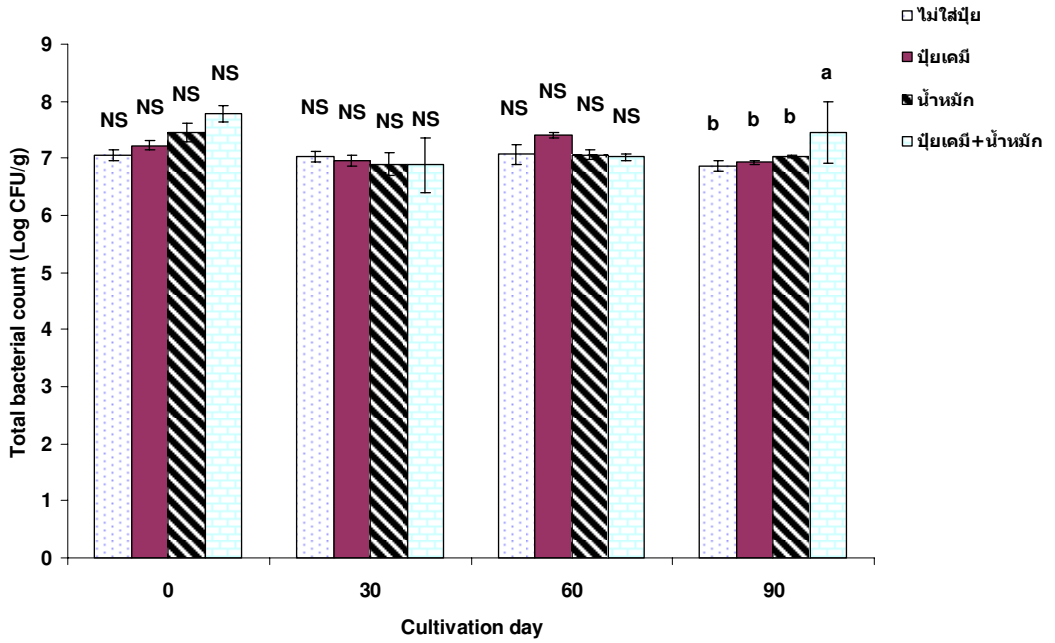


รูปที่ 19 ปริมาณอินทรียวัตถุในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

3. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี

จากผลการตรวจจุลินทรีย์ในดินซึ่งได้แก่ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียแลคติก จำนวนยีสต์และรา วันที่ 0 30 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูกพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในดินวันที่ 0 ในทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 7.06-7.78 log CFU/g โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ จากนั้นเมื่อมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 30 วันหลังย้ายปลูกจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดกลับลดลงอยู่ในช่วง 6.88-7.03 log CFU/g โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 60 วันหลังย้ายปลูกจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดกลับเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 30 หลังย้ายปลูกคือพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 7.02-7.41 log CFU/g แต่เมื่อวันที่ 90 หลังย้ายปลูกพบว่าดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 7.46 log CFU/g ซึ่งสูงกว่าดินชุดอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) ในขณะที่ดินชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย ดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี ดินชุดที่ได้รับน้ำหมัก มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 6.87 6.93 และ 7.03 log CFU/g ตามลำดับ ดังรูปที่ 20 ในกรณีจำนวนแบคทีเรียแลกติคตรวจไม่พบในดินทั้ง 4 ชุดการทดลอง

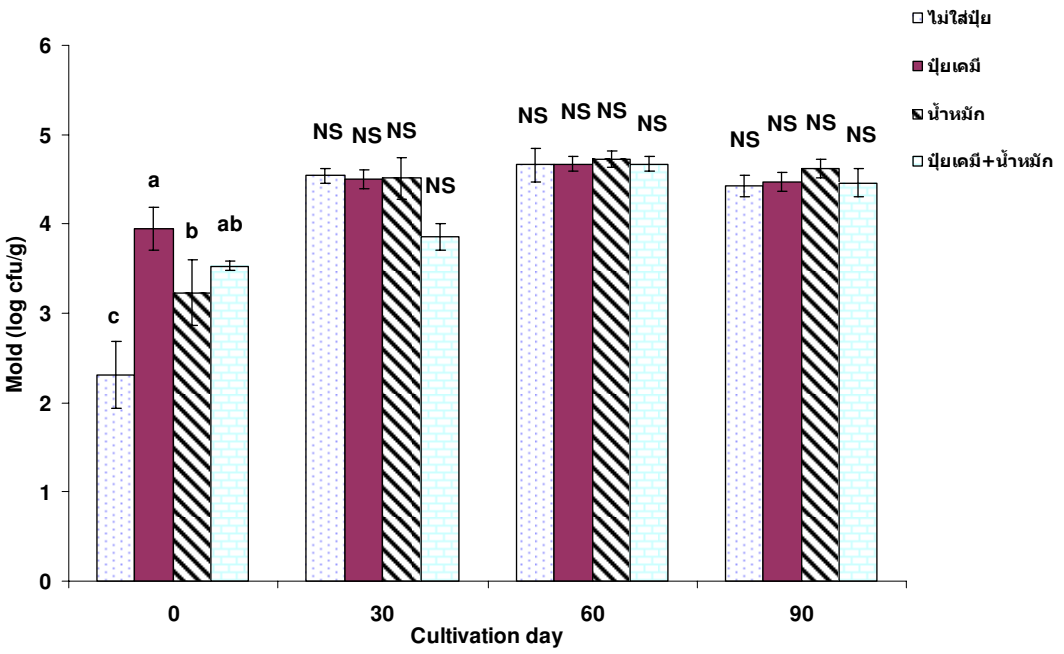


รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่างๆกันของแต่ละชุดการทดสอบ

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

ส่วนจำนวนเชื้อราทั้งหมดพบว่าดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีวันที่ 0 มีค่าเฉลี่ยของเชื้อราสูงสุด คือ 3.94 log CFU/g ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) ในขณะที่ดินชุดไม่ได้ใส่ปุ๋ย ดินชุดที่ได้รับน้ำหมัก ดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมัก มีจำนวนเชื้อรา 2.31 3.23 และ 3.53 log CFU/g จากนั้นเมื่อมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 30 วันหลังย้ายปลูกจำนวนเชื้อราในดินมีจำนวนเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลองโดยพบจำนวนเชื้อราอยู่ในช่วง 3.86-4.54 log CFU/g ส่วนวันที่ 60 และ 90 หลังย้ายปลูก จำนวนของเชื้อราทั้ง 4 ชุดการทดลองอยู่ในช่วง 4.43 - 4.62 log CFU/g โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละชุดการทดสอง ที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 วัน ดังรูปที่ 21

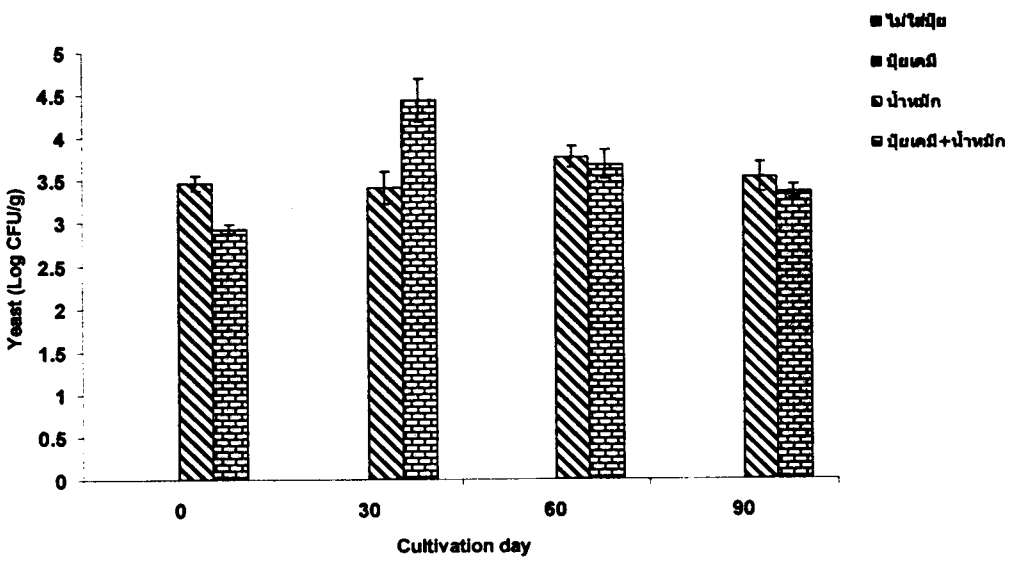


รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อราในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่างๆกันของแต่ละชุดการทดสอบ

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

จำนวนของยีสต์ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีพบเฉพาะดินชุดที่ได้รับน้ำหมักและดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมัก คือ วันที่ 0 หลังย้ายปลูกดินชุดที่ได้รับน้ำหมักมียีสต์ 3.46 log CFU/g และดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมัก มียีสต์ 2.92 log CFU/g จากนั้นวันที่ 30 ดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักกลับมีมียีสต์เพิ่มขึ้นเป็น 4.43 log CFU/g ส่วนดินชุดที่ได้รับน้ำหมักมียีสต์ 3.40 log CFU/g จากนั้นเมื่อมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 60 และ 90 วัน พบว่าจำนวนยีสต์ในดินของทั้งชุดที่ได้รับน้ำหมักและดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักมียีสต์จำนวนใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 3.35-3.76 log CFU/g ดังรูปที่ 22

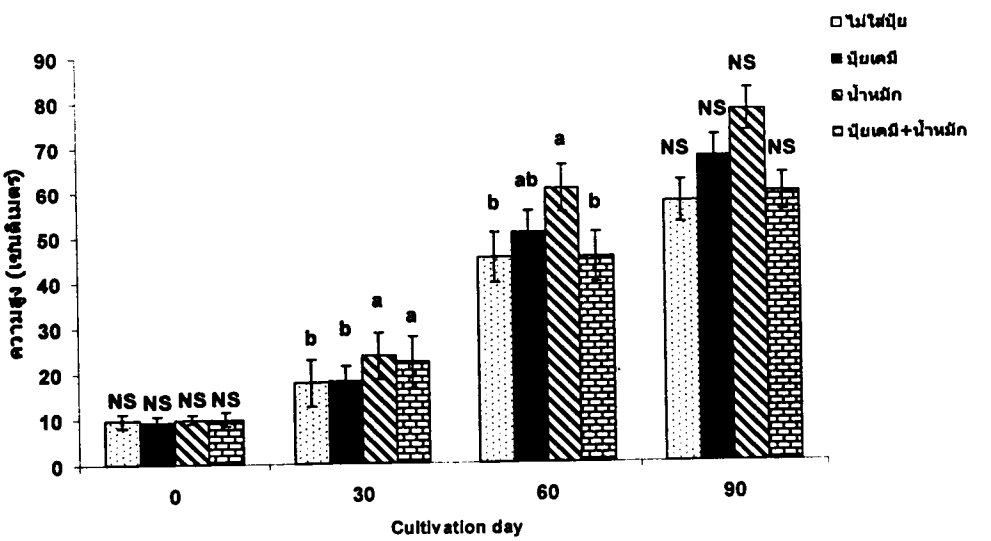


รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงจำนวนยีสต์ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่างๆกันของแต่ละชุดการทดสอบ

4. ผลทางด้านการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศราชินี

4.1 ความสูงของต้น

การศึกษาการเจริญเติบโตทางด้านความสูงของต้นมะเขือเทศราชินีราชินีที่ปลูกภายใต้กรรมวิธีต่างๆ จำนวน 4 ครั้ง เมื่ออายุ 0 30 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูก พบว่าต้นกล้าที่นำมาปลูกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทางด้านความสูง (p=0.05) และเมื่อวัดความสูงมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 30 วันหลังย้ายปลูก ดินชุดที่ได้รับน้ำหมักมีความสูงสูงสุดเท่ากับ 23.5 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ชุดได้รับปุ๋ยเคมี และชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+ น้ำหมัก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 17.68 18 และ 22.12 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อวัดความสูงมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 60 วันหลังย้ายปลูก พบว่าดินชุดที่ได้รับน้ำหมักยังคงมีความสูงสูงสุดเท่ากับ 60.25 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ชุดได้รับปุ๋ยเคมี และชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมัก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต่างก็มีความสูงเท่ากับ 45 50.58 และ 45 เซนติเมตร ตามลำดับ วันที่ 90 วันหลังย้ายปลูกก็เช่นกัน พบว่าดินชุดที่ได้รับน้ำหมักยังคงมีความสูงสูงสุด เท่ากับ 77.5 เซนติเมตร ในขณะที่ดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ชุดได้รับปุ๋ยเคมี และชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+ น้ำหมัก มีความสูงเท่ากับ 57.25 67.25 และ 59.13 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสำหรับแต่ละชุดการทดลอง (รูปที่ 23)



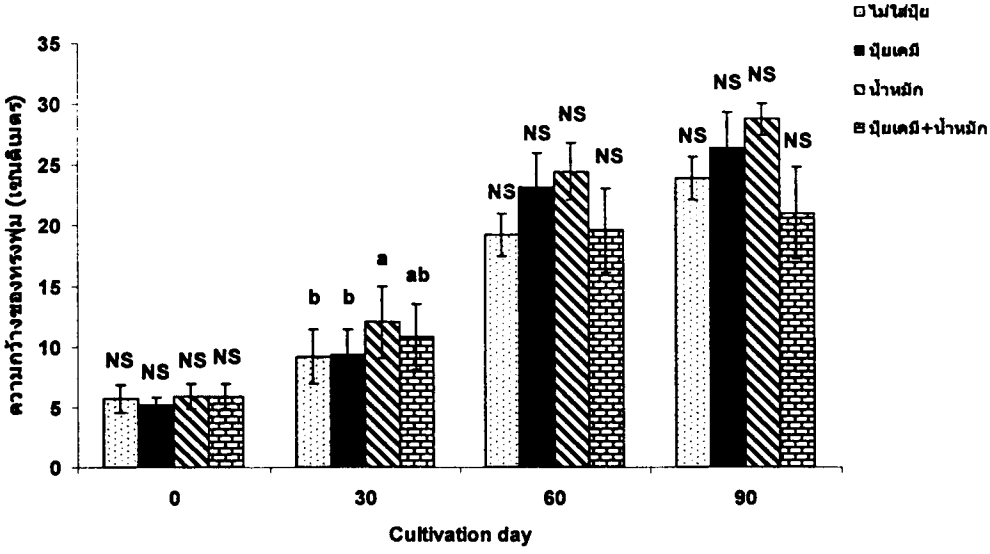
รูปที่ 23 ความสูงของต้นมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่างๆ ของแต่ละชุดการทดสอบ

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

4.2 ความกว้างของทรงพุ่ม

การศึกษาการเจริญเติบโตทางด้านความกว้างของทรงพุ่มของต้นมะเขือเทศราชินีราชินีที่ปลูกภายใต้กรรมวิธีต่างๆ จำนวน 4 ครั้ง เมื่ออายุ 0 30 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูก พบว่าต้นกล้าที่นำมาปลูกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทางด้านความกว้างของทรงพุ่ม ($p=0.05$) และเมื่อวัดความกว้างของทรงพุ่มต้นมะเขือเทศราชินีที่มีอายุได้ 30 วันหลังย้ายปลูก ดินชุดที่ได้รับน้ำหมักมีความกว้างของทรงพุ่มสูงสุดเท่ากับ 12 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ชุดได้รับปุ๋ยเคมี และชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมัก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) โดยต่างก็มีความกว้างของทรงพุ่มเท่ากับ 9.18 9.37 และ 10.81 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อวัดความกว้างของทรงพุ่มมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 60 วันหลังย้ายปลูก พบว่าดินชุดที่ได้รับน้ำหมักยังคงมีความกว้างของทรงพุ่มสูงสุดเท่ากับ 24.42 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ชุดได้รับปุ๋ยเคมี และชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+ น้ำหมัก แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่มีความกว้างของทรงพุ่มเท่ากับ 19.18 23.17 และ 19.58 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อวันที่ 90 วันหลังย้ายปลูกก็เช่นกัน พบว่าดินชุดที่ได้รับน้ำหมักยังคงมีความกว้างของทรงพุ่มสูงสุด เท่ากับ 28.75 เซนติเมตร ในขณะที่ดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ชุดได้รับปุ๋ยเคมีและชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+ น้ำหมัก มีความกว้างของทรงพุ่มเท่ากับ 23.88 26.38 และ 21 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 24)



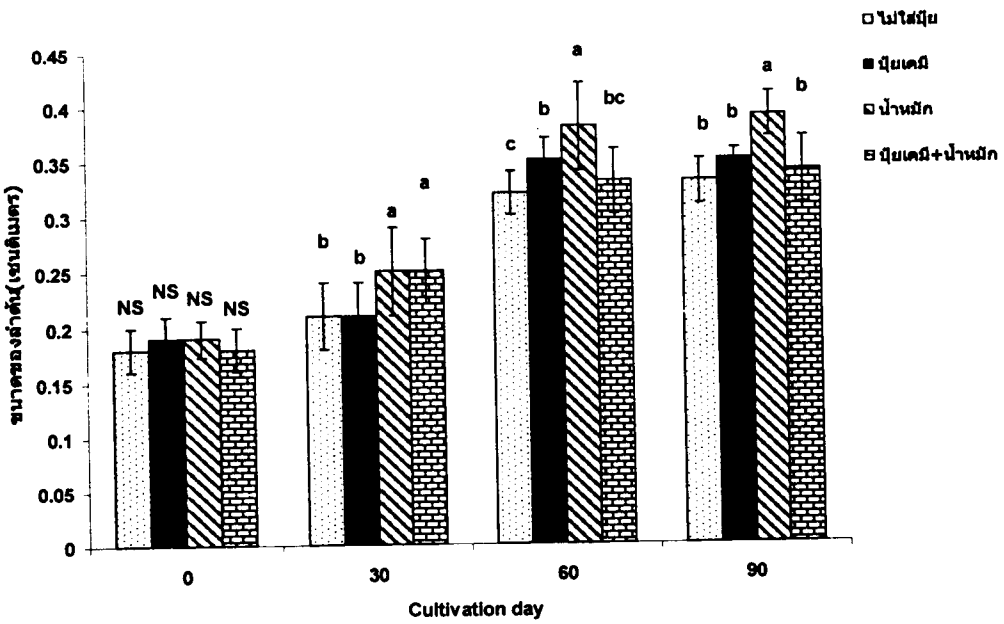
รูปที่ 24 ความกว้างของทรงพุ่มต้นมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่างๆ ของแต่ละชุดการทดสอบ

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

4.3 เส้นรอบวงของลำต้น

การศึกษาการเจริญเติบโตทางด้านเส้นรอบวงของลำต้นมะเขือเทศราชินีที่ปลูกภายใต้กรรมวิธีต่างๆ จำนวน 4 ครั้ง เมื่ออายุ 0 30 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูก พบว่าต้นกล้าที่นำมาปลูกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทางด้านเส้นรอบวงของลำต้น (p=0.05) และเมื่อวัดเส้นรอบวงของลำต้นมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 30 วันหลังย้ายปลูก ดินชุดที่ได้รับน้ำหมักและชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักมีเส้นรอบวงของลำต้นเท่ากันคือ 0.25 เซนติเมตร ในขณะที่ดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ชุดได้รับปุ๋ยเคมีมีเส้นรอบวงของลำต้นเท่ากับ 0.21 เซนติเมตร เมื่อมะเขือเทศราชินีมีอายุได้ 60 วันหลังย้ายปลูก ดินชุดที่ได้รับน้ำหมักยังคงมีเส้นรอบวงของลำต้นสูงสุดคือ 0.38 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) จากดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ชุดได้รับปุ๋ยเคมี และชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักที่มีเส้นรอบวงของลำต้น 0.32 0.35 และ 0.33 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อวันที่ 90 วันหลังย้ายปลูกก็เช่นกันพบว่าดินชุดที่ได้รับน้ำหมักยังคงมีเส้นรอบวงของลำต้นสูงสุด เท่ากับ 0.39 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) กับชุดการทดสอบที่เหลือ โดยดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ชุดได้รับปุ๋ยเคมี และชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมัก มีเส้นรอบวงของลำต้นเท่ากับ 0.33 0.35 และ 0.34 เซนติเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 25)



รูปที่ 25 เส้นรอบวงของลำต้นมะเขือเทศราชินีที่ระยะเวลาต่างๆ ของแต่ละชุดการทดสอบ

NS= ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05)

5. การเก็บข้อมูลด้านผลผลิตของมะเขือเทศราชินี

การเก็บข้อมูลด้านผลผลิตของมะเขือเทศราชินีไม่สามารถเก็บผลการทดลองได้ เนื่องจากมะเขือเทศราชินีที่ใช้ทดลองในครั้งนี้ไม่มีผลผลิต โดยปกติมะเขือเทศจะออกดอกและให้ผลผลิตเมื่อมีอายุได้ประมาณ 40-60 วันหลังย้ายปลูก แต่จากการทดลองในครั้งนี้พบว่ามะเขือเทศราชินีชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีและชุดที่ได้รับน้ำหมักเริ่มออกดอกเมื่อมีอายุได้ 70-75 วัน แล้วหลังจากนั้นดอกร่วงและไม่ติดผล ในขณะที่ดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยและชุดที่ใส่ปุ๋ยเคมี+น้ำหมักเริ่มติดดอกเมื่อมีอายุได้ 72-76 วัน แล้วหลังจากนั้นดอกร่วงและไม่ติดผลเช่นกัน

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. กระบวนการหมักและลักษณะของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

1.1 จุลชีววิทยาในกระบวนการหมักของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

1.1.1 การเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์

การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า พบว่าสำหรับการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count: TBC) และแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria: LAB) ตลอดระยะเวลาการหมักเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือวันที่ 14 ของการหมักมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งสองประเภทสูงสุด โดยกลายเป็นประชากรส่วนใหญ่ด้วยเงื่อนไขการหมักที่มีอากาศน้อย แสดงว่าใน TBC ส่วนใหญ่คือแบคทีเรียแลคติกซึ่งเป็นเชื้อดั้งเดิมที่ติดมากับลูกยอป่าและกากน้ำตาล (วัตถุดิบที่ใช้หมัก) แล้วหลังจากนั้นตั้งแต่วันที่ 21 จนกระทั่งสิ้นสุดการหมักมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ (รูปที่ 7) ขณะที่เชื้อราพบเฉพาะเริ่มต้นการหมักหลังจากนั้นจนตลอดการหมักไม่พบเชื้อราอีก เป็นเพราะว่าเชื้อราต้องการอากาศในการเจริญ แต่ด้วยสภาพการหมักทำให้ออกซิเจนหรืออากาศหมดไปอย่างรวดเร็วจากการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ โดยออกซิเจนถูกใช้ไปและเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น ดังนั้นทำให้แบคทีเรียแลคติกกลายเป็นประชากรส่วนใหญ่ เพราะสภาวะแวดล้อมเหมาะสมทำให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้เร็วและที่พบรองลงมาคือยีสต์ (รูปที่ 7) เนื่องจากบางกลุ่มของยีสต์เป็นพวกที่เจริญได้ทั้งสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ ทั้งในสภาวะการหมักที่ใช้ถุงพลาสติกปิดทับด้านบนเป็นการจำกัดปริมาณอากาศตั้งแต่เริ่มต้นการหมักสามารถป้องกันการเจริญของฟิล์มยีสต์ที่ผิวหน้าของน้ำหมัก (ดวงพร และคณะ, 2547)

1.1.2 แบคทีเรียแลคติกและยีสต์ที่พบในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

จากการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากกระบวนการหมักตลอดระยะเวลา 56 วัน จำนวน 102 ไอโซเลท ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* สูงถึง 97% โดยพบตั้งแต่วันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 56 ของการหมักโดยเป็นประชากรส่วนใหญ่และพบว่าเป็น *Lactobacillus pentosus* (3%) เฉพาะวันที่ 21 (ตารางที่ 8 และ 13) เชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 ชนิด จัดเป็น Facultative heterofermenter เพราะสามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาล C_5 และ C_6 ได้ผ่าน Phosphoketolase pathway ในการสร้างกรดแลกติก กรดอะซิติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนในถังหมัก จึงทำให้เกิดสภาวะที่

เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ชนิดนี้ การศึกษาครั้งนี้ต่างจากการรายงานของ Kantachote และ Charernratrakul (2008) ที่พบ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* และ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ในวันที่ 1-5 ของการหมัก และพบ *Lactobacillus plantarum* วันที่ 4 และ 5 ของการหมัก ซึ่งสาเหตุอาจมาจากแหล่งของคาร์บอนในการทดลองนี้ใช้กากน้ำตาลและแหล่งของลูกยอป่าที่แตกต่างกัน

ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของจำนวนยีสต์มีปริมาณสูงสุดในวันที่ 21 ของการหมัก หลังจากนั้นค่อยๆลดลงและมีปริมาณคงเหลืออยู่ในน้ำหมักมากกว่าแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นเพราะยีสต์มีความทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้มากกว่าแบคทีเรียโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia anomala* สามารถทนอยู่ได้ที่ pH 3.0 ส่วนยีสต์ *Pichia membranifaciens* ทนอยู่ได้ที่ pH 2.5 (Praphailong และ Fleet, 1997)

Kennes *et.al* (1991) ได้ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในน้ำส้ม พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่พบคือ *Lactobacillus plantarum* และยีสต์ที่พบคือ *Saccharomyces cerevisiae* การที่ pH ลดลงเรื่อยๆ จะยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus plantarum*

ชนิดของยีสต์ที่พบเมื่อเริ่มต้นการหมักเป็น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Rhodotorula mucilaginosa* โดย *S. cerevisiae* ยังคงพบในน้ำหมักจนถึงวันที่ 49 ในขณะที่ *R. mucilaginosa* ตรวจไม่พบตั้งแต่วันที่ 7 ของการหมัก และ *S. cerevisiae* พบเป็นสัดส่วนที่สูงถึง 38% ตลอดการหมัก (ตารางที่ 13) สามารถอธิบายได้ว่าเป็นเพราะ pH เมื่อเริ่มต้นการหมัก 4.4 และถังหมักยังมีออกซิเจนพอที่ยีสต์ *R. mucilaginosa* สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งยีสต์ชนิดนี้เป็นยีสต์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Moore และ Breedveld, 1989) แต่เมื่อหมักได้ 7 วัน พบว่า pH ลดลงเหลือ 3.7 และอยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนน้อยทำให้ยีสต์ *R. mucilaginosa* ไม่สามารถเจริญเติบโต ในขณะที่ *Pichia membranifaciens* เริ่มตรวจพบตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 35 จากนั้นวันที่ 42 ถึง 56 ตรวจไม่พบ ขณะเดียวกันยีสต์ *Pichia anomala* พบตั้งแต่วันที่ 14 จนถึงวันที่ 56 พบเป็นสัดส่วนที่รองจาก *S. cerevisiae* และเป็นยีสต์เพียงชนิดเดียวที่ยังคงอยู่รอดได้ในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า อาจเป็นเพราะ *P. anomala* สามารถผลิตสารพิษ (killer toxin) ที่สามารถฆ่ายีสต์อื่นๆ ซึ่งก็คือ *S. cerevisiae* และ *P. membranifaciens* ได้ด้วยการทำลายผนังเซลล์ และจากการศึกษาของ Fatih *et. al.* (2006) พบว่าสารพิษที่ผลิตโดย *P. anomala* เป็นโปรตีน คงสภาพอยู่ได้ที่ pH 3 - 5.5 ที่อุณหภูมิ 4 - 40°C และกิจกรรมจะลดลงเหลือ 60% เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 50°C ถึงแม้ว่ายีสต์ *P. membranifaciens* จะสามารถผลิตสารพิษได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพของสารพิษดังกล่าวจะมีกิจกรรมเมื่อ pH 3.0 - 4.8 และอุณหภูมิ 5 - 20°C (Santos และ Marqina, 2004) แต่ตลอดระยะเวลาการหมักอุณหภูมิของน้ำหมักอยู่ในช่วง 28 - 31°C จึงเป็นไปได้ว่า *S. cerevisiae* และ *P. membranifaciens* ในน้ำหมักชีวภาพอาจถูกฆ่าโดยสารพิษที่เกิดจาก *P. anomala*

1.2 บทบาทของจุลินทรีย์ต่อลักษณะของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

1.2.1 คุณสมบัติทางเคมี - กายภาพ

การเจริญของจำนวนจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมี-กายภาพของน้ำหมักได้แก่ ค่าของ pH ค่าการนำไฟฟ้า (EC) อุณหภูมิ อินทรียวัตถุ ปริมาณกรด และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (รูปที่ 8) กล่าวคือเมื่อจุลินทรีย์ที่พบต่างก็เป็นพวก heterotroph (หัวข้อ 1.1.1) จึงเจริญใช้น้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน ทำให้ปริมาณน้ำตาลซึ่งวัดในรูปกลูโคสลดลงและถูกเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติกและเอทานอลโดยแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ด้วยการใช้ phosphoketolase pathway ของ *L. plantarum* และ *L. pentosus* (หัวข้อ 1.1.2) ซึ่งต่างก็เป็น facultative heterofermenter ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลลดลงจาก 8% เหลือ 1.8% และปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการลดลงของน้ำตาลและสัมพันธ์กับค่า pH ที่ลดลงจาก 4.4 เมื่อเริ่มต้นการหมักเป็น 3.7 และเมื่อพิจารณาค่า EC ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณแร่ธาตุที่ละลายอยู่ในน้ำหมักพบว่ามีค่าเริ่มต้น 12.2 mS/cm สูงสุดในช่วงการหมักไว้ 14 และ 28 วัน (15.39 mS/cm) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียแลคติก จากนั้นค่า EC ก็ลดลงบ้างแต่ก็ยังสูงกว่าเมื่อเริ่มต้น แสดงว่าสภาพความเป็นกรดที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติกและ pH ที่ลดลงมีผลทำให้สารอาหารพืชจากลูกยอป่าอยู่ในรูปละลายได้มากขึ้น ซึ่งจากตารางที่ 15 เมื่อเจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำ 1:10 ตามสัดส่วนที่ใช้ทำน้ำหมักพบว่ามีค่าการนำไฟฟ้า 12.08 mS/cm แต่เมื่อผ่านกระบวนการหมักพบว่ามีค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเป็น 14.47 mS/cm สอดคล้องกับการศึกษาของ Tester *et al*. (1977) และ Prachyaki *et al*. (2008) ที่รายงานว่าในสภาวะที่น้ำหมักมีสภาพเป็นกรดช่วยให้ธาตุต่าง ๆที่อยู่ในรูปสารประกอบละลายออกมาอยู่ในรูปอิออนทำให้ค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้นซึ่งค่าการนำไฟฟ้าเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณอิออนทั้งอิออนบวกและอิออนลบ ซึ่งหลายชนิดเป็นธาตุอาหารของพืช เช่น Ca^{2+} และ PO_4^{3-}

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ซึ่งใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหาร ผลจากเมทาบอลิซึมเกิดเป็นก๊าซ CO_2 ทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศทำให้เชื้อราไม่เจริญดังที่กล่าวมาแล้วนั้น และผลจากการใช้สารอาหารส่งผลให้อินทรียวัตถุในน้ำหมักมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น ขณะเดียวปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมักมีมากขึ้นซึ่งเป็นผลจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และสารอินทรีย์ที่ถูกสกัดออกจากพืช (ตารางที่ 15 และ 16) ทำให้ค่า C/N ratio ลดลงจาก 97 เมื่อเริ่มต้นการหมักเป็น 17.5 เมื่อสิ้นสุดการหมัก ซึ่งค่า C/N ratio ที่เหมาะสมสำหรับการเป็นปุ๋ยน้ำควรมีค่าอยู่ระหว่าง 15-20 (Kayhanian และ Tchobanoglous, 1993) จึงทำให้น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่ามีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นปุ๋ยน้ำได้ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการหมัก (ตารางที่ 14) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิแตกต่างเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบ

กับอุณหภูมิห้องซึ่งเป็นเพราะการหมักในภาชนะที่มีขนาดไม่ใหญ่พอจึงไม่พบความแตกต่างของอุณหภูมิในกระบวนการหมักอย่างเด่นชัด

1.2. 2 ธาตุอาหารพืช

สำหรับธาตุอาหารหลักของพืชที่เกิดในระหว่างการหมัก (รูปที่ 10) ก่อนการหมักมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเริ่มต้น 140 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วมีปริมาณสูงสุด ตามระยะเวลาในการหมักซึ่งพบว่าที่อายุการหมัก 56 วัน มีค่า 633 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนฟอสฟอรัสพบว่ามีปริมาณสูงสุด 1360 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 การเพิ่มขึ้นของไนโตรเจนสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียที่มีจำนวนสูง ไนโตรเจนที่เพิ่มมากขึ้นส่วนใหญ่ก็คือผลิตผลจากการเจริญของจุลินทรีย์รวมทั้งเซลล์ของจุลินทรีย์ด้วย และจากตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าธาตุอาหารพืชก่อนการหมักมาจากกากน้ำตาล แต่เมื่อผ่านกระบวนการหมักพบว่าจุลินทรีย์ใช้สารอินทรีย์จากกากน้ำตาลและลูกยอป่าในการเจริญเติบโต โดยใช้ในการสร้างเซลล์ของจุลินทรีย์นั้น ส่งผลให้ปริมาณของธาตุอาหารหลักของพืช ได้แก่ ไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 4.5 เท่า ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมเพิ่มขึ้น 4.48 และ 1.22 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ธาตุอาหารรองคือ แคลเซียมและแมกนีเซียมเพิ่มขึ้น 1.15 และ 1.34 เท่า ในขณะที่จุลธาตุ คือแมกนีเซียมและสังกะสีเพิ่มขึ้น 38 และ 42 เท่า ส่วนโบรอนพบว่าเป็นธาตุที่มีปริมาณเพิ่มมากที่สุดจากกระบวนการหมัก โดยมีปริมาณเพิ่มมากถึง 153 เท่า นอกจากนี้ในกรณีของฟอสฟอรัสละลายมากขึ้นตามเปอร์เซ็นกรดที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าสภาพความเป็นกรดทำให้ฟอสฟอรัสที่อยู่ในลูกยอป่าจากรูปที่ไม่ละลายมาอยู่ในรูปที่ละลายได้ ส่วนโพแทสเซียมเริ่มต้นการหมักมีปริมาณ 3566 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่วันที่ 14 มีปริมาณลดต่ำลงเหลือ 3318 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจะค่อยๆสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น แสดงว่าปริมาณกรดที่มากขึ้นไม่น่าจะมีผลเกี่ยวข้องมากนักกับการมีโพแทสเซียมละลายได้มากขึ้น และปกติโพแทสเซียมละลายได้ง่ายในน้ำ (Bishop และ Lark, 2007) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารรอง (รูปที่ 11) คือ แคลเซียมเริ่มต้นมี 605 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงสุดในช่วงการหมักไว้ 42 วัน (818 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากนั้นก็ลดลงบ้างแต่ก็ยังสูงกว่าเมื่อเริ่มต้น และแมกนีเซียมที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น

ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของจุลธาตุ (รูปที่ 12 และ 13) คือ แมงกานีส สังกะสีและโบรอนมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเช่นกัน และเป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณโบรอนเริ่มต้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มเป็น 153 เท่า เมื่อน้ำหมักมีอายุได้ 28 วัน ซึ่งการเพิ่มขึ้นของโบรอนเกิดจากระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้โบรอนในลูกยอป่าถูกสกัดออกมาละลายอยู่ในน้ำหมัก และ pH ที่ต่ำกว่า 7 ทำให้โบรอนอยู่ในรูปกรดบอริกซึ่งละลายน้ำได้ดี (เพิ่มพูน, 2546)

เมื่อพิจารณาในแง่ของธาตุอาหารซึ่งได้จากการหมักครั้งนี้พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมัก ในน้ำหมักลูกยอป่ามีไนโตรเจน 0.063% ฟอสฟอรัส 0.14% โพแทสเซียม 0.43%

แคลเซียม 693 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม 536 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีส 6.09 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสี 1.69 มิลลิกรัมต่อลิตร และโบรอน 50.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองครั้งนี้ กับการวิเคราะห์น้ำสกัดชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 22 และ 23 ที่ปรากฏในรายงานของกรมวิชาการเกษตร (2545) กล่าวได้ว่าน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่ามีปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมงกานีส อยู่ในช่วงเดียวกันกับน้ำสกัดชีวภาพจากพืชที่มีอยู่ในรายงานของกรมวิชาการเกษตร (2544) แต่แตกต่างกันที่ปริมาณแมกนีเซียมในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าครั้งนี้มีปริมาณมากกว่า (ตารางที่ 23) เมื่อพิจารณาค่า C/N ratio น้ำหมักลูกยอป่าพบว่ามีค่าดังกล่าว 17.5 ซึ่งสำหรับการเป็นปุ๋ยน้ำควรมีค่าอยู่ระหว่าง 15-20 (Kayhanian และ Tchobanoglous, 1993) ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมสามารถใช้เป็นปุ๋ยน้ำได้

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพและธาตุอาหารหลักที่ได้จากน้ำหมักลูกยอป่ากับน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

วัตถุดิบ *	pH	EC (mS/cm)	N (%)	P (%)	K (%)
1. กล้วย	3.79-4.14	0.24-4.96	0.015-0.15	0.01-0.04	0.6-4.07
2. ลำใย	3.54-4.18	3.01-6.22	0.093-0.16	0.03-0.06	0.89
3. สับปะรด	3.84	2.04	0.04	0.02	1.13
4. ลิ้นจี่	3.85	1.76	0.08	0.02	11.24
5. ฝรั่ง	3.31	1.68	0.03	0.01	1.09
6. ลูกหม่อน	4.59	1.38	0.01	0.002	0.34
7. มะละกอ	3.59	6.60	0.15	0.02	1.45
8. ผักบุ้ง	3.48-4.13	1.83-9.64	0.05-0.18	0.02-0.05	0.94-11.27
9. เห็ดหอม	5.04	3.31	0.33	0.14	3.26
10. ผักกาด	3.83	10.11	0.2	0.04	2.15
11. หอยเชอรี่	4.49-5.16	0.80-1.56	0.23-0.35	0.01-0.02	0.25
12. ปลา	4.11	1.09	0.61	0.17	2.69
13. น้ำหมักชีวภาพจากพืช	3.5-5.6	3-79	0.03-1.91	ไม่พบ-1.06	0.05-2.0
14. ลูกยอป่า	3.66	14.47	0.063	0.14	0.436

* หมายเลข 1-12 น้ำหมักชีวภาพที่ผลิตโดยเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ (มะลิวัลย์, 2545)
หมายเลข 13 ปริมาณธาตุอาหารที่วิเคราะห์พบในน้ำสกัดชีวภาพจากพืชที่ผลิตโดยเกษตรกร จำนวน 89 สูตร (หน่วยงานวิเคราะห์ปุ๋ย กองเกษตรเคมี 2543 - 2545)
หมายเลข 14 เป็นน้ำหมักลูกยอป่าที่ได้จากการทดลองครั้งนี้

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบธาตุอาหารรองและจุลธาตุที่ได้จากน้ำหมักลูกยอป่ากับน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

วัตถุดิบ *	แร่ธาตุ (mg/L)					
	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn
1. กล้วย	22-60	152-555	9-26	0	14-33	5-9
2. ลำใย	30	204-280	2-52	0	10-19	5-10
3. สับปะรด	44	176	9	0	12	8
4. ลิ้นจี่	51	268	15	0	11	9
5. ฝรั่ง	40	140	15	0	14	5
6. ลูกหม่อน	22	12	21	0	10	5
7. มะละกอ	60	312	24	0	11	6
8. ผักบุ้ง	28-39	165-312	8-59	0	14-21	6-9
9. เห็ดหอม	40	376	34	0	21	15
10. ผักกาด	47	249	33	0	19	129
11. หอยเชอรี่	180-2,751	274-329	19	1-5	52-56	9-10
12. ปลา	1,224	690	51	0	29	10
13. น้ำหมักชีวภาพจากพืช	43-1,190	95-350	ไม่พบ-850	ไม่พบ-100	ไม่พบ-150	2-58
14. ลูกยอป่า	693	536	-	-	6.09	1.69

- = ไม่ได้วิเคราะห์

* หมายเลข 1-12 น้ำหมักชีวภาพที่ผลิตโดยเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ (มะลิวัลย์, 2545)
หมายเลข 13 ปริมาณธาตุอาหารที่วิเคราะห์พบในน้ำสกัดชีวภาพจากพืชที่ผลิตโดยเกษตรกร จำนวน 89 สูตร (หน่วยงานวิเคราะห์ปุ๋ย กองเกษตรเคมี 2543 - 2545)
หมายเลข 14 เป็นน้ำหมักลูกยอป่าที่ได้จากการทดลองครั้งนี้

1.2.3 การตรวจวิเคราะห์หาฮอร์โมนพืชจิบเบอแรลลิน (Gibberellins) และออกซิน (Auxins)

ในน้ำหมักชีวภาพนอกจากมีสารอาหารของพืชแล้วยังมีสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย เช่น ฮอร์โมนจิบเบอแรลลินและออกซิน สำหรับผลการทดสอบหาฮอร์โมนจิบเบอแรลลิน โดยใช้ gibberlic acid (GA_3) เป็นสารมาตรฐานของฮอร์โมนดังกล่าวและมีค่า Rf เท่ากับ 0.70 (รูปที่ 14) ในขณะที่ตัวอย่างน้ำหมักลูกยอป่าเมื่อเริ่มต้นการหมักวันที่ 0 (จุดที่ 1 ถึง 3) มีค่า Rf เท่ากับ 0.35 เพียงค่าเดียว แต่ตัวอย่างน้ำหมักวันที่ 14 (จุดที่ 4 ถึง 6) มีค่า Rf 2 ค่า คือ 0.53 และ 0.60 ทำนองเดียวกันกับตัวอย่างอื่นๆ เมื่ออายุการหมักมากขึ้นที่ให้ค่า Rf 2

ค่าเช่นกันและมีค่าไม่แตกต่างจากวันที่ 14 ของการหมัก แต่ไม่พบว่ามีค่า Rf เท่ากับสารมาตรฐาน เป็นที่ทราบกันดีว่าฮอร์โมนจิบเบอแรลลินมีหลายชนิด แต่การทดสอบครั้งนี้มีสารมาตรฐานของฮอร์โมนจิบเบอแรลลินเพียง 1 ชนิดเท่านั้นคือ gibberellic acid (GA_3) ค่า Rf ในตัวอย่างจึงอาจเกิดจากฮอร์โมนจิบเบอแรลลินชนิดอื่น เช่น จากการศึกษาฮอร์โมนจิบเบอแรลลินในถั่วฝักพร้า (*Canavalia gladiata* DC) ของ Tamura *et.al* (1967) โดยใช้วิธีเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ พบว่าในถั่วดังกล่าวสารที่มีค่า Rf 0.3 และ Rf 0.6 คือ ฮอร์โมนจิบเบอแรลลิน

จากการรายงานของสุนันทาและคณะ (2545) อ้างโดย ชุติมา (2546) พบว่าน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากผักและผลไม้ เช่น มะละกอ กล้วย ฟักทอง มีปริมาณ indole-3-acetic acid (IAA) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ gibberellic acid (GA_3) 18.27 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 1 ปี แต่ในการศึกษาครั้งนี้หมักเพียง 8 สัปดาห์เท่านั้น

1.2.4 ปริมาณกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์

ผลจากการวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก และกรดอะซิติก (ตารางที่ 17) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการหมักจากแบคทีเรียแลคติกโดยใช้ Phosphoketolase pathway และในกรณีของเอทานอลยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากยีสต์ *S. cerevisiae* จากน้ำหมักที่มีอายุการหมักได้ 56 วัน พบว่ามีปริมาณเอทานอลสูงถึง 1.7% กรดอะซิติก 0.33% และตรวจไม่พบ กรดแลกติก ทั้งๆที่ปริมาณกรดสูงถึง 1% ทั้งนี้เป็นเพราะยีสต์ในน้ำหมักสามารถใช้กรดแลกติกได้ โดยเฉพาะ *P. anomala* ซึ่งพบปริมาณสูงรองจาก *S. cerevisiae* เป็นที่ทราบว่าการเสื่อมคุณภาพของหญ้าหมัก (silage) เกิดโดยยีสต์พวก *Pichia* และ *Candida* (Jonsson และ Pahlow, 1984) โดยยีสต์จะใช้กรดแลกติก ทำให้ pH ของหญ้าหมักสูงขึ้น ส่งผลให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้เกิดการเน่าเสียเพิ่มจำนวน เกิดการเสื่อมคุณภาพของหญ้าหมักในที่สุด (Woolford และ Pahlow, 1998)

1.2.5 ความเป็นพิษของน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าต่อเมล็ดมะเขือเทศราชินี

การบ่งชี้ถึงปุ๋ยที่ปราศจากความเป็นพิษต่อพืชโดยพิจารณาจากค่าดัชนีการงอก (Germination index) เกิน 50% (Zucconi *et al*., 1985) และสำหรับน้ำหมักลูกยอป่าอายุการหมัก 8 สัปดาห์เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อพืช ดังรูปที่ 16 พบว่าเมื่อเจือจางน้ำหมัก 64 เท่า มีค่าดัชนีการงอก 114% ซึ่งเกินค่าเกณฑ์บ่งชี้ดังกล่าวและเมื่อเจือจาง 256 เท่า มีค่าดัชนีการงอกเพิ่มขึ้นเป็น 157% เป็นอัตราส่วนที่สารต่างๆในน้ำหมักอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศราชินีซึ่งสามารถอธิบายได้จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกเป็นกรดที่มีผลยับยั้งการงอกได้ (Paré *et al.,* 1997) พบว่ามีปริมาณขณะที่ยังไม่ได้เจือจาง 0.33% รวมถึงปริมาณเอทานอลซึ่งก็มีความเป็นพิษเช่นกันมีปริมาณสูงถึง 1.70% ดังนั้นเมื่อเจือจางมากขึ้นทำ

ให้ความเป็นพิษของสารทั้งสองลดลงเมล็ดมะเขือเทศราชินีจึงงอกได้ดีขึ้นและยังพบด้วยว่าเมื่อเจือจางมากขึ้นถึง 512 เท่า และ 1024 เท่า ค่าดัชนีการงอกกลับลดลงแสดงว่าธาตุอาหารหรือฮอร์โมนจิบเบอเรลลินซึ่งเร่งการงอกถูกเจือจางลงมากจึงไม่ส่งเสริมต่อการงอกของเมล็ด

เมื่อเจือจางน้ำหมัก 1:200 เท่า พบว่า pH 3.99 EC 1.38 mS/cm มีปริมาณธาตุอาหาร ดังนี้ คือ ไนโตรเจน 3.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัส 6.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และโพแทสเซียม 21.7 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียม 3.46 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม 2.68 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีส 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสี 0.008 มิลลิกรัมต่อลิตร และโบรอน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นไปได้ว่าน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าไม่ได้เป็นแหล่งของธาตุอาหารหลักซึ่งพืชต้องการในปริมาณมาก แต่เป็นแหล่งของธาตุอาหารรองและจุลธาตุได้ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียมและโบรอน รวมถึงฮอร์โมนพืชอย่างเช่น จิบเบอแรลลิน ซึ่งพืชต้องการในปริมาณน้อยความเข้มข้นเพียง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Farooqi *et al.,* 1994)

2. น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศราชินี

ในส่วนผลของน้ำหมักลูกยอป่าที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ที่ใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินีโดยได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของดิน โดยตรวจวิเคราะห์เนื้อดิน ค่า pH ค่าการนำไฟฟ้า อินทรียวัตถุ วิเคราะห์ปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส โบรอน และสังกะสี

2.1 การวิเคราะห์เนื้อดินของดินที่ใช้ปลูกมะเขือเทศราชินี

เมื่อวิเคราะห์เนื้อดินพบว่าเป็นดินทรายร่วน (Loamy sand) ดังตารางที่ 18 ซึ่งเป็นดินที่เหมาะต่อการเจริญของมะเขือเทศราชินี เพราะเป็นดินที่ระบายน้ำดีและอุ้มความชื้นได้สูง (สัมฤทธิ์, 2538)

2.2 ค่า pH และการนำไฟฟ้าของดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี

โดยก่อนปลูกมะเขือเทศราชินี (วันที่ 0) คุณสมบัติทางเคมีของดินชุดควบคุมและดินชุดที่ใส่ปุ๋ยเคมีมี pH เป็นกรดปานกลางอยู่ในช่วง 5.83-5.89 และดินชุดที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพกับดินชุดที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพ+ปุ๋ยเคมีมี pH เป็นกรดน้อยกว่า คือ มี pH 6.29 และ 6.32 ตามลำดับ (รูปที่ 17) จัดเป็นดินที่เป็นกรดเล็กน้อย ซึ่ง pH ของดินที่เหมาะต่อการปลูกมะเขือเทศราชินี คือ ประมาณ 6.0-7.0 (สัมฤทธิ์, 2538) จึงกล่าวได้ว่าดินชุดที่ได้รับน้ำหมักมี pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของมะเขือเทศราชินีมากกว่าดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีและดินชุดควบคุม

ทั้งในระหว่างที่มีการปลูกมะเขือเทศราชินีพบว่าการเปลี่ยนแปลงของดินชุดที่ได้รับน้ำหมักและดินชุดที่ได้รับน้ำหมัก+ปุ๋ย เคมีมี pH เป็นกรดน้อยกว่าดินชุดควบคุมและดินที่ใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี เช่นเดียวกันกับการรายงานของมะลิวัลย์ (2545) ที่พบว่าเมื่อบ่มดินกับน้ำหมักชีวภาพเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำให้ดินมีค่า pH เพิ่มขึ้น 0.08-0.34 pH unit

ในขณะที่การนำไฟฟ้าของดินทุกชุดการทดลองตลอดระยะเวลา 90 วัน มีค่าตั้งแต่ 0.8-1.86 mS/cm ซึ่งเป็นค่าที่ไม่กระทบกระเทือนต่อการเจริญของมะเขือเทศ ซึ่งถ้ามีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า 15 mS/cm ทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศลดลง (Adams และ Ho, 1992)

2.3 ปริมาณธาตุอาหารหลัก (Primary plant nutrient)

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดินทุกชุดการทดลองก่อนย้ายปลูกอยู่ในช่วง 251-397 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (0.025-0.039%) ฟอสฟอรัสทั้งหมดอยู่ในช่วง 983-1841 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (0.098-0.184%) โพแทสเซียมอยู่ในช่วง 108-126 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (0.0108-0.0126%) จากการรายงานของนภดล (2538) ระบุว่าปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศคือ มีปริมาณไนโตรเจน 150-1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฟอสฟอรัส 50-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และโพแทสเซียม 100-400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งปริมาณของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมเมื่อเริ่มต้นปลูกมะเขือเทศ (วันที่ 0) ทุกชุดการทดลองมีปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญ

แต่เมื่อวันที่ 90 หลังย้ายปลูกพบว่า ดินทุกชุดการทดสอบมีปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ทุกชุดการทดลองที่มีจำนวนธาตุทั้งสองชนิดในดินมีปริมาณลดลงซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศราชินีที่เพิ่มขึ้นซึ่งต้องดูดธาตุอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต

เมื่อพิจารณาความเพียงพอของโพแทสเซียมในการทดลองครั้งนี้ พบว่าดินทุกชุดการทดลองเมื่อเริ่มต้นย้ายปลูก (วันที่ 0) มีปริมาณโพแทสเซียมในดินอยู่ในช่วง 108-126 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ

ในส่วนของเปอร์เซ็นต์ของอินทรียวัตถุในดินที่ปลูกมะเขือเทศอยู่ในระดับปานกลาง คือ 3.2-4% ซึ่งเป็นระดับปกติที่พบในดินทรายร่วนซึ่งเป็นเหตุผลที่ว่าชุดที่ใส่น้ำหมักชีวภาพมีการขาดธาตุไนโตเจนและโพแทสเซียมน้อยกว่าชุดการทดลองอื่นๆ จึงเป็นไปได้ว่าน้ำหมักชีวภาพสามารถช่วยเพิ่มการสลายหรือดึงธาตุอาหารจากอินทรียวัตถุในดิน

2.4 ปริมาณธาตุอาหารรอง (□econdary plant nutrient) และปริมาณจุลธาตุ (Micronutrients)

ในวันแรกที่ย้ายปลูกมีแคลเซียมอยู่ในปริมาณสูงคืออยู่ในช่วง 3374-3953 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แมกนีเซียมอยู่ในช่วง 70-88 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แมงกานีส 20-24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โบรอน 2.3-3.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสังกะสี 36-56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ปริมาณของจุลธาตุที่เหมาะสมคือ แมงกานีส 50-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โบรอน 2-5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสังกะสี 20-24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Aydin *et al*. 2000) ซึ่งทั้ง 3 ธาตุนี้ในดินมีเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ ในขณะที่ปริมาณของแคลเซียมที่เพียงพอต่อการเจริญ คือ 5,800-9,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และแมกนีเซียม 1,100-1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณของแคลเซียมและแมกนีเซียมที่มีในดินจึงไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี

3. การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ในดินที่ปลูกมะเขือเทศราชินี

ในแง่ของการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดินตั้งแต่วันแรกหลังย้ายปลูก ทั้ง 4 ชุดการทดลองมีจำนวนไม่แตกต่างกันทางสถิติคืออยู่ในช่วง 7.06-7.78 log CFU/g วันที่ 30 กลับลดลงเหลือ 6.8-7.03 log CFU/g แต่วันที่ 90 ดินชุดควบคุมและดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดน้อยกว่าชุดที่ได้รับน้ำหมักและชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 20) ซึ่งจำนวนแบคทีเรียในดินชุดควบคุมและดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีที่ลดลงอาจเป็นเพราะ pH ที่เป็นกรดมากกว่า (รูปที่ 17) ซึ่งโดยปกติแบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วง pH 6-8 (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541) แต่ในดินชุดควบคุมและดินชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีมี pH 5.75 และ 5.48 ต่างจากดินชุดที่ได้รับน้ำหมักและชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมักที่มี pH 6.18 และ 6.14 ซึ่งนี้อาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ดินเพาะปลูกเมื่อใช้แต่เพียงปุ๋ยเคมีทำให้คุณภาพดินต่ำลงในแง่ของจุลินทรีย์ดิน

ในขณะที่เชื้อรามีความสามารถทนในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดได้มากกว่าแบคทีเรีย โดยจะเติบโตได้ดีช่วง pH 4-8 (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2541) จึงทำให้จำนวนเชื้อราในวันแรกหลังย้ายปลูกมีจำนวนสูงสุดในชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมีซึ่งเป็นชุดที่มี pH ต่ำที่สุด แต่หลังจากนั้นปริมาณไม่แตกต่างจากการทดลองชุดอื่น (รูปที่ 21) ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ในดินขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น สารอินทรีย์ชนิดต่างๆ pH ที่แตกต่างกันไม่ใช่ปัจจัยหลักเพียงอย่างเดียว ทั้งในน้ำหมักยังมีสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์และสารประกอบอื่นๆ ซึ่งจุลินทรีย์ในดินสามารถใช้ประโยชน์ได้ก็อาจเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้จุลินทรีย์ในดินมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้เช่นกัน

ส่วนยีสต์พบเฉพาะชุดที่ได้รับน้ำหมักและชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมัก (รูปที่ 22) แสดงว่ายีสต์ที่พบมาจากน้ำหมักที่ใส่ลงในดินและเป็นยีสต์ *P. anomala* ซึ่งเป็นยีสต์เพียงชนิดเดียวที่พบในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยยีสต์มีประโยชน์ต่อพืชหลายประการเช่น ยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ β -1,3 glucanase ที่ผลิตโดยยีสต์ *Pichia membranifaciens* (ที่พบในน้ำหมักลูกยอป่า แต่ไม่พบในช่วงสุดท้ายของการหมัก) ซึ่งสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคพืชได้ (Santos และ Marquina, 2004) และยีสต์สามารถผลิตวิตามินบี 12 ที่ส่งเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่รอบรากพืช หรือ Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) เจริญได้ดีซึ่งมีผลโดยตรงคือ ทำให้ PGPR เพิ่มจำนวนและผลิตฮอร์โมน auxins gibberellins และ cytokinins ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (Cocking, 2003)

นอกจากนี้ยีสต์ *P. anomala* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้กว้างและสามารถโตได้ในสภาพที่มีออกซิเจนน้อย (Fredlund *et.al*. 2002) ทั้งยังยับยั้งเชื้อราที่ก่อความเสียหายแก่ผลผลิตหลังเก็บเกี่ยว เช่น จากรายงานของ Druvefors *et.al*. 2005 ที่ใช้ยีสต์ *P. anomala* ยับยั้งเชื้อรา *Penicillium roqueforti* ที่ทำความเสียหายแก่ข้าวสาลีในระหว่างการเก็บในไซโล โดยในการทดลองครั้งนี้ยีสต์ที่พบในน้ำหมักโดยเฉพาะ *P. anomala* อาจสามารถสร้างสารพิษที่ยับยั้งราหลายชนิด เช่น *Aspergillus flavus* (Petersson และ Schnurer ,1995) *Aspergillus parasiticus, Aspergillus niger, Aspergillus pullulans* (Polonelli *et al*., 1987) *Botrytis cinerea* (Masih *et al*., 2000) *Penicillium notatum* (Polonelli และ Morace, 1986) รวมทั้ง *Cladosporium cladosporioides* ซึ่งเป็นราก่อโรคใบจุดและรากดำของทุเรียน (Petersson และ Schnurer ,1995) ทั้งยังสามารถสร้าง killer toxin ต่อ *Candida albicans* (Masih *et al*., 2002) ได้อีกด้วย

4. การเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศราชินี

จากการวัดการเจริญเติบของมะเขือเทศราชินีในวันที่ 0 หลังย้ายปลูก มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันไม่พบความแตกต่างทางสถิติ แต่ในช่วง 30-90 วันหลังย้ายปลูกพบว่าดินชุดที่ได้รับน้ำหมักมีการเจริญเติบโตทั้งด้านความสูง ขนาดของทรงพุ่ม และขนาดของลำต้นสูงสุดและแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) ดังรูปที่ 23-25 เนื่องจากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่านอกจากจะมีธาตุอาหารที่หลากหลายอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ที่พืชสามารถจะดูดไปใช้ได้รวดเร็ว โดยเฉพาะธาตุไนโตรเจนที่มีความสำคัญต่อการเจริญทางด้านลำต้น ใบ กิ่ง แล้วยังอาจมีสารที่เร่งการเจริญเติบโต ซึ่งสัมพันธ์กับการตรวจพบฮอร์โมนจิบเบอเรลลินในน้ำหมักตั้งแต่วันที่ 14 ของการหมัก (รูปที่ 14) เช่นเดียวการศึกษาการใช้น้ำหมักชีวภาพในการปลูกพริกของ ชุติมา (2546) พบว่าการใช้น้ำหมักชีวภาพในช่วงปีแรกในการปลูกพริกให้ผลดีกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีในแง่ความสูง ขนาดลำต้นและผลผลิต และดินที่ใช้น้ำหมักชีวภาพ

ติดต่อกัน 3 ปี นอกจากจะทำให้ความสูง ขนาดลำต้นและผลผลิตพริกดีกว่าปุ๋ยเคมีแล้วพบว่าพริกได้รับความเสียหายจากการระบาดของโรคกุ้งแห้งซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* น้อยกว่าดินที่ใช้ปุ๋ยเคมีและดินที่ใช้น้ำหมักเป็นระยะเวลา 1 ปี

ในส่วนของน้ำหมักชีวภาพต่อผลผลิตของมะเขือเทศราชินีสำหรับการทดลองนี้ พบว่า ทุกชุดการทดลองมะเขือเทศราชินีมีการติดดอก แต่ไม่ติดผล และเมื่อพิจารณาจากสภาพภูมิอากาศจากการรายงานของสถานีตรวจวัดอากาศเกษตรคอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา (http://www.tmd.go.th) อุณหภูมิเฉลี่ยเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม ซึ่งเป็นช่วงที่ปลูกมะเขือเทศราชินี มีอุณหภูมิเฉลี่ยในแต่ละเดือน คือ 30.2ºC 31.9ºC และ 34.1ºC ตามลำดับ โดยมีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 64% 55% และ 52% แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 15ºC-25ºC และมีความชื้นสัมพัทธ์ 50-65% (Pu□os และ Morard, 1997) ดังนั้นการไม่ติดผลสาเหตุหลักเป็นเพราะอุณหภูมิที่สูงเกินไป จากการรายงานของ สัมฤทธิ์ (2538) กล่าวว่ามะเขือเทศราชินีจะติดผลที่อุณหภูมิ 18ºC และที่อุณหภูมิสูงกว่า 30ºC จะทำให้ไม่ติดผล เช่นเดียวกับรายงานของ Ho (1987) ที่กล่าวว่าการปลูกมะเขือเทศภายใต้สภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิเหมาะสมให้ผลดีที่สุดทั้งต่อการออกดอกและการติดผล อุณหภูมิที่สูงเกิน 30ºC ทำให้เกิดการร่วงของดอกและการติดผลต่ำเพราะในช่วงที่อุณหภูมิสูง ทำให้ก้านชูเกสรตัวเมียโผล่พ้นอับเรณูอันเป็นอุปสรรคในการถ่ายละอองเกสร ทำให้เปอร์เซ็นต์การผสมตัวเองลดลงส่งผลให้ดอกร่วงและการติดผลลดลง

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าแม้น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าจะไม่สามารถส่งผลให้มะเขือเทศราชินีมีผลผลิตได้ แต่ก็พบว่าน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าก็เป็นแหล่งของฟอสฟอรัสที่มีปริมาณใกล้เคียงกับน้ำหมักที่ผลิตจากเศษปลา ในขณะที่แหล่งของโพแทสเซียมควรหาพืชที่มีโพแทสเซียมมากกว่าลูกยอป่า เช่น กล้วยหรือผักบุ้ง (ตารางที่ 22)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากบทบาทของแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus pentosus* ในกระบวนการหมักทำให้ได้น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่มีสภาวะเป็นกรด ทำให้ pH ของน้ำหมักต่ำ ส่งผลให้สารอาหารพืชทั้งธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และจุลธาตุอยู่ในรูปสารละลายที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งจากกระบวนการหมักพบว่าปริมาณของธาตุอาหารหลักของพืช ได้แก่ ไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 4.5 เท่า ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมเพิ่มขึ้น 4.48 และ 1.22 เท่า นอกจากนี้ธาตุอาหารรองคือ แคลเซียมและแมกนีเซียมเพิ่มขึ้น 1.15 และ 1.34 เท่า ในขณะที่จุลธาตุ คือแมกนีเซียมและสังกะสีเพิ่มขึ้น 38 และ 42 เท่า ส่วนโบรอนพบว่าเป็นธาตุที่มีปริมาณเพิ่มมากที่สุดจากกระบวนการหมัก โดยมีปริมาณเพิ่มมากถึง 153 เท่า และน้ำหมักชีวภาพยังเพิ่มดัชนีการงอกให้กับเมล็ดมะเขือเทศราชินีโดยใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยด้วยการเจือจางน้ำหมักในช่วง 200-500 เท่า ทั้งมีค่า C/N ratio เท่ากับ 18 และมีค่า EC 1.38 mS/cm ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมสามารถใช้เป็นปุ๋ยน้ำได้ ดังนั้นน้ำหมักชีวภาพเมื่อเจือจาง 1:200 เท่า เป็นแหล่งของธาตุอาหารรองและจุลธาตุได้ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียมและโบรอน โดยเฉพาะโบรอน

2. ยีสต์ที่พบในน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าคือ *Saccharomyces cerevisiae* (38%), *Pichia anomala* (31%) , *Pichia membranifaciens* (28.6%) และ *Rhodotorula mucilaginosa* (2.4 %) และสำหรับ *Pichia anomala* และ *Pichia membranifaciens* ที่พบทั้ง 2 ชนิด เป็นยีสต์ที่สามารถควบคุมราก่อโรคได้เป็นอย่างดี

3. ดินชุดที่ใช้น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าและชุดที่ได้รับปุ๋ยเคมี+น้ำหมัก มี pH เป็นกรดน้อยกว่าดินชุดที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย และชุดได้รับปุ๋ยเคมีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. สามารถพบยีสต์ได้ในชุดดินที่มีการใช้น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าเท่านั้น

ข้อเสนอแนะ

1. จากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้ได้ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียและยีสต์ที่มีบทบาทในการหมัก เพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพมากขึ้นในด้านการใช้เป็นปุ๋ยน้ำควรจะมีการศึกษาถึงชนิดของพืชที่อุดมด้วยธาตุอาหารหลักและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการนำน้ำหมักมาใช้

2. ควรจะศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำหมักชีวภาพในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา เพราะในน้ำหมักชีวภาพพบชนิดของยีสต์ที่อาจสร้างสารพิษยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้

3. การใช้น้ำหมักชีวภาพควรมีการตรวจสอบธาตุอาหารพืชและดูว่ามีความเหมาะสมในการนำไปใช้กับพืชชนิดใดบ้าง เพื่อแนะนำเกษตรกร

4. น้ำหมักชีวภาพลูกยอป่ามีความเหมาะสมเป็นแหล่งของจุลธาตุโดยเฉพาะโบรอน

5. การใช้น้ำหมักชีวภาพส่งผลดีต่อดินในแง่ของความเป็นกรด-ด่าง ทำให้ดินมีค่าเป็นกลางเหมาะต่อการเจริญต่อพืช

6. การใช้น้ำหมักชีวภาพทำให้ดินมีความหลากหลายของจุลินทรีย์มากขึ้น โดยเฉพาะการมียีสต์

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. ฝ่ายเผยแพร่และประชามสัมพันธ์. 2536. การใช้ข้อมูลผลการวิเคราะห์ดิน. วารสารพัฒนาที่ดิน. 30 กันยายน 2536, 44-46.

เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์. 2541. มะเขือเทศ. 70 หน้า. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2541. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. 547 หน้า. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จำเป็น อ่อนทอง. 2547. คู่มือการวิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาธรณีศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชุติมา ประดิษฐเวทย์. 2546. ผลของน้ำสกัดชีวภาพต่อการเจริญเติบโต การดูดใช้ธาตุอาหารพืช และผลผลิตพริกในแปลงเกษตรกร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. 216 หน้า. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ดวงพร คันธโชติ และวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2547. คุณลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชและบทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เสนอสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

ดวงพร คันธโชติ, วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และณรงค์ฤทธิ์ อัศวเรืองพิภพ. 2548. ลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไทย. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27(3): 601-615.

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2544. สถานการณ์การผลิตผักในประเทศไทย. 320 หน้า. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการผลิตผักสดและเมล็ดพันธุ์ผัก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นภดล เรียบเลิศหิรัญ. 2538. การปลูกพืชไร้ดิน. 210 หน้า. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เพิ่มพูน กีรติกสิกร. 2546. โบรอน-จุลธาตุอาหารพืช. 197 หน้า. ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มาโนช วามานนท์. 2540. ผักพื้นบ้าน: ความหมายและภูมิปัญญาของสามัญชนไทย.261 หน้า. กรุงเทพฯ: สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

มะลิวัลย์ แซ่อุ้ย. 2545. ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำสกัดชีวภาพและผลกระทบต่อคุณสมบัติบางประการของดิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มูลนิธิสายใยแผ่นดิน. 2547. ตลาดผักและผลไม้เกษตรอินทรีย์. ว.เกษตรกรรมธรรมชาติ. 4/2547 : 43-47.

วนิดา พรมขาวทอง. 2547. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอทานอล. โครงการทางจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมบูรณ์ เตชะภิญญาวัฒน์. 2535. สรีรวิทยาของพืช. 239 หน้า. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมศักดิ์ วังใน. 2528. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. 193 หน้า. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2538. แร่ธาตุอาหารพืชสวน. 450 หน้า. ขอนแก่น: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2526. ฮอร์โมนพืช. 147 หน้า. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนันทา ชมภูนิช. 2546. ฮอร์โมนพืชและธาตุอาหารพืชในน้ำหมักชีวภาพ.134 หน้า.กรุงเทพฯ: กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร.

Adams, P., and Ho, LC. 1992. The susceptibility of modern tomato cultivars blossom-end rot in relation to salinity. Hort. Science 67, 827-839.

Aroonrungsikul, C., S. Sukprakarn, S. Shigenaga and E. Nawata. 1993. Analysis of endogenous gibberellic acid abscisic acid and ethylene in cucumber seed (*Cucumis sativus* L.). Kasetsart J.(Nat. Sci. Suppl.). 27(5), 21-26

AOAC. 2002. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15th ed. Vol II. The Association of Official Analytical Chemists, Inc. USA.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic acid bacteria : Classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria. (ed. Salminen, S. and Wright, A.V.) New York: Mercel Dekker. pp. 1-64.

Aydin, G., Mehmet, A.,Yakup, C., and Hesna, O. 2000. The effect of zinc and boron toxicity in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L.) Turk J Agric. 24, 505-509.

Barnett, J.A., Payne, R..W., Yarrow, D. 2000. Yeasts: characteristics and identification. (3rd ed.). Cambridge: Cambridge University Press. pp.1139.

Bishop, T.F.A., and Lark, R.M. 2007. A landscape-scale experiment on the changes in available potassium over a winter wheat cropping season. Geoderma. 141, 384-396.

Blom, H., Mortvedt, C. 1991. Anti-microbial substances produced by food-associated micro-organisms. Biochem. Soc. Trans. 19, 694–698.

Boekhout, T., and Robert, V. 2003. Yeasts in food. New York: Woodhead publishing Ltd. pp. 69-116.

Buckenhu¨skes, H.J. 1997. Fermented Vegetables. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology:Fundamentals and Frontiers, ASM Press, Washington D.C. pp. 595–609.

Cocking, E.C. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen fixing bacteria. Plant soil. 252, 169-175.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Phenol sulfuric total sugar. Anal. Chem. 28- 350.

Druvefors, U.A., Passoth, V., and Schnurer, J. 2005. Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat. Appl. and Environ. Microbiol. 1865-1869.

Ehmann A. 1977. The Van Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. J. Chromatogr.132, 267-276.

Farooqi, A.H., Shukla, Y.N., Sharma, S., and Bansal, R.P. 1994. Relationship between gibberellin and cytokinin activity and flowering in *Rosa damascene* Mill. Plant growth regul. 14, 109-113.

Fatih, I. , Altinbay, D., Acun, T. 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo-beta -1,3-glucanase activity. Enzyme and Microb Teachnol. 39, 669-676.

Fredlund, E., Druvefors, U., Lingsten, K., Boysen ME., and Schnurer, J. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. FEMS Yeast Res. 2,395-402.

Garrido, A., Garcia, P., and Brenes, M. 1995. Olives fermentation. Food Sci and Technol. 8, 31-127.

Ghassemi, F., Jakeman A., and Nix HA. 1995. Mechanism of salt tolerance in non-halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 149-190.

Hoekstra, N.J., Bosker, T., and Lantinga, E.A. 2002. Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). Agric. Ecosyst and Environ. 93, 189–196.

Ho, L. 1987. Hybrid tomato seed production. In. FFTC Book Series No. 36. Improve Vegetable Production in Asia. Taiwan.

John, G. H., and Nuel, R.K. 1984. Genus IX *Zymomonas*. In Garrity, G.M.(ed.). Bergey' Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2 (2nd ed.).pp. 282-287. Baltimore: The William & Wilkins.

Jonsson, A., and Pahlow, G. 1984. Systemic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with Lactobacillus cultures. Anim. Res. and Dev. 20, 7-22.

Kantachote, D., and Charernjiratrakul, W. 2008. Effects of initial air removal on microorganisms and characteristics of fermented plant beverages. Pakistan J.Biolo Sci. 11(2), 173 -180.

Kayhanian, M., and Tchobanoglous, G.1993. Characteristics of humus produced from the anaerobic composting of the biodegradable organic fraction of municipal solid waste. Environ. Technol. 14, 815-829.

Kennes, C., Veiga,M.C., Dubourguier, H.C.,Touzel, J.P., Albagnac, G.,Naveau,H., and Nyns, E.J. 1991. Trophic relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* and their metabolism of glucose and citrate. Applied and Environ. Microbiol. 1046-1051.

Masih, E.I., Alie, I., and Paul, B. 2000. Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? FEMS Microbiology Letters 189, 233-237.

Masih, E.I., and Paul, B. 2002. Secretion of beta-1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. Current Microbiol. 44, 391-395.

Moore, M., and Breedveld, M. 1989. The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*. Arch. Biochem. Biophys. 270, 419-31.

Paré, T., Gregorich, E.G., and Dinel, H. 1997. Effects of stockpiled and composted manures on germination and initial growth of cress (*Lepidium sativum*). Biol. Agric. Horticulture 17, 3–11.

Patricia,I. 1999. International Potash Instituta Coordinator India. Recent techniques in fertigation of horticultural crops in Israel. (cited 15 January 2004) Available from: http:// www.ipipotash.org/presentn/rtifohc.html

Petersson, S., and Schnürer, J. 1995. Biocontrol of mold growth in high moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. and Environ. Microbiol. 61, 1027-1032.

Polonelli, L., Dettori, G., Cattel, C., and Morace, G. 1987. Biotyping of micelial fungus cultures by the killer system. European J. Epidemiol. 3, 237-42.

Polonelli, L., and Morace, G. 1986. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. J.Clinic Microbiol. 24, 866-869.

Prachyakij, P., Charernjiratrakul, W., and Kantachote, D. 2008. Improvement in the quality of a fermented seaweed beverage using an antiyeast starter of *Lactobacillus plantarum* DW3 and partial sterilization. World J Microbiol Biotechnol.

Praphailong, W., and Fleet, G.H. 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. Food Microbiol. 14, 459-468.

Pujos, A., and Morard, P. 1997. Effects of potassium deficiency on tomato growth and mineral nutrition at the early production stage. Plant and Soil. 189, 189-196.

Ruiz, J.L., and Jimenez, R. 1995. Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. Appl and Environ Microbiol. 61, 1294-1299.

Santos, A., and Marquina, D. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. Microbiol. 150, 2527-2534.

Soil Survey Division Staff. 1993. Soil Survey Manual. United States Department of Agriculture United States Government Printing Office. Washington D.C.437 pp.

Stoffella, P.J. and Kahm, B.A. 2001. Compost utilization in horticultural cropping systems. New York: Lewis publishers. 414 pp.

Tamura, S., Takahashi, N., Murofushi, N., and Yokota, T.1967. Isolation of two new gibberellins from immature seeds of *Canavalia gladiata* DC. Planta 75, 279-282.

Tester, C.F., Sikora, L.J., Taylor, J.M., and Parr, J.F.1977. Decomposition of sewage sludge compost In soil. I. Carbon and nitrogen transformations. J. Environ. Quality. 6, 459-463.

Thomas, K.C., Hynes, S.H., and Ingledew, W.M. 2002. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acid. Appl and Environ Microbiol. 68,1616-1623.

Walker, G. M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. 350 pp. England: John Wiley & Son Ltd.

Wong, J.W.C., Mak, K.F., Chan, N.W., Lam, A., Fang, M., Zhou, L.X.,Wu, Q.T. and Liao, X.D. 2001. Co-composting of soybean residues and leaves in Hong Kong. Bioresource Technol. 76, 99–106.

Wood, B.J.B., and Holzapfel, W.H. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. 398 pp. London: Blackie Academic.

Wood, B.J.B. 1998. Microbiology of fermented foods. (2nd ed.). 440 pp. London: Thomson Science.

Woolford, M.K., and Pahlow, G. 1998. The silage fermentation. In Wood, B.J.B.(ed.). Microbiology of fermented foods (Vol.I). pp. 73-96. London: Thomson Science.

Yang, M. and Choong, Y. 2001. A rapid gas chromatographic method for direct determination of short chain (C1-C12) volatile organic acids in foods. Food Chemis. 75: 327-331.

Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M. and Beritodi, M. 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: Gasser, J.K.R. (Ed.), Composting of agricultural and other wastes. Elsevier, London, pp. 73–86.

Wikipedia the free encyclopedia, Gibberellic acid, April 10, 2008. Available from: http://en.wikipedia.org.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Assimilation of carbon compound

เตรียม stock ความเข้มข้น 10 เท่า ประกอบด้วย

Yeast nitrogen base	6.7	กรัม
แหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบ	5	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ด้วยน้ำบริสุทธิ์ต้มเดือดที่ 100ºC จนเข้ากัน เมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงเหลือประมาณ 50ºC ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองปราศจากเชื้อขนาดรู 0.45 ไมครอน แบ่งใส่ขวดฝาเกลียวขวดละ 5 มิลลิลิตร แช่แข็งจนกว่าจะใช้

เตรียมอาหาร

ละลาย 10 เท่า stock solution ที่อุณหภูมิห้อง ผสม 10 เท่า stock solution ให้เข้ากัน จากนั้นแบ่ง 10 เท่า stock solution 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

Carbohydrate fermentation broth

Phenol-red broth base	15.0	กรัม
Glucose	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา10 นาที

Christensen Urea agar

Peptone	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Dihydrogen phosphate	2.0	กรัม
Phenol red	0.012	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้ได้ 6.8 จึงเติมวุ้น 20 กรัม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 45-50ºC เติมสารละลาย urea ความเข้มข้น 20% ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ

โดยการกรองด้วยแผ่นกรองปราศจากเชื้อขนาดรู 0.45 ไมครอน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดใส่หลอดปราศจากเชื้อขนาด 13x100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร และวาง slant

Cycloheximide Medium: 0.01% และ 0.1%

Cycloheximide	0.1	กรัม (สำหรับ 0.01%)
Cycloheximide	1.0	กรัม (สำหรับ 0.1%)
Acetone	2.5	มิลลิลิตร
Yeast Nitrogen Base (Difco)	6.7	กรัม
D-glucose	10.0	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลาย cycloheximide กับ acetone หลังจากนั้นละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันกับน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองปราศจากเชื้อขนาดรู 0.45 ไมครอน ดูดส่วนผสมที่ได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

Fermentation medium

Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
D-glucose	20.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม 0.2% bromothymol blue 4 มิลลิลิตร ดูดอาหารใส่หลอดขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่มีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา10 นาที

Fermentation medium สำหรับน้ำตาลอื่น

เตรียม stock น้ำตาลที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 6% (w/v) ยกเว้นน้ำตาล raffinose ให้มีความเข้มข้น 12% (w/v) ทำให้น้ำตาลปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองปราศจากเชื้อขนาดรู 0.45 ไมครอน แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวหลอดละ 5 มิลลิลิตร แช่แข็งจนกว่าจะใช้

<u>Basal medium</u>

Yeast extract	4.5	กรัม
Peptone	7.5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น เติม 0.2% bromothymol blue 4 มิลลิลิตร/Basal medium 100 มิลลิลิตร ดูดอาหารใส่หลอดขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่มีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ดูด stock น้ำตาลที่ต้องการทดสอบ 2 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร Basal medium

Malt yeast glucose peptone agar (YM agar)

Malt extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
D-glucose	10.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 5.5

MRS (de Man Rogosa and Shape) agar

Proteose Peptone	10.0	กรัม
Beef Extract	10.0	กรัม
Yeast Extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Polysobate 80	1.0	กรัม
Ammonium Citrate	2.0	กรัม
Sodium Acetate	5.0	กรัม
Magnesium Sulfate	0.1	กรัม
Manganese Sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

MRS (de Man Rogosa and Shape) broth

Proteose Peptone	10.0	กรัม
Beef Extract	10.0	กรัม
Yeast Extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Polysobate 80	1.0	กรัม
Ammonium Citrate	2.0	กรัม
Sodium Acetate	5.0	กรัม
Magnesium Sulfate	0.1	กรัม
Manganese Sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น จนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา15 นาที

Plate count agar

Pancreatic digest of casein	5.0	กรัม
Yeast Extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น จนส่วนผสมละลายเข้ากันปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0± 0.2 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา15 นาที

Potato dextrose agar

Potato starch	4.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปต้มให้ส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อรางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 45-50ºC ปรับ pH ให้เป็น 3.5 ด้วย 10% tartaric acid

Potassium acetate agar

Potassium acetate	10.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสม agar ลงไป 1.5% นำไปต้มให้ส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากัน ดูดใส่หลอดทดลองฝาเกรียวขนาด 18x150 มิลลิลิตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อรางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จแล้วนำมาวาง slant

WL Differential Medium

Yeast extract	4.0	กรัม
Pancreatic Digest of Casein	5.0	กรัม
Dextrose	50.0	กรัม
Monopotassium phosphate	0.55	กรัม
Potassium chloride	0.425	กรัม
Calcium chloride	0.125	กรัม
Magnesium sulfate	0.125	กรัม
Ferric chloride	0.0025	กรัม
Manganese sulfate	0.0025	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Bromcresol green	0.022	กรัม
Cycloheximide	0.004	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปต้มให้ส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อรางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 45-50ºC ปรับ pH ให้เป็น 6.5±2 ด้วย 1% sodium carbonate

YM agar

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปต้มให้ส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อรางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 45-50ºC ปรับ pH ให้เป็น 3-4

YM broth

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น จนส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อรางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

น้ำยาทดสอบคะตาเลส (ร้อยละ 3 H_2O_2)

35% H_2O_2 8.6 มิลลิลิตร

Distilled water 1,000.0 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชาแล้วแช่ตู้เย็น

สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีแกรม

1. Crystal violet

- สารละลาย A: ละลาย crystal violet 2.0 กรัม ใน 95% ethyl alcohol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- สารละลาย B: ละลาย ammonium oxalate 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชม. กรองผ่านกระดาษกรองได้เป็น crystal violet staining reagent

2. 95% ethyl alcohol

3. Gram iodine (mordant)

บดไอโอดีน 1.0 กรัม และ potassium iodine 2.0 กรัม เข้าด้วยกันแล้วค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปผสมจนกระทั่งไอโอดีนละลาย เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

4. Safranin (conunterstain)

ละลาย safranin 2.5 กรัม ใน 95% ethylalcohol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการย้อม ascospore

1. 5% Malachite green

ชั่ง ผงสี Malachite green 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองตะกอนสีด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บไว้ในขวดสีชา

2. 0.5 % Safranin

ละลาย safranin 0.5 กรัม ใน 95% ethylalcohol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

การย้อม ascospore โดย smear เชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบบนสไลด์ fix ด้วยความร้อน จากนั้นหยดสี Malachite green ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 3-5 นาที ใช้ไฟลนใต้สไลด์ให้สีเดือดนาน 3-6 นาที คอยเติมสีอย่าให้สีแห้งติดสไลด์ จากนั้นล้างสีออกด้วยน้ำ แล้วย้อมทับด้วย 0.5 % Safranin เป็นเวลา 30 วินาที รินสีที่เหลือออก ล้างน้ำ ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นเซลล์ที่มี ascospore ของยีสต์ติดสีเขียว

Bromocresal purple ความเข้มข้น 1%

Bromocresal purple	1.0	กรัม
Distilled water	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย bromocresal purple ด้วยน้ำเพียงเล็กน้อยแล้วค่อยๆ เติม 95% alcohol เพื่อช่วยละลาย bromocresal purple แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

Sodium azide

Sodium azide	1.0	กรัม
Distilled water	10.0	มิลลิลิตร

ละลาย sodium azide ในน้ำกลั่นจนกระทั่งละลายหมด ใส่ในขวดสีชา แล้วนำไปเก็บในตู้เย็น

Van Urk-Salkowski reagent สำหรับทดสอบฮอร์โมนออกซิน

(A) Van Urk reagent

- 1 g p-dimethylaminobenzadehyde
- 50 ml conc. HCL
- 50 ml absolute ethanol

(B) Salkowski reagent

- 2.03 g $FeCl_3.6H_2O$
- 500 ml water
- 300 ml conc. H_2SO_4

Van Urk-Salkowski reagent คือ A:B = 1:3

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด โดยวิธี Titration method (AOAC, 2002)

สารเคมี

1. น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (น้ำกลั่นต้มเดือด 20 นาที ใส่ soda lime เล็กน้อย)

2. สารละลาย 0.1 N NaOH (NaOH 4 g. เติมน้ำกลั่นครบ 1 ลิตร) เก็บในขวดแก้วที่กันคาร์บอนไดออกไซด์ได้ และเป็นแก้วทนด่าง ก่อนนำมาใช้หาความเข้มข้นมาตรฐาน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH

Acid potassium phthalate (อบ 2 ชั่วโมง ที่ 120ºC แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง) ชั่ง 0.3 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ให้ครบ 100 มิลลิลิตร เมื่อ Acid potassium phthalate ($HC_8H_4O_4$) ละลาย จึงเติม phenolphthalein (ชั่งสาร 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95% 100 มิลลิลิตร) 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ความเข้มข้นมาตรฐาน

$$\text{คำนวณได้จากสูตร (N)} = \frac{\text{กรัม } HC_8H_4O_4 \times 1000}{\text{ml. ของ 0.1 N NaOH} \times 204.229}$$

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เติม phenolphthalein 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติ ซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนๆ ปริมาณกรดคำนวณเป็นกรดแลกติกได้จากสูตร

$$\text{กรดทั้งหมด (กรัม/100 มิลลิลิตร)} = \frac{N \times V \times 90 \times 100}{1000 \times 1}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*,1956)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (reagent grade 95.5% , specific gravity 1.84)

2. สารละลาย ฟีนอล 5% เตรียมโดยชั่ง ฟีนอล 5 กรัม ปรับน้ำให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

วิธีการวิเคราะห์

1. แช่หลอดทดสอบขนาด 20x150 มิลลิเมตร ในน้ำแข็ง ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายฟีนอล 5% 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วนำหลอดทดสอบออกจากน้ำแข็งที่แช่มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. เติมกรดซัลฟูริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วเขย่าอีกวางไว้ไม่เกิน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เอาค่าที่ได้ Plot curve ระหว่างค่า OD กับปริมาณน้ำตาล

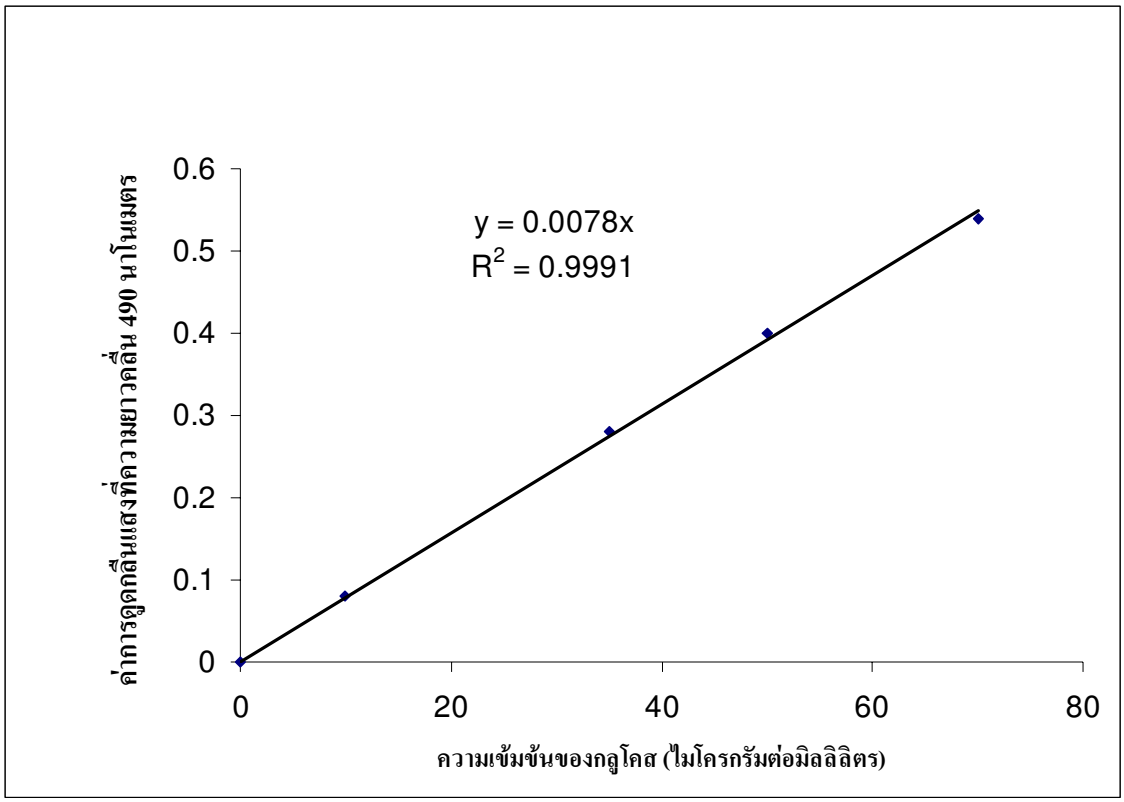
การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดย ชั่งกลูโคส 0.35 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีระดับความเข้มข้น 10 35 50 70 ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร

2. ดูดสารละลายที่เจือจางแล้ว 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่แช่ในน้ำแข็ง เติมสารละลายฟีนอล 5% 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วนำหลอดทดสอบออกจากน้ำแข็งที่แช่มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. เติมกรดซัลฟูริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วเขย่าอีกวางไว้ไม่เกิน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

4. นำค่า OD ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน



รูปภาคผนวก ข 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

3. การวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดิน

สารเคมี

สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (Cl) 1 โมลาร์ โดยละลาย Cl 74.56 กรัม ในน้ำ deionized แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20-30 นาที จึงใช้ pH meter วัดค่า pH ในส่วนที่เป็นน้ำใส

4. การวัดค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity)

ชั่งตัวอย่างดิน 5 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติก เติมน้ำ deionized จำนวน 25 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่า ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายด้วยเครื่อง conductivity meter ด้วยการจุ่มอิเล็กโทรดในสารละลายใส

5. การวิเคราะห์อินทรียวัตถุและอินทรีย์คาร์บอน

สารเคมี

1.0 N potassium dichromate ($K_2Cr_20_7$): โดยการละลาย potassium dichromate 49.04 กรัม (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) ใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ด้วยน้ำ deionized แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

0.5 N Ferrous ammonium sulfate hexahydrate ($Fe\ (NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$): โดยการละลาย $Fe\ (NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ 196.07 กรัม ในน้ำ deionized เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

กรดซัลฟิวริก (Sulphuric acid) เข้มข้น 96% (96% w/w H_2SO_4)

Ferroin indicator: ละลาย 1, 10-phenanthroline ferrous sulfate indicator 1.485 กรัม และ $Fe\ SO_4.7H_2O$ 0.695 กรัม ในน้ำ deionized 100 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

ใช้ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ 1 มิลลิลิตร (ถ้าเป็นตัวอย่างดินต้องชั่งดิน 0.5-2 กรัม) ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 1.0 N potassium dichromate 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก 15 มิลลิลิตร เขย่าแล้ววางทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วหยด Ferroin indicator 3-4 หยด นำไปไตเตรทด้วยสารละลาย 0.5 N Ferrous ammonium sulfate hexahydrate จนกระทั่งสีของสารแขวนลอยเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ค่อยๆ ไตเตรทจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงและทำ Blank ด้วย

การคำนวณ

หาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลาย Fe^{+2}

	$N_1\ V_1$	=	N_2V_2
	N_1	=	$1.0 \times 10 / V_1$
โดยที่	N_1	=	ความเข้มข้นของสารละลาย Fe_2^+ (1 นอร์มัล)
	V_1	=	ปริมาตรของสารละลาย Fe_2^+ ที่ใช้ไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลาย $\square_2Cr_2O_7$ (1 นอร์มัล)

V_2 = ปริมาตรของสารละลาย $\square_2Cr_2O_7$ (10 มิลลิลิตร)

% Organic Carbon = $\{(N_2 \times V_2) - (N_1 \times V_1)\}$ x 0.399 / soil wt

= $\{(1.0 \times 10) - (N_1 \times V_1)\}$ x 0.399 / soil wt

% Organic Matter = $\{(1.0 \times 10) - (N_1 \times V_1)\}$ x 0.6717 / soil wt

= % Organic Carbon x 1.724

6. Germination index: GI (Wong *et al*., 2001)

GI: germination index

RSG: The percentages of relative seed germination

RRG: The percentages of relative root growth

$$\text{RSG (\%)} = \frac{\text{Number of seeds germinated in fermented wild forest noni extract}}{\text{Number of seeds germinated in control (Distilled water)}} \text{ X 100}$$

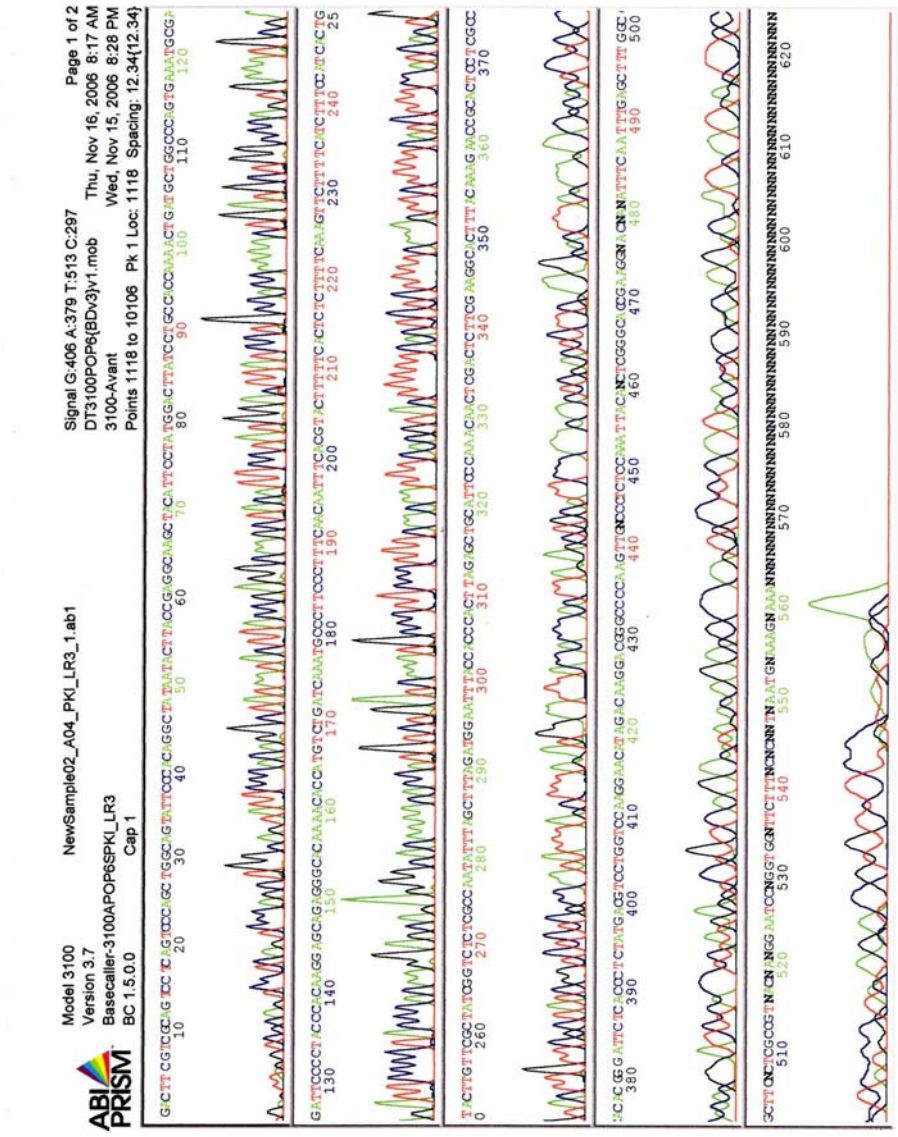
$$\text{RRG (\%)} = \frac{\text{Mean root length in fermented wild forest noni extract}}{\text{Mean root length in control (Distilled water)}} \text{ X 100}$$

$$\text{GI (\%)} = \frac{\text{RSG x RRG}}{100}$$

ภาคผนวก ค

ผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

1. ผลการจัดจำแนกยีสต์ โดยวิธี DNA Sequencing electropherogram จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล



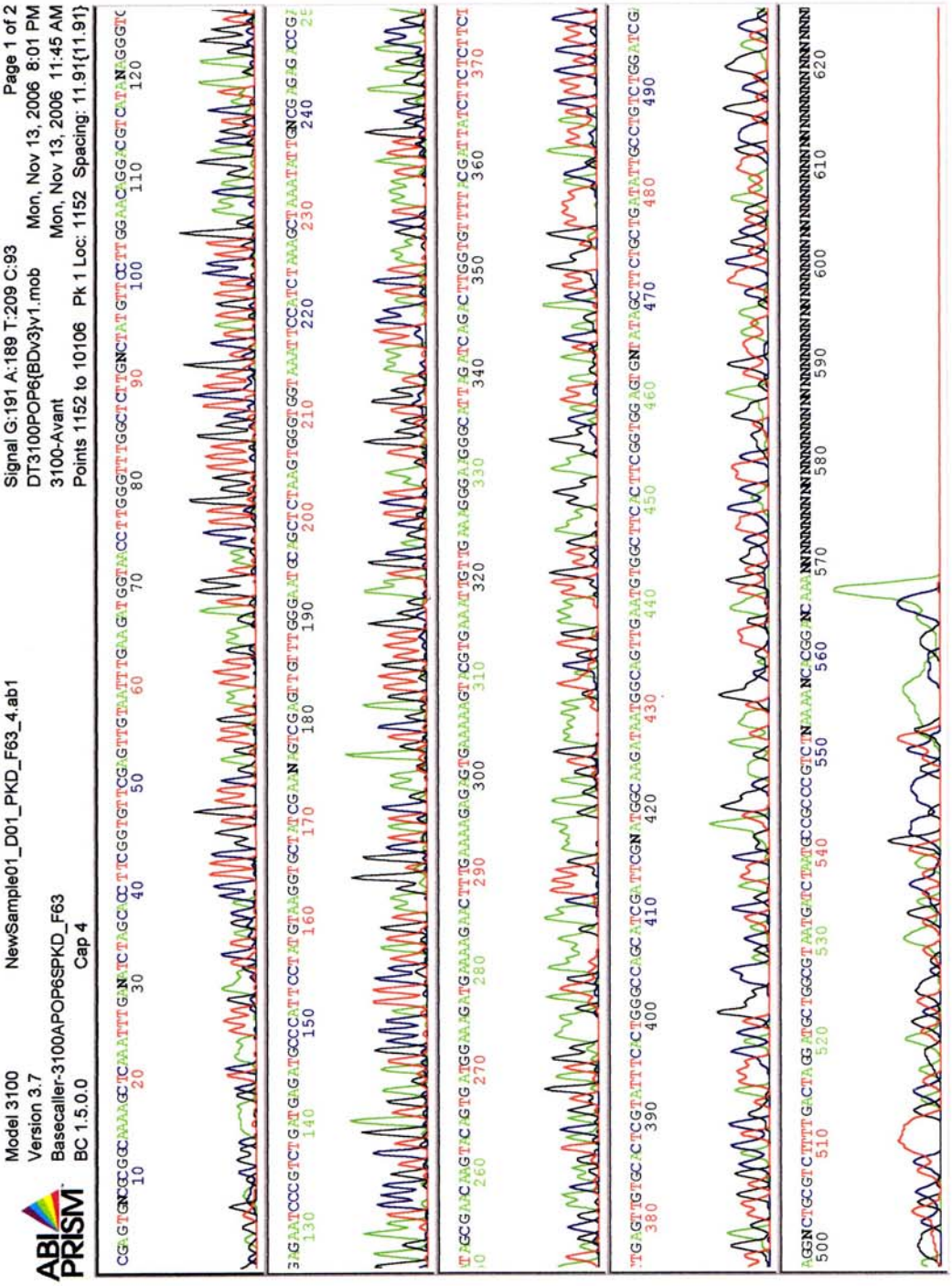
รูปภาคผนวก ค1 การจัดจำแนกยีสต์กลุ่มที่ 1 โดยวิธี DNA Sequencing electropherogram

gi|62857315|dbj|AB211971.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	967	0.0
gi|62857314|dbj|AB211970.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	967	0.0
gi|62857313|dbj|AB211969.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	967	0.0
gi|62857312|dbj|AB211968.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	967	0.0
gi|62857311|dbj|AB211967.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	967	0.0
gi|62857310|dbj|AB211966.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	967	0.0
gi|62857309|dbj|AB211965.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	967	0.0
gi|62857308|dbj|AB211964.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	967	0.0
gi|62857307|dbj|AB211963.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	967	0.0
gi|10717178|gb|AY007889.1|	Saccharomyces cerevisiae 26S ribos...	967	0.0
gi|48596767|emb|AJ746340.1|	Saccharomyces cerevisiae 26S rRNA ge	967	0.0
gi|1360587|emb|Z73326.1|SCYLR154C	S.cerevisiae chromosome XII re	967	0.0
gi|82581164|emb|AM159109.1|	Saccharomyces sp. YS35 partial 28S r	967	0.0
gi|46242018|gb|AY529518.1|	Saccharomyces cerevisiae isolate 9...	967	0.0
gi|46242016|gb|AY529516.1|	Saccharomyces cerevisiae isolate 5...	967	0.0
gi|46242015|gb|AY529515.1|	Saccharomyces cerevisiae isolate 4...	967	0.0
gi|32127530|emb|AJ508593.1|SCA508593	Saccharomyces pastorianus p	967	0.0
gi|32127528|emb|AJ508591.1|SBA508591	Saccharomyces sp. CBS 21...	967	0.0
gi|32127518|emb|AJ508581.1|CRO508581	Saccharomyces cerevisiae...	967	0.0
gi|46277150|gb|AY518285.1|	Saccharomyces cerevisiae strain SC...	967	0.0
gi|1262303|gb|U53879.1|YSCL9634	Saccharomyces cerevisiae chromos	967	0.0
gi|82503171|gb|DQ285663.1|	Saccharomyces cerevisiae strain CI...	967	0.0
gi|80975543|gb|DQ267097.1|	Saccharomyces cerevisiae strain CI...	967	0.0
gi|19032273|emb|AJ437312.1|SCE437312	Saccharomyces cerevisiae pa	967	0.0
gi|42556001|gb|AY526109.1|	Saccharomyces cerevisiae strain IS...	965	0.0
gi|117394946|gb|EF042284.1|	Saccharomyces cerevisiae/Candida ...	959	0.0
gi|71384023|gb|DQ132884.1|	Saccharomyces cerevisiae strain XJ...	959	0.0
gi|172409|gb|J01355.1|YSCRGIH5	Saccharomyces cerevisiae 25S r...	959	0.0
gi|80975542|gb|DQ267096.1|	Saccharomyces cerevisiae strain CI...	959	0.0
gi|46242017|gb|AY529517.1|	Saccharomyces cerevisiae isolate 8...	955	0.0
gi|21541791|gb|AF516757.1|	Saccharomyces cerevisiae strain MR...	954	0.0
gi|82503173|gb|DQ285665.1|	Saccharomyces cerevisiae strain CI...	954	0.0
gi|82503172|gb|DQ285664.1|	Saccharomyces cerevisiae strain CI...	954	0.0
gi|80975544|gb|DQ267098.1|	Saccharomyces cerevisiae strain CI...	954	0.0
gi|16151845|gb|AF286597.1|AF286597	Saccharomyces sp. A6 26S ribo	952	0.0
gi|16151844|gb|AF286596.1|AF286596	Saccharomyces sp. A4 26S ribo	952	0.0
gi|45024894|gb|AY540305.1|	Saccharomyces cerevisiae 26S ribos...	946	0.0
gi|63003704|dbj|AB212636.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	946	0.0
gi|63003703|dbj|AB212635.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	946	0.0
gi|42661532|emb|AJ544259.1|SCE544259	Saccharomyces cerevisiae...	946	0.0
gi|82503170|gb|DQ285662.1|	Saccharomyces cerevisiae strain CI...	946	0.0
gi|42661534|emb|AJ544261.1|SCE544261	Saccharomyces cerevisiae...	940	0.0
gi|42733146|emb|AJ544257.1|SCE544257	Saccharomyces cerevisiae...	932	0.0
gi|42733144|emb|AJ544255.1|SCE544255	Saccharomyces cerevisiae...	930	0.0
gi|42733143|emb|AJ544254.1|SCE544254	Saccharomyces cerevisiae...	930	0.0
gi|47847301|dbj|AB180465.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|47847300|dbj|AB180464.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|47847299|dbj|AB180463.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|47847298|dbj|AB180462.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|47847297|dbj|AB180461.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|47847296|dbj|AB180460.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|47847295|dbj|AB180459.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|47847294|dbj|AB180458.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|47847293|dbj|AB180457.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|47847292|dbj|AB180456.1|	Saccharomyces cerevisiae gene for...	928	0.0
gi|42661533|emb|AJ544260.1|SCE544260	Saccharomyces cerevisiae...	928	0.0

gi|117573767|gb|EF063139.1| Saccharomyces cerevisiae strain PR1 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=602

Score = 967 bits (488), Expect = 0.0
Identities = 508/512 (99%), Gaps = 2/512 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    ACGGCGAGTGAAGCGCCAAA-GCTCAAATT-GAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTG  58
            ||||||||||||||| |||| ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  49   ACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTG  108

Query  59   TAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTC  118
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  109  TAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTC  168

Query  119  ATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGA  178
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  169  ATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGA  228

Query  179  GTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATAT  238
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  229  GTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATAT  288

Query  239  TGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAG  298
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  289  TGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAG  348

Query  299  AGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTT  358
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  349  AGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTT  408

Query  359  TGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTT  418
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  409  TGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTT  468

Query  419  TGGTGGCAGGATAAGTCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGG  478
            ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  469  TGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGG  528

Query  479  AATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACG  510
            ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  529  AATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACG  560
```



รูปภาคผนวก ค2 การจัดจำแนกยีสต์กลุ่มที่ 2 โดยวิธี DNA Sequencing electropherogram

PKD_500bp

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1163647241-495-83436971008.BLASTQ2

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
4,563,550 sequences; 18,419,680,154 total letters

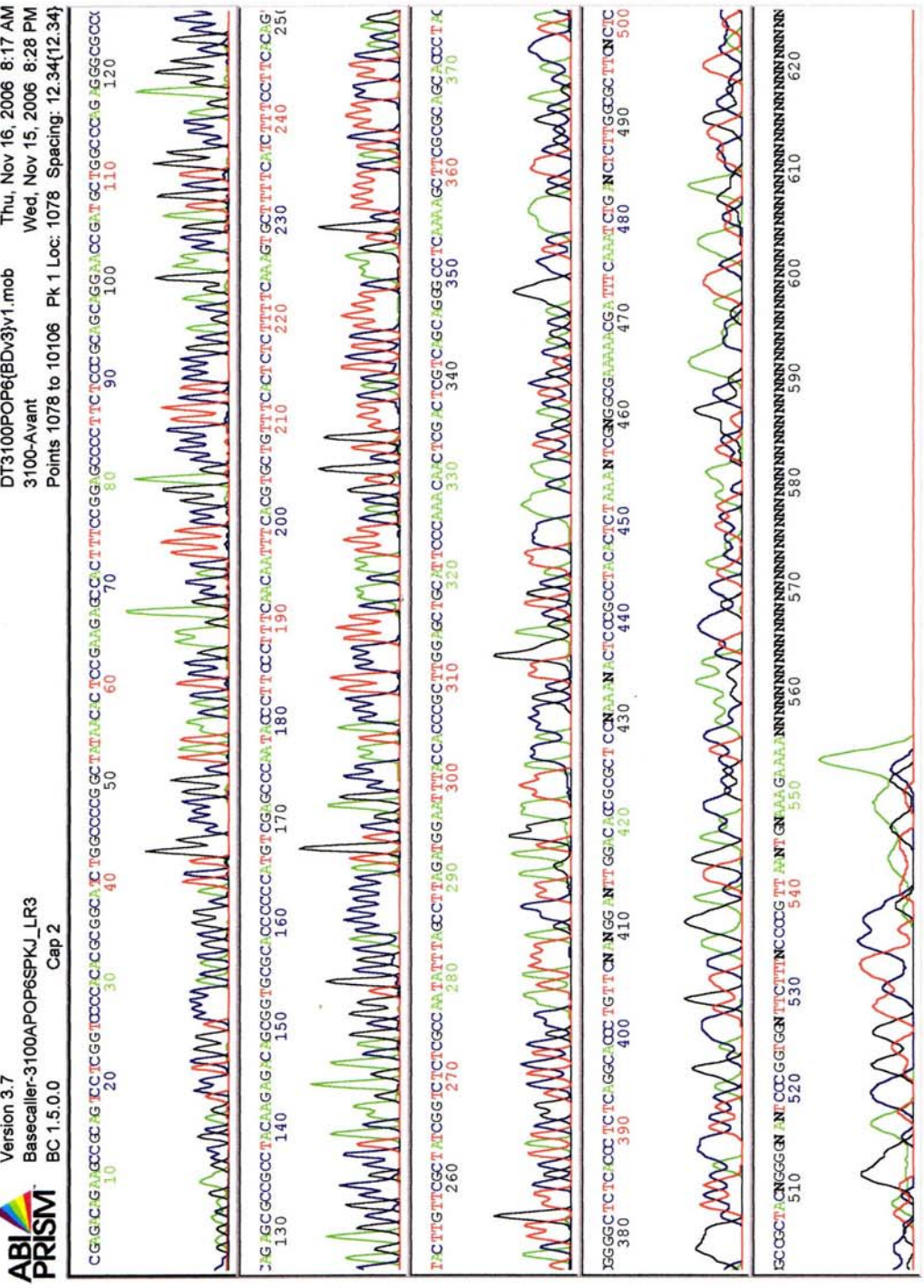
Query=Length=561

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi|87298870|gb|DQ377650.1| Pichia anomala strain VTT C-04565 ...	1112	0.0
gi|89258198|gb|DQ432635.1| Pichia anomala strain AH2 26S ribo...	1106	0.0
gi|15429071|gb|AF330115.1| Pichia anomala strain VKM Y-140 26...	1100	0.0
gi|15429070|gb|AF330114.1| Pichia anomala strain CBS 113 26S ...	1100	0.0
gi|15429069|gb|AF330113.1| Pichia anomala strain CBS 247 26S ...	1100	0.0
gi|15429068|gb|AF330112.1| Pichia anomala strain CBS 249 26S ...	1100	0.0
gi|15429067|gb|AF330111.1| Pichia anomala strain CBS 248 26S ...	1100	0.0
gi|12642545|gb|AF286599.1| Pichia anomala 26S large subunit r...	1100	0.0
gi|55415931|dbj|AB126675.1| Pichia anomala gene for 26S ribos...	1100	0.0
gi|56342325|dbj|AB180744.1| Pichia anomala gene for 26S ribosoma	1100	0.0
gi|4038832|gb|U74592.1|PAU74592 Pichia anomala 26S large subu...	1100	0.0
gi|32127515|emb|AJ508578.1|CPE508578 Pichia anomala partial 26S	1100	0.0
gi|34148828|gb|AY296048.1| Pichia anomala strain CECT 11972 i...	1092	0.0
gi|55415933|dbj|AB126677.1| Pichia anomala gene for 26S ribos...	1092	0.0
gi|55415932|dbj|AB126676.1| Pichia anomala gene for 26S ribos...	1092	0.0
gi|33591237|gb|AY305676.1| Pichia anomala isolate G7p1 26S ri...	1086	0.0
gi|55415934|dbj|AB126678.1| Pichia myanmaensis gene for 26S r...	1084	0.0
gi|46405790|gb|AY520386.1| Candida sp. BG02-7-21-005A-1-1 26S...	1074	0.0
gi|37933471|gb|AY242305.1| Candida sp. BG00-10-20-1-5-1 26S r...	1074	0.0
gi|62530401|gb|AY974610.1| Candida sp. AEH2005 26S ribosomal RNA	1072	0.0
gi|84180574|gb|DQ318802.1| Pichia anomala strain 242FC 26S ri...	1057	0.0
gi|46405776|gb|AY520372.1| Candida sp. BG02-6-9-4 26S ribosomal	1057	0.0
gi|89146459|gb|DQ404483.1| Pichia sp. ST-236 26S ribosomal RNA g	1053	0.0
gi|110765867|gb|DQ857889.1| Pichia anomala strain GS80A 26S r...	1049	0.0
gi|84180584|gb|DQ318812.1| Candida albicans strain 297V 26S r...	1049	0.0
gi|84180582|gb|DQ318810.1| Candida albicans strain 297L 26S r...	1049	0.0
gi|82581166|emb|AM159111.1| Pichia sp. YS31 partial 28S rRNA gen	1047	0.0
gi|4038838|gb|U74595.1|PLU74595 Pichia lynferdii 26S large su...	1037	0.0
gi|84180573|gb|DQ318801.1| Pichia anomala strain 242L 26S rib...	1033	0.0
gi|4038842|gb|U74593.1|PSU74593 Pichia subpelliculosa 26S lar...	1029	0.0
gi|84180575|gb|DQ318803.1| Pichia anomala strain 242V 26S rib...	1027	0.0
gi|117939010|dbj|AB281327.1| Pichia sydowiorum gene for 26S r...	1025	0.0
gi|117939012|dbj|AB281329.1| Pichia sydowiorum gene for 26S r...	1013	0.0
gi|117939011|dbj|AB281328.1| Pichia sydowiorum gene for 26S r...	1013	0.0
gi|117939009|dbj|AB281326.1| Pichia sydowiorum gene for 26S r...	1013	0.0
gi|32127510|emb|AJ508573.1|CNI508573 Pichia sydowiorum partial 2	1013	0.0
gi|117939008|dbj|AB281325.1| Pichia sydowiorum gene for 26S r...	1011	0.0
gi|110891382|gb|DQ862846.1| Pichia anomala strain GS30A 26S r...	1005	0.0
gi|4038843|gb|U74594.1|PSU74594 Pichia sydowiorum 26S large s...	999	0.0
gi|4038835|gb|U74587.1|PCU74587 Pichia ciferrii 26S large sub...	989	0.0
gi|33591230|gb|AY305669.1| Pichia anomala isolate G3p4 26S ri...	987	0.0
gi|33591238|gb|AY305677.1| Pichia anomala isolate G7p4 26S ri...	963	0.0
gi|4038762|gb|U69879.1|CSU69879 Candida silvicultrix 26S ribosom	934	0.0
gi|33591229|gb|AY305668.1| Pichia anomala isolate G3p1 26S ri...	825	0.0

gi|87298870|gb|DQ377650.1| Pichia anomala strain VTT C-04565 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=605

Score = 1112 bits (561), Expect = 0.0
Identities = 561/561 (100%), Gaps = 0/561 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query  1    AGACGGGCGGCATTAGATCATTACGCCAGCATCCTAGTCAAAAGACGCAGCCCTCGATCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  604  AGACGGGCGGCATTAGATCATTACGCCAGCATCCTAGTCAAAAGACGCAGCCCTCGATCC  545

Query  61   AGACAGGCAATATCAGCAGAAGCTATAACACTCCACCGAAGTGAAGCCACATTCAACTGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  544  AGACAGGCAATATCAGCAGAAGCTATAACACTCCACCGAAGTGAAGCCACATTCAACTGC  485

Query  121  CATTATCTTGCCATCCGAATCGATGCTGGCCCAGTGAAATACGAGTGCACAACTCAAGAA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  484  CATTATCTTGCCATCCGAATCGATGCTGGCCCAGTGAAATACGAGTGCACAACTCAAGAA  425

Query  181  GAGAAGATAATCGTAAAACACCAAGTCTGATCTAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTCAC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  424  GAGAAGATAATCGTAAAACACCAAGTCTGATCTAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTCAC  365

Query  241  GTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  364  GTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCT  305

Query  301  ATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  304  ATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATT  245

Query  361  CCCAAACAACTCGACTCTTCGATAGCACCTTACATAGGAATGGGCATCTCATCAGACGGG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  244  CCCAAACAACTCGACTCTTCGATAGCACCTTACATAGGAATGGGCATCTCATCAGACGGG  185

Query  421  ATTCTCACCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCAAACCCAAGGTT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  184  ATTCTCACCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCAAACCCAAGGTT  125

Query  481  ACCATCTTCAAATTACAACTCGAACACCGAAGGTGCTAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGC  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  124  ACCATCTTCAAATTACAACTCGAACACCGAAGGTGCTAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGC  65

Query  541  CGCTTCACTCGCCGTTACTGA  561
            ||||||||||||||||||||
Sbjct  64   CGCTTCACTCGCCGTTACTGA  44
```



รูปภาคผนวก ค3 การจัดจำแนกยีสต์กลุ่มที่ 3 โดยวิธี DNA Sequencing electropherogram

PKJ_500bp

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1163651945-32644-29038759180.BLASTQ2

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
4,563,550 sequences; 18,419,680,154 total letters

Query=Length=537

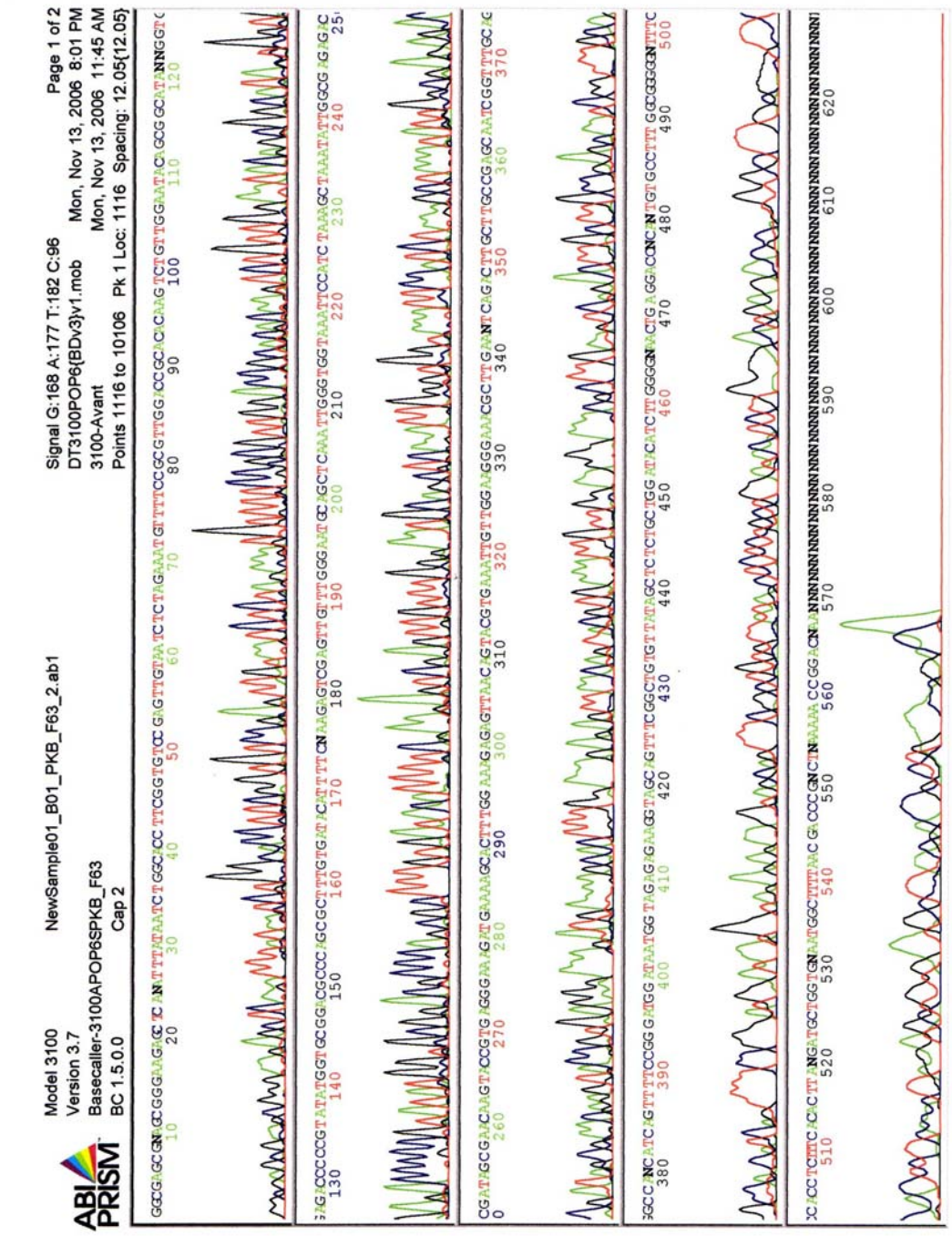
Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi|93009081|gb|DQ466534.1| Pichia membranifaciens isolate G46...	1015	0.0
gi|70888512|gb|DQ104714.1| Pichia sp. CBS 209 18S ribosomal R...	1015	0.0
gi|70888500|gb|DQ104719.1| Pichia sp. CBS 241 26S ribosomal RNA	1015	0.0
gi|49457181|emb|AJ749826.1| Pichia galeiformis 26S rRNA gene, is	1015	0.0
gi|46242008|gb|AY529508.1| Pichia membranifaciens isolate 59 ...	1015	0.0
gi|46242006|gb|AY529506.1| Pichia membranifaciens isolate 90 ...	1015	0.0
gi|4038882|gb|U75738.1|PGU75738 Pichia galeiformis 26S ribosomal	1015	0.0
gi|7619911|dbj|AB041002.1| Pichia manshurica gene for 26S rRNA,	1015	0.0
gi|46242009|gb|AY529509.1| Pichia membranifaciens isolate 83 ...	1011	0.0
gi|37933493|gb|AY242327.1| Candida sp. JW01-7-11-1-4-y1 26S r...	1007	0.0
gi|46242007|gb|AY529507.1| Pichia membranifaciens isolate 77 ...	1001	0.0
gi|109810197|gb|DQ655692.1| Pichia galeiformis strain NRRL Y-...	999	0.0
gi|108860301|emb|AM275341.1| Pichia sp. YS104 partial 16S rRNA g	995	0.0
gi|11994817|dbj|AB045137.1| Pichia sp. IFO 1788 gene for 26S rRN	983	0.0
gi|4039008|gb|AF017413.1|AF017413 Pichia sp. NRRL YB-4149 26S...	920	0.0
gi|94450969|gb|DQ472020.1| Fungal sp. DQY-2 26S ribosomal RNA ge	872	0.0
gi|70888505|gb|DQ104729.1| Candida sp. CBS 989 26S ribosomal RNA	872	0.0
gi|4038880|gb|U75734.1|PDU75734 Pichia deserticola 26S ribosomal	872	0.0
gi|93009087|gb|DQ466540.1| Candida ethanolica isolate G111 26...	856	0.0
gi|89146484|gb|DQ404508.1| Pichia sp. ST-339 26S ribosomal RNA g	856	0.0
gi|4038791|gb|U71073.1|CEU71073 Candida ethanolica 26S ribosomal	856	0.0
gi|2443759|gb|AF020436.1| Pichia sp. AWRI 1272 26S ribosomal RNA	852	0.0
gi|22532352|gb|AF530614.1| Pichia sp. UWO(PS)85-301.3 large s...	833	0.0
gi|37933496|gb|AY242330.1| Candida sp. JW01-7-11-2-1-y2 26S r...	833	0.0
gi|89355865|gb|DQ409150.1| Pichia scaptomyzae strain CECT 114...	827	0.0
gi|70888511|gb|DQ104713.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	827	0.0
gi|11994816|dbj|AB045136.1| Pichia membranifaciens gene for 2...	827	0.0
gi|45479205|gb|AY551000.1| Candida sp. CBS 6394 large subunit...	825	0.0
gi|70888510|gb|DQ104712.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	819	0.0
gi|11994815|dbj|AB045135.1| Pichia membranifaciens gene for 2...	819	0.0
gi|70888513|gb|DQ104715.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	811	0.0
gi|70888504|gb|DQ104727.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	811	0.0
gi|70888499|gb|DQ104717.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	811	0.0
gi|22532353|gb|AF530615.1| Pichia sp. UWO(PS)99-666.3 large s...	809	0.0
gi|12964779|gb|AF322059.1|AF322059 Pichia sp. UWO(PS)99-305.1...	809	0.0
gi|114156060|emb|AM397860.1| Pichia sp. YS DN22 partial 26S r...	803	0.0
gi|89355864|gb|DQ409149.1| Pichia membranifaciens strain CECT...	803	0.0
gi|76446119|gb|DQ198965.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	803	0.0
gi|76446118|gb|DQ198963.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	803	0.0
gi|76446117|gb|DQ198961.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	803	0.0
gi|76446116|gb|DQ198959.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	803	0.0
gi|76446115|gb|DQ198957.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	803	0.0
gi|76446114|gb|DQ198955.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	803	0.0
gi|76446113|gb|DQ198953.1| Pichia membranifaciens strain CBS ...	803	0.0

gi|70888503|gb|DQ104725.1|	Pichia membranifaciens strain CBS ...	803	0.0
gi|70888501|gb|DQ104723.1|	Pichia membranifaciens strain CBS ...	803	0.0
gi|56342324|dbj|AB180743.1|	Pichia membranifaciens gene for 2...	803	0.0
gi|4038887|gb|U75725.1|PMU75725	Pichia membranifaciens 26S ribos	803	0.0
gi|32127523|emb|AJ508586.1|CVA508586	Candida valida partial 26S	803	0.0
gi|76446120|gb|DQ198951.1|	Pichia membranifaciens strain CBS ...	799	0.0
gi|22532351|gb|AF530613.1|	Pichia sp. UWO(PS)99-530.3 large s...	799	0.0
gi|70888506|gb|DQ104731.1|	Pichia membranifaciens strain CBS ...	795	0.0
gi|2443761|gb|AF020438.1|AF020438	Pichia membranifaciens 26S rib	781	0.0
gi|46405747|gb|AY520343.1|	Candida sp. BG02-7-20-019A-2-1 26S...	767	0.0
gi|21541790|gb|AF516756.1|	Pichia sp. MR-3 26S ribosomal RNA gen	763	0.0
gi|110348443|gb|DQ674261.1|	Pichia membranifaciens strain L8 ...	759	0.0
gi|24939890|emb|AJ511348.1|PME511348	Pichia membranifaciens part	755	0.0
gi|116812147|dbj|AB264014.1|	Candida thaimueangensis gene for...	753	0.0
gi|116812146|dbj|AB264013.1|	Candida thaimueangensis gene for...	753	0.0
gi|116812145|dbj|AB264010.1|	Candida thaimueangensis gene for...	753	0.0
gi|116812144|dbj|AB264009.1|	Candida thaimueangensis gene for...	753	0.0
gi|4090549|gb|U76349.1|ISU76349	Issatchenkia scutulata var. e...	622	3e-175
gi|117939003|dbj|AB281320.1|	Issatchenkia orientalis gene for...	620	1e-174
gi|117939002|dbj|AB281319.1|	Issatchenkia orientalis gene for...	620	1e-174
gi|117939001|dbj|AB281318.1|	Issatchenkia orientalis gene for...	620	1e-174
gi|117938983|dbj|AB281300.1|	Issatchenkia orientalis gene for...	620	1e-174
gi|117938981|dbj|AB281298.1|	Issatchenkia orientalis gene for...	620	1e-174
gi|116834296|gb|EF030708.1|	Issatchenkia orientalis strain CC...	620	1e-174
gi|114156058|emb|AM397858.1|	Issatchenkia sp. YS 110 partial ...	620	1e-174
gi|93009080|gb|DQ466533.1|	Issatchenkia orientalis isolate G2...	620	1e-174
gi|51471992|gb|AY601160.1|	Issatchenkia orientalis strain 249...	620	1e-174
gi|51860165|gb|AY707865.1|	Issatchenkia orientalis WL2002 26S...	620	1e-174
gi|87298869|gb|DQ377649.1|	Issatchenkia orientalis strain VTT...	620	1e-174
gi|16755511|gb|AF335979.1|	Issatchenkia orientalis strain UWF...	620	1e-174
gi|49457180|emb|AJ749825.1|	Issatchenkia orientalis partial 26S	620	1e-174
gi|46242005|gb|AY529505.1|	Issatchenkia orientalis isolate 14...	620	1e-174
gi|46242004|gb|AY529504.1|	Issatchenkia orientalis isolate 22...	620	1e-174
gi|46242003|gb|AY529503.1|	Issatchenkia orientalis isolate 19...	620	1e-174
gi|46242002|gb|AY529502.1|	Issatchenkia orientalis isolate 21...	620	1e-174
gi|46242001|gb|AY529501.1|	Issatchenkia orientalis isolate 18...	620	1e-174
gi|46242000|gb|AY529500.1|	Issatchenkia orientalis isolate 18...	620	1e-174
gi|46241999|gb|AY529499.1|	Issatchenkia orientalis isolate 19...	620	1e-174
gi|46241998|gb|AY529498.1|	Issatchenkia orientalis isolate 20...	620	1e-174
gi|4090547|gb|U76347.1|IOU76347	Issatchenkia orientalis 26S r...	620	1e-174
gi|82581165|emb|AM159110.1|	Issatchenkia sp. YS22 partial 28S rR	613	3e-172
gi|32127505|emb|AJ508568.1|CKR508568	Issatchenkia orientalis par	611	1e-171
gi|117939000|dbj|AB281317.1|	Issatchenkia orientalis gene for...	607	2e-170
gi|117938982|dbj|AB281299.1|	Issatchenkia orientalis gene for...	601	1e-168
gi|112148933|gb|DQ871596.1|	Issatchenkia sp. YS16B 28S ribosomal	593	3e-166
gi|112148896|gb|DQ871595.1|	Issatchenkia sp. YS16A 28S ribosomal	593	3e-166
gi|111035944|emb|AM159112.3|	Issatchenkia sp. YS16 partial 28S r	593	3e-166
gi|33591236|gb|AY305675.1|	Issatchenkia orientalis isolate G6...	587	2e-164
gi|82581158|emb|AM159103.1|	Issatchenkia sp. YS5 partial 28S rRN	583	2e-163
gi|33591235|gb|AY305674.1|	Issatchenkia orientalis isolate G6...	577	1e-161
gi|4038976|gb|AF017235.1|AF017235	Candida sp. NRRL Y-12827 26...	561	9e-157
gi|12584211|gb|AF325358.1|AF325358	Issatchenkia scutulata var...	557	1e-155
gi|4038994|gb|AF017399.1|AF017399	Issatchenkia sp. NRRL Y-128...	551	9e-154
gi|4038993|gb|AF017398.1|AF017398	Issatchenkia sp. NRRL Y-128...	551	9e-154
gi|42541755|gb|AY497668.1|	Pichia membranifaciens strain CBS ...	529	3e-147
gi|42541771|gb|AY497684.1|	Issatchenkia orientalis strain CBS...	502	7e-139

gi|93009081|gb|DQ466534.1| Pichia membranifaciens isolate G46 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=571

Score = 1015 bits (512), Expect = 0.0
Identities = 525/528 (99%), Gaps = 1/528 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query  1    CCAGCATTCGAGACAGAAGCCGCAGTCCTCGGTCCCCACACGCGGCATCTGGCCCCGGCT  60
            ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  532  CCAGCATCCGAGACAGAAGCCGCAGTCCTCGGTCCCCACACGCGGCATCTGGCCCCGGCT  473

Query  61   ATAACACTCCGAAGAGCCACTTTCCGGAGCCCCTTCTCCCGCAGCAGGAACCGATGCTGG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  472  ATAACACTCCGAAGAGCCACTTTCCGGAGCCCCTTCTCCCGCAGCAGGAACCGATGCTGG  413

Query  121  CCCAGAGGGCGCCCAGAGCGCCGCCTACAAGAGACAGCGGTGCGCACCCCCCATGTCGAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  412  CCCAGAGGGCGCCCAGAGCGCCGCCTACAAGAGACAGCGGTGCGCACCCCCCATGTCGAG  353

Query  181  CCCAATACCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTGCTGTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCTT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  352  CCCAATACCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTGCTGTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCTT  293

Query  241  TTCATCTTTCCTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCCTTAGA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  292  TTCATCTTTCCTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCCTTAGA  233

Query  301  TGGAATTTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCAGCAGGGCCT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  232  TGGAATTTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCGTCAGCAGGGCCT  173

Query  361  CAAAAGCTTCGCGCAGCACCCTACGGGGCTCTCACCCTCTCAGGCACCCTGTTCCAAGGG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  172  CAAAAGCTTCGCGCAGCACCCTACGGGGCTCTCACCCTCTCAGGCACCCTGTTCCAAGGG  113

Query  421  ACTTGGACACCGCGCTCCACAGAGACTCCCGCCTACACTCTACAACTCGTGCCGAAACAC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  112  ACTTGGACACCGCGCTCCACAGAGACTCCCGCCTACACTCTACAACTCGTGCCGAAACAC  53

Query  481  GGATTTCAAATCTGAGCTCTTGGCGCTTCACTCGCCGCTACTGGGGCA  528
             |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  52   -GATTTCAAATCTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTGGGGCA  6
```



รูปภาคผนวก ค 4 การจัดจำแนกยีสต์กลุ่มที่ 4 โดยวิธี DNA Sequencing electropherogram

PKB_500bp

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1163647198-31028-14664184451.BLASTQ2

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
4,563,550 sequences; 18,419,680,154 total letters

Query=Length=522

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi|114156064|emb|AM397864.1| Rhodotorula sp. YS NB2 partial 2...	1021	0.0
gi|111283846|gb|DQ832198.1| Rhodotorula mucilaginosa AFTOL-ID...	1021	0.0
gi|110681874|gb|DQ778627.1| Rhodotorula mucilaginosa Z1 26S r...	1021	0.0
gi|108795589|gb|DQ538371.1| Rhodotorula mucilaginosa strain M...	1021	0.0
gi|108795588|gb|DQ538370.1| Rhodotorula mucilaginosa strain M...	1021	0.0
gi|71384027|gb|DQ132885.1| Rhodotorula mucilaginosa strain XJ...	1021	0.0
gi|37724177|gb|AY158650.1| Rhodotorula mucilaginosa strain CR...	1021	0.0
gi|58011315|gb|AY731717.1| Rhodotorula mucilaginosa strain MA...	1021	0.0
gi|58011311|gb|AY731716.1| Rhodotorula mucilaginosa strain MA...	1021	0.0
gi|58011307|gb|AY731715.1| Rhodotorula mucilaginosa strain MA...	1021	0.0
gi|58011304|gb|AY731714.1| Rhodotorula mucilaginosa strain MA...	1021	0.0
gi|58011300|gb|AY731713.1| Rhodotorula mucilaginosa strain MA...	1021	0.0
gi|58011413|gb|AY731797.1| Rhodotorula mucilaginosa strain RT...	1021	0.0
gi|58011410|gb|AY731796.1| Rhodotorula mucilaginosa strain SD...	1021	0.0
gi|58011408|gb|AY731795.1| Rhodotorula mucilaginosa strain RT...	1021	0.0
gi|38261929|gb|AY437842.1| Rhodotorula sp. RCL11 26S ribosomal R	1021	0.0
gi|25991978|gb|AF485994.1| Rhodotorula mucilaginosa A53 26S r...	1021	0.0
gi|25991977|gb|AF485993.1| Rhodotorula mucilaginosa A261 26S ...	1021	0.0
gi|25991976|gb|AF485992.1| Rhodotorula mucilaginosa A229 26S ...	1021	0.0
gi|6273238|gb|AF189961.1| Rhodotorula mucilaginosa strain CBS...	1021	0.0
gi|6273237|gb|AF189960.1| Rhodotorula mucilaginosa strain CBS...	1021	0.0
gi|6273235|gb|AF189958.1| Rhodotorula mucilaginosa strain Y17...	1021	0.0
gi|6273234|gb|AF189957.1| Rhodotorula mucilaginosa strain Y17...	1021	0.0
gi|6273233|gb|AF189956.1| Rhodotorula mucilaginosa strain Y17...	1021	0.0
gi|6273232|gb|AF189955.1| Rhodotorula mucilaginosa strain Y17...	1021	0.0
gi|6273231|gb|AF189954.1| Rhodotorula mucilaginosa strain Y17...	1021	0.0
gi|6273230|gb|AF189953.1| Rhodotorula mucilaginosa strain Y17...	1021	0.0
gi|6273229|gb|AF189952.1| Rhodotorula mucilaginosa strain Y17...	1021	0.0
gi|6273228|gb|AF189951.1| Rhodotorula mucilaginosa strain IGC...	1021	0.0
gi|78039182|emb|AM114910.1| Rhodotorula mucilaginosa partial 26S	1021	0.0
gi|78039181|emb|AM114909.1| Rhodotorula mucilaginosa partial 26S	1021	0.0
gi|15637386|gb|AF406911.1| Rhodotorula mucilaginosa strain CB...	1021	0.0
gi|15637385|gb|AF406910.1| Rhodotorula mucilaginosa strain CB...	1021	0.0
gi|78039183|emb|AM114911.1| Rhodotorula mucilaginosa partial 26S	1021	0.0
gi|16755518|gb|AF335986.1| Rhodotorula mucilaginosa strain AT...	1021	0.0
gi|50787920|emb|AJ786248.1| Rhodotorula mucilaginosa partial 26S	1021	0.0
gi|21435771|gb|AF514862.1| Rhodotorula mucilaginosa isolate 4...	1021	0.0
gi|21435767|gb|AF514860.1| Rhodotorula mucilaginosa isolate 2...	1021	0.0
gi|8099635|gb|AF257267.1|AF257267 Rhodotorula mucilaginosa KC...	1021	0.0
gi|49457190|emb|AJ749835.1| Rhodotorula mucilaginosa partial 26S	1021	0.0
gi|6601463|gb|AF207886.1|AF207886 Sporobolomyces alborubescen...	1021	0.0
gi|20378608|gb|AF444755.1| Rhodotorula mucilaginosa strain CB...	1021	0.0
gi|20378603|gb|AF444750.1| Rhodotorula mucilaginosa strain CB...	1021	0.0
gi|20452200|gb|AF444725.1| Rhodotorula mucilaginosa strain Y ...	1021	0.0
gi|4557128|gb|AF070432.1|AF070432 Rhodotorula mucilaginosa 26...	1021	0.0

gi|62766630|gb|DQ000220.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain DB...	1021	0.0
gi|110891377|gb|DQ862841.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain G...	1017	0.0
gi|6273236|gb|AF189959.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain CBS...	1013	0.0
gi|86198025|dbj|AB217492.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	1013	0.0
gi|73658618|emb|AM076410.1|	Rhodotorula mucilaginosa partial 26S	1013	0.0
gi|73658610|emb|AM076402.1|	Rhodotorula mucilaginosa partial ...	1013	0.0
gi|21435768|gb|AF514861.1|	Rhodotorula mucilaginosa isolate 9...	1013	0.0
gi|20378602|gb|AF444749.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain CB...	1013	0.0
gi|60893910|gb|AY941089.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain CC...	1013	0.0
gi|108795587|gb|DQ538369.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain M...	1009	0.0
gi|117573766|gb|EF063138.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain E...	1007	0.0
gi|37724178|gb|AY158651.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain CR...	1007	0.0
gi|16755519|gb|AF335987.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain UW...	1007	0.0
gi|20452213|gb|AF444738.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain CB...	1007	0.0
gi|34148831|gb|AY296051.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain CE...	1005	0.0
gi|50787922|emb|AJ786249.1|	Rhodotorula mucilaginosa partial 26S	1005	0.0
gi|86198034|dbj|AB217501.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	1003	0.0
gi|19309741|emb|AJ437347.1|RMU437347	Rhodotorula mucilaginosa 26	999	0.0
gi|110765862|gb|DQ857888.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain G...	997	0.0
gi|58011319|gb|AY731718.1|	Rhodotorula sp. MARY 160 26S ribos...	997	0.0
gi|58011414|gb|AY731798.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain SD...	997	0.0
gi|73658611|emb|AM076403.1|	Rhodotorula mucilaginosa partial 26S	997	0.0
gi|62754299|gb|DQ009002.1|	Rhodotorula mucilaginosa isolate x...	997	0.0
gi|86198039|dbj|AB217506.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	995	0.0
gi|108947466|gb|DQ640485.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain M...	993	0.0
gi|86198026|dbj|AB217493.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	991	0.0
gi|62178413|gb|AY953967.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain SJ...	991	0.0
gi|54260883|dbj|AB193175.1|	Rhodotorula mucilaginosa genes fo...	989	0.0
gi|50787932|emb|AJ786256.1|	Rhodotorula mucilaginosa partial 26S	985	0.0
gi|86198032|dbj|AB217499.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	979	0.0
gi|108947467|gb|DQ640486.1|	Rhodotorula mucilaginosa strain M...	977	0.0
gi|18698577|gb|AF459702.1|	Rhodotorula glutinis var. dairenen...	975	0.0
gi|54260885|dbj|AB026010.2|	Rhodotorula sp. SY-100 genes for ...	975	0.0
gi|15986672|gb|AF387146.1|	Rhodotorula dairenensis 26S riboso...	975	0.0
gi|54260884|dbj|AB026006.2|	Rhodotorula sp. SY-96 genes for 1...	973	0.0
gi|86198033|dbj|AB217500.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	969	0.0
gi|14289127|gb|AY033552.1|	Rhodotorula dairenensis strain IGC...	959	0.0
gi|14289126|gb|AY033551.1|	Rhodotorula dairenensis strain IGC...	959	0.0
gi|4557125|gb|AF070429.1|AF070429	Rhodotorula glutinis var. d...	959	0.0
gi|86198031|dbj|AB217498.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	957	0.0
gi|86198036|dbj|AB217503.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	954	0.0
gi|86198029|dbj|AB217496.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	952	0.0
gi|86198027|dbj|AB217494.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	946	0.0
gi|85542870|gb|DQ350841.1|	Rhodotorula dairenensis strain AH5...	936	0.0
gi|86198042|dbj|AB217509.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	934	0.0
gi|86198035|dbj|AB217502.1|	Rhodotorula mucilaginosa gene for...	932	0.0
gi|86198043|dbj|AB217510.1|	Rhodotorula dairenensis gene for ...	926	0.0
gi|15986668|gb|AF387142.1|	Rhodotorula sp. IGC 4884 26S ribos...	924	0.0
gi|15986667|gb|AF387141.1|	Rhodotorula sp. IGC 5600 26S ribos...	924	0.0
gi|20378598|gb|AF444745.1|	Rhodotorula sp. CBS 8885 26S ribos...	912	0.0
gi|58011419|gb|AY731800.1|	Rhodotorula sp. SDY 20 26S ribosomal	908	0.0
gi|58011417|gb|AY731799.1|	Rhodotorula sp. SDY 119 26S riboso...	908	0.0
gi|37704713|gb|AY332031.1|	Uncultured eukaryote clone C02-2-1...	908	0.0
gi|15986669|gb|AF387143.1|	Rhodotorula sp. IGC 5380 26S ribos...	908	0.0
gi|15986666|gb|AF387140.1|	Rhodotorula sp. IGC 4782 26S ribos...	908	0.0

gi|111283846|gb|DQ832198.1| Rhodotorula mucilaginosa AFTOL-ID 1548 25S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1399

Score = 1021 bits (515), Expect = 0.0
Identities = 522/523 (99%), Gaps = 1/523 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query  1    TAAGTGTGAAGAGGTCGAAACCCCCGCCAAAGGCACACTGCGTTCCTCAGTCCCCCAAGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  575  TAAGTGTGAAGAGGTCGAAACCCCCGCCAAAGGCACACTGCGTTCCTCAGTCCCCCAAGA  516

Query  61   TGTATCCAGCAGAGAGCTATAACACAGCCGAAACTGCTACCTTCTCTCTACCATTATCCA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  515  TGTATCCAGCAGAGAGCTATAACACAGCCGAAACTGCTACCTTCTCTCTACCATTATCCA  456

Query  121  TCCCGGAAAACTGATGCTGGCCTGCAAACCGATTGCTCGGCAAGCAAGTCTGACTTCAAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  455  TCCCGGAAAACTGATGCTGGCCTGCAAACCGATTGCTCGGCAAGCAAGTCTGACTTCAAG  396

Query  181  CGTTTCCCTTCCAACAATTTCACGTACTGTTAACTCTCTTTCCAAAGTGCTTTTCATCTT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  395  CGTTTCCCTTCCAACAATTTCACGTACTGTTAACTCTCTTTCCAAAGTGCTTTTCATCTT  336

Query  241  TCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  335  TCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTT  276

Query  301  ACCACCCAATTTGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAAATGTATCACAAAGC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  275  ACCACCCAATTTGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAAATGTATCACAAAGC  216

Query  361  GCTGGGCGTCCGCACCATATACGGGGGTCTCACCACTATGCCGCTGTATTCCAACAGACT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  215  GCTGGGCGTCCGCACCATATACGGGGGTCTCACCACTATGCCGCTGTATTCCAACAGACT  156

Query  421  TGTGTGCGGTCCAACGCGGAAAACATTTCTAGAGATTACAACTCGGACACCGAAGGTGCC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  155  TGTGTGCGGTCCAACGCGGAAAACATTTCTAGAGATTACAACTCGGACACCGAAGGTGCC  96

Query  481  AGATTATAAA-TTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGCTACTA  522
            |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  95   AGATTATAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGCTACTA  53
```

ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่า

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 การหมักคาร์โบไฮเดรต 10 ชนิดของแบคทีเรียแลคติกรูปแท่งที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าที่ระยะเวลาต่างๆของการหมัก จำนวน 102 ไอโซเลต

วันที่	ไอโซเลต	ผลการทดสอบน้ำตาล												
		Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Gluconate	Mannitol	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose
0	WF0-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF0-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF0-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF0-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF0-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF0-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF0-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF0-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF0-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF0-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	WF7-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-9	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF7-10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
14	WF14-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	WF14-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 (ต่อ)

วันที่	ไอโซเลต	ผลการทดสอบน้ำตาล												
		Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Gluconate	Mannitol	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose
14	WF14-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF14-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
21	WF21-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	WF21-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-9	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	WF21-10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	WF21-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF21-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
28	WF28-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 (ต่อ)

วันที่	ไอโซเลต	ผลการทดสอบน้ำตาล												
		Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Gluconate	Mannitol	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose
28	WF28-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF28-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
35	WF35-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF35-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF35-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF35-4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	WF35-5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	WF35-6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	WF35-7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	WF35-8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	WF35-9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	WF35-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
42	WF42-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF42-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 (ต่อ)

วันที่	ไอโซเลต	ผลการทดสอบน้ำตาล												
		Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Gluconate	Mannitol	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose
49	WF49-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF49-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF49-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF49-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF49-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF49-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF49-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF49-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF49-9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	WF49-10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
56	WF56-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF56-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF56-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF56-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF56-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF56-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF56-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF56-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF56-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WF56-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

หมายเหตุ: + = เติบโต, - = ไม่เติบโต

ตารางภาคผนวก ค ที่ 2 การหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพลูกยอป่าโดยใช้ API 50 CHL test และโปรแกรม API Web Stand Alone V. 1.1.0

Tube	Test	*Lactobacillus* sp.									
		WF0-1	WF7-1	WF7-7	WF14-1	WF14-3	WF21-1	WF21-6	WF28-1	WF35-1	*L. plantarum*
0	CONTROL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Glycerol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	D-Xylose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	A-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	D-Sorbitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
20	Methyl-αD-Mannopyranoside	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
21	Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
22	N-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	Esculin ferric citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

ตารางภาคผนวก ค ที่ 2 (ต่อ)

Tube	Test	*Lactobacillus* sp.									
		WF0-1	WF7-1	WF7-7	WF14-1	WF14-3	WF21-1	WF21-6	WF28-1	WF35-1	*L. plantarum*
26	Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	D-Celibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	D-Lactose (bovine origin)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	D-Saccharose (sucrose)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
35	D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	Amidon (starch)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
40	D-Turanose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
41	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Potassium Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
48	Potassium 2-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	Potassium 5-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + = เติบโต, - = ไม่เติบโต

ตารางภาคผนวก ค ที่ 2 (ต่อ)

Tube	Test	*Lactobacillus* sp.				
		WF35-4	WF42-1	WF49-1	WF49-9	WF56-1
0	CONTROL	-	-	-	-	-
1	Glycerol	-	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	+	+	+	+	+
5	D-Ribose	+	+	+	+	+
6	D-Xylose	-	-	-	-	-
7	L-Xylose	-	-	-	-	-
8	A-Adonitol	-	-	-	-	-
9	Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-	-
10	D-Galactose	+	+	+	+	+
11	D-Glucose	+	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+	+
14	L-Sorbose	-	-	-	-	-
15	L-Rhamnose	-	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	-
18	D-Mannitol	+	+	+	+	+
19	D-Sorbitol	-	-	+	+	+
20	Methyl-αD-Mannopyranoside	+	+	-	+	+
21	Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-	-
22	N-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+
23	Amygdalin	+	+	+	+	+
24	Arbutin	+	+	+	+	+
25	Esculin ferric citrate	-	-	-	-	-

ตารางภาคผนวก ค ที่ 2 (ต่อ)

Tube	Test	*Lactobacillus* sp.				
		WF35-4	WF42-1	WF49-1	WF49-9	WF56-1
26	Salicin	+	+	+	+	+
27	D-Celibiose	+	+	+	+	+
28	D-Maltose	+	+	+	+	+
29	D-Lactose (bovine origin)	+	+	+	+	+
30	D-Melibiose	+	+	+	+	+
31	D-Saccharose (sucrose)	+	+	+	+	+
32	D-Trehalose	+	+	+	+	+
33	Inulin	-	-	-	-	-
34	D-Melezitose	+	+	+	+	+
35	D-Raffinose	+	+	+	+	+
36	Amidon (starch)	-	-	-	-	-
37	Glycogen	-	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-	-
39	Gentiobiose	+	+	+	+	+
40	D-Turanose	+	+	+	+	+
41	D-Lyxose	-	-	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	-	-	-
43	D-Fucose	-	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	+	+	-	-	+
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-
47	Potassium Gluconate	+	+	-	-	+
48	Potassium 2-ketogluconate	-	-	-	-	-
49	Potassium 5-ketogluconate	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + = เติบโต, - = ไม่เติบโต

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวกาญจนา ขาวผ่อง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4822004

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
สาธารณสุขศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช	2545

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

กาญจนา ขาวผ่อง วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล อัจฉรา เพ็งหนู และ ดวงพร คันธโชติ. 2550. กระบวนการหมักน้ำหมักลูกยอป่าและศักยภาพการใช้น้ำหมักเป็นปุ๋ยน้ำ. งานนำเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตแห่งชาติ ครั้งที่ 7 วันที่ 4-5 เมษายน 2550. นำเสนอแบบบรรยาย ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี.

กาญจนา ขาวผ่อง และดวงพร คันธโชติ. 2550. ผลของการใช้น้ำหมักลูกยอป่า (*Morinda coreia* Ham) ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมะเขือเทศราชินี. การประชุมน้ำหมักชีวภาพเทคโนโลยีเพื่อความพอเพียงสู่นวัตกรรมเพื่อสุขภาพชุมชน. วันที่ 25 พฤษภาคม 2550. นำเสนอแบบบรรยาย ณ โรงแรมแกรนด์ เมอร์เคียว ฟอร์จูน ถนนรัชดาภิเษก กรุงเทพฯ. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.).