การเปลี่ยนแปลงทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา ในการหมักปุ๋ยผักตบชวา

Chemical, Physical and Microbiological Changes during the Water Hyacinth Composting.

ณัฐพล ศรีเมือง

Nattapon Srimuang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยาในการหมักปุ๋ยผักตบชวา

ผู้เขียน นายณัฐพล ศรีเมือง

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..

(ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

…..……..

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ)

คณะกรรมการสอบ

……...…….…….....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

……...กรรมการ

(ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล)

……...……....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ)

...…….กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

…….

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยาในการหมักปุ๋ยผักตบชวา

ผู้เขียน นายณัฐพล ศรีเมือง

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะทางเคมี กายภาพและจุลชีววิทยาที่เปลี่ยนแปลงในกระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวาเป็นเวลา 11 สัปดาห์ พบว่าปุ๋ยหมักมีสีดำ เปื่อยยุ่ย ไม่มีกลิ่นพีเอชอยู่ในช่วงประมาณ 7 อุณหภูมิมีค่าสูงสุด 40 องศาเซลเซียสในสัปดาห์ที่ 1 และเปอร์เซ็นต์ความชื้นในกองปุ๋ยค่อนข้างสูงจากประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ในสัปดาห์แรก จนสัปดาห์สุดท้ายยังมีความชื้นสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นการหมักเท่ากับ 17.61 และมีค่า 18.12 เมื่อสิ้นสุดการหมัก จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มลดลงอย่างมากจาก 1.3 x 10^8 เป็น 7 x 10^5 MPN/g และไม่พบเชื้อแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มและ *Escherichia coli* ในอาทิตย์สุดท้ายของการหมัก กลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดคือแบคทีเรีย รองลงมาคือ แอคติโนมัยซีตและราตามลำดับ โดยจุลินทรีย์ทุกกลุ่มพบมากที่สุดในช่วง 1-2 สัปดาห์แรก สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มชอบอุณหภูมิปานกลางมีจำนวนมากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มชอบอุณหภูมิสูงตลอดกระบวนการหมักปุ๋ย ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของกองปุ๋ยหมักสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 ของการหมัก มีค่า 6.67 และ 10.24 unit/kg DW ซึ่งสัมพันธ์กับค่าอุณหภูมิ

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในปริมาณสูงสามารถคัดเลือกได้ 2 ไอโซเลท จากผลการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ไอโซเลททางด้านชีวโมเลกุลโดยการศึกษาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rRNA gene ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทคือ *Bacillus* spp. กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงโดยใช้อาหารแข็งที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยซังข้าวโพดและฟางข้าวให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสสูงจากเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท ไอโซเลท B4 เมื่อเลี้ยงในฟางข้าวให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเป็น 2.54 Unit/g DW ส่วนไอโซเลท B91 เมื่อเลี้ยงในซังข้าวโพดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเป็น 1.38 Unit/g DW เมื่อเลี้ยงไอโซเลท B4 ในผักตบชวาผสมขุยมะพร้าว พบว่าที่ความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสสูงสุด มีค่าเท่ากับ 0.62 และ 1.34 unit/g DW เอนไซม์ทั้งสองมีความเสถียรและทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นที่ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียสตามลำดับ การทดลองนี้ชี้ให้เห็นทางเลือกใน

การนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอย่างอื่น เช่น ซังข้าวโพด และ ฟางข้าว เป็นวัสดุเริ่มต้นในการหมักปุ๋ย และเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักปุ๋ยผักตบชวาได้ต่อไป การตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในกองปุ๋ยหมักชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในการหมักปุ๋ย

Thesis Title	Chemical, Physical and Microbiological Changes during the Water Hyacinth Composting.
Author	Mr. Nattapon Srimuang
Major Programme	Microbiology
Academic Year	2009

ABSTRACT

An investigation of the physical, chemical and microbiological changes that occurred during the composting of water hyacinth was carried out. After 11 weeks of composting, the compost turned black, had decomposed and had no smell. The pH was 7 and the highest temperature reached, 40^{o}C occurred in the first week. The moisture content was high at 80% at the start of the composting and decreased to 70% at the end. The initial carbon/nitrogen ratio was 17.61 and this increased to 18.12 by the end of the composting. After the addition of animal manure the coliform population declined greatly from 1.3 x 10^{8} to 7 x 10^{5} MPN/g and *Escherichia coli* was not detected in the final product. Bacteria were the dominant microbes in the compost followed by actinomycetes and fungi. All groups of microorganisms were highest during the first two weeks. Mesophillic microorganisms were present in higher numbers than thermophillic microorganisms throughout the composting. The highest cellulase and xylanase activities in the compost of 6.67 and 10.24 unit/kg DW respectively were detected in the second week which was related to the temperature. Two bacterial isolates (B4, B91) that produced good levels of cellulase and xylanase on solid media containing cellulose and xylan respectively were selected from the compost at this time to examine cellulase and xylanase production. Agro-industrial residues were used as substrates during solid-state fermentation (SSF) processes. This showed that corncob and rice straws were good substrates for the production of the enzymes. Isolate B4 grown with straws gave a maximum xylanase activity of 2.54 Unit/g DW while isolate B91 grown with corncob gave the maximum cellulase activity of 1.38 Unit/g DW. When water hyacinth was mixed with coconut shells at various moisture contents and used as substrates, isolate B4 gave maximum cellulase and xylanase activities of 0.62 and 1.34 Unit/g DW respectively at 80% moisture content. The activities of both enzymes were stable and maximum at 50^{o}C.

The stability and activity of both enzymes decreased in direct proportion to higher temperatures of 60, 70, 80 and 90^{o}C respectively. Isolates B4 and B91 were later identified as *Bacillus* spp. by morphology and a partial 16S rRNA gene sequence analysis. This study indicated that agro-industrial residues such as straws and corncob can be alternative materials for composting using these two bacterial isolates as starter strains. Because of the levels of xylanase and cellulase in the compost they also probably have important roles in the composting of water hyacinth.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำช่วยเหลือและให้กำลังใจในเรื่องการศึกษา ค้นคว้าวิจัย รวมถึงการเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบระคุณ ผศ.ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ รศ.ดร.ดวงพร คันธโชติ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำเรื่องการศึกษา ค้นคว้าวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.นุกูล อินทระสังขา กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2549 และทุนอุดหนุนวิจัยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่สถาบันทรัพยากรชายฝั่ง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และกลุ่มชาวบ้านอำเภอปากพนังที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างรวมถึงการหมักปุ๋ยผักตบชวาเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนเรื่องการศึกษา ขอบคุณเพื่อนๆ พี่และน้องร่วมรุ่น พี่และน้องในห้องปฏิบัติการทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และคำปรึกษาที่ดีตลอดมา ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือที่ดีมาตลอด

ณัฐพล ศรีเมือง

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	21
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	25
3. ผลการทดลอง	34
4. วิจารณ์	59
5. สรุป	71
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก ก	87
ภาคผนวก ข	92
ภาคผนวก ค	95
ภาคผนวก ง	99
ภาคผนวก จ	104
ประวัติผู้เขียน	124

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ส่วนประกอบของผักตบชวา	4
2.	ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนที่มีอยู่ในวัสดุชนิดต่าง ๆ	10
3.	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส	31
4.	อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของปุ๋ยหมักผักตบชวาสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 11	3 (8)
5.	จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli* ของปุ๋ยหมักผักตบชวา เมื่อเริ่มต้นหมักปุ๋ยและสัปดาห์สุดท้าย	41
6.	ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC agar อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	43
7.	ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร Xylan agar อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	44
8.	อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของวัสดุทางการเกษตรแต่ละชนิด	52
9.	ผลการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis	58
10.	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส	67
11.	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตหากิจกรรมเอนไซม์	91
12.	การปรับพีเอชของสาร Acetate buffer 0.1 M pH 5.0	93
13.	การเตรียมสารละลายกลูโคสและไซโลสมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Nelson-Somogyi	96
14.	ปริมาตรน้ำกลั่นและ Berg's mineral salts medium ที่เติมลงในสับสเตรทแต่ละชนิดเพื่อปรับความชื้นให้ได้ 70 เปอร์เซ็นต์	99
15.	ปริมาตรน้ำกลั่นและ Berg's mineral salts medium ที่เติมลงในผักตบชวาผสมขุยมะพร้าวให้ได้ความชื้นช่วง 50 - 80 เปอร์เซ็นต์	100
16.	การเตรียม McFarland standard	100
17.	ตาราง MPN ต่อ กรัม เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม ปริมาตรละ 5 หลอด	102

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	แสดงตำแหน่งบริเวณเก็บตัวอย่างภายในกองปุ๋ยหมัก	26
2.	ลักษณะกองผักตบชวาที่เตรียมพร้อมสำหรับทำปุ๋ยหมัก	34
3.	ลักษณะของผักตบชวาก่อนการทำปุ๋ยหมัก	34
4.	กองปุ๋ยหมักผักตบชวาที่ผ่านกระบวนการหมักเป็นเวลา 11 สัปดาห์	35
5.	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของปุ๋ยหมักผักตบชวา	36
6.	การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความชื้นของปุ๋ยหมักผักตบชวา	36
7.	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของปุ๋ยหมักผักตบชวา	37
8.	การเปลี่ยนแปลงจำนวน mesophilic bacteria และ thermophilic bacteria ในกระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวาสัปดาห์ที่ 0 - 11	39
9.	การเปลี่ยนแปลงจำนวน mesophilic actinomycete และ thermophilic actinomycete ในกระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวาสัปดาห์ที่ 0 - 11	40
10.	การเปลี่ยนแปลงจำนวน mesophilic fungi และ thermophilic fungi ในกระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวาสัปดาห์ที่ 0 - 11	40
11.	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของปุ๋ยหมักผักตบชวา	41
12.	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหาร CMC broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 5 ไอโซเลท	45
13.	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงในอาหาร Xylan broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 5 ไอโซเลท	45
14.	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท B4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร CMC broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	47
15.	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท B4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Xylan broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	48
16.	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้วัสดุทางการเกษตรได้แก่ ผักตบชวา, ขุยมะพร้าว, ฟางข้าวและซังข้าวโพด ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วัน	50
17.	กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้วัสดุทางการเกษตรได้แก่ ผักตบชวา, ขุยมะพร้าว, ฟางข้าวและซังข้าวโพด ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วัน	50

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

18. กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B91 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้วัสดุทางการเกษตร ได้แก่ ผักตบชวา, ขุยมะพร้าว, ฟางข้า และซังข้าวโพด ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วัน 51
19. กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B91 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้วัสดุทางการเกษตร ได้แก่ ผักตบชวา, ขุยมะพร้าว, ฟางข้าวและซังข้าวโพด ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วัน 51
20. กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B4 ที่เพาะเลี้ยงในผักตบชวาต่อขุยมะพร้าว (13:1) ที่มีความชื้นต่างๆกัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 วัน (ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์, 60 เปอร์เซ็นต์, 70 เปอร์เซ็นต์ , 80 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่น 70 เปอร์เซ็นต์) 53
21. กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B4 ที่เพาะเลี้ยงในผักตบชวาต่อขุยมะพร้าว (13:1) ที่มีความชื้นต่างๆกัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 วัน (ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์, 60 เปอร์เซ็นต์, 70 เปอร์เซ็นต์ , 80 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่น 70 เปอร์เซ็นต์) 53
22. ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่ผลิตโดยไอโซเลท B4 เมื่อบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 40 – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แสดงเป็นค่าสัมพัทธ์ (Relative activity) กับค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 54
23. ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่ผลิตโดยไอโซเลท B4 เมื่อบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 50 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แสดงเป็นค่าสัมพัทธ์ (Relative activity) กับค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 55
24. ผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลท B4 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA เป็นเวลา 16 ชั่วโมง 56
25. ผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลท B91 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSAเป็นเวลา 16 ชั่วโมง 56
26. ผลการย้อมสีสปอร์ของ B4 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA เป็นเวลา 3 วัน 57
27. ผลการย้อมสีสปอร์ของไอโซเลท B91 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA เป็นเวลา 3 วัน 57
28. ลักษณะโคโลนี B4 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 58
29. ลักษณะโคโลนี B91 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 58

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

30. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัม 97
31. กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัม 98

ตัวย่อและสัญลักษณ์

Aw	=	Available water
cm	=	centimeter
CFU	=	colony forming unit
$^{\circ}C$	=	degree celcius
C/N ratio	=	carbon-nitrogen ratio
DW	=	dried weight
g	=	gram
h	=	hour
µg	=	microgram
µl	=	microliter
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
MPN	=	most probable number
nm	=	nanometer
%	=	percentage

บทที่ 1

บทนำ

บทนำ

ผักตบชวาเป็นวัชพืชที่เติบโตได้รวดเร็ว ก่อให้เกิดปัญหานานาประการกับแหล่งน้ำโดยทั่วไป เช่น เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของยุง สัตว์นำโรคบางชนิด เช่น หอยธีเนีย เป็นพาหะนำโรคของพยาธิต่างๆ เป็นตัวการขัดขวางการสัญจรทางน้ำ ทำให้กระแสน้ำเปลี่ยนทิศทาง และอุดตันทางระบายน้ำ (สุกัลยา และ ปารวี, 5) การนำผักตบชวามาทำเป็นปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยชีวภาพ เป็นวิธีการกำจัดผักตบชวาที่แพร่หลายวิธีหนึ่ง เนื่องจากหาง่าย มีอยู่ในท้องถิ่น ทำให้มีต้นทุนต่ำมาก และสามารถทำได้ด้วยตนเอง แต่ถึงแม้ว่าจะมีการทำปุ๋ยหมักกันอย่างแพร่หลายในชุมชน ในปัจจุบันการศึกษาคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของปุ๋ยหมักยังคงมีน้อย กระบวนการผลิตปุ๋ยหมักที่ไม่สมบูรณ์อาจส่งผลร้ายต่อผู้ใช้และต่อพืช (Polprasert *et al*., 199) วัสดุที่นำมาใช้ทำปุ๋ยหมัก เช่น พืช วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและมูลสัตว์ จะมีจุลินทรีย์ปะปนอยู่ด้วยเป็นจำนวนมาก และอาจมีจุลินทรีย์ก่อโรคติดมาด้วย ดังนั้นการตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยการตรวจจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม หรือ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค จะมีส่วนช่วยประเมินคุณภาพของปุ๋ยหมักได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมักจะช่วยทำให้เข้าใจกระบวนการหมักที่ดีขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์มีบทบาทที่สำคัญมากต่อการย่อยสลายกองปุ๋ยหมัก กระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญต่อลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของปุ๋ยหมัก ประชากรของจุลินทรีย์ที่พบในปุ๋ยหมักจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายด้าน เช่น วัสดุที่นำมาทำปุ๋ยหมัก อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรดด่าง หรือ อากาศ โดยอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อจำนวนประชากรและชนิดของจุลินทรีย์ (McKinley and estal, 198 ; Ishii *et al*., 000) ในกระบวนการหมักปุ๋ย เมื่อสภาพภายในกองเศษพืชเหมาะสมจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีต (Finstein and Morris, 1975; Lacey, 1980; สมศักดิ์, 538) จะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นโดยการเข้าย่อยสลายวัสดุที่ใช้หมัก จุลินทรีย์เหล่านี้จะขับเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเศษพืชได้สารต่างๆมากมาย ด้วยกิจกรรมของเอนไซม์และกระบวนการเมแทบอลิซึม เป็นเหตุให้เกิดความร้อนขึ้นในกองปุ๋ย (Bailey and Ollis, 1977; พิทยากรและเสียงแจ๋ว, 5 0; ยุพิน, 5)

การสร้างสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมัก เช่น ขนาดกองปุ๋ย วัสดุที่นำมาใช้ อุณหภูมิ ความชื้น ฯลฯ จะเป็นการลดระยะเวลาการย่อยสลายเศษพืชให้สั้นลง ทำให้

ได้ปุ๋ยหมักเร็วขึ้น การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการหมักปุ๋ยจะก่อให้เกิดความเข้าใจในกระบวนการย่อยสลายมากขึ้น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ผักตบชวาเป็นส่วนประกอบหลักในการหมัก โดยในผักตบชวามีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Abdelhamid and Gabr, 1991) แต่เมื่อทำให้แห้งพบว่ามีเฮมิเซลลูโลส 33.97 เปอร์เซ็นต์ และมีเซลลูโลส 18 เปอร์เซ็นต์ (Chana□ya *et al*., 1993) ซึ่งมีค่อนข้างมาก การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสและการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดี จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการหมักปุ๋ย

ดังนั้นการศึกษาปัจจัยทางด้านกายภาพและชีวภาพของปุ๋ยหมักผักตบชวาจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการทำปุ๋ยหมักผักตบชวาให้มีคุณภาพดียิ่งขึ้น ไม่ส่งผลร้ายต่อพืชและผู้ใช้

การตรวจเอกสาร

1. ผักตบชวา

ผักตบชวา (Water hyacinth) มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Eichhornia crassipes* (Bolenz *et al*., 1990) จัดเป็นวัชพืชประเภทลอยน้ำ มีความคงทนต่อดินฟ้าอากาศได้อย่างดีเยี่ยม มีดอกสีม่วงอ่อนงดงาม คล้ายช่อดอกกล้วยไม้ มีชื่อเรียกในแต่ละท้องถิ่นไม่เหมือนกัน เช่น ผักปอด, สวะ, ผักโรค, ผักตบชวา, ผักยะวา, ผักอีโยก เป็นต้น

ผักตบชวา มีถิ่นกำเนิดในแม่น้ำอะเมซอนในทวีปอเมริกาใต้ (Bolenz *et al*.,1990) มีอัตราการเจริญเติบโตสูง (Coo□, 1990) สามารถอยู่ได้ทั้งในน้ำนิ่งและน้ำไหล ผักตบชวามีการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วทั้งทางเมล็ดและการแตกหน่อ (Awe□e, 1993) สามารถเติบโตได้ในเขตร้อนในช่วงระหว่าง □0 องศาเหนือ ถึง □0 องศาใต้ รวมถึงในอินเดีย แอฟริกาใต้และสหรัฐอเมริกา (Center, 199□) ผักตบชวาก่อให้เกิดปัญหาต่อแหล่งน้ำและก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพ เศรษฐกิจ และสิ่งแวดล้อม (Epstein, 1998)

ผักตบชวาสามารถเติบโตได้ในน้ำทุกสภาวะและเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำที่มีสารอาหาร พีเอชในน้ำที่เหมาะสมคือประมาณ 6 – 8 อุณหภูมิที่สามารถเติบโตได้คือ 1 – □0 องศาเซลเซียส (Wilson *et al*., □005) แต่เติบโตได้ดีมากในน้ำที่มีการปนเปื้อนของไนโตรเจน (Heard and Winterton, □000) หากมีความหนาแน่นของผักตบชวามาก มีผลให้ปริมาณแสงในน้ำลดลง ทำให้พืชใต้น้ำสังเคราะห์แสงลดลง ส่งผลต่อการผลิตออกซิเจนลดลง (Sun *et al*.,1993) ผักตบชวาจะตายได้เมื่ออยู่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของเกลือ 6 – 8 เปอร์เซ็นต์ (Olivares and Colonnello, □000)

ผักตบชวาสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยใช้เมล็ด (□erma *et al*., □003) สามารถเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อได้ทุกๆ 6 – 18 วัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Methy *et al*.,

1990) แต่หากอยู่ในภาวะไม่เหมาะสม เช่น ไม่มีแสงแดดเป็นเวลานานๆ หรืออุณหภูมิไม่เหมาะสม การเพิ่มจำนวนของผักตบชวาต้องใช้เวลายาวนานขึ้น (Barrett, 1980)

ปัญหาสิ่งแวดล้อมจากผักตบชวาเป็นปัญหาใหญ่ที่พบเกือบทั่วโลก ผักตบชวาเพิ่มจำนวนจาก 1 เป็น ได้ภายใน 5 วัน และเพิ่มจำนวนได้ถึง ,000,000 ต้น โดยใช้เวลาแตกหน่อ 70 – 00 ครั้ง (Epstein, 1998) จึงต้องใช้เงินจำนวนมากในการกำจัดผักตบชวาที่อยู่ในแม่น้ำ นอกจากนี้ยังมีปัญหาอย่างอื่น เช่น ชาวประมงนอกจากจับปลายากขึ้นเนื่องจากมีผักตบชวากีดขวางบนผิวน้ำแล้ว จำนวนปลาในแม่น้ำมีจำนวนและขนาดลดลงเนื่องจากออกซิเจนในน้ำลดลง รวมถึงเป็นแหล่งของยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคต่างๆ เช่น ไข้มาลาเรีย สมองอักเสบและโรคพยาธิบางชนิด (Mailu, 001; Mironga, 00)

ผักตบชวาเพิ่มจำนวนทั่วโลก 50 ตัน (น้ำหนักแห้ง) ต่อ 10,000 ตารางเมตรต่อปี (Abbasi and Ramasamy, 1999) จึงจำเป็นต้องควบคุมปริมาณผักตบชวาซึ่งมีหลายวิธีเช่น ใช้ตาข่ายกรองผักตบชวา (Smith *et al*., 198) การใช้สาร ,-dichlorophenoxyacetic acid amine พ่นลงบนผักตบชวา (Ram and Moolani, 000) การใช้แมลงบางชนิด เช่น *Neochetina eichhorniae* (Julien and Griffiths, 1998) ใช้เชื้อรา *Alternaria eichhorniae* (Babu *et al*., 003) ในการกำจัดผักตบชวา เป็นต้น

จากการศึกษาพบว่า ผักตบชวามีน้ำเป็นองค์ประกอบถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และมีองค์ประกอบเคมีหลักอื่นดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของผักตบชวา

Parameter (% on dry matter basis)	Abdelhamid and Gabr (1991)	Bolenz *et al.* (1990)	Poddar *et al.* (1991)	Polprasert *et al* (1980)	Gunnarsson and Mattsson (1997)	
					Fresh	Dried
C/N ratio	-	-	-	15.8	3.5	5.1
Xylan	33.		18.	-	-	-
Cellulose	19.5	31	5.61	-	-	-
Lignin	9. 7	7	9.93	-	-	-

ที่มา : Carina and Cecilia (007)

ผักตบชวาสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น สามารถลดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยการดูดซึมได้ถึง 7 เปอร์เซ็นต์ และ 63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในน้ำทิ้งจากโรงงานนม (Tripathi and Upadhyay, 003) ลดไนโตรเจนรวม 50 เปอร์เซ็นต์ จากแหล่งเลี้ยงหมูที่ปล่อยน้ำเสียที่มีไนโตรเจนรวม 110 กิโลกรัมต่อ 10,000 ตารางเมตรต่อวัน สามารถดูดซับโลหะหนักจากแหล่งน้ำ ผลิตแอลกอฮอล์ ผลิตไบโอแก๊ส ทำปุ๋ยหมัก เป็นแหล่งอาหารสัตว์และอื่นๆอีกมากมาย (Costa *et al*., 000)

2. ปุ๋ยอินทรีย์

จากการที่ประชากรส่วนใหญ่ในประเทศไทย ประกอบอาชีพเกษตรกรรม มีการใช้ดินเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรอย่างต่อเนื่อง เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ดินมีอัตราการเสื่อมโทรมของอินทรียวัตถุอย่างรวดเร็ว (ยุพิน, 5) รวมถึงมีปัญหาทางสิ่งแวดล้อมอันเนื่องจากการอุปโภค หรือบริโภคของประชากรในพื้นที่นั้นๆ เช่น ปัญหาน้ำเน่าเสีย อากาศเป็นพิษ เป็นต้น

ในสถานการณ์ปัจจุบัน ประเทศไทยประสบกับสภาวะวิกฤตการณ์ทางเศรษฐกิจ การพัฒนาทางภาคเกษตรจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้ประชาชนมีรายได้ทดแทนจากภาคอุตสาหกรรม การพัฒนาการเกษตรมีปัจจัยสำคัญที่ต้องพัฒนาคือ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ดังนั้นการใช้ปุ๋ยจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืช การใช้ปุ๋ยมากเกินไปโดยเฉพาะปุ๋ยเคมี เมื่อใช้ไปนานๆจะทำให้ดินแน่น ขาดคุณสมบัติที่ดีทางกายภาพของดิน มีอัตราสูญเสียธาตุอาหาร โดยเฉพาะไนโตรเจนจะถูกชะล้างไปง่ายกว่าปุ๋ยอินทรีย์ และเมื่อใช้มากเกินความจำเป็น จะมีผลให้พืชมีความเจริญเติบโตทางใบมากเกินไป ปริมาณผลผลิตตกต่ำ ให้คุณภาพไม่ดีและผลตกค้างของปุ๋ยจะก่อปัญหาทางดิน (สมภพ, 5 9) การนำเทคโนโลยีเกี่ยวกับปุ๋ยชนิดอื่นเช่น ปุ๋ยอินทรีย์ จะเป็นทิศทางหนึ่งที่ทำให้การเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินเป็นไปอย่างยั่งยืน

ปุ๋ย คือ สารที่ใส่ลงไปในดินเพื่อวัตถุประสงค์ให้ปลดปล่อยธาตุอาหารพืช ที่พืชยังขาดอยู่ให้ได้รับอย่างเพียงพอ พืชสามารถเจริญงอกงามและให้ผลผลิตสูงขึ้น แหล่งที่มาของปุ๋ยมี แหล่งคือ แหล่งที่เป็นอินทรียสาร ได้แก่ มูลสัตว์ต่างๆที่เรียกว่าปุ๋ยคอก การกองสุมเศษพืชเศษขยะแล้วหมักให้สลายตัวจนหมดเรียกว่า ปุ๋ยหมัก และการปลูกพืชบำรุงดินพวกพืชตระกูลถั่วแล้วไถกลบ เรียกว่า ปุ๋ยพืชสด ปุ๋ยเหล่านี้ รวมเรียกว่า ปุ๋ยอินทรีย์ แหล่งที่เป็นอนินทรียสาร ได้แก่ สารที่สังเคราะห์หรือผลิตจากวัตถุดิบที่เป็นหิน, แร่ และก๊าซ โดยกระบวนการทางอุตสาหกรรมเคมี ให้เป็นสารประกอบทางเคมีที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นปุ๋ย เรียกว่า ปุ๋ยวิทยาศาสตร์หรือปุ๋ยเคมี (สรสิทธิ์และคณะ, 5 0)

ปุ๋ยอินทรีย์ หมายถึง ปุ๋ยธรรมชาติชนิดหนึ่งที่เกิดจากการใช้เศษพืชหรือของเหลือใช้ทางเกษตรหรือจากโรงงานอุตสาหกรรมและวัชพืชต่างๆมารวมกับมูลสัตว์และหรือปุ๋ยเคมี หลังจากการหมักแล้วระยะหนึ่ง เศษพืชเปื่อยยุ่ยมีสีน้ำตาลปนดำกลายเป็นอินทรียวัตถุนำไปใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้ (ธาตรี, 53) การทำปุ๋ยอินทรีย์อาศัยกระบวนการทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์พวกที่ต้องการออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในวัสดุเศษเหลือใช้ ดังปฏิกิริยาเคมี (1) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในด้านความชื้น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ทำการหมักเป็นเวลา 1- เดือน สามารถนำไปใช้เป็นสารปรับปรุงคุณภาพดินได้ ส่วนการหมักแบบไร้อากาศ ดังปฏิกิริยาเคมี ( ) ซึ่งใช้แบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนและใช้ระยะเวลาย่อยสลาย -1 เดือน (นภารัตน์, 5)

complex organics + O_2 ⟶ CO_2 + H_2O + NO_3^- + SO_4^{2-} + less complex organic + heat

aerobic bacteria (1 - เดือน) .....(1)

organics (C, H, O, N, S) ⟶ CH_3COOH + CO_2 + H_2S + NH_3 + CH_4

anaerobic bacteria (- 1 เดือน) .....( )

เมื่อมีการหมักปุ๋ยไประยะเวลาหนึ่ง กองปุ๋ยหมักจะมีการเปลี่ยนแปลง เช่น ชิ้นส่วนของวัสดุจะถูกย่อยสลาย มีขนาดเล็กลงและเปื่อยยุ่ย กองปุ๋ยหมักจะยุบตัวลง สีของปุ๋ยหมักจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ (วิไลลักษณ์, 53)

3. ความสำคัญและประโยชน์ของปุ๋ยหมัก (ธงชัย, 5 6)

ประโยชน์ของปุ๋ยหมักอาจแบ่งออกได้เป็น 3 ลักษณะใหญ่ๆ คือ

3.1 การปรับปรุงคุณสมบัติต่าง ๆของดิน

ปุ๋ยหมักช่วยในการปรับปรุงสภาพของดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ถ้าเป็นดินเนื้อละเอียด อัดตัวกันแน่น เช่น ดินเหนียว ปุ๋ยหมักก็จะช่วยให้ดินมีสภาพร่วนซุยมากขึ้น ไม่อัดตัวกันแน่นทึบ ทำให้ระบายน้ำและอากาศดีขึ้น จึงเป็นประโยชน์ต่อพืชได้มากขึ้น

3.2 การปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน

ปุ๋ยหมักเป็นแหล่งแร่ธาตุอาหารที่จะปลดปล่อยออกมาให้แก่ต้นพืชอย่างช้าๆ และสม่ำเสมอ โดยทั่วไปแล้วปุ๋ยหมักจะมีแร่ธาตุอาหารพืชที่สำคัญครบถ้วน กล่าวคือมีไนโตรเจนทั้งหมดประมาณ 0. ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชประมาณ 0. – 5 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมในรูปสารละลายน้ำได้ 0.5 ถึง 1.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแร่ธาตุจะมีมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของเศษพืชที่นำมาหมักและวัสดุอื่นๆที่ใส่ลงไปในกองปุ๋ย

นอกจากธาตุอาหาร 3 ธาตุที่กล่าวมาแล้ว ปุ๋ยหมักยังมีธาตุอาหารพืชชนิดอื่นๆ อีก เช่น แคลเซียม กำมะถัน แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี แมงกานีส ทองแดง โบรอน โมลิบดีนัม คลอรีน และธาตุอื่นๆ ซึ่งปกติแล้วปุ๋ยเคมีจะไม่มีหรือมีเพียงบางธาตุเท่านั้น ธาตุเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่ต้องการในปริมาณน้อยกว่าธาตุอาหารหลักเท่านั้น

นอกจากจะเพิ่มปริมาณธาตุอาหารพืชแล้ว ปุ๋ยหมักยังมีคุณค่าในแง่การปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดินอีกหลายประการ เช่น ช่วยทำให้แร่ธาตุอาหารพืชในดินแปรสภาพไปอยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซึมได้ง่าย ช่วยดูดซับธาตุอาหารพืชเอาไว้ไม่ให้ถูกฝนชะล้างสูญหายไปได้ง่าย เป็นการช่วยถนอมแร่ธาตุอาหารหรือความอุดมสมบูรณ์ของดินไว้อีกทางหนึ่ง

แม้ปุ๋ยหมักจะมีปริมาณแร่ธาตุอาหารในปุ๋ยไม่มากเท่าเหมือนกับปุ๋ยเคมี แต่ก็มีลักษณะดีอื่นๆที่ช่วยรักษาและปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดินได้เป็นอย่างดี

3.3 การปรับปรุงสภาพแวดล้อม

ประโยชน์ของปุ๋ยหมักด้านการปรับปรุงสภาพแวดล้อมสรุปได้ดังนี้

3.3.1 เป็นการกำจัดขยะมูลฝอยทั่วไป ทำให้บริเวณที่อยู่อาศัยถูกสุขอนามัย

3.3.□ ช่วยลดอุบัติเหตุซึ่งเกิดขึ้นจากการเผาทำลายเศษพืช เช่น ตอซังข้าว เศษหญ้า ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ถูกต้อง ทำให้เกิดอุบัติเหตุ การจราจรติดขัด ก่อให้เกิดความเสียหาย และยังทำให้อากาศเป็นพิษรวมทั้งทำลายสิ่งแวดล้อมด้วย

3.3.3 ลดปัญหาทางด้านกลิ่นจากของเหลือใช้จากโรงงานแปรรูปผลิตผลทางการเกษตร ของเหลือต่างๆ หากปล่อยทิ้งไว้นานๆ จะเกิดกลิ่นอันไม่พึงประสงค์ เมื่อได้นำมาทำปุ๋ยหมักแล้ว จะเป็นการนำกลับมาใช้ประโยชน์อีก และยังเป็นการลดกลิ่นได้ด้วย

3.3.□เป็นการกำจัดวัชพืชน้ำต่างๆ ทำให้สัตว์น้ำได้รับออกซิเจน และแสงแดดเต็มที่ เกิดสภาพสมดุลในการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ

3.3.5 ช่วยให้การสัญจรทางน้ำสะดวกขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกำจัดผักตบชวา ซึ่งมักมีมากเกินความต้องการตามแม่น้ำ ห้วย หนอง คลอง บึง และแหล่งน้ำทั่วไป

4. ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายในกองปุ๋ยหมัก (ธงชัย, □5□6)

การแปรสภาพของเศษพืชไปเป็นปุ๋ยหมักจะเร็วหรือช้า ขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ภายในกองปุ๋ย ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญๆดังนี้

4.1 ชนิดและขนาดของวัสดุที่ใช้หมัก

วัสดุที่สามารถนำมาทำปุ๋ยหมักมีหลายชนิด บางชนิดย่อยสลายได้ง่าย รวดเร็ว บางชนิดย่อยสลายได้ช้า ขึ้นอยู่กับเนื้อของวัสดุเหล่านั้นว่ามีส่วนที่จุลินทรีย์ใช้เป็นอาหารได้ยากหรือง่าย และมีแร่ธาตุอยู่เพียงพอกับความต้องการของจุลินทรีย์หรือไม่ ดังนั้นจึงอาจแบ่งวัสดุเหล่านี้ออกเป็น □ พวก คือ เศษพืชสลายตัวง่าย เช่น ผักตบชวา ต้นกล้วย ใบตอง ฯลฯ และเศษพืชสลายตัวได้ยาก เช่น ฟางข้าว กากอ้อย ขี้เลื่อย ขุยมะพร้าว ฯลฯ (สมศักดิ์, □5□1) โดยปกติแล้ว เศษพืชที่ย่อยสลายยากจะมีแร่ธาตุอาหารบางชนิดอยู่น้อย ไม่เพียงพอกับความต้องการของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนโตรเจน ดังนั้นถ้าต้องการให้เศษพืชนี้สลายตัวได้รวดเร็วขึ้น ต้องเพิ่มธาตุไนโตรเจนลงไปในรูปปุ๋ยเคมี หรือมูลสัตว์ต่างๆแทน หรือกองรวมกับพวกเศษพืชที่สลายได้ง่าย เช่น ผักตบชวาหรือเศษหญ้าสด โดยกองสลับชั้นระหว่างวัสดุที่สลายตัวได้ยากให้หนาประมาณ 8 นิ้ว แล้วกองทับด้วยเศษพืชสลายตัวง่ายหนาประมาณ □ถึง 5 นิ้ว เช่นนี้สลับกับไปเรื่อยๆจนได้ขนาดของกองปุ๋ยตามต้องการ (ธงชัย, □5□6)

นอกจากชนิดของเศษพืชแล้ว ขนาดของเศษวัสดุก็เป็นเรื่องที่ควรให้ความสำคัญ ถ้าเศษพืชที่นำมาหมักมีขนาดใหญ่เกินไป ภายในกองจะมีช่องว่างอยู่มาก กองปุ๋ยจะแห้งได้ง่าย ความร้อนที่เกิดขึ้นในกองปุ๋ยกระจายหายไปอย่างรวดเร็ว ทำให้กองปุ๋ยไม่ร้อนเท่าที่ควร การย่อยสลายเศษพืชจะช้า ดังนั้นควรสับหรือหั่นให้มีขนาดเล็กประมาณ □– 3 นิ้ว จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตในชิ้นส่วนของพืชได้ทั่วถึง เมื่อเศษพืชอยู่ใกล้ชิดกันมากขึ้น การเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์เป็นไปอย่างรวดเร็ว และกองปุ๋ยจะมีความร้อนดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม ในการทำปุ๋ยหมักในปริมาณมาก การหั่นเศษวัสดุที่จะใช้ทำปุ๋ยหมักอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากเป็นการสิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่ายมาก อาจเปลี่ยนไปใช้วิธีการอื่นได้ตามความเหมาะสม เช่น ถ้ามีรถแทรกเตอร์ โรยชิ้นส่วนพืชลงบนพื้นแข็ง แล้วใช้รถบดทับไปมา หรือใช้วิธีหาเศษพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น เศษหญ้า ผสมคลุกเคล้าเข้าไปในกองเพื่อลดช่องว่างที่มีอยู่ แต่ถ้ามีเศษหญ้าไม่พอ อาจใช้ดินหรือเศษหญ้าคลุมกองหรือเลี่ยงไปใช้วิธีกองปุ๋ยหมักในหลุมหรือบ่อหมักแทน (ธงชัย, □5□6)

4.2 มูลสัตว์

ในการทำปุ๋ยหมักนั้น หากใส่มูลสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น มูลสัตว์ มูลสุกร มูลเป็ด มูลไก่ ผสมคลุกเคล้าลงไป กองปุ๋ยหมักจะมีความร้อนที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เกิดการย่อยสลายได้ดีกว่าการใช้เศษพืชอย่างเดียว ทั้งนี้เพราะมูลสัตว์มีสารประกอบต่างๆที่เป็นอาหารของจุลินทรีย์อยู่มากมายหลายชนิด จึงเป็นการเร่งให้จุลินทรีย์ย่อยเศษพืชได้อย่างรวดเร็ว และมูลสัตว์มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่มีความสามารถในการย่อยเศษพืชได้ดี จึงเหมือนเป็นการใส่เชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากลงไปในกองปุ๋ย จุลินทรีย์เหล่านี้จะมีส่วนช่วยกับจุลินทรีย์ที่ติดมากับเศษพืช ช่วยย่อยและแปรสภาพเศษพืชให้กลายเป็นปุ๋ยหมักได้เร็วขึ้น

ปริมาณของมูลสัตว์ที่ต้องการใช้ในการทำปุ๋ยหมักนั้นไม่คงที่ตายตัว ถ้ามีมากก็ใส่ได้ตามที่ต้องการ เพราะยิ่งใส่มากก็จะยิ่งทำให้เศษพืชแปรสภาพได้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามไม่ควรใส่น้อยกว่า 1 ส่วนต่อเศษพืชหรือวัสดุทางการเกษตร 10 ส่วน ถ้ามีมูลสัตว์น้อยเกินไป และเศษพืชที่ใช้เป็นพวกที่สลายตัวได้ยาก ควรหาวัสดุอื่นๆที่มีธาตุไนโตรเจนมากๆ เช่น ปุ๋ยเคมีมาเสริมแทนได้

4.3 ปุ๋ยเคมี

เศษพืชประเภทที่สลายตัวได้ยากจะมีแร่ธาตุอาหารอยู่น้อย ไม่เพียงพอกับความต้องการของจุลินทรีย์ แร่ธาตุตัวสำคัญที่ปกติมักจะขาดแคลนมากที่สุดในเศษพืชพวกนี้ ได้แก่ ธาตุไนโตรเจน ดังนั้นจึงเน้นเฉพาะการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนเป็นหลัก ปกติเศษพืชจะมีแร่ธาตุอยู่แล้ว แต่อาจจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืชแต่การใส่แร่ธาตุเหล่านั้นเพิ่มเติมลงไปมักไม่ทำให้เศษพืชสลายตัวได้รวดเร็วขึ้นเท่าใดนัก

ปริมาณของปุ๋ยไนโตรเจนที่ต้องใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของเศษพืชที่นำมาหมัก ถ้าเป็นพวกที่ย่อยสลายได้ง่ายก็ไม่จำเป็นต้องใส่ปุ๋ยเคมีลงไปอีกหรืออาจใส่ในปริมาณเล็กน้อยเพื่อเสริมหรือกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เท่านั้น ถ้าเป็นเศษพืชพวกที่ย่อยสลายได้ยากควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนด้วย จากตารางที่ □ เศษพืชชนิดที่มีไนโตรเจนน้อยกว่า 1.5 เปอร์เซ็นต์ควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มเติม

4.4 การระบายอากาศของกองปุ๋ย

ในการทำกองปุ๋ยหมักนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องคำนึงถึงสภาพการระบายอากาศภายในกองปุ๋ย เพราะถ้าไม่มีการระบายอากาศให้จุลินทรีย์ได้ใช้ออกซิเจนแล้ว การย่อยสลายของกองปุ๋ยหมักจะเปลี่ยนไปเป็นการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้การสลายตัวเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และมักเกิดกลิ่นเหม็นอันเนื่องมาจากการย่อยสลายจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน ความร้อนภายในกองปุ๋ยที่จะช่วยกำจัดสิ่งไม่พึงประสงค์ในกองปุ๋ยก็ไม่เกิดขึ้นลักษณะเช่นนี้ พบได้เสมอกับกองปุ๋ยที่แน่นทึบหรือรดน้ำจนเปียกแฉะ ถ้าหากหมักเศษพืชในสภาพนี้ จะใช้เวลานาน ถ้าต้องการให้เศษพืชสลายตัวได้รวดเร็ว ไม่มีกลิ่นเหม็น และเกิดความร้อนในกองปุ๋ยสูงพอที่จะกำจัดเชื้อโรค จำเป็นต้องปฏิบัติดูแลให้การระบายอากาศภายในกองปุ๋ยดีอยู่เสมอ (สมศักดิ์, □5□1)

นอกจากนี้ยังต้องควบคุมปัจจัยอื่นๆภายนอกที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายในกองปุ๋ยหมัก (ธงชัย, □5□6) ได้แก่

ตารางที่ 2 ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนที่มีอยู่ในวัสดุชนิดต่าง ๆ

ชนิดของวัสดุ	ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)
ตะกอนน้ำเสีย	□.0 – 6.0
มูลเป็ด – ไก่	3.5 – 5.0
มูลสุกร	3.0
มูลม้า	□.0
มูลโค – กระบือ	1.□ – □.0
ต้นถั่วต่าง ๆ	□.0 – 3.0
ผักตบชวา	□.□ – □.5
เปลือกถั่วลิสง	1.6 – 1.8
ต้นฝ้าย	1.0 – 1.5
ต้นข้าวฟ่าง	1.0
ต้นข้าวโพด	0.7 – 1.0
ใบไม้แห้ง	0.□ – 1.5
ฟางข้าว	0.□ – 0.6
หญ้าแห้ง	0.3 – □.0
กาบมะพร้าว	0.5
แกลบ	0.3 – 0.5
กากอ้อย	0.3 – 0.□
ขี้เลื่อยเก่า	0.□
ขี้เลื่อยใหม่	0.1
เศษกระดาษ	น้อยมาก

ที่มา : สมศักดิ์, □5□1; ธงชัย และ อรรถศิษฐ์, □5□1

4.5 ขนาดของกองปุ๋ยหมัก

ไม่ควรตั้งกองปุ๋ยให้สูงเกินไป ถ้ากองปุ๋ยสูงมาก ส่วนล่างของกองปุ๋ยจะถูกน้ำหมักจากส่วนบนของกองปุ๋ยมากดทับ ทำให้กองปุ๋ยชั้นล่างถูกอัดตัวกันแน่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเศษพืชสลายตัวไประยะหนึ่งแล้วจะมีเนื้อละเอียดขึ้น กองปุ๋ยจะยุบตัวลง เนื้อปุ๋ยด้านล่างของกองถูกกดจนแน่นทึบจนไม่สามารถระบายอากาศได้ ความสูงของกองปุ๋ยที่พอเหมาะอยู่ที่ 1.5 – 1.8 เมตร ความกว้างของกองปุ๋ยไม่ควรมากจนเกินไปเพราะมีผลต่อการระบายของอากาศด้านข้างของกองปุ๋ยเช่นกัน ถ้ากว้างมากเกินไปการกลับกองปุ๋ยอาจทำได้ไม่สะดวก ปกติควรกว้างประมาณ □– 3 เมตร ในทางตรงกันข้าม กองปุ๋ยไม่ควรจะเตี้ยหรือแคบเกินไป เพราะจะทำให้ความร้อนที่เกิดขึ้นไม่สะสมและมีการกระจายความร้อนออกไปได้ง่าย กองปุ๋ยจะไม่ร้อนเท่าที่ควร และแห้งได้ง่าย ถ้ากองปุ๋ยแห้งการสลายตัวจะหยุดชะงักลง ขนาดของกองปุ๋ยไม่ควรเล็กกว่า 1 ลูกบาศก์เมตร คือ ด้านกว้าง ยาว สูง ด้านละไม่ต่ำกว่า 1 เมตร

4.6 การรดน้ำกองปุ๋ย

ควรมีการรดน้ำกองปุ๋ยหมัก อย่างสม่ำเสมอจนกองปุ๋ยมีความชื้นมากพอที่จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ และไม่รดน้ำจนแฉะมากเกินไปจนกระทั่งการระบายอากาศของกองปุ๋ยไม่ดี ถ้าเศษพืชนั้นแห้งและมีขนาดใหญ่ เช่น ซังข้าวโพด ต้นข้าวโพด เศษวัชพืชแห้ง จะไม่ค่อยมีปัญหาเรื่องการระบายอากาศในกองปุ๋ยเนื่องจากมีช่องว่างระหว่างเศษวัสดุในกองปุ๋ย แต่มีปัญหาเรื่องเศษพืชไม่ค่อยเปียกน้ำ ต้องการรดน้ำเพิ่มมากขึ้น เศษวัสดุทางการเกษตรในกองปุ๋ยจึงจะมีความชื้นเพียงพอ แต่ถ้าเศษพืชมีขนาดเล็กดูดซับน้ำได้ดี เช่น ชานอ้อย ขี้เลื่อย ขุยมะพร้าว กากตะกอนน้ำเสีย กากส่าเหล้า ต้องการน้ำเพียงเล็กน้อยแค่ทำให้วัสดุเหล่านั้นเปียกชื้นสม่ำเสมอเท่านั้น อย่าให้แฉะ ขณะรดน้ำ ควรหลีกเลี่ยงการขึ้นเหยียบย่ำบนกองวัสดุ เพราะจะทำให้กองปุ๋ยแน่นทึบเกินไป เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร ในกรณีของเศษพืชที่อวบและฉ่ำน้ำ เช่น ผักตบชวา หลังจากนำขึ้นจากน้ำจะอมน้ำไว้มาก ถ้านำมากองปุ๋ยทันทีจะอัดตัวกันแน่น ควรปล่อยทิ้งไว้ให้เหี่ยวพอสมควร แล้วค่อยนำไปกอง จะช่วยให้กองปุ๋ยมีการระบายอากาศดีขึ้น

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ให้กลายเป็นปุ๋ยนั้นต้องอาศัยน้ำหรือความชื้นในการเจริญเติบโต วัสดุที่นำมากองจึงต้องเปียกชื้น การรดน้ำกองปุ๋ยควรรดน้ำพอแค่ให้เศษพืชในกองเปียกชื้นพอสมควร ส่วนใหญ่แล้วเศษพืชมักไม่ค่อยดูดซับน้ำ จึงอาจรดน้ำให้มากกว่าปกติในวันแรก อีกสองสามวันต่อมาควรดูกองเศษพืชว่าด้านในของกองมีความชื้นเพียงพอหรือไม่ หากยังไม่พอ ต้องรดน้ำเพิ่มเติมจนเปียกชื้นโดยทั่วกัน จากนั้นคอยตรวจตราเป็นระยะๆ ดูแลให้กองปุ๋ยชื้นอยู่เสมอ ความชื้นที่พอดีของกองปุ๋ยอยู่ในช่วงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก วิธีง่ายๆ คือ มือหยิบเอาเศษพืชในกองปุ๋ยออกมา แล้วกำบีบให้แน่น ถ้ามีน้ำไหลซึมออกมาตามซอกนิ้ว แสดงว่ากองปุ๋ยแฉะเกินไป ไม่ควรรดน้ำ แต่ควรทำการกลับกองปุ๋ยบ่อยขึ้น

หรือใช้วัสดุที่แห้งดูดซับน้ำได้ดี เช่น ขี้เลื่อย ขุยมะพร้าว หรือเศษพืชแห้งผสมคลุกเคล้าลงไป ถ้าบีบดูแล้วน้ำซึมออกมาตามซอกนิ้ว แต่ไม่ถึงกับไหลออกเป็นทาง แสดงว่าความชื้นพอดีแล้ว แต่เมื่อบีบแล้วไม่มีน้ำซึมออกมาเลย แสดงว่าเศษพืชนั้นแห้งเกินไป ต้องรดน้ำเพิ่ม

4. การระบายอากาศ

ถ้าหากวัสดุทางการเกษตรมีขนาดค่อนข้างเล็ก เมื่อทำการหมักปุ๋ยไปแล้วระยะหนึ่งกองปุ๋ยจะมีลักษณะค่อนข้างทึบ อาจทำให้การระบายอากาศภายในกองปุ๋ยไม่เพียงพอ วิธีช่วยระบายอากาศในกองปุ๋ยได้อย่างง่ายๆ คือ เมื่อเริ่มตั้งกองปุ๋ยหรือจะตั้งกองปุ๋ยใหม่หลังจากการกลับกอง หาวัสดุที่มีลักษณะเป็นท่อ เช่น ไม้ไผ่ หรือท่อพีวีซี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 - 6 นิ้ว จำนวนพอประมาณมาปักตั้งไว้บนพื้นดินที่จะตั้งกองปุ๋ย โดยเมื่อตั้งกองไปแล้ว ลำไม้ไผ่หรือท่อพีวีซีจะกระจายอยู่ทั่วๆกอง แล้วจึงทำการตั้งกองปุ๋ย

เมื่อตั้งกองปุ๋ยเรียบร้อยแล้ว ดึงลำไม้ไผ่หรือท่อพีวีซีออก กองปุ๋ยก็จะมีช่องระบายอากาศมากขึ้น ก่อนถอนท่อออก ควรโยกไปมารอบๆ จะทำให้ช่องระบายอากาศคงรูปได้ดีขึ้น ไม่ยุบตัว ควรทำช่องระบายอากาศเช่นนี้ทุกครั้งที่มีการกลับกองปุ๋ย

4. การกลับกองปุ๋ย

หลังจากตั้งกองปุ๋ยไประยะหนึ่งแล้ว ควรกลับกองปุ๋ยโดยการคุ้ยกองลงมาทั้งหมด เกลี่ยผสมคลุกเคล้ากัน แล้วนำวัสดุทั้งหมดกลับตั้งเป็นกองใหม่ในรูปทรงเดิม โดยพยายามกลับเอาเศษพืชที่เคยด้านอยู่ด้านนอกของกอง ให้กลับเข้าไปอยู่ด้านในของกอง

การกลับกองปุ๋ยจะทำให้สภาพของกองปุ๋ยมีลักษณะโปร่งขึ้น การระบายอากาศดีขึ้น รวมทั้งเป็นการหมุนเวียนเอาวัสดุด้านนอกของกองที่ยังไม่สลายตัวให้เข้าไปรับความร้อนภายในกอง และช่วยกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ เช่น หนอน ตัวอ่อนของแมลงวันหรือเชื้อก่อโรคที่อาจเกิดขึ้นบริเวณขอบนอกของกอง ขณะเดียวกันก็เป็นการผสมคลุกเคล้าวัสดุให้เข้ากัน มีความชื้นสม่ำเสมอทั้งกอง

การกลับกองปุ๋ยมีความสำคัญมากต่อการแปรสภาพของปุ๋ยหมัก ยิ่งสามารถกลับกองได้บ่อยครั้งจะยิ่งช่วยให้เศษพืชแปรสภาพไปเป็นปุ๋ยหมักได้เร็วขึ้น เช่น การกลับกองทุกๆ 3 – 5 วัน หรือทุกสัปดาห์ จะทำให้เศษพืชสลายตัวได้รวดเร็ว แต่การกลับกองเป็นขั้นตอนที่สิ้นเปลืองแรงงานอย่างมาก ถ้าไม่มีความจำเป็นต้องรีบใช้ปุ๋ยหมัก ก็สามารถลดจำนวนครั้งในการกลับกองปุ๋ยลงได้ตามเวลา หรือแรงงานที่มีอยู่ แต่อย่างน้อยที่สุดก็ควรจะได้มีการกลับกองปุ๋ยประมาณ 3 - □ครั้ง คือกลับกองครั้งแรกประมาณ 10 วัน หลังจากเริ่มตั้งกองปุ๋ย ครั้งที่ □ ประมาณ 15 วันหลังจากกลับกองครั้งแรก จากนั้นก็อาจกลับกองทุกๆ □0 วัน จนสามารถนำไปใช้ได้

การกลับกองปุ๋ยมีความสำคัญต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ เพื่อใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในระบบหายใจทำให้เกิดพลังงาน และจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ออกมาเพื่อทำการย่อยสลายวัสดุเศษเหลือได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นหลังจากตั้งกองไประยะหนึ่งแล้วควรมีการกลับกองปุ๋ยหมักอย่างสม่ำเสมอ (ศักดิ์สิทธิ์, 2531) จากการทดลองของ Suler and Finstein (1977) โดยควบคุมปริมาณออกซิเจนในกองปุ๋ยหมักที่ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 0.0 – 15.0 เปอร์เซ็นต์ของออกซิเจน พบว่าการใช้อากาศที่มีปริมาณออกซิเจน 5.0 เปอร์เซ็นต์ ไหลผ่านกองปุ๋ยหมักทำให้มีอัตราการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 8 – 10 กรัมของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อ 100 กรัมของปุ๋ยหมัก ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมคือ 18.0 – 20.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเพียงพอต่อปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ ทำให้อัตราการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์สูงสุด และพบว่าสภาวะการขาดออกซิเจนทำให้กระบวนการย่อยสลายเกิดได้ช้าและยืดระยะเวลาในการทำปุ๋ยหมักนานขึ้น

4. อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนของวัสดุเศษเหลือที่ใช้หมัก

เป็นค่าที่ใช้เป็นตัวกำหนดระดับการเป็นปุ๋ยหมักที่สมบูรณ์ และใช้บ่งบอกความยากง่ายต่อการย่อยสลาย ซึ่งการผลิตปุ๋ยหมัก ถ้าจุลินทรีย์ขาดไนโตรเจนหรือไนโตรเจนมีไม่เพียงพอ ทำให้อัตราการย่อยสลายช้าลง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าถ้าวัสดุเศษเหลือที่ใช้หมักมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงอัตราการย่อยสลายจะช้า ดังนั้นการเติมไนโตรเจนลงไป ทำให้ลดช่วงกว้างของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายมีค่าประมาณ 30 – 35:1 (ศักดิ์สิทธิ์, 2531; Schulze, 1961)

ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักขึ้นอยู่กับส่วนผสมของวัสดุต่างๆที่ใช้ในการหมัก ปริมาณของ C และ N มีความสำคัญในกระบวนการหมักของปุ๋ยหมัก เพราะคาร์บอนเป็นแหล่งให้พลังงานและไนโตรเจนเป็นตัวช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ อัตราส่วนของ C : N มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการหมัก วัสดุทางการเกษตรที่ใช้ในการหมักที่ดีอัตราส่วนของ C : N อยู่ในช่วง 25 - 35 (Hamoda *et al*., 1998) โดยอัตราส่วนของ C : N ในผักตบชวาเท่ากับ 35 (Stoffella and Kahn, 2000) เหมาะแก่การนำมาใช้ทำปุ๋ยหมัก ค่าอัตราส่วนของ C : N ของปุ๋ยหมักที่เสร็จสมบูรณ์แล้วจะมีค่าโดยประมาณ 15 – 20 (Kayhanian and Tchobanoglous, 1993)

Thambirajah and Kuthubutheen (1989) ผลิตปุ๋ยหมักโดยใช้เส้นปาล์มเป็นวัสดุในการหมัก เติมมูลไก่และยูเรีย ความชื้นภายในกองปุ๋ยหมัก 65 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้น เท่ากับ 33:1 ระยะเวลาในการหมัก 8 สัปดาห์ พบว่าอุณหภูมิสูง 60 – 70 องศาเซลเซียส ใน 3 สัปดาห์แรกของการหมัก และค่อยๆ ลดลงเหลือ 30 – 40 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการหมัก ปริมาณเซลลูโลส คาร์บอน และอัตราส่วนคาร์บอนต่อ

ไนโตรเจนเหลือ 10 มิลลิกรัมต่อกรัม, 3 เปอร์เซ็นต์ และ 17:1 ตามลำดับ ปริมาณไนโตรเจน ลิกนิน และเถ้าเพิ่มขึ้นเป็น .1, 36 และ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.10 อุณหภูมิ

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักจะช้าหรือเร็ว ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและชนิดของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงไป โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในกองปุ๋ยหมักจะอยู่ในช่วง 0 – 70 องศาเซลเซียส ถ้าหากภายในกองปุ๋ยหมักมีอุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียสขึ้นไป จุลินทรีย์บางชนิดอาจตายหรือลดจำนวนลง นอกจากนี้อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาเคมีและควบคุมอัตราเร็วของปฏิกิริยาชีวเคมี ซึ่งสภาพภูมิอากาศในฤดูร้อนมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายเร็ว (ศักดิ์สิทธิ์, 531) Hassen *et al*. (001) กล่าวว่า อุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส มีผลต่อการย่อยสลายของวัสดุจากเศษพืช เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic) และอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) ไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการสูญเสียความชื้นภายในกองปุ๋ยหมักด้วย จึงควรควบคุมอุณหภูมิในกองปุ๋ยหมักให้ต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส

4.11 พีเอช

จุลินทรีย์แต่ละชนิดเจริญได้ดีในพีเอชต่างกัน เช่น แบคทีเรียเจริญได้ดีที่พีเอช 6.0 – 8.0 ส่วนแอคติโนมัยซีตและเชื้อราเจริญได้ดีเมื่อมีสภาพค่อนข้างเป็นกรด (พีเอช 0 - 6.0) ซึ่งพีเอชของกองปุ๋ยหมักควรอยู่ระหว่าง 5.0 – 7.5 (ศักดิ์สิทธิ์, 531)

การเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรดด่างในกองปุ๋ยหมักมีดังนี้ คือ ในระยะเวลาประมาณ 3 วันแรกของการกองปุ๋ยหมัก พีเอช ในกองปุ๋ยหมักจะลดลง โดยจะมีค่าเฉลี่ยของพีเอชอยู่ระหว่าง 5.3 – 5.7 (Mondini *et al*., 1996) ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงแรกจะมีการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุที่ย่อยสลายง่ายจะมีกรดอินทรีย์บางชนิดเกิดขึ้น แต่หลังจากนั้น พีเอชจะค่อยๆสูงขึ้นอย่างช้าๆจนอยู่ในระดับระหว่าง 7 – 8.5 ทั้งนี้เนื่องจากเมื่ออินทรีย์วัตถุถูกย่อยสลายจะมีลักษณะเป็นสารที่ต้านการเปลี่ยนแปลงระดับพีเอชที่ดี และมีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถสามารถดูดซับไฮโดรเจนไอออน (H^+) ไว้ได้มากขึ้น และมีสารประกอบบางชนิดที่มีฤทธิ์เป็นด่าง เช่น แอมโมเนีย เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย ความเป็นด่างอ่อนของปุ๋ยหมักจึงมีผลดีต่อการนำไปใช้ในการปรับปรุงดิน แต่ถ้าในปุ๋ยหมักที่มีระดับพีเอชสูงเกินไป จุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์อาจจะหยุดกิจกรรมและจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เชื้อโรคพืชต่างๆ ทำงานได้ดี (ธันวดี, 57)

5. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับปุ๋ยหมัก

5.1 เชื้อรา (fungi) (พิทยากรและเสียงแจ๋ว, 5 0)

ในกองปุ๋ยหมักจะตรวจพบเชื้อราหลากหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่พบอยู่ในดินและเศษวัสดุจากพืช (Fran land *et al*., 198 ; Carroll and Wic low, 199 ; Dix and Webster, 1995) ชนิดและปริมาณของเชื้อราจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัสดุที่นำมาทำปุ๋ยหมัก (Garret, 1951) ความชื้น (Ayres and Boddy, 1986) และอุณหภูมิของสภาพแวดล้อม (Crisan, 1973; Dix and Webster, 1995; Mouchacca, 1995) การที่อุณหภูมิสูงขึ้นและมีความชื้นสูงเป็นสภาพที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา ดังนั้น จึงมักตรวจพบเชื้อราเจริญอยู่บริเวณผิวนอกของกองปุ๋ยหมัก ซึ่งมีอุณหภูมิและความชื้นต่ำกว่าภายในกองปุ๋ยหมัก ในช่วงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถพบเชื้อราได้ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส จะไม่พบเชื้อราเลย ในระยะแรกซึ่งมีอุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักเริ่มสูงขึ้นมักจะตรวจพบเชื้อราพวก *Geotrichum candidum* และ *Aspergillus fumigatus* และเมื่ออุณหภูมิสูงถึงระดับ 5 ถึง 55 องศาเซลเซียส มักจะตรวจพบพวก *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. และ *Mucor* sp. เมื่ออุณหภูมิสูงกว่านี้ อาจจะพบพวก *Penicillium duponti* อย่างไรก็ตาม ชนิดของเชื้อราดังกล่าวจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและวัสดุที่ใช้

5.2 แบคทีเรีย (bacteria) (พิทยากรและเสียงแจ๋ว, 5 0)

เป็นจุลินทรีย์ที่มีมากที่สุดในกองปุ๋ยหมัก (Balows *et al*., 199) โดยประมาณ 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ของจุลินทรีย์ที่พบในช่วงการย่อยสลายจะเป็นแบคทีเรีย ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในกองปุ๋ยหมักมีค่าประมาณ 3x10^{8} เซลล์ต่อกรัม ปริมาณเชื้อแบคทีเรียอาจไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและวัสดุที่นำมาใช้ทำปุ๋ยหมัก แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายและการเกิดความร้อนในกองปุ๋ยหมัก ในระยะแรกของกองปุ๋ยหมักอุณหภูมิภายในกองจะไม่สูงมากนัก แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่พบได้ทั่วไปในดิน เช่น *Pseudomonas* sp., *Cellulomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Micrococcus* sp. และ *Bacillus* sp. พวก *Bacillus* sp. มีแนวโน้มจะพบในปริมาณมากกว่าพวกอื่นๆ (Strom, 1985) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่ชอบอุณหภูมิสูง ได้แก่ *B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* ซึ่งเจริญได้ดีในช่วง 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส ในบางกรณีอาจถึง 65 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบว่าเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงในระดับนี้ได้แก่ *Thermus* sp. (Beffa *et al*., 1996) มีบทบาทสำคัญในช่วงที่อุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักสูง บางครั้งจะพบว่าสามารถทนต่อความร้อนสูงได้ ได้แก่ *Thermus aquaticus* เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

5.3 แอคติโนมัยซีต (actinomycetes) (พิทยากรและเสียงแจ๋ว, 5 0)

โดยทั่วไปแอคติโนมัยซีตมีอัตราการเจริญช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา เจริญได้ไม่ดีเมื่ออยู่ในสภาพอากาศไม่พอเพียง เนื่องจากจุลินทรีย์พวกนี้ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีต เมื่อเจริญเป็นกลุ่มบนวัสดุที่ใช้ทำปุ๋ยหมักจะเห็น

เป็นจุดสีขาวคล้ายผงปูน เชื้อแอคติโนมัยซีตสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูง 8 – 60 องศาเซลเซียส (Korn – Wendisch and Kutzner, 199) ได้แก่ *Streptomyces thermovulgaris, S. thermoviolaceus, S. macrosporus* และ *S. megasporus* (Goodfellow *et al*., 1987) การเจริญจะลดลงหรือหยุดชะงัก เมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 75 องศาเซลเซียส เชื้อแอคติโนมัยซีตที่มักพบอยู่เสมอในกองปุ๋ยหมัก ได้แก่พวก *Thermoactinomyces* sp. และ *Thermomonospora* sp.

จุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มมีส่วนช่วยในการย่อยสลายเศษพืชให้เร็วขึ้น จุลินทรีย์พวกแบคทีเรียจะย่อยสลายได้เร็วที่สุด แต่ถ้าหากเป็นวัสดุที่ย่อยสลายยาก จุลินทรีย์กลุ่มเชื้อราและแอคติโนมัยซีตย่อยสลายได้ดีกว่า และสามารถเชื่อมทำให้ดินจับตัวเป็นก้อนร่วนซุย สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเศษพืชในกองปุ๋ยหมัก นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีตบางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมาทำลายเชื้อโรคพืช การเกิดอุณหภูมิที่สูงในกองปุ๋ยหมักสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและทำลายไข่แมลงหรือหนอนศัตรูพืชต่าง ๆได้ เป็นต้น (ศักดิ์สิทธิ์, 531)

ในแต่ละระยะของกระบวนการหมักปุ๋ย รูปแบบการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก สามารถทราบได้จากลักษณะของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ดังต่อไปนี้ (ฉวีวรรณ, 531)

1. ในช่วงการหมักปุ๋ยระยะแรก เป็นช่วงเวลาสำหรับที่จุลินทรีย์ปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ โดยเฉพาะกลุ่ม mesophilic bacteria และ fungi มีการสร้างเซลล์ใหม่และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิถึงระดับ mesophile ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยที่อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นในช่วง 15 – 0 องศาเซลเซียส

. หลังจากผ่านช่วงระยะเวลาแรก อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นมาก จุลินทรีย์กลุ่ม thermophilic ของแบคทีเรีย เชื้อราและแอคติโนมัยซีตบางชนิดเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ อยู่ในช่วงระหว่าง 55 – 65 องศาเซลเซียส

3. ระยะที่สาม อุณหภูมิยังคงสูงอยู่ ซึ่งเกิดจากกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการย่อยสลายภายในกองปุ๋ย จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบ ยังคงเป็น thermophilic ของแบคทีเรีย เชื้อราและแอคติโนมัยซีต ระยะนี้เป็นช่วงที่ย่อยสลายสูงสุดจนทำให้เกิดความร้อนสะสมในกองปุ๋ยหมัก ในระยะนี้อินทรีย์วัตถุถูกเปลี่ยนให้มีความคงตัว และมีการทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ

. ระยะสุดท้าย อุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักค่อย ๆ ลดลงอยู่ในระดับ mesophile และลดลงเรื่อย ๆจนอยู่ในระดับอุณหภูมิบรรยากาศทั่วไป จุลินทรีย์กลุ่ม mesophilic ที่รอดจากอุณหภูมิสูงในช่วงของการหมักจะเพิ่มจำนวนขึ้น ช่วงนี้เป็นระยะใกล้เสร็จสิ้นของการย่อยสลายแล้ว

นอกเหนือจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในธรรมชาติที่ติดมากับวัสดุที่ใช้หมักแล้ว ยังมีการเติมหัวเชื้อ พด.1 ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร และอุตสาหกรรมแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรเพื่อผลิตปุ๋ยหมักในเวลารวดเร็วและมีคุณภาพสูงขึ้น ประกอบด้วยเชื้อราและแอคติโนมัยซีตที่ย่อยสลายเซลลูโลสและแบคทีเรียที่ย่อยไขมัน จุดเด่นของสารเร่ง พด.1 คือ มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสที่ย่อยสลายยากและย่อยวัสดุเหลือใช้ได้หลากหลายและคลอบคลุมมากขึ้น สามารถย่อยสลายน้ำมันหรือไขมันในวัสดุหมัก ผลิตปุ๋ยหมักในระยะเวลารวดเร็วและมีคุณภาพ เป็นจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงและสามารถสร้างสปอร์ จึงเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นาน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2550)

ภาวนา และ สมศักดิ์ (2539) ทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักที่ผลิตโดยจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ (อีเอ็ม ไฮเทค พด.1 และมูลสัตว์เคี้ยวเอื้อง) ต่อการเจริญของพืชโดยใช้ปุ๋ยหมักแต่ละชนิดผสมกับดินชุดโคราชแล้วปลูกผักบุ้ง ผักคะน้า และผักกวางตุ้ง ผสมปุ๋ยหมักแต่ละชนิดกับดินโคราช 5 กิโลกรัม ซึ่งใช้อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักแล้วบรรจุในกระถาง ทดลองในเรือนทดลอง วัดการเจริญ (ความสูง) และผลผลิต (น้ำหนักสด) ของผักทั้ง 3 ชนิด หลังจากปล่อยให้เจริญเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าปุ๋ยหมักที่ผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ อีเอ็ม พด.1 และ มูลสัตว์ทำให้ผลผลิตของผักทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้น สำหรับปุ๋ยหมักจากไฮเทค ทำให้ผลผลิตของผักคะน้าและผักกวางตุ้งสูงขึ้น แต่ไม่ทำให้ผลผลิตของผักบุ้งสูงขึ้น

สุพจน์ และ สุนทร (2537) ศึกษาการผลิตปุ๋ยหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เช่น ใบไม้ หญ้าขน วัชพืช ฟางข้าง และมูลสัตว์ในเขตลาดกระบัง พบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับมูลโคและไก่ สามารถผลิตปุ๋ยหมัก (ขนาดกอง 1.0 x 1.0 x 0.5 เมตร) มาใช้ประโยชน์ได้ภายในระยะเวลา 15 วัน มีปริมาณธาตุอาหารพวกไนโตรเจน 1.77-2.16 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 1.81 - 2.63 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) มีค่าต่ำกว่า 20:1 ในทุกกองปุ๋ยหมัก

สมศักดิ์ และคณะ (2539) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้อีเอ็ม (EM, effective microorganism) ไฮเทค (Hi-tech, high technology) พด.1 (กรมพัฒนาที่ดินหมายเลข 1 หรือเรียกว่า LDD.1) และมูลสัตว์เคี้ยงเอื้อง เป็นแหล่งของจุลินทรีย์สำหรับผลิตปุ๋ยหมัก โดยใช้ฟางข้าวในเรือนทดลอง และเติมวัสดุเสริมกิจกรรมของจุลินทรีย์ (เช่น ปุ๋ยเคมี มูลสัตว์ รำ กากน้ำตาล และดินบด) แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ปริมาณเชื้อรา แอคติโนมัยซีตและแบคทีเรีย รวมทั้ง วัดปริมาตรและอัตราส่วนของอินทรีย์คาร์บอนต่ออินทรีย์ไนโตรเจนในกองปุ๋ยหมักทุกๆ 15 วัน พบว่า ปุ๋ยที่ใส่เชื้อ พด.1 เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี และชีวภาพ สูงสุด ถัดมาเป็นมูลสัตว์เคี้ยวเอื้อง ไฮเทค และอีเอ็ม ตามลำดับ

นอกจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายปุ๋ยหมักแล้ว ยังมีจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่อยู่ในปุ๋ยหมักอันเนื่องจากวัสดุที่ใช้ในการทำปุ๋ยหมัก อย่างเช่น มูลสัตว์ต่างๆ วัชพืชในแต่ละชนิด รวมถึงแหล่งน้ำที่ใช้ในการรดปุ๋ยหมักเพื่อรักษาความชื้นที่เหมาะสม เป็นต้น ซึ่งจากตัวอย่างดังกล่าว อาจมีจุลินทรีย์ที่อาจทำให้ก่อโรค โดยเฉพาะในระบบทางเดินอาหาร จึงมีความจำเป็นที่ตรวจสอบคุณภาพของปุ๋ยหมักทางจุลชีววิทยา โดยการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ซึ่งเป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ว่าอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคได้

6. จุลินทรีย์บ่งชี้คุณภาพทางจุลชีววิทยา

6. 1 แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria)

แบคทีเรียโคลิฟอร์ม เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae มีรูปท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกแจลลาที่อยู่รอบเซลล์ สามารถเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบสูตรอาหารไม่ซับซ้อน เติบโตได้ดีในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ หมักย่อยน้ำตาลแลคโตส (lactose) ได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระหว่าง □□ – 8 ชั่วโมง โดยสร้างกรดและแก๊สออกมา โดยปกติแบคทีเรียกลุ่มนี้ จะอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นเรียกว่า แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม (บุษกร, 5 5)

แบคทีเรียโคลิฟอร์มเป็นจุลินทรีย์ดัชนี (index microorganisms) แสดงถึงการปนเปื้อนของอุจจาระเนื่องจาก

1. เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลือดอุ่น
2. เป็นแบคทีเรียที่ถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระในจำนวนที่สม่ำเสมอ
3. ไม่เป็นเชื้อก่ออันตรายแก่ผู้ตรวจวิเคราะห์
4. เป็นเชื้อที่ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าเชื้อโรค
5. ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ไม่ยุ่งยากเหมือนการตรวจหาเชื้อก่อโรค
6. ตัวอย่าง ดิน น้ำและอื่นๆ ที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม แสดงว่าตัวอย่างนั้นไม่สะอาด อาจมีสิ่งโสโครก เช่น อุจจาระปนเปื้อน และอาจมีเชื้อโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร อาจทำให้ไม่ปลอดภัยต่อผู้อุปโภคบริโภค (บุษกร, 5 5)

6.2 แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms) (บุษกร, 5 5)

แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม เป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่อยู่ในอุจจาระ เช่น เชื้อ *E. coli* หากพบเชื้อนี้ในตัวอย่างทดสอบ เป็นการบ่งชี้ให้ทราบว่าตัวอย่างทดสอบนั้นได้รับการปนเปื้อนจากอุจจาระของคน หรือสัตว์เลือดอุ่น สามารถแยกแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์ม ออกจากพวกแบคทีเรียนอนฟีคัลโคลิฟอร์ม (non – fecal coliforms) โดยอาศัยความสามารถในการเติบโตที่อุณหภูมิต่างกัน แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มสามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสและผลิต

แก๊สออกมาได้ที่อุณหภูมิ □□.5 องศาเซลเซียส ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มนอนฟีคัลโคลิฟอร์มไม่เติบโตที่อุณหภูมิดังกล่าว

6.3 *Escherichia coli* (บุษกร, □5□5)

จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์บ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระ การพบเชื้อนี้แสดงให้ทราบว่าตัวอย่างไม่สะอาด *E. coli* เป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น เซลล์มีความกว้าง 0.6 ไมโครเมตร และความยาว □– 3 ไมโครเมตร ไม่มีสปอร์และมักจะไม่มีแคปซูล เป็นพวกแกรมลบ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ สามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ จากการทดสอบทางชีวเคมีพบว่า *E. coli* สามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคส มอลโตส แมนนิทอล แลคโตส ไรโบส กลีเซอรอล แรมโนส อะราบิโนส ให้กรดและแก๊ส แต่ไม่ย่อยสลายเดกซ์ทริน อินโอซิทอล และแป้ง (starch)

□.เอนไซม์จากจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ตลอดจนสิ่งแวดล้อมที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น น้ำทิ้งจากโรงงาน ของเสียปฏิกูลต่างๆจากการปศุสัตว์ พบว่าแบคทีเรียบางชนิดผลิตเอนไซม์ เช่น โปรติเนส ไลเปส อะไมเลส เป็นต้น เอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมานี้อาจอยู่เฉพาะภายในเซลล์ หรือถูกขับออกมานอกเซลล์ กรณีที่เอนไซม์ถูกขับออกมานอกเซลล์ จะเป็นประโยชน์ต่อเซลล์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะแวดล้อมที่อาศัยอยู่ แล้วดูดซึมไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนหรือพลังงานของเซลล์ต่อไป (สมพร, □5□8)

การย่อยสลายปุ๋ยหมักโดยจุลินทรีย์ เมื่อมีการกองปุ๋ยหมักที่เหมาะสม จะเป็นการลดระยะเวลาการย่อยสลายเศษพืชให้สั้นลง ทำให้ได้ปุ๋ยหมักเร็วขึ้น เชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายเศษพืชประกอบด้วยจุลินทรีย์ 3 กลุ่มคือ แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซีต จุลินทรีย์เหล่านี้จะขับเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเศษพืชได้สารต่างๆมากมาย (พิทยากรและเสียงแจ๋ว, □5□0) ในผักตบชวามีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำให้แห้งพบว่ามีเซลลูโลสประมาณ 31 เปอร์เซ็นต์ (Bolenz *et al.* 1990) และเฮมิเซลลูโลส 33 - 55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าค่อนข้างมาก การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูเลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดีเพื่อให้เกิดการย่อยสลายที่ดียิ่งขึ้น จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมักปุ๋ย (Nigan, □00□)

1 เอนไซม์เซลลูเลส (Enari, 1983)

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีน เท่ากับ 1 : 1 ละลายน้ำได้ ไม่ต้องการโคแฟคเตอร์หรือโลหะอื่นในการเข้าทำปฏิกิริยา เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ส่วน ได้แก่

endoglucanase ทำหน้าที่ย่อย beta-1, glucosidic linkage แบบสุ่มได้กลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเซลโลไบโอส แต่ย่อยเซลโลเดกซ์ตริน เซลลูโลสที่พองตัวด้วยกรดฟอสฟอริก คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose, CMC) และไฮดรอกซีเอทธิลเซลลูโลส (Hydroxymethyl cellulose, HEC) และสามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึก (crystalline cellulose) ได้ด้วย ความจำเพาะของเอนไซม์ไม่สูงมากนัก วิเคราะห์เอนไซม์ได้โดยใช้ CMC และ HEC เป็นสับสเตรท

cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non – reducing end ของเส้นสายได้เซลโลไบโอส มีความจำเพาะสูงกว่า endoglucanase ย่อยเซลโลเดกซ์ตรินแต่ไม่ย่อยเซลโลไบโอส การวิเคราะห์เอนไซม์นี้ใช้สำลี และ amorphous cellulose เป็นสับสเตรท

beta – glucosidase ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอสและเซลโล–โอลิโกแซคคาไรด์ (cello - oligosaccharide) ได้กลูโคสแต่ไม่ย่อยเซลลูโลส หรือ เซลโลเดกซ์ตริน วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้เซลโลไบโอส p – nitrophenyl – beta – D – glucoside หรือซาลิซิน (salicin) เป็นสับสเตรท

2 เอนไซม์ไซลาเนส

เป็นเอนไซม์ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขาและประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสให้สมบูรณ์มีอยู่หลายชนิดด้วยกัน จากองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสที่ส่วนใหญ่เป็นพวก ดี-ไซแลน เอนไซม์หลักที่สำคัญต่อการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส แบ่งออกได้เป็น กลุ่มใหญ่ (Rogalski *et al*., 1985)

endo – 1, 4 – beta – D – xylanase ทำการย่อยสลายพันธะ 1, – glucosidic ของ beta – D – xylopyranoside ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไซแลน และให้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปของไซโล – โอลิโกแซคคาไรด์และไซโลไบโอส วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท

exo – 1, 4 – beta – D – xylanase ย่อยสลายไซโล – โอลิโกแซคคาไรด์ และไซโลไบโอส ออกมาได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส การทดสอบเอนไซม์นี้ใช้ p – nitrophenyl - beta – D – xyloside เป็นสับสเตรท

เอนไซม์ที่พบในธรรมชาติส่วนมากผลิตโดยจุลินทรีย์พวกที่ก่อให้เกิดโรคพืช พวกที่ย่อยสลายซากพืชที่ตายแล้วให้ผุพังหรือมีอยู่ภายในเซลล์ของพืช สำหรับพืชที่ยังมีชีวิตอยู่จะผลิตสารบางอย่างที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ เช่น tannin หรือ phenolic compound ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถที่จะทำงานได้ นอกจากนี้พืชยังมีผนังเซลล์ที่แข็งแรงทำให้ยากต่อการเข้าทำลายโดยจุลินทรีย์ แต่หลังจากพืชตายแล้วหรือในพืชที่ไม่สมบูรณ์ เช่น ผนังเซลล์มีบาดแผล เอนไซม์เหล่านี้จะทำงานโดยย่อยสลายเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ให้เป็นน้ำตาล กรดน้ำตาล หรือโมเลกุลอื่นๆ ขนาดเล็กซึ่งจะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานโดยจุลินทรีย์ต่างๆต่อไป (กนก, 2539 อ้างโดย อรลัดา, 2537)

เยาวลักษณ์ (2533) ศึกษาจุลินทรีย์ในการหมักปุ๋ยจากขยะชุมชนโดยศึกษาจำนวน mesophile กับ thermophile และกิจกรรมเอนไซม์ 3 ชนิด คือ protease, amylase และ cellulase พบว่าจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายปุ๋ยจากขยะชุมชนมี 3 กลุ่ม คือ mesophile, thermotolerance mesophile และ thermophile เอนไซม์ amylase พบมากในช่วง active stage เอนไซม์ protease พบในช่วงท้าย active stage ส่วนเอนไซม์ cellulase มีผลต่อการย่อยสลายในช่วง curing stage

Chino *et al*. (1963) พบว่า เซลลูโลสถูกย่อยสลายด้วย mesophilic fungi และ aerobic bacteria มากกว่า thermophilic actinomycete ในระยะเร่งของการหมักปุ๋ยหมักจาก sewage sludge จะให้ CO_2 และ NH_3 พบว่าการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดความร้อนสูงในกองปุ๋ยหมัก

Sneh *et al*. (2005) ศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากปุ๋ยหมักชนิดต่างๆ (กากอ้อยผสมกับมูลสัตว์เคี้ยวเอื้อง, เศษหญ้า, มูลสัตว์ปีกและผักตบชวา) เป็นเวลา 90 วัน พบว่า ผักตบชวาผลิตกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสมากที่สุดในวันที่ 30 และ 60 ตามลำดับ (17 และ 17 mg sugar g/dry matter/h)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพที่เปลี่ยนแปลงในกระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวา
2. ศึกษาจำนวนของแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซีตในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมักผักตบชวา
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในกระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวา
4. เพื่อคัดเลือกและบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสสูง
5. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของเชื้อที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุที่ใช้ในการทำปุ๋ยหมัก

วัตถุดิบสำหรับทำปุ๋ยหมัก

ผักตบชวา จากคลองชลประทาน ในโครงการพระราชดำริลุ่มน้ำปากพนัง อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช มูลสัตว์และขุยมะพร้าว จากแหล่งพื้นที่ใน อ.ปากพนังและพื้นที่ใกล้เคียง

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

ผักตบชวา
ฟางข้าว
ขุยมะพร้าว
ซังข้าวโพด

2.2 อุปกรณ์

อุปกรณ์สำหรับทำปุ๋ยหมัก

จอบสำหรับการผสมวัสดุและกลับกองปุ๋ย
บัวรดน้ำและถังน้ำ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปุ๋ยหมักทางกายภาพและชีวภาพ

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) Tuledo ของ Metter tocedo
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance with 4 digitals sartorius analytic ของ Sciencetific promotion Co., Ltd.
เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Balance with 3 digitals) Pl-83-SmittlerToledo
เครื่องเขย่า (Orbital incubator) ของ Gallenkamp
เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) ของ MMM medicine
ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร
โถดูดความชื้น (Desiccator)
จานเพาะเชื้อ (Petri-dish)
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) Heraeus type 6000 kelvitron ของ Heraeus Instruments
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet) Micro flow advance bio safety cabinet ของ Science Co., Ltd.
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) ES-315 TOMY ของ Tomy Seiko. Co., Ltd.
เครื่องนับเชื้อ (Colony counter) ของ Suntex
เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer) ของ Sciencetific Industries
เครื่อง Hot plate & Stirrer ของ HL instrument
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) Co11 ของ Olympus
Auto-pipette ขนาด 100-1,000 µl พร้อม tips ของ Eppendrof
เครื่องวัดดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) SP 300 ของ Optima
เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) Sorvall RC5C plus ของ Kendo
หลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
เทอร์โมมิเตอร์
เครื่องมือวัดระยะอย่างละเอียด (Vernier)
สไลด์และกระจกปิด
กระดาษฟอยล์
ห่วงเขี่ยเชื้อ
ไม้จิ้มฟัน

สารเคมี

Manganese chloride (Univar)
Manganese sulfate (Univar)
Potassium acetate (Baker)
Potassium chloride (Univar)
Potassium iodide (Univar)
Potassium di – hydrogen phosphate (Anala R)
Di Potassium hydrogen phosphate (Fluka)
Sodium carbonate (Anala R)
Sodium chloride (Univar)
Sodium dihydrogen phosphate (Merck)
Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Carlo ERBA)

Sodium hydroxide (Univar)

Indole

Alpha – napthol solution

Methyl red solution

Kovac's reagent

แอลกอฮอล์ 70 & 95 % (LD science)

0.1 % Congo red (Merck)

Iodine (Mark)

Acetate buffer 0.1 M pH 5.0

Phosphate-buffered 0.1 M pH 7.0

Glucose (Univar)

Xylose (Himedia)

Carboxymethyl cellulose, CMC (Sigma)

Xylan (Fluka)

Somogyi – Nelson's reagent

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptic soy agar, TSA (Difco)

Rose bengal medium (Himedia)

Actinomycete isolation agar (Difco)

Lauryl tryptose broth, LST (Difco)

EC medium (Difco)

Brilliant green lactose broth, BGLB (Difco)

Bacto peptone (Difco)

Nutrient agar, NA (Difco)

Nutrient broth, NB (Difco)

MR-VP (Difco)

Peptone (Difco)

Simmons citrate agar (Difco)

Yeast extract (Oxoid)

Tryptone broth (Difco)

Eosin – methylene blue agar, EMB medium (Difco)

Plate count agar, PCA medium (Difco)

ยาปฏิชีวนะ

Cycloheximide (Sigma)

Gentamicin (Nida pharma)

วิธีการทดลอง

1. การทำปุ๋ยหมักผักตบชวา

1.1 ขั้นตอนการทำปุ๋ยหมัก

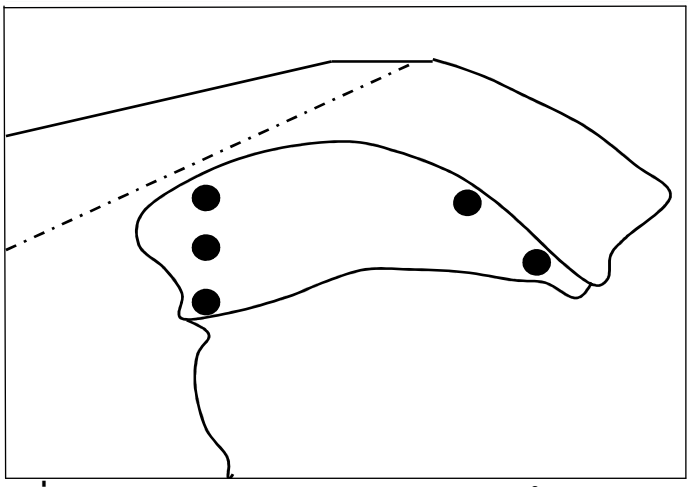
นำผักตบชวาจากคลองชลประทาน บริเวณโครงการพระราชดำริฯ อำเภอปากพนัง จังหวัด นครศรีธรรมราช มาตากกลางแจ้งประมาณ 1-2 สัปดาห์ (ขึ้นอยู่กับสภาวะภูมิอากาศและความชื้นของผักตบชวา) นำมากองในโรงเรือน ให้มีความสูงประมาณ 50 – 70 เซนติเมตร กว้างและยาวประมาณ 2 เมตร นำมูลวัวมาหว่านทับ 75 กิโลกรัม ตามด้วยขุยมะพร้าว 30 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน หมักกองปุ๋ยหมักทิ้งไว้ประมาณ 3 เดือน

1.2 การดูแลกองปุ๋ยหมัก

กลับกองปุ๋ยหมักอย่างสม่ำเสมอทุกๆ 2 สัปดาห์ เพื่อเป็นการระบายอากาศและช่วยให้วัสดุคลุกเคล้าเข้ากัน การรดน้ำกองปุ๋ยหมักควรทำสม่ำเสมอ เพื่อให้ความชื้นภายในกองปุ๋ยหมักอยู่ในระดับที่เหมาะสม คือ ประมาณ 50 – 70 เปอร์เซ็นต์ ในทางปฏิบัติควบคุมไม่ให้แห้งหรือแฉะจนเกินไป การตรวจสอบอย่างง่ายคือการสอดมือเข้าไปในกองปุ๋ยหมักให้ลึกแล้วหยิบปุ๋ยมาบีบดู ถ้าความชื้นน้อยเกินไปต้องรดน้ำเพิ่ม

1.3 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างปุ๋ยหมัก 2 จุด โดยในแต่ละจุดขุดจากกึ่งกลางของกองปุ๋ยหมัก แล้วเก็บบริเวณชั้นบน ชั้นกลางและชั้นล่าง พร้อมทั้งเก็บบริเวณผิวด้านข้างของปุ๋ยหมักทั้งชั้นกลางและชั้นล่าง (รูปที่ 1) รวมทั้งหมดประมาณ 100 กรัม เมื่อเก็บตัวอย่างแล้วนำมาผสมกันบรรจุลงในถุงพลาสติก มัดปากถุงให้แน่น บันทึกวันเดือนปีที่เก็บ บรรจุลงในกล่องที่มีน้ำแข็งทันทีเพื่อรักษาสภาพของปุ๋ยหมักและจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ภายในปุ๋ยหมัก นำตัวอย่างกลับมาวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมง



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งบริเวณเก็บตัวอย่างภายในกองปุ๋ยหมัก

2. วิธีการเตรียมตัวอย่างปุ๋ยหมักเพื่อวิเคราะห์

2.1 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

2.1.1 การวัดอุณหภูมิ

วัดอุณหภูมิของกองปุ๋ยหมัก โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์เสียบบริเวณแกนกลางของปุ๋ยหมัก จากนั้นรอให้ค่าอุณหภูมิคงที่ประมาณ 2 – 3 นาที อ่านค่าอุณหภูมิและบันทึกผล

2.1.2 การวัดความชื้น

นำตัวอย่างปุ๋ยหมักที่ทำการสุ่มตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ถาดอะลูมิเนียมหรือภาชนะที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ใส่ในโถดูดความชื้น ประมาณ 2 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักหลังการอบและบันทึกผล คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของความชื้นดังสูตรข้างล่าง

$$\text{ความชื้นของปุ๋ยหมัก (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

2.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

2.2.1 การวัดพีเอช

นำตัวอย่างปุ๋ย 25 กรัม เจือจางในน้ำกลั่น ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 30 นาที (ได้ความเจือจางที่ 10^{-1}) วัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Gil *et al.*, 2004)

2.2.2 การหาค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C : N ratio)

นำตัวอย่างปุ๋ยหมักในวันแรกและวันสุดท้ายของการหมัก ส่งวิเคราะห์ค่าคาร์บอนทั้งหมด (total carbon) ด้วยวิธี dynamic flash combustion (Horwitz, 1997) และไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ด้วยวิธี N/protein Analysis (Horwitz, 1997) ที่ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาอัตราส่วน C:N

2.3 การวิเคราะห์ทางชีวภาพ

2.3.1 การศึกษาจำนวนแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซีต

นำตัวอย่างปุ๋ยหมักมาทำการเจือจางในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้ได้ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-8} ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่ความเจือจางระดับต่างๆ อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ทำการ spread plate บนอาหารที่เหมาะสมสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ความเจือจางละ 4 จาน สำหรับการนับแบคทีเรียใช้ TSA ที่มียาปฏิชีวนะ Cycloheximide ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร สำหรับการนับเชื้อราใช้ Rose Bengal medium ที่มียาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 50 มิลลิลิกรัมต่อลิตร สำหรับการนับแอคติโนมัยซีต ใช้ Actinomycete isolation agar ที่มียาปฏิชีวนะ Cycloheximide ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิปานกลางโดยการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 จานที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงโดยการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 2 จานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน (แบคทีเรีย : 2 วัน, เชื้อรา : 4 วัน และ แอคติโนมัยซีต : 10 วัน) บันทึกผล แล้วนำไปคำนวณหาจำนวนเชื้อต่อหนึ่งมิลลิลิตร (CFU/ml)

2.3.2 การศึกษาจำนวนโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli*

นำตัวอย่างปุ๋ยในสัปดาห์แรกและสัปดาห์สุดท้าย ไปตรวจวิเคราะห์หาโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli* ด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) (AWWA, 2005) แบบ 5 หลอด มี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. **Presumptive test** สำหรับศึกษาจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหาร Lauryl tryptose broth (LST) (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ความเจือจางละ 5 หลอด (ทำที่ความเจือจาง 10^{-1} – 10^{-8})บ่มหลอดทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. **Confirmed test** สำหรับศึกษาจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรีย เขย่าหลอด LST ที่เกิดแก๊สเบาๆ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สทุกหลอดลงอาหาร Brilliant green lactose broth (BGLB) หลอดต่อหลอด บ่มหลอด BGLB ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

48 ชั่วโมง นำผลหลอดที่เกิดแก๊สไปอ่านค่า MPN จากตาราง MPN (ภาคผนวก ง) รายงานผลเป็น MPN coliform/ g

สำหรับศึกษาจำนวนฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย เขย่าหลอด LST ที่เกิดแก๊สเบาๆ และใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สทุกหลอด ใส่ในอาหาร EC broth หลอดต่อหลอด บ่มหลอด EC broth ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 44.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตแก๊สภายในหลอดดักแก๊ส ถ้าไม่เกิดแก๊สบ่มต่อจนครบ 48 ชั่วโมง นำผลหลอดที่เกิดแก๊สไปอ่านค่า MPN จากตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN fecal coliform/g

3. **Confirmed test** สำหรับศึกษาจำนวน *E. coli* ทำการถ่ายเชื้อจากหลอด EC broth ที่เกิดแก๊สทุกหลอดไป streak บนอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) บ่มจาน EMB ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่น่าจะเป็น *E. coli* คือ ตรงกลางโคโลนีสีเข้ม อาจมีหรือไม่มี Metallic sheen ถ่ายเชื้อจากโคโลนีดังกล่าว 2 โคโลนีของแต่ละจานอาหาร EMB ใส่หลอดอาหาร Plate count agar (PCA) บ่มที่ 38 องศาเซลเซียส 18 – 24 ชั่วโมง นำเชื้อจากหลอด PCA ไปทดสอบต่อไปนี้ คือ ย้อมสีแกรม, IMViC test (ภาคผนวก ง) และ ถ่ายเชื้อลงอาหาร LST (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การแปลผล ถ้าหากเป็น *E. coli* จะติดสีแกรมลบ รูปแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ ผล IMViC เป็น ++-- และหมัก Lactose ใน LST ให้กรดและแก๊สที่ 35 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 48 ชั่วโมง

2.3.3 การตรวจหาเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในตัวอย่างปุ๋ยหมัก

นำปุ๋ยหมัก 100 กรัม เจือจางใน อะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5 ให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสม เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการตกตะกอนปุ๋ยหมักโดยนำตัวอย่างไปทำการหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (Supernatant) ที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส โดยใช้สับสเตรท คือ CMC และ Xylan ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5 (ภาคผนวก ค)

2.3.3.1 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson- Somogyi (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

ดูดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม Low-alkalinity reagent of Somogyi (ภาคผนวก ค) ลงไป 10 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง เติม Arsenomolybdate

reagent of Nelson (ภาคผนวก ค) ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อทำให้คิวปรัสออกไซด์ (Cu_2O) ละลายหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส (ภาคผนวก ค) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ และนำค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปคำนวนหาค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยใช้สูตร

กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

$$\text{Unit/ml} = \frac{\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส x 2 x Dilution factor}}{\text{มวลโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส x 30}}$$

1 หน่วยของเอนไซม์ (Unit) ของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อย CMC แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อ 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

$$\text{Unit/ml} = \frac{\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส x 2 x Dilution factor}}{\text{มวลโมเลกุลของน้ำตาลไซโลส x 30}}$$

1 หน่วยของเอนไซม์ (Unit) ของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อย xylan แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อ 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

โดย มวลโมเลกุลของกลูโคสเท่ากับ 180 และมวลโมเลกุลของไซโลสเท่ากับ 105.1

2.3.4 การคัดเลือกหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไซลาเนสในปริมาณสูงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการสุ่มเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จากข้อ 2.3.1 เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยว ๆ แตะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar, Xylan agar และ TSA (Master plate) นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 72 ชั่วโมง จากนั้นราดสารละลายคองโกเรด (congo red solution) ปริมาตร 2 – 3 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร CMC และ Xylan agar ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เทคองโกเรดทิ้ง จากนั้นราดโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (Chen *et al.*, 2004) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที คัดเลือกโคโลนีที่มีวงใส (clear zone) เส้นผ่านศูนย์กลาง

มากกว่า 1 เซนติเมตร วัดขนาดโคโลนีและขนาดวงใสเพื่อคำนวณหาค่า Degree of hydrolysis ถ่ายเชื้อที่คัดเลือกได้จาก TSA (Master plate) ลงบน TSA slant เพื่อเก็บเชื้อรอการทดสอบขั้นต่อไป

การคำนวณหาค่า Degree of hydrolysis

$$\text{Degree of hydrolysis} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)}}$$

2.3.5 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในอาหาร CMC broth และ xylan broth

ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อจุลินทรีย์เจริญจนถึงระยะ Exponential phase โดยมีค่า Optical density อยู่ในช่วงประมาณ 0.6 – 0.7 ดูดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว CMC broth และ xylan broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสต่อไป

2.3.5.1 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากอาหาร NB มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแต่ละสูตรที่ต้องการศึกษา เขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไปทุกๆ 4 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24 เพื่อหากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส ตามวิธีที่กล่าวมา

ตารางที่ 3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส สูตรอาหารที่ 1, 2 และ 3 ดัดแปลงจากสูตรที่ 4 ของ Kapoor *et al*. (2007) อาหารทุกสูตรใส่สับสเตรท CMC หรือ xylan 5 กรัม ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบ

สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
Bacto peptone 10 กรัม	tryptone 10 กรัม	tryptone 10 กรัม	peptone 5 กรัม
yeast extract 10 กรัม	yeast extract 10 กรัม	yeast extract 10 กรัม	yeast extract 5 กรัม
$MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัม	$MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัม	$MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัม	$MgSO_4.\ 7H_2O$ 0.1 กรัม
	NH_4NO_3 0.4 กรัม		KH_2PO_4 1 กรัม
น้ำ 1 ลิตร	น้ำ 1 ลิตร	น้ำ 1 ลิตร	น้ำ 1 ลิตร

2.3.6 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของจุลินทรีย์โดยการเลี้ยงในอาหารแข็งที่ใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นสับเสตรท

2.3.6.1 การปรับเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุทางการเกษตร

นำฟางข้าว ผักตบชวา ขุยมะพร้าว และซังข้าวโพดขนาดประมาณ 0.5 - 1 เซนติเมตร อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตักแบ่งสับสเตรทแต่ละชนิดใส่ถ้วยโลหะที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ถ้วยละ 5 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตรต่างๆกันตั้งแต่ 10 จนถึง 20 มิลลิลิตร (เพิ่มขึ้นครั้งละ 1 มิลลิลิตร) ผสมสับสเตรทและน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นปิดปากถ้วยด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันน้ำระเหย ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักสดด้วยเครื่องชั่งน้ำหนัก 3 ตำแหน่ง นำไปอบในตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น (Desiccator) 2 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (ภาคผนวก ง)

ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ใช้วัสดุเป็นสับสเตรท จะเตรียมสับสเตรทแต่ละชนิดหนัก 70 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร ปิดปากขวดฟลาสก์ด้วยจุกสำลี หุ้มด้วยฟอยล์ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.3.6.2 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับหากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่ม 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจาก NA ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Berg's mineral salts medium (Berg *et al*., 1972) ผสมเชื้อให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer) ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ประมาณ 1.5 x 10^8 เซลล์/ มิลลิลิตร (0.5 McFarland standard)

2.3.6.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของจุลินทรีย์ในอาหารแข็งที่ปรับความชื้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์

ดูดเชื้อที่ปรับความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Berg's mineral salts medium ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทลงในฟลาสก์ที่มีสับสเตรทแต่ละชนิด ปรับเปอร์เซ็นต์ความชื้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำกลั่น (ภาคผนวก ง) คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน โดยเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทุกวัน

2.3.6.4 ผลของเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์

ทำการเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบตามข้อ 2.3.6.2 โดยใช้ผักตบชวาผสมกับขุยมะพร้าวเป็นสับสเตรท ทำการชั่งผักตบชวา 65 กรัมผสมกับขุยมะพร้าว 5 กรัม จำนวน 5 ฟลาสก์ ทำการปรับความชื้นตามวิธีในข้อ 2.3.6.1 ให้ได้ความชื้นเป็น 50, 60, 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน โดยเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทุกวัน

2.3.6.5 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude enzyme โดยใช้วิธีการเดียวกับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์บ่มกับสับสเตรทใน อะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1M pH 7 ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 65, 70, 80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที แล้วตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.3.3

2.3.6.6 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

ทำการศึกษาโดยนำ crude enzyme แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50, 60, 65, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ก่อนทำการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.3.3

2.4 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

นำแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสมากที่สุด 2 สายพันธุ์ ศึกษารูปร่างเซลล์และสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทียบเคียงเชื้อโดยวิธีการเรียงลำดับเบส (16S rDNA analysis) โดยวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ KU – VECTOR ศูนย์พัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีรัฐร่วมเอกชน (ศรอ.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ซึ่งใช้โปรแกรม DNASIS V3.7 ในการจัดเรียงลำดับเบส DNA และสร้าง Phylogenetic tree

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ลักษณะทางกายภาพของผักตบชวาก่อนและหลังกระบวนการหมัก

ลักษณะผักตบชวาหลังจากตากแดดประมาณ 2 สัปดาห์ก่อนทำปุ๋ยหมักในโรงเรือนยังคงมีสีเขียวสดและมีความชื้นมากพอสมควรดังรูปที่ 2 – 3

รูปที่ 2 ลักษณะกองผักตบชวาที่เตรียมพร้อมสำหรับทำปุ๋ยหมัก

รูปที่ 3 ลักษณะของผักตบชวาก่อนการทำปุ๋ยหมัก

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่าปุ๋ยหมักที่ประกอบด้วยผักตบชวา ขุยมะพร้าว และมูลสัตว์มีการเปลี่ยนลักษณะทางกายภาพอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่) คือ เนื้อปุ๋ยเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีดำหรือน้ำตาล มวลวัตถุมีขนาดเล็กลง เนื้อละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็น เป็นต้น

รูปที่ 4 กองปุ๋ยหมักผักตบชวาที่ผ่านกระบวนการหมักเป็นเวลา 11 สัปดาห์

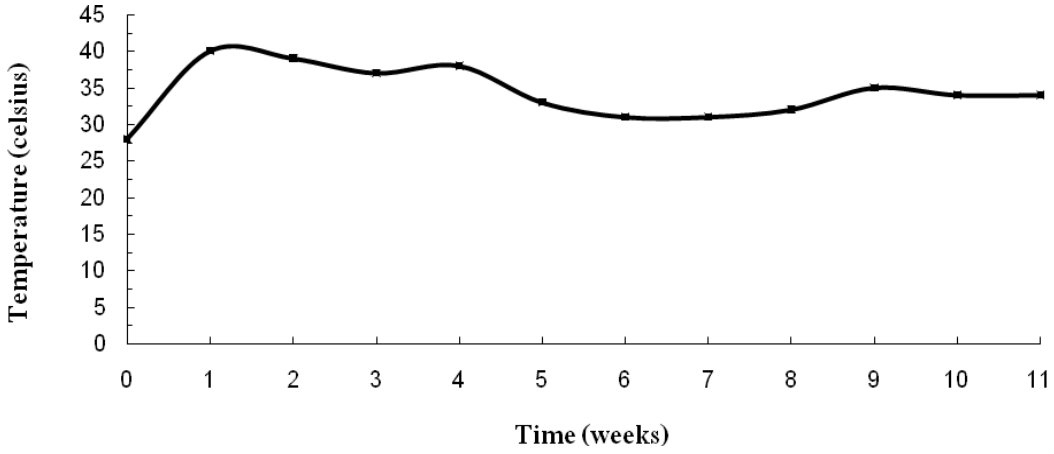
2. การวิเคราะห์ปุ๋ยหมักผักตบชวา

2.1 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

การวิเคราะห์ปุ๋ยหมักทางกายภาพประกอบด้วย การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้นของปุ๋ยหมัก การวัดอุณหภูมิเฉลี่ยของกองปุ๋ยหมักและการวัดพีเอช (pH) ของปุ๋ยหมัก ซึ่งผลการทดลองมีดังนี้

2.1.1 ผลการวัดอุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักผักตบชวา

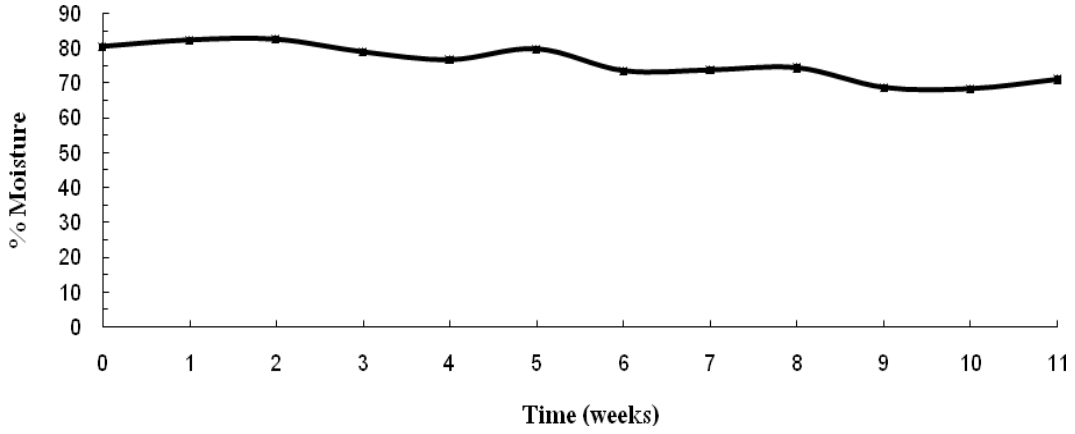
อุณหภูมิเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญถึงการย่อยสลายของกองจุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก การวัดอุณหภูมิของกองปุ๋ย โดยวัดจากจุดกึ่งกลางของกองปุ๋ยหมักผักตบชวา อุณหภูมิเริ่มต้นของกองปุ๋ยหมักมีค่าเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาของการหมัก พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 มีอุณหภูมิสูงสุดที่ □0 องศาเซลเซียส (รูปที่ 5) จากนั้น อุณหภูมิค่อนข้างคงที่ถึงสัปดาห์ที่ □ (อุณหภูมิอยู่ในช่วง 36 – 38 องศาเซลเซียส) หลังจากสัปดาห์ที่ □เป็นต้นไป อุณหภูมิค่อยๆ ลดลง ในสัปดาห์ที่ 11 ซึ่งเป็นช่วงสิ้นสุดการทดลอง อุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักลดลงเหลือ 3□ องศาเซลเซียส



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของปุ๋ยหมักผักตบชวา

2.1.2 ผลการวัดความชื้นของปุ๋ยหมักผักตบชวา

ความชื้นมีความสำคัญต่อการเจริญและการทำกิจกรรมต่าง ๆของเชื้อจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมัก ซึ่งจุลินทรีย์จะเป็นตัวช่วยในการย่อยสลายวัสดุเศษเหลือใช้ทางการเกษตร ในการทำปุ๋ยหมัก ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 50 – 70 เปอร์เซ็นต์ (Hamoda *et al*., 1998) จากการตรวจวัดความชื้นของปุ๋ยหมักผักตบชวาทุกสัปดาห์ พบว่าในช่วงเริ่มต้นของการหมักปุ๋ยผักตบชวา ความชื้นในกองปุ๋ยหมักสูงมากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และค่อนข้างคงที่ถึงสัปดาห์ที่ 2 หลังจากนั้น ปริมาณความชื้นค่อย ๆลดลง ในสัปดาห์ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความชื้นลดลงเหลือ 79 เปอร์เซ็นต์ และสัปดาห์ที่ □ มีความชื้นเหลือ 77 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มลดลงตลอดการหมัก อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ปริมาณความชื้นยังค่อนข้างสูงอยู่ที่ 71 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 6)

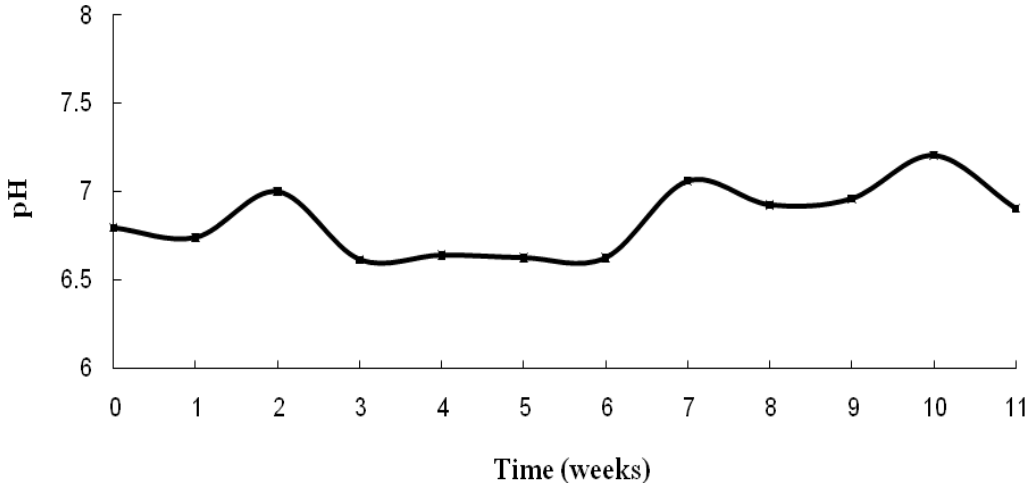


รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความชื้นของปุ๋ยหมักผักตบชวา

2.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

2.2.1 ผลการวัดพีเอช

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชภายในกองปุ๋ยหมักมีความสัมพันธ์ต่อการเจริญและกิจกรรมต่างๆของจุลินทรีย์ การย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ เกิดขึ้นได้มากในช่วงพีเอช 6 - 9 (Nakasaki *et al*., 1993) ในช่วงเริ่มต้นของการหมัก พีเอชของปุ๋ยหมักมีค่าประมาณ 7 จากนั้นค่าพีเอชมีการแปรเปลี่ยนอยู่ในช่วง 6.6 – 7.2 ปุ๋ยหมักที่ดีต้องมีค่ามาตรฐานของพีเอชประมาณ 6 – 7.5 ซึ่งเป็นกรดถึงด่างเล็กน้อย (ธงชัย, 25 6) เมื่อทำการวัดพีเอชในสัปดาห์สุดท้ายมีค่า 6.91 (รูปที่ 7) แสดงว่าปุ๋ยหมักมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้



รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของปุ๋ยหมักผักตบชวา

2.2.2 ผลการวิเคราะห์อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของตัวอย่างปุ๋ยเมื่อเริ่มต้นการหมัก มีค่าเท่ากับ 17.61 โดยประกอบด้วยคาร์บอน 33.29 เปอร์เซ็นต์และไนโตรเจน 1.89 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่) ค่าที่ได้ไม่เหมาะสมต่อการเริ่มต้นกระบวนการหมัก เพราะค่าเริ่มต้นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของกระบวนการหมักควรอยู่ระหว่าง 25 - 35 (Hamoda *et al*., 1998) แต่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในสัปดาห์ที่ 11 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีค่าเท่ากับ 18.12 ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับสัปดาห์แรกของการทดลอง เป็นผลมาจากเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนมีค่าลดลงในอัตราส่วนที่มากกว่าคาร์บอน โดยไนโตรเจนลดลง 13.2 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับคาร์บอนที่มีค่าลดลง 10.7 เปอร์เซ็นต์ ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ได้ในสัปดาห์สุดท้ายเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ ซึ่งปุ๋ยหมักที่ดีควรมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ในช่วง 15 - 20

ตารางที่ 4 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของปุ๋ยหมักผักตบชวาสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 11

ตัวอย่างปุ๋ยหมัก (สัปดาห์ที่)	เปอร์เซ็นต์ คาร์บอน (C)	เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน (N)	อัตราส่วนคาร์บอนต่อ ไนโตรเจน (C N)
0	33.29	1.89	17.61
11	29.71	1.6	18.12

2.3 การวิเคราะห์ทางชีวภาพ

2.3.1 ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์

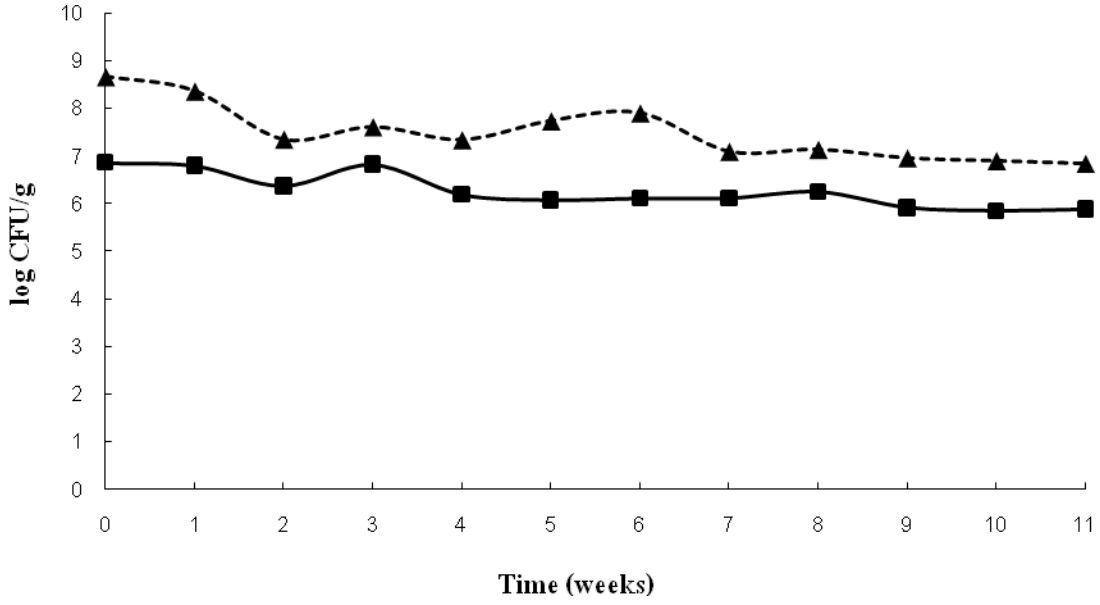
ในการศึกษาจำนวนแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SA, Rose bengal medium และ Actinomycete isolation agar ตามลำดับนั้น ได้ทำการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม mesophiles โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และกลุ่ม thermophiles บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า แบคทีเรียมีจำนวนมากที่สุด รองลงมาคือแอคติโนมัยซีต และพบเชื้อราน้อยที่สุด โดยกลุ่ม mesophilic bacteria ในสัปดาห์แรกมีจำนวนสูงถึง 8.66 log CFU/g หลังจากนั้นจำนวน mesophilic bacteria ค่อยๆลดลง ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ซึ่งลดลงเหลือ 8.36 และ 7.3 log CFU/g ตามลำดับ แต่ในสัปดาห์ที่ 3 เพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อยเป็น 7.60 log CFU/g และสัปดาห์สุดท้ายเหลือ 6.83 log CFU/g

แบคทีเรียกลุ่ม thermophiles มีจำนวนต่ำกว่าแบคทีเรียกลุ่ม mesophiles แบคทีเรียกลุ่ม thermophiles มีจำนวนมากที่สุดใน สัปดาห์แรก ประชากรของแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในช่วงระหว่าง 6.85 log CFU/g (ในสัปดาห์ที่ 0) ถึง 6.37 log CFU/g (ในสัปดาห์ที่ 2) แต่หลังสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป ประชากร thermophilic bacteria ลดลง โดยตั้งแต่สัปดาห์ที่ ถึงสัปดาห์สุดท้าย จำนวนแบคทีเรียมีค่าใกล้เคียงกัน ในสัปดาห์ที่ มีจำนวนเท่ากับ 6.18 log CFU/g จนถึงสัปดาห์สุดท้ายของการหมักปุ๋ยเหลือเท่ากับ 5.87 log CFU/g เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียระหว่างกลุ่ม mesophiles และกลุ่ม thermophiles พบว่า มีจำนวนที่แตกต่างกันประมาณ 1 – 2 log CFU/g ตามรูปที่ 8

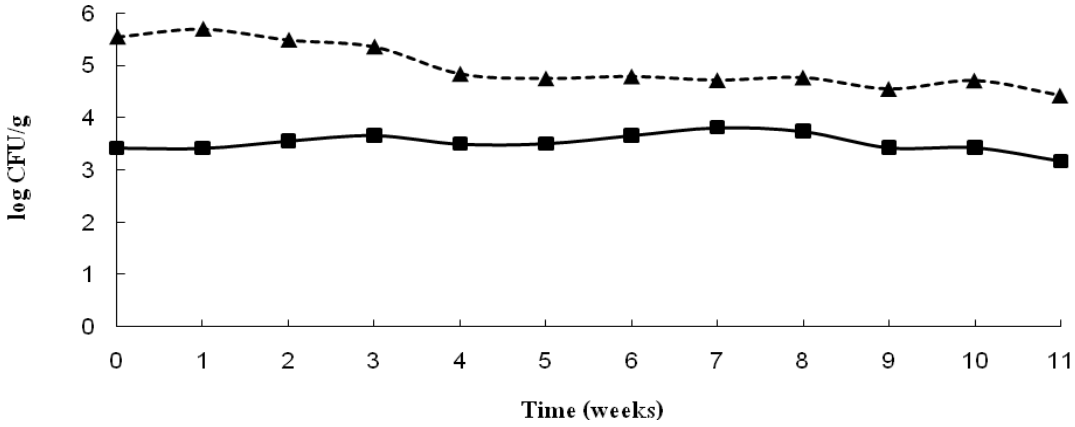
การตรวจหาจำนวนของแอคติโนมัยซีตในกลุ่ม mesophiles พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 3 มีประชากรมากกว่า 5 log CFU/g โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 1 ของกระบวนการหมักปุ๋ยหมักผักตบชวามีจำนวนมากที่สุดถึง 5.69 log CFU/g หลังจากสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป จำนวนของ mesophiles ลดลง โดยสัปดาห์ที่ มีจำนวน .8 log CFU/g และมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนถึงสัปดาห์สุดท้าย ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ .2 log CFU/g แต่สำหรับจำนวนของ thermophiles ตั้งแต่สัปดาห์แรกถึงสัปดาห์สุดท้ายค่อนข้างคงที่ โดยสัปดาห์แรกของการหมักมีจำนวน 3. 2 log CFU/g หลังจากนั้นจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยถึงสัปดาห์ที่ 7 มี

จำนวน thermophiles เท่ากับ 3.81 log CFU/g หลังสัปดาห์ที่ 8 เป็นต้นไป จำนวนจุลินทรีย์กลุ่มนี้ค่อยๆลดลงเหลือ 3.17 log CFU/g ในสัปดาห์ที่ 11 (รูปที่ 9)

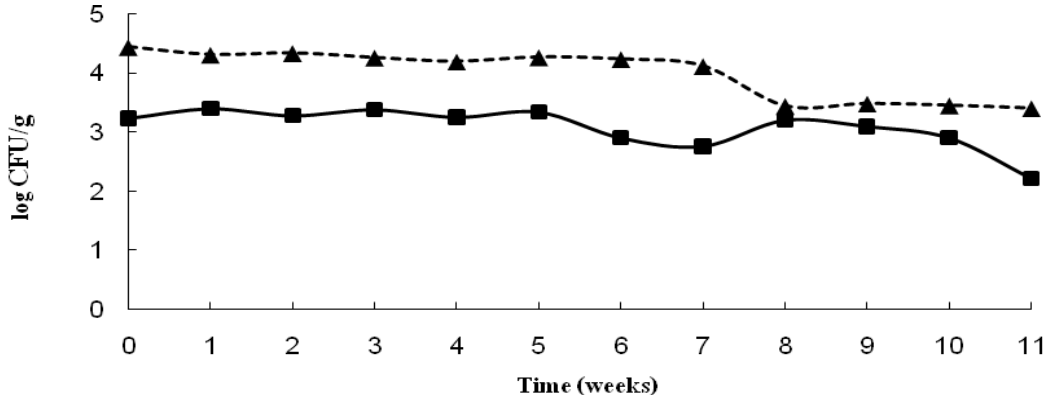
ประชากรเชื้อรามีจำนวนน้อยที่สุดในจำนวนจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม โดยพบว่าในช่วง 7 สัปดาห์แรกกลุ่ม mesophilic fungi มีจำนวนค่อนข้างน้อย โดยในสัปดาห์แรกมีค่าเท่ากับ □.□3 log CFU/g จนถึงสัปดาห์ที่ 7 มีจำนวนเชื้อราเท่ากับ □.11 log CFU/g ส่วนช่วงสัปดาห์ที่ 8 จนถึงสัปดาห์ที่ 11 จำนวนเชื้อรากลุ่มนี้ลดลงเมื่อเทียบกับช่วงระยะเวลาการหมักปุ๋ยใน 7 สัปดาห์แรก จำนวนของ mesophiles ในสัปดาห์ที่ 8 ถึง 11 มีจำนวน 3.□5, 3.□7, 3.□□ และ 3.39 log CFU/g ตามลำดับ สำหรับ thermophiles ในช่วง 5 สัปดาห์แรก มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนของเชื้อราค่อนข้างน้อย ในสัปดาห์แรกมีจำนวน 3.23 log CFU/g จนถึงสัปดาห์ที่ 5 มีจำนวนเท่ากับ 3.3□log CFU/g แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป จำนวนของ thermophiles ลดลง โดยในช่วงที่สัปดาห์ที่ 7 ลดลงเหลือ 2.76 log CFU/g และสัปดาห์สุดท้ายมีจำนวนน้อยที่สุดเหลือ 2.21 log CFU/g (รูปที่ 10)



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงจำนวน mesophilic bacteria (▲) และ thermophilic bacteria (■) ในกระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวาสัปดาห์ที่ 0 - 11



รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงจำนวน mesophilic actinomycete (▲) และ thermophilic actinomycete (■) ในกระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวาสัปดาห์ที่ 0 - 11



รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงจำนวน mesophilic fungi (▲) และ thermophilic fungi (■) ในกระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวาสัปดาห์ที่ 0 - 11

2.3.2 ผลการศึกษาจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli*

จากการเก็บตัวอย่างของปุ๋ยหมักเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดกระบวนการหมัก มาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยตรวจหาจุลินทรีย์บ่งชี้แบคทีเรียโคลิฟอร์ม แบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli* พบว่า ในสัปดาห์แรกปุ๋ยหมักมีจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่สูงมาก ถึง 1.3 x 10^8 MPN/g และยังตรวจพบเชื้อแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli* มีจำนวนถึง 1.1 x 10^7 และ 9 x 10^6 MPN/g ตามลำดับ แต่เมื่อตรวจสอบอีกครั้งในสัปดาห์สุดท้ายของการหมักพบว่า ปริมาณแบคทีเรียโคลิฟอร์มลดลงอย่างเห็นได้ชัดเป็น 7 x 10^5 MPN/g และไม่พบเชื้อแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli* ดังผลการทดลองในตารางที่ 5

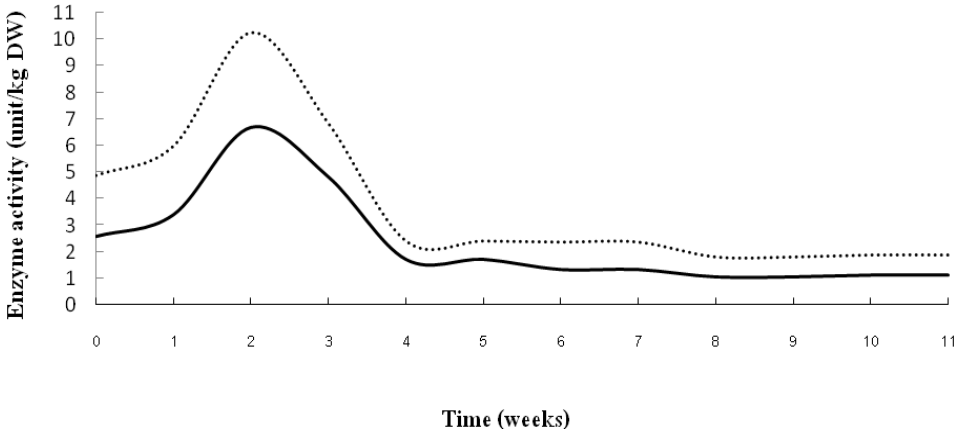
ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli* ของปุ๋ยหมักผักตบชวาเมื่อเริ่มต้นหมักปุ๋ยและสัปดาห์สุดท้าย

กลุ่มแบคทีเรียที่ทดสอบ	สัปดาห์ที่ 0 (MPN/g)	สัปดาห์ที่ 11 (MPN/g)
โคลิฟอร์ม	1.3×10^{8}	7×10^{5}
ฟีคัลโคลิฟอร์ม	1.1×10^{7}	< 1.1
E. coli	$.9 \times 10^{6}$	< 1.1

2.3.3 ผลการตรวจหาเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในตัวอย่างปุ๋ยหมัก

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ในปุ๋ยหมัก เป็นวิธีการหนึ่งที่ตรวจสอบถึงประสิทธิภาพกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยและคุณภาพของกองปุ๋ย เพราะหากกิจกรรมเอนไซม์ปริมาณน้อยอาจส่งผลต่อกระบวนการหมัก

จากการเก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักมาทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ทุกสัปดาห์ พบว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลอง ทั้งเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.57 และ .86 unit/kg DW ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 1 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเพิ่มสูงขึ้นเป็น 3.39 และ 5.97 unit/kg DW กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 โดยกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส มีค่าสูงสุดเท่ากับ 6.67 unit/kg DW และกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส มีค่าสูงสุดเท่ากับ 10.2 unit/kg DW และค่อยๆ ลดลงจนถึงสัปดาห์ที่ 5 หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ และมีค่าค่อนข้างต่ำโดยมีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส มีค่าเท่ากับ 1.7 และ 2. unit/kg DW ตามลำดับ



รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (—) และไซลาเนส (·····) ของปุ๋ยหมักผักตบชวา

2.3.4 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสบนอาหาร CMC agar และ Xylan agar

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์จากปุ๋ยหมักที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกได้บนอาหารที่มี CMC หรือ Xylan เป็นสับสเตรท และสังเกตวงใสที่เกิดขึ้นโดยการราดด้วยสารละลายคองโกเรด และคำนวณค่า degree of hydrolysis จากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (B) ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (A) สามารถคัดเลือกได้ 18 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและ 11 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (ตารางที่ 6 – 7) ไอโซเลทที่สามารถผลิตได้ทั้ง 2 เอนไซม์มีทั้งหมด 10 ไอโซเลท

เมื่อทำการวัดวงใสของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC พบว่า ไอโซเลท B12 ให้ค่า degree of hydrolysis มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 5.23 รองลงมาคือ ไอโซเลท B7 ให้ค่า degree of hydrolysis เท่ากับ □.□9 ส่วนวงใสบนอาหาร Xylan agar จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุด คือ ไอโซเลท B15 ให้ค่า degree of hydrolysis เท่ากับ □.82 รองลงมาคือ ไอโซเลท B□ ให้ค่า degree of hydrolysis เท่ากับ □.□5

เมื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลูเลสและไซลาเนสขั้นเบื้องต้นจากการหาค่า degree of hydrolysis แล้วจึงทำการทดสอบขั้นต่อไปโดยหากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสและไซลาเนส โดยคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท B1, B□, B15, B91 และ B158 และอีก 5 ไอโซเลท เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ได้แก่ไอโซเลท B1, B3, B□, B9 และ B91 โดยไอโซเลททั้งหมดที่คัดเลือกอาจจะไม่ได้ให้ค่า degree of hydrolysis สูงสุด แต่ทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีเหมาะสมต่อการนำไปใช้ศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC agar อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)				Degree of hydrolysis (B/A)
	โคโลนี	โคโลนีเฉลี่ย (A)	วงใส	วงใสเฉลี่ย (B)	
B 1	1.1, 0.99	1.07	3.01, 2.80	2.91	2.72
B 2	0.88, 0.93	0.91	2.31, 2.27	2.29	2.52
B 3	0.8, 0.78	0.81	2.11, 2.75	2.43	3
B 4	0.59, 0.56	0.58	2.23, 2.19	2.21	3.81
B 6	1.06, 0.97	1.02	3.01, 3.01	3.01	2.95
B 7	0.7, 0.51	0.63	2.82, 2.84	2.83	4.49
B 8	0.86, 0.74	0.8	2.83, 2.71	2.77	3.46
B 9	0.88, 0.72	0.8	2.99, 2.94	2.97	3.71
B 10	0.9, 0.81	0.88	2.77, 2.81	2.79	3.17
B 11	0.62, 0.55	0.59	2.03, 2.01	2.02	3.42
B 12	0.60, 0.45	0.53	2.78, 2.76	2.77	5.23
B 15	0.77, 0.73	0.75	3.02, 2.95	2.99	3.99
B 16	0.79, 0.72	0.76	3.15, 3.19	3.17	4.17
B 17	0.75, 0.66	0.71	2.90, 2.88	2.89	4.07
B 18	0.73, 0.59	0.66	2.31, 2.27	2.29	3.47
B 91	0.91, 0.87	0.89	2.85, 2.78	2.82	3.17
B 108	1.12, 1.04	1.08	2.71, 2.88	2.65	2.45
B 158	0.88, 0.82	0.85	2.77, 2.77	2.77	3.26

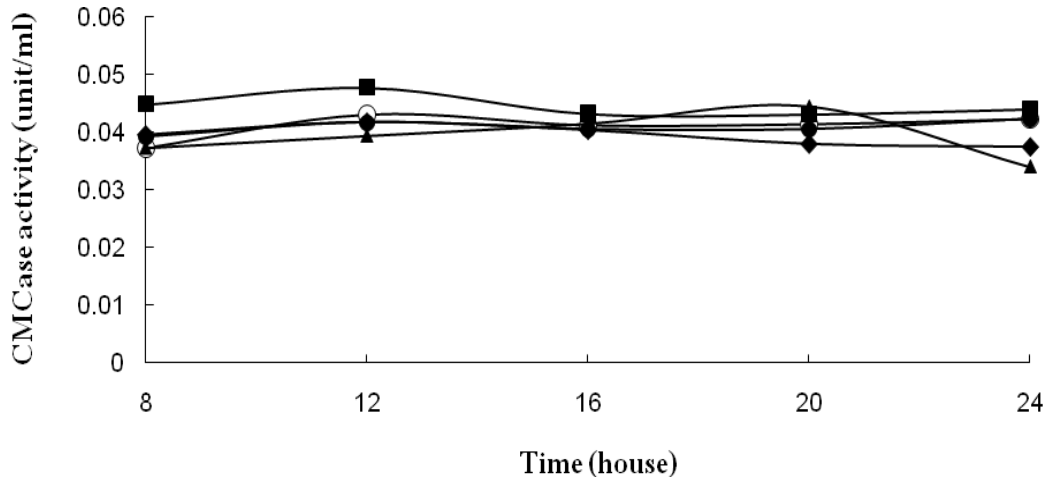
ตารางที่ 7 ความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสบนอาหาร Xylan agar อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)				Degree of hydrolysis (B/A)
	โคโลนี	โคโลนีเฉลี่ย (A)	วงใส	วงใสเฉลี่ย (B)	
B 1	0.61, 0.5□	0.58	2.33, 2.27	2.3	3.97
B 3	0.9□, 0.78	0.86	1.69, 1.66	1.68	1.95
B □	0.72, 0.66	0.69	3.15, 2.98	3.07	□.□5
B 6	0.83, 0.75	0.79	2.33, 2.25	2.29	3.67
B 9	0.78, 0.80	0.79	2.25, 2.27	2.26	2.86
B 15	0.72, 0.62	0.67	3.16, 3.29	3.23	□.82
B 16	0.86, 0.8□	0.85	3.07, 2.90	2.99	3.52
B 18	1.□2, 1.□1	1.□2	3.35, 3.31	3.33	2.3□
B 20	1.50, 1.33	1.□2	3.13, 3.09	3.11	2.19
B 91	0.92, 0.95	0.9□	3.00, 3.18	3.09	3.29
B 158	0.96, 1.07	1.02	2.56, 2.73	2.65	2.60

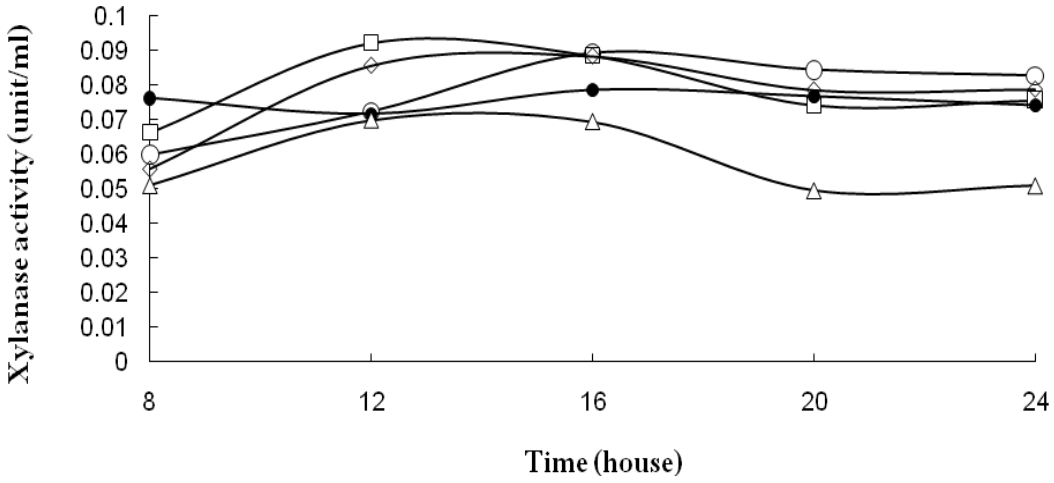
2.3.5 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในอาหาร CMC broth และ xylan broth

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสได้ในปริมาณสูงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ชนิดละ 5 ไอโซเลท มาทำการศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในอาหารเหลว พบว่าทุกไอโซเลทมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสต่ำมาก โดยมีค่าเอนไซม์เซลลูเลสไม่เกิน 0.05 unit/ml และกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสไม่เกิน 0.09 unit/ml (รูป 12 – 13)

เนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากไอโซเลทที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน จึงคัดเลือก ไอโซเลท B□และ B91 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 2 ชนิดและเจริญได้ดีกว่าไอโซเลทอื่นๆ เพื่อทำการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย เมื่อ เลี้ยงในอาหาร CMC broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (B1 (○), B (●), B15 (▲), B91 (◆) และ B158 (■) จำนวน 5 ไอโซเลท



รูปที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในอาหาร Xylan broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (B1 (○), B3 (□), B (●), B9 (△) และ B91 (◇) จำนวน 5 ไอโซเลท

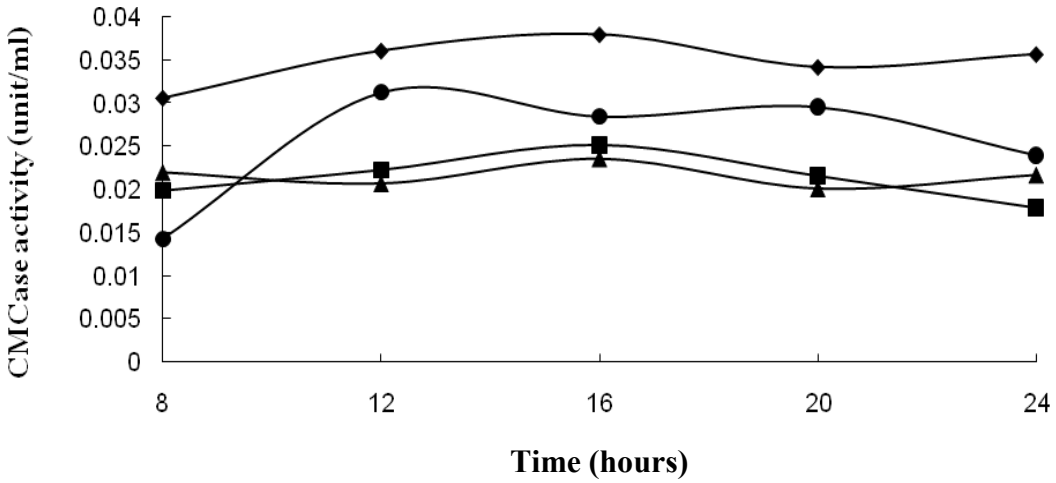
2.3.6 ผลของชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

ในการศึกษาผลของอาหารและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โดยเลี้ยงไอโซเลท B ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆกัน สูตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 2

จากรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยงไอโซเลท B ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง สูตร จุลินทรีย์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสน้อยมาก มีค่าสูงสุดไม่เกิน 0.0 unit/ml กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียไอโซเลท B มีค่าสูงสุดในอาหารสูตรที่ 1 โดยในช่วงชั่วโมงที่ 16 ไอโซเลท B สามารถเกิดกิจกรรมเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 0.038 unit/ml สูตรอาหารที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสน้อยที่สุดคือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่

จากรูปที่ 15 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของไอโซเลท B พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1, 2 และ 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกัน โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงระหว่าง 0.07 – 0.09 unit/ml ซึ่งมีค่าต่ำมาก

เนื่องจากสูตรอาหารทั้ง สูตรยังให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ต่ำมาก และจากการทดสอบเบื้องต้นกับไอโซเลท B91 ก็ให้ผลใกล้เคียงกัน จึงศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของจุลินทรีย์โดยการเลี้ยงบนวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสม



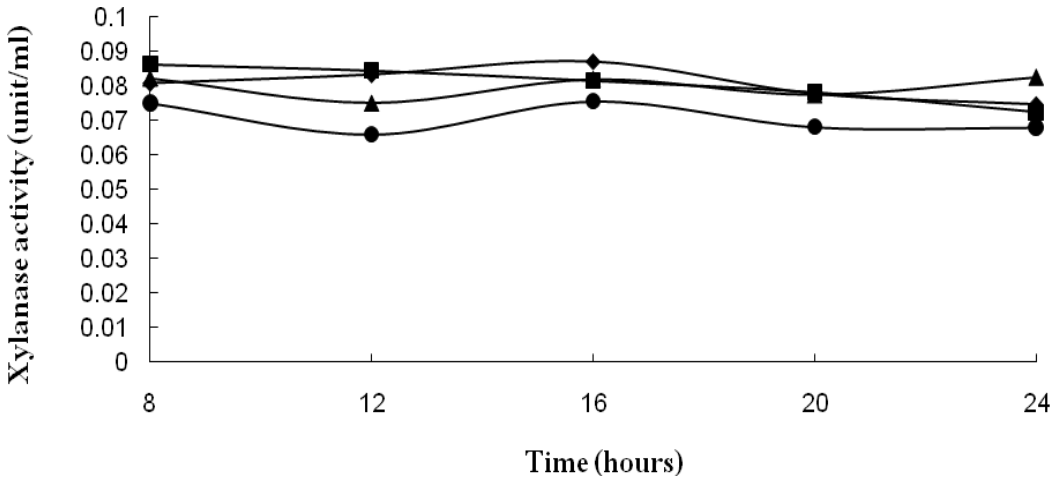
รูปที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท B เมื่อเลี้ยงในอาหาร CMC broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สูตร 1 (◆) Bacto peptone 10 กรัม, yeast extract 10 กรัม, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 กรัม

สูตร 2 (■) tryptone 10 กรัม, yeast extract 10 กรัม, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 กรัม, NH_4NO_3 0. กรัม

สูตร 3 (▲) tryptone 10 กรัม, yeast extract 10 กรัม, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 กรัม

สูตร (●) peptone 5 กรัม, yeast extract 5 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 กรัม, KH_2PO_4 1 กรัม



รูปที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท B เมื่อเลี้ยงในอาหาร Xylan broth บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สูตร 1 (◆) Bacto peptone 10 กรัม, yeast extract 10 กรัม, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 กรัม

สูตร 2 (■) tryptone 10 กรัม, yeast extract 10 กรัม, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 กรัม, NH_4NO_3 0. กรัม

สูตร 3 (▲) tryptone 10 กรัม, yeast extract 10 กรัม, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 กรัม

สูตร (●) peptone 5 กรัม, yeast extract 5 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 กรัม, KH_2PO_4 1 กรัม

2.3.7 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งโดยใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นสับเสตรท

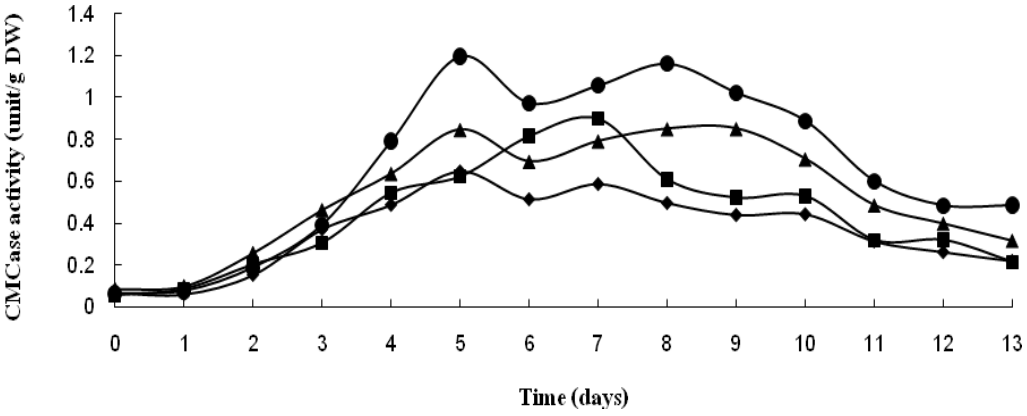
จากการเลี้ยงไอโซเลท B และ B91 บนอาหารแข็ง โดยใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดเป็นสับสเตรท เปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงไอโซเลท B ในซังข้าวโพดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากวัสดุทางการเกษตรชนิดอื่นๆ โดยในวันที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากซังข้าวโพดสูงสุด เท่ากับ 1.19 unit/g DW และกิจกรรมเอนไซม์สูงอีกครั้งในวันที่ 8 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 1.16 unit/g DW หลังจากวันที่ 8 เป็นต้นไป กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสลดลงตามลำดับ จนวันสุดท้ายลดลงเหลือ 0.8 unit/g DW สำหรับ ฟางข้าว ขุยมะพร้าวและผักตบชวา พบว่า ให้กิจกรรมเอนไซม์

เซลลูเลสสูงสุด เท่ากับ 0.89, 0.85 และ 0.65 unit/g DW ตามลำดับ โดยผลิตเอนไซม์มากที่สุดในช่วงวันที่ 5 - 8 ของการทดลอง (รูปที่ 16)

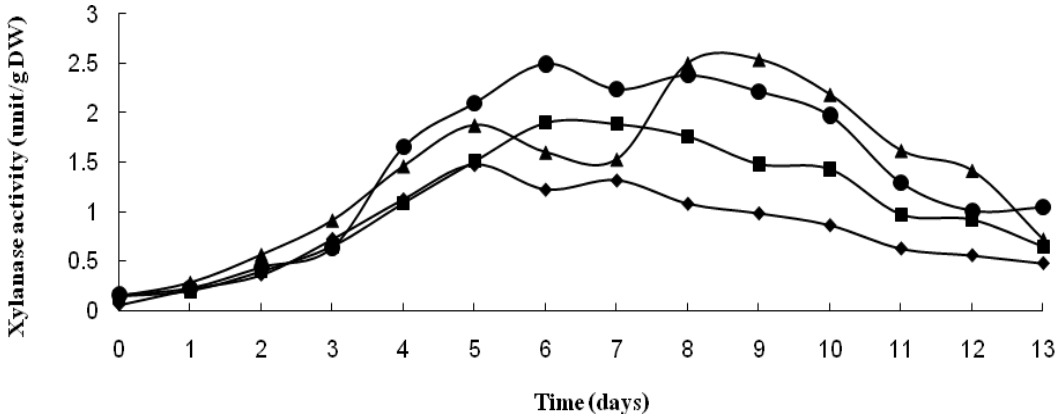
เอนไซม์ไซลาเนสจากฟางข้าวให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 9 มีค่าเท่ากับ 2.5 unit/g DW รองลงมาคือ ซังข้าวโพด ให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 2.9 unit/g DW ในส่วนของขุยมะพร้าวและผักตบชวาให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1.90 และ 1.51 unit/g DW ในวันที่ 5 และ 6 ตามลำดับ (รูปที่ 17)

ผลการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์จากไอโซเลท B91 (รูปที่ 18 – 19) เมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งสับสเตรทกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 7 มีค่า 1.37 unit/g DW ขณะเดียวกันยังสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากที่สุดโดยพบว่า วันที่ 5 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 1.90 unit/g DW รองลงมาคือฟางข้าว ให้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 1.00 unit/g DW ในวันที่ 8 และเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1.1 unit/g DW ในวันที่ 5

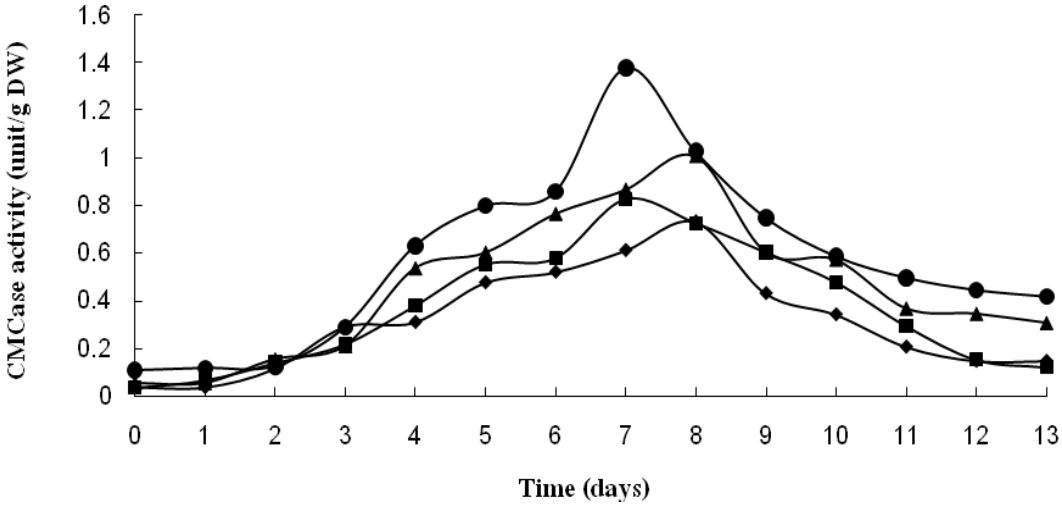
ส่วนขุยมะพร้าวและผักตบชวาให้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสน้อยที่สุด โดยขุยมะพร้าวให้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 0.82 unit/g DW และเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 1.27 unit/g DW ส่วนผักตบชวาให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด น้อยที่สุดตลอดการทดลอง



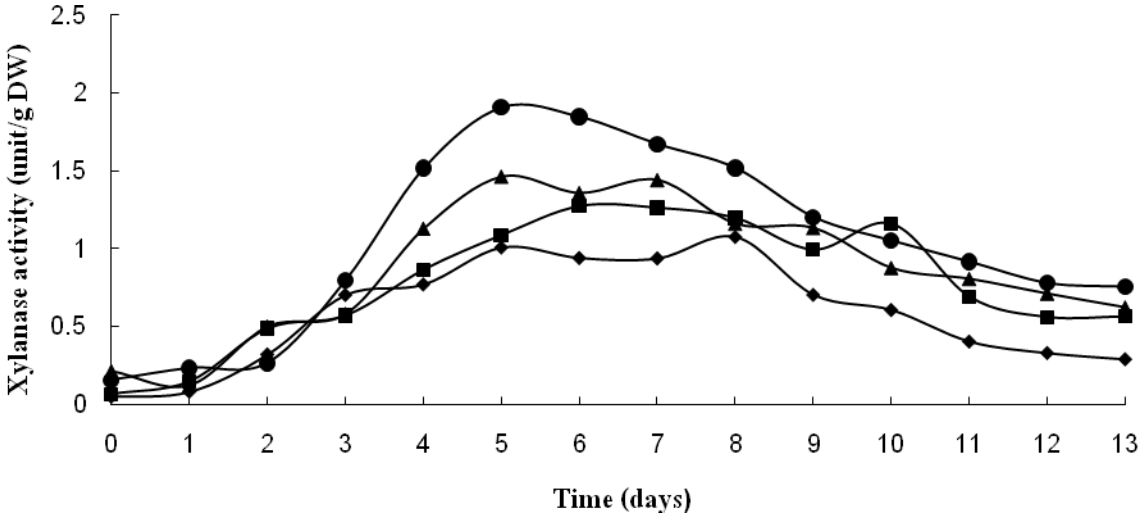
รูปที่ 16 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B□ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้วัสดุทางการเกษตรได้แก่ ผักตบชวา (◆), ขุยมะพร้าว (■), ฟางข้าว (▲) และซังข้าวโพด (●) ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วัน



รูปที่ 17 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B□ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้วัสดุทางการเกษตรได้แก่ ผักตบชวา (◆), ขุยมะพร้าว (■), ฟางข้าว (▲) และซังข้าวโพด (●) ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วัน



รูปที่ 18 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B91 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้วัสดุทางการเกษตร ได้แก่ ผักตบชวา (◆), ขุยมะพร้าว (■), ฟางข้าว (▲) และซังข้าวโพด (●) ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วัน



รูปที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B91 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้วัสดุทางการเกษตร ได้แก่ ผักตบชวา (◆), ขุยมะพร้าว (■), ฟางข้าว (▲) และซังข้าวโพด (●) ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 วัน

ผลการศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากวัสดุทางการเกษตร พบว่าส่วนใหญ่ซังข้าวโพดและฟางข้าวให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าขุยมะพร้าวและผักตบชวา จากการวิเคราะห์หาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของวัสดุทางการเกษตรแต่ละชนิด ซังข้าวโพดและฟางข้าวให้ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการหมักปุ๋ยโดยมีค่าเท่ากับ 3□.87 และ □0.8□ตามลำดับ แต่ผักตบชวาและขุยมะพร้าวมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อเริ่มไนโตรเจนเท่ากับ 18.76 และ 102.91 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตปุ๋ยหมัก และทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลท B□มาทำการศึกษาขั้นต่อไปเนื่องจากให้กิจกรรมเอนไซม์ได้ดีกว่าไอโซเลท B91

ตารางที่ 8 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของวัสดุทางการเกษตรแต่ละชนิด

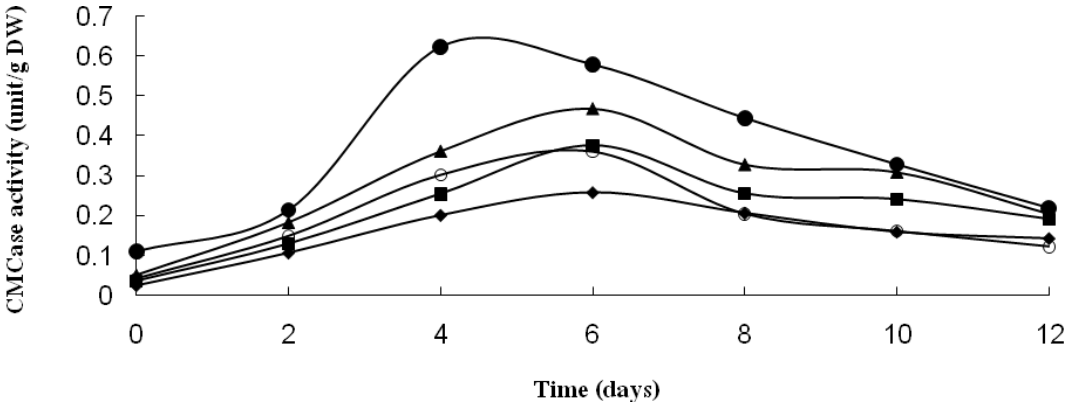
วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	คาร์บอน (%)	ไนโตรเจน (%)	อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N)
ผักตบชวา	21.57	1.15	18.76
ขุยมะพร้าว	23.67	0.23	102.91
ฟางข้าว	38.80	0.95	□0.8□
ซังข้าวโพด	□□.29	1.27	3□.87

2.3.8 ผลของเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง

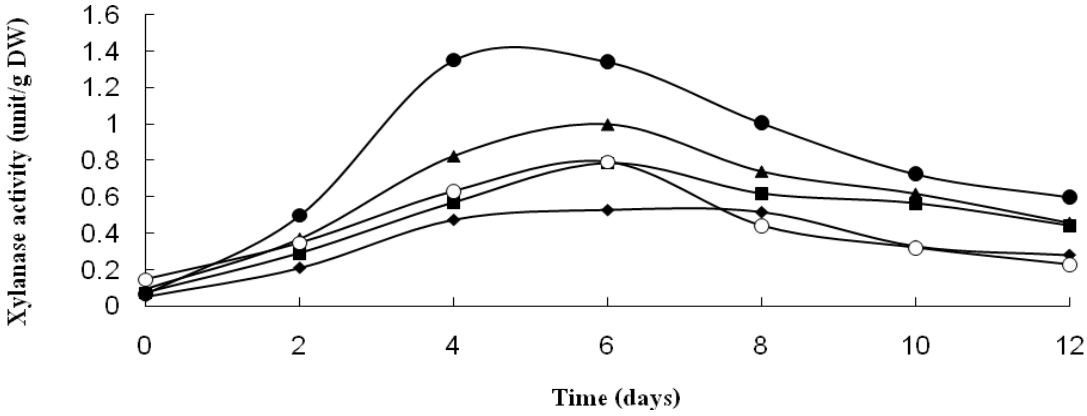
จากการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสของไอโซเลท B□ โดยใช้ผักตบชวาที่สับละเอียด 65 กรัม ต่อ ขุยมะพร้าว 5 กรัม ซึ่งเป็นส่วนผสมที่สำคัญในการทำปุ๋ยหมักผักตบชวาเป็นสับสเตรท ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Berg's mineral salts medium และน้ำกลั่นในการปรับความชื้นตั้งแต่ 50, 60, 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ปรับความชื้นร้อยละ 70 ด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว

ผลของความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ 50, 60, 70 และ 80) ต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท B□ แสดงไว้ในรูปที่ 20 และ 21 พบว่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลส และไซลาเนส สูงที่สุดเท่ากับ 0.62 และ 1.3□unit/g DW ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ □และ 5 ตามลำดับ หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ จะค่อยๆลดลง สับสเตรทที่มีค่าความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสต่ำสุด โดยมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 0.25 และ 0.52 unit/g DW ตามลำดับ ในส่วนของกิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้จากชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวในการปรับความชื้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในบางช่วงเวลาของการทดลอง กิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี

Berg's mineral salts medium ที่ปรับความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ และ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.36 unit/g DW และกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.79 unit/g DW



รูปที่ 20 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B□ ที่เพาะเลี้ยงในผักตบชวาต่อขุยมะพร้าว (13:1) ที่มีความชื้นต่าง ๆกัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 วัน (ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ (◆), 60 เปอร์เซ็นต์ (■), 70 เปอร์เซ็นต์ (▲), 80 เปอร์เซ็นต์ (●) และ ชุดควบคุมปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่น 70 เปอร์เซ็นต์ (○)

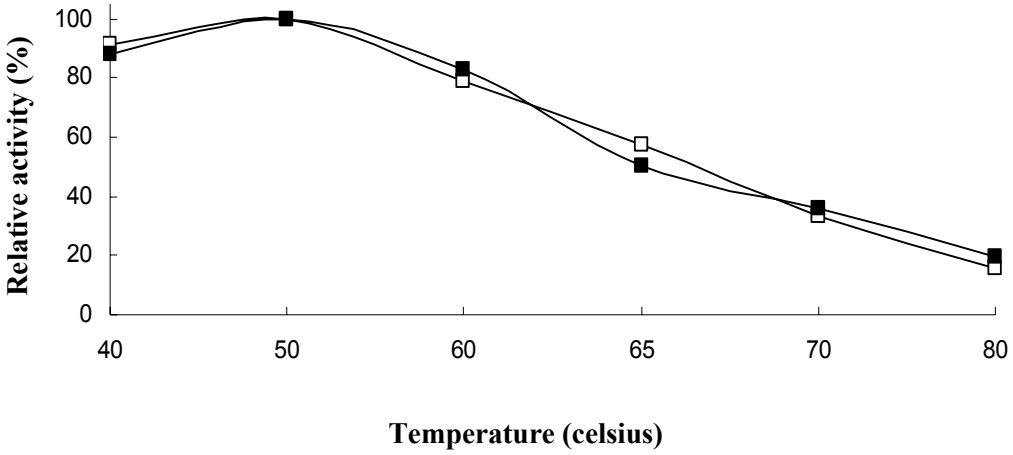


รูปที่ 21 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท B□ ที่เพาะเลี้ยงในผักตบชวาต่อขุยมะพร้าว (13:1) ที่มีความชื้นต่าง ๆกัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 วัน (ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ (◆), 60 เปอร์เซ็นต์ (■), 70 เปอร์เซ็นต์ (▲), 80 เปอร์เซ็นต์ (●) และชุดควบคุมปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่น 70 เปอร์เซ็นต์ (○)

2.3.9 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและ ไซลาเนส

เมื่อทำการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิต่างๆกัน พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมเอนไซม์ของเซลลูเลสและไซลาเนสสูงที่สุด เมื่อคิดค่า relative activity โดยเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 91.25 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสลดลงเหลือ 87.82 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสลดลงเหลือ 78.97 และ 83.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส มีค่าเท่ากับ 57.09 และ 50.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

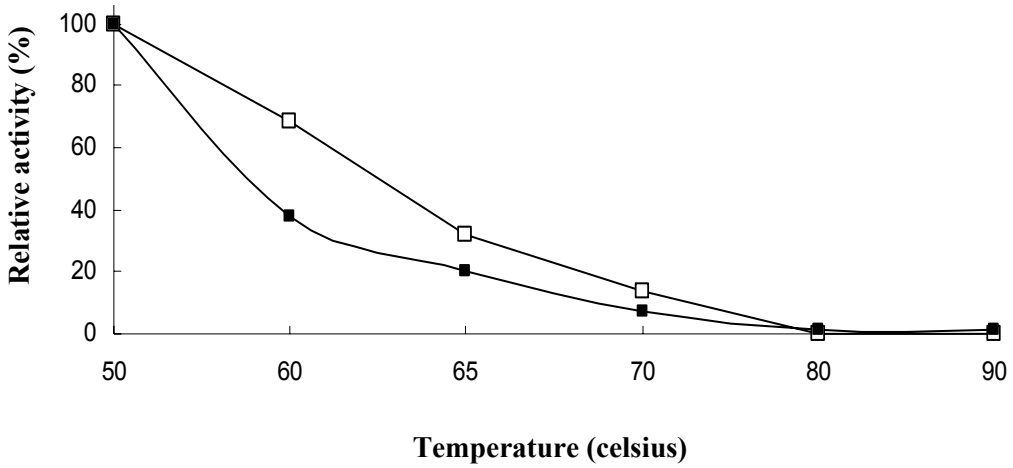
กิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียสมีค่าลดลงอย่างมากโดยที่ 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเป็น 33.19 และ 15.55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนที่ 80 องศาเซลเซียส กิจกรรมของทั้งสองเอนไซม์มีค่าน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานเอนไซม์เซลลูเลส (□) และไซลาเนส (■) ที่ผลิตโดยไอโซเลท B เมื่อบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 0 – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แสดงเป็นค่าสัมพัทธ์ (Relative activity) กับค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.3.10 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ (50 – 90 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการนำเอนไซม์บ่มกับสับสเตรทและตรวจวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จากไอโซเลท B□มีค่าคงที่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 23 แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 60 องศาเซลเซียสขึ้นไป ความเสถียรของเอนไซม์ลดลง มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเหลือ 68.□8 และ 37.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 13.65 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเอนไซม์เซลลูเลส และ 6.92 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเอนไซม์ไซลาเนส สำหรับอุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์



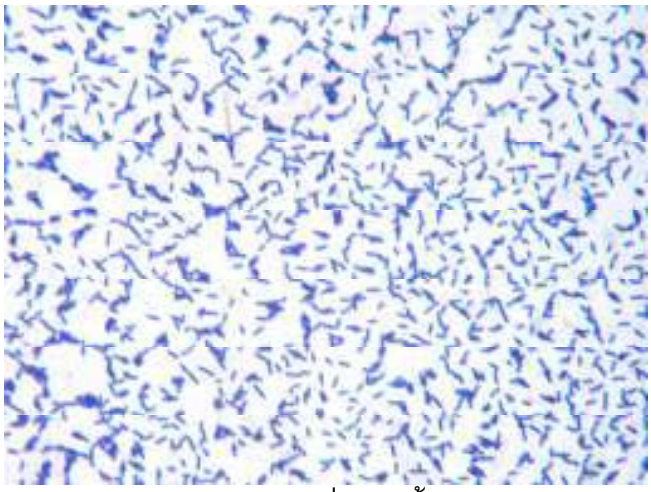
รูปที่ 23 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส (■) และไซลาเนส (□) ที่ผลิตโดย ไอโซเลท B□ เมื่อบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 50 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แสดงเป็นค่าสัมพัทธ์ (Relative activity) กับค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.4 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากการย้อมสีแกรมดูลักษณะสัณฐานวิทยาไอโซเลท B□ มีรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมบวก (รูปที่ 2□) อยู่แบบเดี่ยวๆ ซึ่งต่างจากเชื้อไอโซเลท B91 คือ มีลักษณะเป็นแท่ง กว้างสั้นกว่าไอโซเลท B□ เล็กน้อย (รูปที่ 25) และเรียงตัวแบบต่อเป็นเส้นสายสั้นๆ (โดยเฉลี่ยประมาณ 2 – 5 เซลล์ต่อ 1 เส้นสาย) การย้อมสีเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียที่มีอายุ 3 วัน ปรากฏ

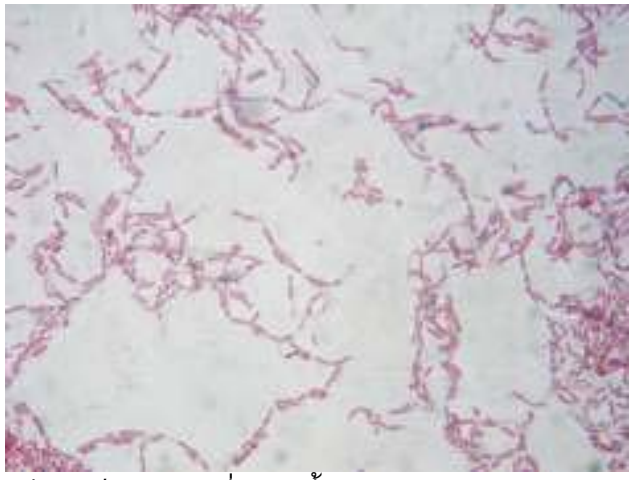
ว่าไอโซเลท B□ตำแหน่งสปอร์อยู่บริเวณเกือบส่วนปลายของเซลล์ แต่ไอโซเลท B91 ตำแหน่งสปอร์อยู่บริเวณตรงกลางของเซลล์ (รูปที่ 26 - 27)

โคโลนีของไอโซเลท B□ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร □SA เป็นเวลา 2□ ชั่วโมง มีลักษณะสีขาว ดูค่อนข้างแห้ง ขอบโคโลนีมีรอยหยัก ไม่เรียบ มีรูปเส้นบนโคโลนี (รูปที่ 28) แต่โคโลนี B91 มีสีขาวเช่นเดียวกัน แตกต่างจากไอโซเลท B□คือ ขอบค่อนข้างเรียบกว่า เยิ้มมันวาว และนูน ขนาดโคโลนีใหญ่กว่า B□เล็กน้อย (รูปที่ 29)



รูปที่ 24 ผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลท B□ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร □SA เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

รูปที่ 25 ผลการย้อมสีแกรมของไอโซเลท B91 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร □SA เป็นเวลา 16 ชั่วโมง



รูปที่ 26 ผลการย้อมสีสปอร์ของ B□ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร □SA เป็นเวลา 3 วัน

รูปที่ 27 ผลการย้อมสีสปอร์ของไอโซเลท B91 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร □SA เป็นเวลา 3 วัน

รูปที่ 28 ลักษณะโคโลนี B□ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร □SA เป็นเวลา 2□ชั่วโมง

รูปที่ 29 ลักษณะโคโลนี B91 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.5 การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ผลการเทียบเคียงชนิดของไอโซเลท B และ B91 โดยจากการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA sequence analysis โดยส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ KU – VEC OR ศูนย์พัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีรัฐร่วมเอกชน (ศรอ.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของ 16S rRNA gene พบว่า ไอโซเลท B มีลำดับเบสเหมือนกับ *Bacillus* sp. GGC-P1 และ ไอโซเลท B91 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Bacillus* sp. KD178 (ภาคผนวก จ)

ตารางที่ 9 ผลการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis

Sample Name	**Closets sequence**	**% similarity**	**Accession number**
B	*Bacillus* sp. GGC-P1 Length=1385 Score = 868 bits (962), Expect = 0.0 Gaps = 0/ 81 (0%) Strand=Plus/Plus	81/ 81 (100%)	FJ3 8028
B91	*Bacillus* sp. KD178 Length=706 Score = 868 bits (962), Expect = 0.0 Gaps = 0/ 81 (0%) Strand=Plus/Plus	81/ 81 (100%)	FJ227139

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าปุ๋ยหมักที่ประกอบด้วยผักตบชวา ขุยมะพร้าวและมูลสัตว์มีการเปลี่ยนลักษณะทางกายภาพ คือ ลักษณะของเนื้อปุ๋ยเปลี่ยนเป็นสีดำ เปื่อยยุ่ย มวลวัตถุมีขนาดเล็กลง ไม่มีกลิ่น เหมาะต่อการนำไปใช้

1.1 ผลการวัดอุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักผักตบชวา

กระบวนการย่อยสลายปุ๋ยหมักเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยจุลินทรีย์หลายชนิดประกอบกัน และเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สภาวะภายในกองปุ๋ยหมักเปลี่ยนแปลงไปตามขั้นตอน โดยระดับอุณหภูมิเปลี่ยนไป ทำให้ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์โดดเด่นแตกต่างกันออกไป

ในช่วงเวลาแรก กระบวนการย่อยสลายเศษพืชในกองปุ๋ยหมักเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ที่ย่อยสลายง่าย หรือสารประกอบที่ละลายน้ำได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน เมื่ออุณหภูมิในกองปุ๋ยหมักสูงเพิ่มขึ้นเกินกว่า 40 องศาเซลเซียส มีผลทำให้จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลางเริ่มลดลง เนื่องจากไม่สามารถเจริญเติบโตและดำรงชีวิตอยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูงเริ่มเจริญและเพิ่มปริมาณมากขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์พวกนี้ยังคงดำเนินกิจกรรมการย่อยสลายอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะสารประกอบที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ไซแลน เซลลูโลส และลิกนิน ในช่วงนี้สามารถตรวจพบเสมอว่าจุลินทรีย์ที่ดำรงชีพได้ในสภาพนี้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนินได้ดี (พิทยากร และ เสียงแจ๋ว, 2537)

อุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักเพิ่มสูงขึ้นภายใน 2 อาทิตย์แรกของการหมักและสูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 มีค่าเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในกองปุ๋ยหมักจะอยู่ในช่วง 40 – 70 องศาเซลเซียส ถ้าหากกองปุ๋ยหมักมีอุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียสขึ้นไป จุลินทรีย์บางชนิดอาจตายหรือมีการเจริญลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาเคมีและควบคุมอัตราเร็วของปฏิกิริยาชีวเคมี ซึ่งสภาพภูมิอากาศในฤดูร้อนมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายวัสดุเศษเหลือได้เร็ว (ศักดิ์สิทธิ์, 2531) Hassen *et al*. (2001) กล่าวว่า อุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส มีผลต่อการย่อยสลายของวัสดุเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic) และอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) ไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการสูญเสียความชื้นภายในกองปุ๋ยหมักด้วย จึงควร

ควบคุมอุณหภูมิในกองปุ๋ยหมักให้ต่ำกว่า 60 – 65 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Hamoda *et al*. (1998) ศึกษาอุณหภูมิเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการทำปุ๋ยหมักจากขยะชุมชนโดยควบคุมอุณหภูมิเริ่มต้นของการหมักต่างกัน (20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส) จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิเริ่มต้นเหมาะสมต่อการทำปุ๋ยหมัก คือ 40 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการย่อยสลายสูงสุด (12 เปอร์เซ็นต์ของสารอินทรีย์ทั้งหมด) ในวันที่ 12 ของการหมัก ส่วนอุณหภูมิ 20 และ 60 องศาเซลเซียส มีอัตราการย่อยสลายค่อนข้างช้า (4 และ 1.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

Tiquia *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในฤดูกาลต่างๆ ในการทำปุ๋ยหมักจากมูลสุกรที่ได้จากระบบ pig-on-litter (POL) system โดยการศึกษานี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ ในช่วงฤดูหนาว และในช่วงฤดูร้อนของประเทศฮ่องกง ในแต่ละชุดทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากการศึกษาพบว่า ชุดการทดลองที่ทำในช่วงฤดูร้อนเกิดกระบวนการหมักได้ดีและเข้าสู่ช่วงเสถียรเร็วกว่าชุดการทดลองที่ทำในช่วงฤดูหนาว ทั้งนี้เพราะช่วงฤดูร้อนมีอุณหภูมิสูงและเหมาะสมกว่าฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิต่ำ ปฏิกิริยาของกระบวนการหมักของชุดการทดลองในช่วงฤดูร้อนจึงเกิดได้ดีกว่า

การทดลองนี้ อุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักค่อนข้างต่ำ มีค่าไม่เกิน 40 องศาเซลเซียสแตกต่างจากผลจากการทดลองของ Sneh *et al*. (2005) ซึ่งผลิตปุ๋ยหมักโดยใช้ผักตบชวา โดยในช่วงเริ่มต้นของการทดลองมีอุณหภูมิประมาณ 28 – 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่วัดได้ในวันที่ 14 คือ 46 องศาเซลเซียส หลังจากวันนั้นอุณหภูมิค่อยๆ ลดลงตามลำดับ

โดยอุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักที่ต่ำอาจเนื่องมาจากกองปุ๋ยที่เล็กเกินไป ความชื้นเริ่มต้นของปุ๋ยหมักที่สูงหรือสภาพอากาศที่มีฝนตกชุกตลอดทำให้อุณหภูมิภายนอกเย็น

การกลับกองปุ๋ยหมักทุกๆสัปดาห์ เป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับกองปุ๋ยหมัก เพราะออกซิเจนมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก เชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจทำให้เกิดพลังงานและสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายวัสดุได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Diaz *et al*., 2002) และจะส่งผลให้อุณหภูมิสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการกลับกองปุ๋ยที่บ่อยเกินไปจะทำให้อุณหภูมิลดลง ซึ่งในการศึกษานี้ทำการกลับปุ๋ยทุก 2 สัปดาห์

1.2 การวัดความชื้นของกองปุ๋ยหมักผักตบชวา

ความชื้นมีความสำคัญต่อการเจริญและการทำกิจกรรมต่างๆของเชื้อจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวจะเป็นตัวช่วยในการย่อยสลายวัสดุเศษเหลือใช้ทางการเกษตร ในการทำปุ๋ยหมัก ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 50 – 70 เปอร์เซ็นต์ (Hamoda *et al*., 1998)

การที่กองปุ๋ยหมักมีความชื้นค่อยๆ ลดลง เนื่องจากการระเหยของน้ำแล้วยังเกิดจากกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ที่ต้องการน้ำในการเคลื่อนย้ายสารอาหารเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อสร้างเซลล์ใหม่และเพิ่มจำนวนเซลล์ (Kulcu and Yaldiz, 2004) แต่การทดลองนี้ตั้งแต่ระยะแรกจนถึงสิ้นสุดการหมัก เปอร์เซ็นต์ความชื้นยังคงค่อนข้างสูงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ อันเนื่องจากผักตบชวามีเส้นใยที่สามารถดูดซับน้ำได้ในปริมาณสูง ซึ่งอาจส่งผลต่ออุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักที่ไม่สูงมากนัก ทำให้ประสิทธิภาพการหมักไม่ดีเท่าที่ควร Vangnai (1985) รายงานว่าถ้ามีการย่อยสลายเศษพืชโดยไม่จำกัดระยะเวลาและไม่ให้สารตัวเร่งใดๆเลย เศษพืชจะย่อยสลายได้อย่างช้า แต่ต้องมีการให้น้ำเพื่อเพิ่มความชื้นให้เพียงพอต่อการทำงานของจุลินทรีย์ด้วย และถ้าต้องการให้มีการย่อยสลายเร็วในระยะเวลาอันจำกัด ก็อาจต้องมีการเติมสารตัวเร่งชนิดต่างๆลงไปในกองวัสดุเศษพืช ให้ความชื้นในกองเศษพืชประมาณ 50 – 70 เปอร์เซ็นต์ และมีการกลับกองปุ๋ยหมักทุก 5 – 7 วัน และงานวิจัยของ Finstein and Morris (1975) พบว่าลักษณะของวัสดุเหลือใช้ที่มีความหนาแน่นแตกต่างกัน มีผลต่อระดับความชื้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายของสารอินทรีย์ เช่น ถ้าสารอินทรีย์มีความหนาแน่นมาก ปริมาณเปอร์เซ็นต์ความชื้นภายในเส้นใยที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายคือ 50 – 60 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) ในพืชที่มีเส้นใยและมีความหนาแน่นน้อย ปริมาณความชื้นที่เหมาะสมอาจสูงถึง 80 – 85 เปอร์เซ็นต์ และถ้าความชื้นที่กองปุ๋ยหมักต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างช้าๆ

การทดลองนี้ ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยหมักที่ได้มีค่าความชื้นสูงกว่ามาตรฐานคุณภาพของปุ๋ยหมักซึ่งปุ๋ยกำหนดว่า ปุ๋ยหมักที่ดีควรมีความชื้นไม่เกิน 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (ปรัชญาและคณะ, 2540 อ้างโดย ธงชัย, 2546) ดังนั้น ควรมีการตากผักตบชวาให้ค่อนข้างแห้งก่อนนำมาทำปุ๋ยหมัก เพื่อให้ความชื้นเริ่มต้นต่ำ

2 การวิเคราะห์ทางเคมี

2.1 ผลการวัดพีเอช

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชภายในกองปุ๋ยหมักมีความสัมพันธ์ต่อการเจริญและกิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ การย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆเกิดขึ้นได้มากในช่วงพีเอช 6- 9 (Nakasaki *et al*., 1993) ในช่วงเริ่มต้นของการหมัก พีเอชของปุ๋ยหมักมีค่าประมาณ 7 จากนั้นค่าพีเอชมีการแปรเปลี่ยนอยู่ในช่วง 6.6 – 7.2 เมื่อทำการวัดพีเอชในสัปดาห์สุดท้ายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.91 แสดงว่ากองปุ๋ยหมักมีพีเอชได้มาตรฐาน ซึ่งพีเอชของกองปุ๋ยหมักควรอยู่ระหว่าง 6.0 – 7.5 (ธงชัย, 2546) ต่างกับการทดลองของ Huang *et al*. (2004) ผลิตปุ๋ยหมักจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยผสมมูลสุกร และขี้เลื่อยในอัตราส่วน 3:2 และ 4:1 (น้ำหนักสดต่อน้ำหนักสด) มีค่าพีเอชเริ่มต้น 7.9 และ 8.1 ตามลำดับ ควบคุมความชื้นอยู่ในช่วง 60 – 70 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการหมัก 63 วัน พีเอชสุดท้ายมีค่าเท่ากับ 7.6 และ 8.0 ตามลำดับ

การเพิ่มขึ้นและลดลงของพีเอชนั้นเป็นผลจากกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์ย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนถูกแปรสภาพเป็นแอมโมเนียโดยอาศัยกระบวนการแอมโมนิฟิเคชัน (ammonification) และกระบวนการแปรสภาพจากอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน (mineralization) ทำให้ค่าพีเอชของกองปุ๋ยหมักเพิ่มขึ้น (Huang *et al*., 2004)

2.2 การวิเคราะห์อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็นค่าที่บ่งบอกความยากง่ายของการย่อยสลายสารอินทรีย์ ซึ่งควรอยู่ในช่วงระหว่าง 25 – 35 สำหรับการเริ่มต้นหมักปุ๋ย (Thambirajah and Kuthubutheen, 1989; Hamoda *et al*., 1998)

ปริมาณคาร์บอนภายในกองปุ๋ยหมักมีความสัมพันธ์กับการเจริญและกิจกรรมต่าง ๆของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญ ส่งผลให้ปริมาณคาร์บอนของกองปุ๋ยหมักมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ โดยสัปดาห์แรกของการหมัก มีเปอร์เซ็นต์คาร์บอนเท่ากับ 33.29 และสัปดาห์สุดท้ายเปอร์เซ็นต์คาร์บอนลดลงเหลือ 29.71 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Huang *et al*. (2004) ที่ผลิตปุ๋ยหมักจากการผสมมูลสุกรและขี้เลื่อยในอัตราส่วน 3:2 และ 4:1 (น้ำหนักสดต่อน้ำหนักสด) มีปริมาณคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 47 และ 46 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการหมัก มีปริมาณคาร์บอนลดลงเหลือ 35 และ 30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แต่พบว่าปริมาณคาร์บอนในการศึกษาครั้งนี้ลดลงค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Huang *et al*. (2004)

ปริมาณไนโตรเจนภายในกองปุ๋ยหมักมีความสัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ใช้ไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อสร้างเซลล์ใหม่ กองปุ๋ยหมักที่ผ่านการหมักเรียบร้อยแล้ว ปริมาณไนโตรเจนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ (Ye and Thomas, 2001) การเพิ่มปริมาณของเซลล์ รวมทั้งการตายของจุลินทรีย์เนื่องจากเซลล์ของจุลินทรีย์มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ (Thambirajah *et al*., 1995 อ้างโดย ภานุพงศ์, 2548) แต่จากการทดลองนี้ ปุ๋ยหมักประกอบด้วยผักตบชวา ขุยมะพร้าวและ มูลสัตว์ สัปดาห์แรกมีปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมด เท่ากับ 1.89 เปอร์เซ็นต์ และสัปดาห์สุดท้ายเท่ากับ 1.64 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าปุ๋ยหมักมีปริมาณไนโตรเจนลดลง

เนื่องจากวัสดุที่ใช้ผลิตปุ๋ยหมักมีหลายชนิด การที่จะเลือกใช้วัสดุใดเป็นวัตถุดิบในการผลิตนั้น มีปัจจัยสำคัญในการพิจารณาหลายประการ เช่น ปริมาณธาตุอาหารเมื่อวัสดุสลายตัวแล้ว และความยากง่ายในการสลายตัว เพราะถ้าใช้วัสดุที่สลายตัวง่ายให้ธาตุอาหารสูงย่อมทำให้ได้ปุ๋ยหมักที่มีคุณภาพดีและใช้ได้รวดเร็ว ย่นระยะเวลาในการผลิต ความยากง่ายในการสลายตัวอาจพิจารณาจากอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน กล่าวคือ วัสดุที่มีอัตราส่วน

ของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ จะสลายตัวเร็วกว่าวัสดุที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง (ธันวดี, 2547)

ถ้าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนน้อยช่วยให้อัตราการย่อยสลายเร็วขึ้น ลดระยะเวลาการทำปุ๋ยหมักให้สั้นลง การหมักที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรส่วนใหญ่เป็นเศษพืช หรือการหมักที่ได้จากเศษวัสดุเหลือทิ้งจากชุมชนมีปริมาณเซลลูโลสอยู่มาก ซึ่งมีปริมาณสารประกอบไนโตรเจนทั้งในรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์น้อยจนไม่สมดุลกับปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน จึงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลาย สารอินทรีย์เป็นปัจจัยที่กำหนดระยะเวลาในการหมักเศษพืช เศษวัสดุ การส่งเสริมให้มีการย่อยสลายเป็นไปอย่างรวดเร็ว อาจมีเติมสารประกอบไนโตรเจนลงไป เช่น สารเคมี มูลสัตว์ เป็นต้น (เสียงแจ๋ว และ นวลจันทร์, 2537)

วัสดุที่ย่อยสลายยากมีโครงสร้างที่คงทนต่อการย่อยสลาย องค์ประกอบดังกล่าวได้แก่ ส่วนของเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างสูงในวัสดุที่ย่อยสลายยาก ส่วนประกอบหลักของเซลลูโลสและลิกนิน คือ ธาตุคาร์บอน ดังนั้นถ้าเปรียบเทียบปริมาณคาร์บอนในวัสดุที่ย่อยสลายง่ายและย่อยสลายยาก พบว่า มีปริมาณแตกต่างกันค่อนข้างชัดเจน กล่าวคือ ในวัสดุทางการเกษตรที่ย่อยสลายง่าย มีปริมาณคาร์บอนประมาณร้อยละ 49.07 (± 8.85) และวัสดุที่ย่อยสลายยากมีปริมาณคาร์บอนร้อยละ 57.15 (± 3.91) (ธันวดี, 2547) โดยผักตบชวาจัดเป็นพืชที่ย่อยง่าย มีปริมาณคาร์บอนประมาณร้อยละ 33

หากวัสดุทางการเกษตรที่ใช้ในการหมักปุ๋ยมีไนโตรเจนมากเกินไป ทำให้เกิดสภาวะความเป็นด่างเนื่องจากเกิดแอมโมเนียซึ่งจะพบมากในช่วงอุณหภูมิสูงและทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเนื่องจาก แก๊สแอมโมเนีย (De Bertoldi *et al*., 1983; Tiquia, 2002)

ในการศึกษานี้ ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน กลับพบว่ามีค่าที่สูงขึ้นจากสัปดาห์แรกมีค่าเท่ากับ17.61 แต่สัปดาห์สุดท้ายกลับเพิ่มขึ้นเป็น 18.12 ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในช่วง thermophilic phase อาจไม่สมบูรณ์ อันเนื่องมาจากอุณหภูมิในสัปดาห์ที่ 1 สูงสุดเพียง 40 องศาเซลเซียสนั้น หลังจากนั้นอุณหภูมิค่อยๆลดต่ำลง และค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นในการหมักยังไม่เหมาะสม จึงทำให้การย่อยสลายเพื่อให้เกิดปุ๋ยหมักไม่ดีเท่าที่ควร ไม่สอดคล้องกับ Huang *et al*. (2004) โดยผสมมูลสุกรและขี้เลื่อยในอัตราส่วน 3:2 และ 4:1 (น้ำหนักสดต่อน้ำหนักสด) ซึ่งอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของปุ๋ยหมักลดลงจาก 30:1 และ 15:1 เป็น 17:1 และ 9:1 ตามลำดับ

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของปุ๋ยหมัก ยังเป็นค่าบ่งชี้ถึงคุณภาพของปุ๋ยหมัก คือ ปุ๋ยหมักที่ดีต้องมีสัดส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนไม่สูงกว่า 20 : 1 (ปรัชญา และคณะ, 2540 อ้างโดย ธงชัย 2546) การทดลองนี้ ผลิตภัณฑ์สุดท้าย มีค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 17.12 ซึ่งต่ำกว่า 20 : 1 เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นปุ๋ยหมักที่ไม่มีผลเสียต่อพืช สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

3. การวิเคราะห์ทางชีวภาพ

3.1 ผลการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์

เนื่องจากอุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักมีค่าไม่สูงมาก ทั้งนี้อาจมาจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาณความชื้นในกองปุ๋ยหมักมีค่อนข้างสูง ทำให้ปริมาณออกซิเจนเข้าไปในกองปุ๋ยหมักน้อยลง ขนาดของกองปุ๋ยที่อาจยังไม่ใหญ่พอให้เกิดการเก็บความร้อน และสภาพแวดล้อมจากภายนอก ล้วนมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ภายในกองปุ๋ย จุลินทรีย์กลุ่ม mesophiles ทั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซีต มีจำนวนมากกว่ากลุ่ม thermophiles และจำนวนแบคทีเรียมีมากกว่าแอคติโนมัยซีต และเชื้อรา ทั้ง 2 กลุ่ม mesophiles และ thermophiles ตลอดการทดลอง ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียมีบทบาทที่สำคัญต่อการเริ่มกระบวนการย่อยสลายและสร้างความร้อนในกองปุ๋ยหมัก อันเนื่องจากระยะการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนที่เร็วกว่า แอคติโนมัยซีตและเชื้อรา รวมถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เอื้ออำนวยให้แบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตและดำเนินกิจกรรมภายในกองปุ๋ยหมักได้อย่างดี แม้ว่าในช่วงสัปดาห์แรกของการทดลองมีอุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Sneh *et al.* (2005) ที่พบว่า ในวันที่ 14 ของการหมักปุ๋ย จุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราในกองปุ๋ยหมักกลุ่ม thermophiles มีจำนวนมากกว่าจุลินทรีย์กลุ่ม mesophiles เพราะสัปดาห์แรกของการหมัก อุณหภูมิอยู่ในช่วง 28 – 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่อหมักไปถึงวันที่ 14 อุณหภูมิของปุ๋ยหมักจะสูงถึง 46 องศาเซลเซียส และการศึกษาของ ธันวดี (2547) พบว่าปริมาณ mesophilic microorganisms เริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 6.75×10^{7} – 1.23×10^{8} CFU/g ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้เศษอาหารเป็นวัสดุร่วมในการทำปุ๋ยหมัก โดยเศษอาหารเป็นวัสดุที่ย่อยสลายง่าย จึงทำให้ปริมาณ mesophillic microorganism ที่วัดได้มีปริมาณสูง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการหมัก ทั้งนี้เพราะในกองปุ๋ยหมักมีปริมาณธาตุอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการและสามารถนำไปใช้ได้ง่าย ทำให้มีปริมาณ mesophillic microorganisms เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่สำหรับปริมาณของ thermophillic microorganisms เพิ่มสูงขึ้นจากค่าเริ่มต้นในวันแรกของการหมักประมาณ 1×10^{2} – 1×10^{3} CFU/g เป็น 3.8×10^{13} – 2×10^{14} CFU/g ในวันที่ 14 ทั้งนี้เพราะมีปริมาณธาตุอาหารและอุณหภูมิที่สูงถึง 45.3 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของ thermophillic microorganisms ทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในระบบที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แล้วค่อยๆ ลดลงหลังวันที่ 21 ของการหมัก และงานวิจัยของ Hassen *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษา ยีสต์ เชื้อรา และ mesophilic bacteria ในกองปุ๋ยหมัก โดยทำการหมักปุ๋ยขนาด 1.5 x 2 x 3 เมตร ปรับความชื้นร้อยละ 50 พบว่าอุณหภูมิในวันแรก 40 องศาเซลเซียส เพิ่มสูงขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ เชื้อราและยีสต์ จาก 4.5×10^{6} cell/g waste dry weight (WDW) ใน 3 สัปดาห์แรก ลดลงเหลือ 6.3×10^{3} cell/g WDW ในช่วงอุณหภูมิสูง เมื่อสิ้นสุดระยะ thermophilic phase จำนวนเชื้อราและยีสต์

ลดลงเหลือ 2.6 x 10^3 cell/g WDW ในส่วน mesophilic bacteria จากช่วงเริ่มต้นของการหมักมีจำนวน 8.5 x 10^8 cell/g WDW ลดลงเหลือ 1.8 x 10^7 cell/g WDW ในสัปดาห์ที่ 9 แต่ในช่วง cooling phase จำนวน mesophilic bacteria เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เป็น 1.8 x 10^8 cell/g WDW

3.2 การศึกษาจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli*

วัสดุที่นำมาทำปุ๋ยหมักได้จากสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจมีเชื้อก่อโรคปนเปื้อนอยู่ด้วย การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นจุลินทรีย์ดัชนีบ่งบอกความปลอดภัยและคุณภาพของปุ๋ยหมัก ปุ๋ยหมักที่ปลอดภัยต้องตรวจไม่พบ *E. coli* จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียโคลิฟอร์มจากสัปดาห์แรกมีจำนวนค่อนข้างสูง และลดลงมากในสัปดาห์สุดท้าย ไม่พบแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มและ *E. coli* เมื่อสิ้นสุดการหมัก บ่งชี้ว่าปุ๋ยหมักน่าจะปราศจากเชื้อก่อโรค ปลอดภัยต่อการนำไปใช้ ซึ่งงานวิจัยของ Bjorn (2007) โดยนำปุ๋ยที่ทำจากมูลสัตว์และเศษอาหาร ใส่ในถังหมักขนาด 90 ลิตร ปรับอุณหภูมิมากกว่า 65 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการทดลอง พบว่าแบคทีเรียโคลิฟอร์มลดลง 5 log cycle ซึ่งอุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักมีส่วนสำคัญมากในการควบคุมเชื้อก่อโรค กองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงจะช่วยกำจัดเชื้อก่อโรคได้เป็นอย่างดี

3.3 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในตัวอย่างปุ๋ยหมัก

ในปุ๋ยหมัก ทั้งกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง สัมพันธ์กับจำนวนจุลินทรีย์และอุณหภูมิที่เกิดขึ้นภายในกองปุ๋ย จากนั้นจะค่อยๆลดลง เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจะย่อยสลายสับสเตรทที่อยู่ภายในกองปุ๋ยหมัก ผักตบชวาให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง และเกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงในช่วงอุณหภูมิสูง เนื่องจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ thermophiles ทำกิจกรรมต่อเนื่องจากจุลินทรีย์ mesophiles (Vesilind and Riaer, 1981) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เยาวลักษณ์ (2534) ศึกษาจำนวน mesophiles กับ thermophiles และกิจกรรมเอนไซม์ 3 ชนิด คือ protease, amylase และ cellulase ในปุ๋ยจากขยะชุมชนพบว่าจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายปุ๋ยจากขยะชุมชนมี 3 กลุ่ม คือ mesophiles, thermotolerance mesophiles และ thermophiles เอนไซม์ cellulase มีผลต่อการย่อยสลายในช่วงอุณหภูมิสูง (curing stage) หากเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง พบว่าปุ๋ยหมักผักตบชวาจากการทดลองครั้งนี้มีกิจกรรมเอนไซม์น้อยกว่า เช่นงานวิจัยของ Sneh *et al*. (2005) ศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากปุ๋ยหมักชนิดต่างๆ (กากอ้อยผสมกับมูลสัตว์เคี้ยวเอื้อง, เศษหญ้า, มูลสัตว์ปีกและผักตบชวา) เป็นเวลา 90 วัน พบว่าผักตบชวามีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสมากที่สุดโดยพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นในวันที่ 30 และ 60 ตามลำดับ (227 และ 127 mg sugar kg/dry matter/h)

3.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสบนอาหาร Carboxymethyl cellulose agar และ Xylan agar

ในขั้นตอนการหมักปุ๋ยหมักผักตบชวา มีจุลินทรีย์ทำการย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง และอาจจะมีผลิตภัณฑ์อื่นๆนอกเหนือจากการย่อยสลายเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและการเติบโตของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยผักตบชวาได้ ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผักตบชวา เมื่อนำจุลินทรีย์จากปุ๋ยหมักผักตบชวาแต่ละไอโซเลทมาคัดเลือกเบื้องต้นโดยทดสอบการย่อยสลาย CMC และไซแลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีโคโลนีที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 18 ไอโซเลท และผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 11 ไอโซเลท จุลินทรีย์ทั้งหมดคัดเลือกมาจากช่วงการหมักปุ๋ยในสัปดาห์ที่ 2 – 10 โดยคัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โดยมี degree of hydrolysis สูงมาทำการทดลองหากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส ขั้นต่อไป

3.5 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว

การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของเชื้อสามารถตรวจพบได้เมื่อเชื้อเริ่มมีการเติบโต โดยปริมาณการสร้างเอนไซม์เพิ่มหลังชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไป ซึ่งเป็นช่วงระยะ log phase การผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงโมงที่ 16 หลังจากนั้นค่อยๆลดลง แต่อย่างไรก็ตาม กิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้นจากไอโซเลทที่คัดเลือกแล้ว ยังมีปริมาณที่น้อย อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบในอาหารเหลวยังไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการทำงานของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ จึงนำสูตรอาหารเหลวอื่นๆ มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป โดยนำไอโซเลท B4 และ B91 มาทดสอบ

3.6 สูตรอาหารและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและ ไซลาเนส

จากผลการศึกษาสูตรอาหารและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อไอโซเลท B4 พบว่า เชื้อเจริญได้ดีในอาหารทุกสูตร ช่วงเวลาที่มีกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองมากที่สุดอยู่ในช่วง stationary phase (ชั่วโมงที่ 16) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณเอนไซม์ที่เกิดขึ้นน้อยมาก โดยเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าไม่เกิน 0.04 unit/ml และเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าไม่เกิน 0.09 unit/ml อาหารเลี้ยงสูตรที่ 1 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่นๆ อาจเป็นเพราะส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา อาหารแต่ละสูตร ประกอบด้วย

ตารางที่ 10 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส อาหารทุกสูตรใส่สับสเตรท CMC หรือ xylan 5 กรัม ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบ

สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
Bacto peptone 10 กรัม	Tryptone 10 กรัม	Tryptone 10 กรัม	peptone 5 กรัม
yeast extract 10 กรัม	yeast extract 10 กรัม	yeast extract 10 กรัม	yeast extract 5 กรัม
$MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัม	$MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัม	$MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัม	$MgSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม
	NH_4NO_3 0.4 กรัม		KH_2PO_4 1 กรัม
น้ำ 1 ลิตร	น้ำ 1 ลิตร	น้ำ 1 ลิตร	น้ำ 1 ลิตร

โดยสูตรอาหารที่ใช้ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Kapoor *et al.* (2007) (สูตร 4) ซึ่งทำการศึกษา การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ *Bacillus pumilus* strain MK001 โดยวิธีการเพาะเชื้อแบบ submerged fermentation โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 9 อัตราการเขย่าเชื้อ 200 รอบต่อนาที ผลปรากฏว่า เมื่อใช้ birch wood xylan และ oat spelt xylan ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1,190 และ 1,150 unit/ml ตามลำดับ

จากสูตรอาหารที่กล่าวมา สูตร 2 และ 3 มีส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมือนกัน ยกเว้นมี NH_4NO_3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 เมื่อทำเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจวัดหากิจกรรมเอนไซม์แล้ว ไม่พบความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ตลอดการทดลอง แสดงว่า NH_4NO_3 ไม่มีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไซลาเนสได้มากกว่าเดิม ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 มีการเพิ่ม KH_2PO_4 และ $MgSO_4$ ลงไปแต่ก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในกิจกรรมของเอนไซม์

ดังนั้นจึงเปลี่ยนวิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จากอาหารเหลวเป็นการเลี้ยงโดยใช้วัสดุทางการเกษตร เพื่อหากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากการเติบโตของจุลินทรีย์ต่อไป

3.7 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของจุลินทรีย์โดยใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นสับเสตรท

3.7.1 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของจุลินทรีย์ ไอโซเลท B4 และ B91 โดยใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นแหล่งสับเสตรท

ในการทดลองเลี้ยงไอโซเลท B4 และ B91 ในอาหารที่ประกอบด้วยผักตบชวา ขุยมะพร้าว ฟางข้าว และซังข้าวโพด พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสและไซลาเนสสูงสุดในช่วงประมาณวันที่ 5 – 7 โดยซังข้าวโพดซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าวัสดุทางการเกษตรชนิดอื่นๆ อาจเป็นเพราะ มีสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ คือมีค่าประมาณ 34.87

การที่ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสลดลงหลังจากเพิ่มถึงจุดสูงสุดแล้วอาจเนื่องจากปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ คือ เซลลูโลสและไซแลนในส่วนประกอบของผักตบชวาและฟางข้าว เริ่มมีปริมาณที่ลดลง ประกอบกับจำนวนจุลินทรีย์ คือ ไอโซเลท B4 และ B91 เริ่มมีปริมาณที่น้อยลง หลังจากช่วง log phase และ stationary phase ทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายผักตบชวาและฟางข้าวลดลงตามไปด้วย

3.7.2 เปอร์เซ็นต์ความชื้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ในวัสดุทางการเกษตร

ความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลอย่างยิ่งต่อการผลิตเอนไซม์โดยแบคทีเรีย ซึ่งการทดลองนี้ใช้ผักตบชวา 7 ส่วนต่อขุยมะพร้าว 1 ส่วน ปรับความชื้นด้วย Berg's mineral salts medium เป็น 50, 60, 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองสูงที่สุด อาจเป็นเพราะแบคทีเรียสามารถเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า Aw (Available water) สูง (บุษกร, 2545) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงเชื้อบนวัสดุทางการเกษตรที่ใช้น้ำกลั่น ปรับความชื้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Berg's mineral salts medium ให้กิจกรรมเอนไซม์ได้มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี Berg's mineral salts medium หากนำไอโซเลท B4 และ B91 ไปใช้จริงในกองปุ๋ยหมักจะเหมาะสมกับความชื้นของกองปุ๋ยหมัก เพราะกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่ามากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับความชื้น 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ Berg's mineral salts medium ที่ผสมในวัสดุทางการเกษตร มีส่วนช่วยในการเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้นของเชื้อไอโซเลท B4 และ B91 ส่งผลต่อการย่อยสลายสับสเตรทมากขึ้นตามไปด้วย Liang *et al*. (2003) ศึกษาการผลิตปุ๋ยหมักจากกากตะกอนชีวภาพ โดยศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง แต่ละชุดทดลองมีปริมาณความชื้น 30, 40, 50, 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ พบว่าชุดการทดลองที่มีความชื้น 50, 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์สูงกว่าชุดทดลองที่มีความชื้น 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์

3.7.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

จากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ของจุลินทรีย์โดยใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นสับสเตรท พบว่า โดยภาพรวม ไอโซเลท B4 ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า ไอโซเลท B91 จึงทำการคัดเลือก ไอโซเลท B4 มาศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของไอโซเลท B4 ในการย่อยเซลลูโลสและไซแลน พบว่าในช่วงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ส่วนที่อุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสมีค่าลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากบ่มที่อุณหภูมิมากกว่า 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองลดลงอย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับการทดลองของ สมภพ (2529) ทำการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus, Myceliophthora thermophila* และ *Trichoderma viride* มาทำการบ่ม กับสับสเตรทที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา *T. viride, A. fumigatus, M. thermophila* คือ 40, 50, 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และงานวิจัยของ Lee *et.al.* (2008) ได้ศึกษาการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus amyoliquefaciens* โดยใช้ข้าวเปลือกเป็นแหล่งสับสเตรท นำ crude enzyme ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus amyoliquefaciens* บ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่า relative activities ของเอนไซม์เซลลูเลส มีค่าเท่ากับ 65.9 $\pm$ 7.2, 76.3 $\pm$ 6.0, 86.9 $\pm$ 8.4, 100 $\pm$ 6.3, 96.2 $\pm$ 4.8, 84.1 $\pm$ 5.3 และ 72.3 $\pm$ 6.3 ตามลำดับ

อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีผลต่อการทำงานเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสอย่างมาก ค่าสัมพัทธ์เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างค่อนข้างมาก แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้ง 2 จากไอโซเลท B4 ทำงานได้ไม่ดีที่อุณหภูมิสูงๆ เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่ำ ปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรทดำเนินไปได้ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น ความเร็วของการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเพิ่มขึ้นจึงทำให้การสลายสับสเตรทให้ product เพิ่มสูงขึ้น เมื่อถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมจุดหนึ่งจะให้ product สูงสุด เมื่อเพิ่มปริมาณอุณหภูมิให้สูงขึ้นต่อไป product ที่ได้ลดลงเนื่องจากเอนไซม์เริ่มเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากความร้อนที่เพิ่มขึ้น (Segal, 1975)

เมื่อทำการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยบ่มเอนไซม์จากไอโซเลท B4 ที่อุณหภูมิ 50, 60, 65, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์จากไอโซเลท B4 ค่อนข้างเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 60 องศาเซลเซียสขึ้นไป ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลง และลดลงอย่างมากที่อุณหภูมิเกิน 70 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 13.65 เปอร์เซ็นต์สำหรับเอนไซม์เซลลูเลส และ 6.92 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ สมภพ (2529) เอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ประสิทธิภาพในการทำงานจะลดลงเรื่อยๆ จากอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และจะลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เมื่อถึงอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Lee *et al.* (2008) ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus amyoliquefaciens* บ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่า ค่า relative activity ที่อุณหภูมิ 50 – 70 มีค่ามากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส มีค่า relative activity น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์

4 การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้และการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา จุลินทรีย์ไอโซเลท B4 และ B91 ที่คัดเลือกได้คาดว่าเป็นเชื้อในจีนัส (Genus) *Bacillus* โดยดูลักษณะรูปร่างของโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษา จึงทำการวิเคราะห์ 16S rDNA sequence พบว่าไอโซเลท B4 คือ *Bacillus* sp. GGC-P1 และ ไอโซเลท B91 คือ *Bacillus* sp. KD178 ซึ่งการทดสอบครั้งนี้บอกได้เฉพาะจีนัสและรหัสของจุลินทรีย์ดังกล่าวเท่านั้นเนื่องจากเป็นการศึกษาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rRNA gene ซึ่งหลังจากการศึกษาเชื้อทั้ง 2 เพิ่มเติมแล้ว จะทำการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ได้ เมื่อสืบค้นข้อมูลเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ยังไม่มีฐานข้อมูลและงานวิจัยใดๆ ที่บ่งบอกลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสอง แต่หากกล่าวเฉพาะจีนัส *Bacillus* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบทั่วไปในธรรมชาติ รวมถึงกระบวนการทำปุ๋ยหมัก โดย *Bacillus* sp. ค่อนข้างพบในปริมาณมากกว่าพวกอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่ชอบอุณหภูมิสูง ได้แก่ *B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* ซึ่งเจริญได้ดีในช่วง 50 – 55 องศาเซลเซียส ในบางกรณีอาจถึง 65 องศาเซลเซียส (ธงชัย, 2546) จากงานวิจัยของ Mayende *et al.* (2006) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากกองปุ๋ยหมักในช่วงอุณหภูมิสูง เมื่อทำการหากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่า มีค่าน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 1.333 mg glucose/ml/min เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้มาบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis ไอโซเลทที่ได้คือ *Bacillus subtilis*

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

กระบวนการหมักปุ๋ยผักตบชวาร่วมกับขุยมะพร้าวและมูลสัตว์ เป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์ ทำให้ผักตบชวาเปลี่ยนสภาพเป็น ปุ๋ยหมักที่มีความร่วนซุย สีดำ ไม่มีกลิ่น จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มลดลง ไม่พบเชื้อ *E.coli* ปุ๋ยหมักมีค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 18 ค่าพีเอช ประมาณ 7 ซึ่งคุณลักษณะทั้งหมดนี้เหมาะแก่การนำไปใช้ในการเพาะปลูกอย่างมาก ยกเว้นเปอร์เซ็นต์ความชื้นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่าสูงเกินไป ซึ่งความชื้นที่สูงตลอดระยะเวลาการหมักอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการหมักไม่ดีเท่าที่ควร

อุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักมีค่าค่อนข้างต่ำตลอดเวลาการหมักปุ๋ย เกษตรกรควรเพิ่มขนาดกองปุ๋ยให้ใหญ่ขึ้นและตากผักตบชวาให้ค่อนข้างแห้งก่อนที่จะนำมาทำปุ๋ยหมัก นอกจากนี้สภาพอากาศในภาคใต้มีความชื้นสูง ฝนตกต่อเนื่อง เกษตรกรควรหมักปุ๋ยในโรงเรือนหรือคลุมกองปุ๋ยเพื่อไม่ให้ฝนชะล้างสารอาหารและลดอุณหภูมิที่เกิดขึ้นในกองปุ๋ย เนื่องด้วยอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อประชากรของจุลินทรีย์ ดังนั้นเพื่อให้กระบวนการหมักเป็นไปอย่างสมบูรณ์และรวดเร็ว ควรควบคุมสภาวะของกระบวนการหมักให้อุณหภูมิสูงมากกว่านี้ อุณหภูมิกองปุ๋ยหมักที่สูงยังช่วยเป็นการลดจำนวนเชื้อก่อโรคในกองปุ๋ยได้อีกด้วย

กลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดคือแบคทีเรีย รองลงมาคือ แอคติโนมัยซีตและรา ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียมีบทบาทที่สำคัญต่อการเริ่มกระบวนการย่อยสลายและสร้างความร้อนในกองปุ๋ยหมัก โดยจุลินทรีย์ทุกกลุ่มพบมากที่สุดในช่วง 1-2 สัปดาห์แรก และมีแนวโน้มลดลงตลอดกระบวนการหมัก

การเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของกองปุ๋ยหมักจะบ่งชี้ถึงการย่อยสลายของผักตบชวา ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 ของการหมักซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนประชากรจุลินทรีย์ที่พบมากในช่วง 2 สัปดาห์แรก โดยในสัปดาห์ที่ 2 น่าจะเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีกระบวนการเมแทบอลิซึมสูงสุด มีกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์เกิดขึ้นมากสุด ซึ่งค่าอุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักมีค่าสูงในสัปดาห์เดียวกันด้วย

จากการประเมินค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดบนอาหารแข็งที่มีเซลลูโลสหรือไซแลนเป็นสับสเตรท และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองในปริมาณสูงจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว สามารถคัดเลือกได้ 2 ไอโซเลท เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งโดยใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นสับสเตรท ไอโซเลท B4 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสสูงสุดเป็น 1.19 และ 2.54 Unit/g DW ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท B91 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

เซลลูเลสและไซลาเนสเป็น 1.38 และ 1.91 Unit/g DW ตามลำดับ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสสูงสุดจากเชื้อที่แยกได้ทั้ง 2 ไอโซเลทคือ ซังข้าวโพด รองลงมาคือ ฟางข้าว การใช้วัสดุทางการเกษตรที่เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะช่วยทำให้จุลินทรีย์มีกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สูงขึ้น เร่งการย่อยสลายที่ดีขึ้น ช่วยให้อุณหภูมิของกองปุ๋ยหมักสูงขึ้น และช่วยกำจัดเชื้อก่อโรคที่อาจปนเปื้อนมาในกองปุ๋ยหมักให้หมดไป นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสับสเตรทเพื่อผลิตเอนไซม์แทนการใช้สับสเตรททางการค้าที่มีมูลค่าสูง

ความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในวัสดุทางการเกษตรของไอโซเลท B4 คือที่ความชื้นเริ่มต้น 80 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสและไซลาเนสสูงสุด ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาคือ อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองคือที่อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิยิ่งสูงขึ้น ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์เริ่มลดลง

ชาวบ้านชุมชนอำเภอปากพนังได้ใช้ประโยชน์จากผักตบชวาที่มีอยู่มากและสร้างปัญหาในคลองชลประทาน ให้เกิดประโยชน์สูงสุด การทำปุ๋ยหมักผักตบชวาในปัจจุบันชาวบ้านได้ใช้ผักตบชวา มูลวัวหรือมูลไก่ ขุยมะพร้าว ซึ่งชาวบ้านยังต้องซื้อ มูลวัว และขุยมะพร้าว ที่มีราคาค่อนข้างแพงมาเป็นส่วนผสม ผลการศึกษาในครั้งนี้เสนอทางเลือกในการใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดอื่นที่สามารถหาได้ง่ายในชุมชนเช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว เพื่อทดแทนขุยมะพร้าวได้ โดยทั้งซังข้าวโพดและฟางข้าวเป็นสับสเตรทที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสสูง มีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่อนข้างสูง เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมัก นอกจากนี้ผักตบชวายังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี ช่วยให้เกษตรกรลดปริมาณการเติมมูลสัตว์ในปุ๋ยหมักเป็นการลดต้นทุนในการผลิตปุ๋ยได้

Bacillus spp. ที่แยกได้ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการทำปุ๋ยหมักผักตบชวา จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายที่เกิดจากการใช้และไม่ใช้หัวเชื้อทั้งสอง จากการศึกษาครั้งนี้ เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เมื่อทดสอบในอาหารที่ใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ เพื่อนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์มากยิ่งขึ้น ผลการศึกษาเรื่องปัจจัยต่างๆในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลในการพัฒนากระบวนการหมักปุ๋ยโดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านจุลชีววิทยาของชุมชนชาวบ้านอำเภอปากพนังเพื่อให้มีคุณภาพดียิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

กรมพัฒนาที่ดิน. 2550. การถ่ายทอดเทคโนโลยี. ใน ชุดความรู้และเทคโนโลยีการพัฒนาที่ดิน. สำนักนิเทศและถ่ายทอดเทคโนโลยีการพัฒนาที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ หน้า 1-2.

ฉวีวรรณ เหลืองวุฒิโรจน์. 25□1. การประเมินประสิทธิภาพการย่อยสลายเศษพืชของเชื้อจุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ กรุงเทพฯ.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2545. แบคทีเรียโคลิฟอร์ม. จุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาชีววิทยา โครงการผลิตเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ: สงขลา.

ธาตรี ลีธีระประเสริฐ. 25□2. ปุ๋ยหมักจากเศษพืช. วารสารอุตสาหกรรม. □2(9): 2□– 29.

ธงชัย มาลา และ อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์. 2541. การปรับปรุงดินโดยใช้ปุ๋ยหมัก. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

ธงชัย มาลา. 2546. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

ธันวดี ศรีธาวิรัตน์. 2547. การศึกษากระบวนการทำปุ๋ยหมักจากเศษอาหารร่วมกับเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก.

นภารัตน์ ไวยเจริญ. 2544. การทำปุ๋ยหมักของมูลฝอยจากตลาดสดในเขตเทศบาลนครหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

พิทยากร ลิ่มทอง และ เสียงแจ๋ว พิริยพฤนต์. 25□7. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายและประโยชน์บางประการในการกองปุ๋ยหมัก. ใน กลุ่มอินทรียวัตถุและวัสดุเหลือใช้. คู่มือ

เจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องการปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ. กองอนุรักษ์ดินและน้ำ กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ หน้า 59 – 69.

พิทยากร ลิ่มทอง และ เสียงแจ่ว พิริยพฤนต์. 2540. การผลิตปุ๋ยหมักแบบไร่นา กลุ่มอินทรียวัตถุและวัสดุเหลือใช้. คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องการปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ. กองอนุรักษ์ดินและน้ำ กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ หน้า 14-28.

ภาวนา ลิกขนานนท์ และ สมศักดิ์ วังใน. 25□9. การทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักที่ผลิตโดยใช้ EM (โบกาฉิ) โดยเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ. วิทยาสารเกษตรศาสตร์. □0(5): 121-127.

เยาวลักษณ์ จันดาวงศ์. 25□4. การศึกษาทางจุลชีววิทยาจากขยะชุมชนกรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะพลังงานและวัสดุ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ยุพิน บุระคำ. 2544. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลักในปุ๋ยหมักผักตบชวาและปุ๋ยหมักกากตะกอนอ้อย. รายงานการวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม: มหาสารคาม หน้า 66.

วิไลลักษณ์ สกุลกรุณา. 25□4. ปุ๋ยหมักและการใช้ประโยชน์ เกษตรก้าวหน้า. 6(5): 14 – 16.

ศักดิ์สิทธิ์ ศรีวิชัย. 25□1. ปุ๋ยหมัก. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน: กรุงเทพฯ. หน้า 71.

สมศักดิ์ วังใน. 2521. ปุ๋ยอินทรีย์. สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น): กรุงเทพฯ. หน้า 77.

สมศักดิ์ วังใน. 25□8. การใช้ปุ๋ยอินทรีย์. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : กรุงเทพฯ. หน้า 8□.

สมศักดิ์ วังใน ภาวนา ลิกขนานนท์ และ เย็นใจ วสุวัต. 25□9. การศึกษาเปรียบเทียบการใช้ EM และจุลินทรีย์อื่นๆผลิตปุ๋ยหมัก. วิทยาสารเกษตรศาสตร์. □0(5): 110-120.

สมภพ สุวรรณรัฐ. 2529. เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus, Myceliopthora thermophila* และ *Trichoderma viride* บนอาหารแข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.

สมพร ตั้นสกุล. 2548. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเนสและขับออกนอกเซลล์. ใน คู่มือปฏิบัติการเอนไซม์ของจุลินทรีย์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: สงขลา หน้า 1 – .

สรสิทธิ์ วัชโรทยาน วิสุทธิ์ วีรสาร อิทธิสุนทร นันทกิจ นิภา พณาพิทักษ์กุล สมชาย กรีฑาภีรมย์ และ สุริยา สาสนรักกิจ. 2540. การใช้ผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีอยู่ในประเทศไทยให้เกิดประโยชน์ในการใช้เป็นปุ๋ยและวัสดุบำรุงดิน. โครงการวิจัยและแนะนำทางเทคโนโลยีของดินและปุ๋ย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

สุพจน์ แสงประทุม และ สุนทร พูนพิพัฒน์. 2527. การศึกษาการผลิตปุ๋ยหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับเศษอินทรียวัตถุเหลือใช้บางประเภทในเขตลาดกระบัง. วารสารเพื่อนเกษตร. 11(2): 28- 5.

เสียงแจ่ว พิริยพฤนต์ และ นวลจันทร์ ภาสดา. 25 7. ปัจจัยที่ควบคุมอัตราการย่อยสลายในกองปุ๋ยหมัก. ใน การปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ กองอนุรักษ์ดินและน้ำ กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ หน้า 50 – 62.

สุกัลยา พลพิมพ์ และ ปารวี สิงห์ยะบุศย์. 2542. การศึกษาคุณลักษณะน้ำทิ้งจากหอพักหญิงสถาบันราชภัฏมหาสารคามที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของผักตบชวา. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม มหาสารคาม.

อรลัดา บุญแสน. 25 7. การศึกษาการสร้างเอนไซม์จากจุลินทรีย์อุณหภูมิสูงแยกได้จากปุ๋ยหมักขยะชุมชน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

Abbasi, S.A. and Ramasamy, E.V. 1999. Biotechno ogica method of po ution contro . In: Hyderabad. Orient Longman. pp. 168.

Abdelhamid, A.M. and Gabr, A.A. 1991. Evaluation of water hyacinth as feed for ruminants. Archives of Animal Nutrition. 41: 745-756.

Aweke, G. 199. The water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Ethiopia. Bulletin des séances. Academie royale des Sciences d'outre – mer, Brusse s. 9( ): 99 – 404.

AWWA. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater 21st ed. American Journal of Public Health: Washington. D.C.

Ayers, P.G. and Boddy, L. 1986. Water, fungi and plants. Cambridge University Press: London.

Babu, M.R., Sajeena, A. and Seetharaman. K. 200. Bioassay of the potentiality of *Alternaria alternata* (Fr.) keisseler as a bioherbicide to control water hyacinth and other aquatic weeds. Crop Protection 22: 1005 – 101.

Bailey, J.E. and Ollis, D.F. 1977. Biochemical engineering fundamentals: McGrew-Hill: 47-482.

Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W.and Schleifer, K.H. 1992. The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria. Springer – Verlag: New York.

Barrett, S.C.H. 1980. Sexual reproduction in *Eichhornia crassipes* (water hyacinth): Seed production in natural population. Journal of Applied Soil Ecology. 17: 11 – 124.

Berg, B., Hofstan, B.V. and Petterson, B. 1972. Growth and cellulase formation by *Celluvibrio fulvus*. Journal of Applied Bacteriology. 5: 246-248.

Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G. and Marchiani, M. 1996. Isolation of *Thermus* strains from hot compost. Applied and Environmental Microbiology. 62 : 1723 – 1727.

Bjorn, V. 2007. Comparison of composting, storage and urea treatment for sanitizing of faecal matter and manure. Bioresource Technology. 98: 3117 – 3121.

Boenz, S., Omran, H. and Gierschner, K. 1990. Treatment of water hyacinth tissue to obtain useful products. Biological Wastes. 33(4): 263 – 274.

Carina, C.G. and Cecilia, M.P. 2007. Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production. Waste Management. 27: 117 – 129.

Carroll, G.C. and Wicklow, D.T. 1992. The fungal community: Its organization and the role in the ecosystem. 2nd Edn. Maree Dekker: New York .

Center, T.D. 1994. Biological control of weeds: water hyacinth and water lettuce (Chapter 2). In: Rosen, D., Bennett, F.D., Capinera, J.L. (Eds.), Pest Management in the Subtropics : Biological Control – a Florida Perspective. Intercept Publishing Company, Andover, UK. pp. 481 – 521.

Chanakya, H.N., Borgaonkar, S., Meena, G. and Jagadish, K.S., 1992. Solid phase biogas production with garbage or water hyacinth. Bioresource Technology. 46: 227-231.

Chen, P.J., Wei, T.C., Chang, Y.T. and Lin, L.P. 2004. Purification and characterization of carboxymethylcellulose from *Sinorhizobium fredii.* Botanical Bulletin of Academia Sinica. 45: 111-118.

Chino, M., Kanazaua, S., Mori, T., Araragi, M. and Kanke, B. 1963. Biochemical studies on composting of municipal sewage sludge mixed with rice hull. Soil Science and Plant Nutrition. 29(2): 159 – 173.

Cook, C.D. 1990. Origin, autoecology and spread of some of the world's most troublesome aquatic weeds. The Ecology and Management of Nuisance Aquatic Vegetation. Oxford University Press: Oxford, UK.

Costa, R.H.R., Bavaresco, A.S.L., Medri, W. and Philippi, L.S. 2000. Tertiary treatment of piggery wastes in water hyacinth ponds. Water Science Technology. 42: 211 – 214.

Crisan, E.V. 197. Current concept of thermophilism and the themophilic fungi. Mycologia. 65: 1171 – 1198.

De Bertoldi, M., Vallini, G. and Pera, A. 198. The biology of composting. Waste Management Research. 1: 157 – 176.

Diaz, M.J., Madejon, E., Lopez, F., Lopez, R. and Cabrera, F. 2002. Optimization of the rate vinasse/grape mare for co-composting process. Process Biochemistry. 7: 114 – 1150.

Dix, N.J. and Webster, J. 1995. Fungal ecology. Chapman and Hall. London. pp 1 – 499.

Enari, T.M. 198. Microbial cellulases. Applied Science Publishers: London and New York.

Epstein, P. 1998. Weeds bring disease to the east African waterways. Lancet. 51: 577.

Finstein, M.S. and Morris, M.L. 1975. Microbiology of municipal solid waste composting. Advances in Applied Microbiology. 19: 11 -151.

Frankland, J.C., Hedger, J.N. and Swift, M.J. 1982. Decomposer basidiomycetes : Their biology and ecology. Cambridge University Press: Cambridge.

Garret, S.D. 1951. Ecological groups of soil fungi : A survey of substrate relationships. New Phytologist. 50: 149 – 166.

Gil, J.C., Ceppi, S.B., Velasco, M.I., Polo, A. and Senesi, N. 2004. Long-term effect of amendment with municipal solid waste compost on the elemental and acidic functional group composition and pH-buffer capacity of soil humic acids. Geoderma. 121: 15-142.

Goodfellow, M., Lacey, J. and Todd, C. 1987. Numerical classification of thermophilic streptomycete. Journal of General Microbiology. 1 : 15 – 149.

Gunnarsson, C., Mattasson, C., 1997. Water hyacinth – trying to turn an environmental problem into an agricultural resource. MFS – Report No. 25, Swedish University of Agriculture: Uppsala.

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

Heard, T.A. and Winterton, S.L. 2000. Interactions between nutrient status and weevil herbivory in the biological control of water hyacinth. Journal of Applied Ecology 7: 117 – 127.

Hamoda, M.F., Qdais, H.A. A. and Newham, J. 1998. Evaluation of municipal soil waste composting kinetics. Resource Conservation and Recycling. 2 : 209-22 .

Horwitz, W., 1997. Thermo Finnigan Flash 1112 series, Method 972.4 . In: Latimer, G.W.J. (ed.), Official Method of Analysis of AOAC International, 16th ed. AOAC International, Virginia, USA.

Huang, G.F., Wong, J.W.C., Wu, Q.T. and Nagar, B.B. 2004. Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. Waste Management. 24: 805 – 81 .

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

Julien, M.H. and Griffiths, M.W. 1998. Biological control of weeds, In: A world catalogue of agent and their target weeds, 4th ed. Wallingford. pp 22

Kapoor, K., Lavanya, M.N. and Ramesh, C.K. 2007. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora.* Biochemical Engineering Journal. 8: 88 – 97.

Kayhanian, M., and Tchobanoglous, G. 199. Characteristics of humus produced from an anaerobic composting of the biodegradable organic fraction of municipal solid waste. Environmental Science and Technology. 14: 1 -14.

Korn-Wendisch, F. and Kutzner, H.J. 1992. The family Streptomycetaceae. In : the prokaryotes – a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag. New York. pp 921 – 995.

Kucu, R. and Yadiz, O. 2004. Determination of aeration rate and kinetics of composting some agricultural wastes. Bioresource Technology. 9 : 49 -59.

Kutzner, H. J. 2000. Composting of plant residues and waste plant materials. Biotechnology. 11: 5 – 100.

Lacey, J. 1980. Colonization of damp organic substrate and spontaneous heating in microbial growth and survival in extreme of environment. Applied and Environmental Microbiology. 15: 5 -70.

Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, K.L., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C. and Lee, J.W. 2008. Purification and characterization of cellulose produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL- utilizing rice hull. Bioresource Technology. 99: 78- 86.

Liang, C., Das, K.C. and McClendon, R.W. 2003. The influence of temperature and moisture content regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids compost blend. Bioresource Technology. 86: 131 – 137.

Maiga, A.M. 2001. Preliminary assessment of the social, economic and environmental impact of water hyacinth in the Lake Victoria basin and the status of control. In: Julien, M.H., Hill, M.P. and Jianqing, D. (eds) procedding of the second meeting of global working group for the biological and integrated control of water hyacinth, Beijing, China, 9-12 october 2000, pp 110 – 119.

Mayende, L., Wheale, B.S. and Pletschke, B.I. 2006. Cellulase (CMCase) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. Isolate from compost. Soil Biology and Biochemistry. 38: 2962-2966.

McKinley, V.L. and Vestal, J.R. 1984. Biokinetic analyses of adaptation and succession: microbial activity in composting municipal sewage sludge. Applied and Environmental Microbiology. 47: 933-941.

Methy, M., Alpert, P. and Roy, J. 1990. Effects of light quality and quantity on growth of the clonal plant *Eichhornia crassipes.* Occologia. 84: 184 – 188.

Mironga JM. 2004. Geographic information systems (GIS) and remote sensing in the management of shallow tropical lake. Applied Ecology and Environmental Research. 2: 81 – 102.

Mondini, C., Chiumenti, R., Da. Borso F., Leita, L. and De. Nobili, M. 1996. Changes during process in the organic matter of composted and air dried poultry manure. Bioresource Technology. 55 (3): 241 – 249.

Mouchacca, J. 1995. Thermophilic fungi in desert soils: A neglected extream environment, In : Microbial Diversity and Ecosystem function. CAB International. Wallingford. UK: pp 265 – 288.

Nakasaki, K., Yaguchi, H., Sasaki, Y. and Kubota, H. 199 . Effect of pH on composting of garbage. Waste Management Research. 11(2): 117 – 125.

Ne son, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of g ucose. Journa of Bio ogica Chemistry. 15 : 75- 80.

Nigan, J.N. 2002. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemice u ose acid hydro ysate to motor fue ethano by xy ose–fermenting yeast. Biotechno ogy. 97: 107–116.

O ivares, E. and Co onne o, G. 2000. Sa inity gradient in the Manamo River, a dammed distributary of the Orinoco De ta, and its inf uence on the presence of *Eichhornia crassipes* and *Paspalum repens.* Interciencia . 25: 242 – 248.

Poddar, K., Manda , L., Banerjee, G.C. 1991. Studies on water hyacinth – Chemica composition of the p ant and water from different habitate. Indian Veterinary Journa . 68: 8 – 8 7.

Po prasert, C., Kongsricharoern, N. and Kanjanaprapin, W. 1994. Production of feed and ferti izer from water hyacinth p ants in the tropics. Waste Management Research. 12: -11.

Po prasert, C., Wangsuphachart, S., Muttamara, S., 1980. Composting nightsoi and water hyacinth in the tropica . Compost Science/Land Uti ization. 2: 21.

Verma, R., Singh, S.P. and Ganesha Raj, K. 200 . Assessment of changes in water hyacinth coverage of water bodies in northern part of Banga ore city using tempora remote sensing data. COCIS. 2 : 792 – 804.

Ram, S. and Moo ani, M.K. 2000. Herbicida weed contro of water hyacinth under semi – arid conditions. Pesto ogy. 24: 69 – 71.

Rogalski, J., Szezodark, J., Dawidowicz, A., Ikczuk, Z. and Leonowise, A. 1985. Immobilization of cellulase and D-xylanase complexes from *Aspergillus terreus* F-41 on controlled porosity glasses. Enzyme Microbiology. Technology. 7: 395 – 400.

Schulze, K.L. 1962. Continuous thermophilic composting. Applied Microbiology. 10 (2): 108 – 122.

Segal, I.H. 1975. Enzyme Kenetic : Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady – state enzyme system. John Wiley and Sons: New York.

Smith, L.W., Williams, R.E., Shaw, M. and Green, K.R. 1984. A water hyacinth eradication campaign in New South Wales, Australia,. In: Thyagarajan, G., (Eds.), Proceeding International conference. water hyacinth. Nairobi. pp 925 – 935.

Sneh, G., Dhul, S.K. and Kapoor, K. K. 2005. Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity. Bioresource Techology. 96: 1584 – 1591.

Somogyi, M. 1952. Notes in sugar determination. Journal of Biological chemistry. 195: 19-23.

Stoffella, P.J. and Kahn, B.A. 2001. Compost utilization in horticultural cropping system. Lewis Publisher: New York.

Strom, P.E. 1985. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid waste composting. Applied and Environmental Microbiology. 50: 899 – 905.

Suler, D.J. and Finstein. M.S. 1977. Effect of temperature, aeration, and moisture on CO_2 formation in bench – scale, continuosly thermophilic composting of solid waste. Applied and Environmental Microbiology. 1: 345 – 350.

Sun, W.H., Yu, S.W., Yang, S.Y., Zhao, P.W., Yu, Z.W. and Wu, H.M. 199 . A e ochemica s from root exudates of water hyacinth. Acta Phytophysio ogy Sinica. 19: 92 – 96.

Thambirajah, J.J. and Kuthubutheen, A.J. 1989. Composting of pa m press fiber. Bio ogica Wastes. 27: 257 – 269.

Thambirajah, J.J., Zu kif i, M.D. and Hashim, M.A. 1995. Microbio ogica and biochemica changes during the composting of oi pa m empty fruit bunches; effect of substrate. Bioresource Tehno ogy. 52: 1 – 144.

Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y. and Hodgkiss, I.J. 1996. Microbia activities during composting of spent pig-manure sawdust itter at different moistures content. Bioresource Techno ogy. 55: 201 – 206

Tiquia, S.M. 2002. Microbia transformation of nitrogen during composting. In: Microbio ogy of composting and other biodegradation process. Springer-Ver ag, Ber in, Heide berg. pp. 2 7 – 245.

Tripathi, B.D. and Upadhyay, A.R. 200 . Dairy eff uent po ishing by aquatic macrophytes. Water Air and Soi Po ution. 14 : 77 - 85.

Vangnai, S. 1985. Composting, soi , water, cropping systems research data bases re evant to rainfed agricu ture in northeast Thai and. Department of soi . Kasetsart University. 1711 – 1718.

Vesi ind, P.A. and Rimer, A.E. 1981. Unit operation in resource recovery engineering. Printice Ha . Er C iffs. NJ.

Verma R., Singh S.P, and Ganesha R.,K. 200 . Assessment of changes in water hyacinth coverage of water bodies in northern part of Banga ore city using tempora remote sensing data. Current Science. 20 : 792-804.

Wilson, J.R., Holst, N. and Rees, M. 2005. Determinants and patterns of population growth in water hyacinth. Aquatic Botany. 81: 51 – 67.

Ye, W.R. and Thomas, N.S. 2001. Microbial nitrogen cycles : physiology, genomics and applications. Current Opinion in Microbiology. 4: 07 – 12.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

Lauryl Tryptose Broth (LTB)

- Tryptose 20 g
- Lactose 5 g
- Dipotassium phosphate 2.75 g
- Monopotassium phosphate 2.75 g
- Sodium chloride 5 g
- Sodium lauryl sulfate 0.1 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Brilliant Green Lactose Broth (BGLB)

- Peptone 10 g
- Lactose 10 g
- Oxgall 20 g
- Brilliant green 0.0133 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

EC medium

- Trypticase or tryptose 20 g
- Bile salts 1.5 g
- Lactose 5 g
- K_2HPO_4 4 g
- KH_2PO_4 1.5 g
- NaCl 5 g

- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Eosin Methylene Blue agar (EMB)

- Beef extract 3 g
- Peptone or gelysate 10 g
- NaCl 5 g
- Agar 15 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Nutrient agar slant (NA)

- Beef extract 3 g
- Peptone 5 g
- Agar 15 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Nutrient broth (NB)

- Beef extract 3 g
- Peptone 5 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Tryptone broth

- Tryptone or trypticase 10 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

MR – VP broth

- Polypeptone or buffered peptone 7 g
- K_2HPO_4 5 g
- Glucose 5 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Simmon's Citrate Agar

- Sodium citrate 2 g
- NaCl 5 g
- $MnSO_4$ 0.2 g
- $NH_4H_2PO_4$ 1 g
- K_2HPO_4 1 g
- Bromthymol blue 0.08 g
- Agar 15 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Tryptic Soy Agar (Soybean-Casein Digest Agar)

- Pancreatic digest of casein 15 g
- Papaic digest of soybean 5 g
- Sodium chloride 5 g
- Agar 15 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Rose Bengal Agar Base

- Papaic digest of soybean mal 5 g
- Dextrose 10 g
- Monopotassium phosphate 1 g
- Magnesium sulphate 0.5 g
- □ose bengal 0.05 g
- Agar 15 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Actinomycete Isolation Agar

- Sodium caseinate 2 g
- Asparagine 0.1 g
- Sodium propionate 4 g
- Dipotassium phosphate 0.5 g
- Magnesium sulfate 0.1 g
- Ferrous sulfate 0.001 g
- Agar 15 g
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Carboxymethyl Cellulose / Xylan Agar

- Yeast extract 0.8 g
- Peptone 2 g
- Magnesium sulfate 0.2 g
- Sodium chloride 0.2 g
- Calcium chloride 0.06 g
- Agar 8 g

- Carboxymethylcellulose /xylan 0.8 g
- Distilled water 400 ml

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Berg's mineral salts medium

- $NaNO_3$ 0.2 %
- K_2HPO_4 0.05 %
- $MgSO_4 . 7H_2O$ 0.02 %
- $MnSO_4 . 4H_2O$ 0.002 %
- $CaCl_2 . 2H_2O$ 0.002 %
- Bacto peptone 0.1 %
- Yeast extract 0.1 %
- Distilled water 1 liter

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ตารางที่ 11 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตหากิจกรรมเอนไซม์

สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
Bacto peptone 10 กรัม	Tryptone 10 กรัม	Tryptone 10 กรัม	peptone 5 กรัม
yeast extract 10 กรัม	yeast extract 10 กรัม	yeast extract 10 กรัม	yeast extract 5 กรัม
$MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัม	$MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัม	$MnSO_4.4H_2O$ 0.05 g	$MgSO_4. 7H_2O$ 0.1 กรัม
	NH_4NO_3 0.4 กรัม		KH_2PO_4 1 กรัม

*ทุกสูตรใช้ CMC หรือ xylan 5 กรัม, น้ำ 1 ลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมกันแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ปรับความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ภาคผนวก ข
สารเคมี

Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4

- NaCl 7.650 g
- Na_2HPO_4, anhydrous 0.724 g
- KH_2PO_4 0.210 g
- Distilled water 1 liter

นำสารเคมีทั้งหมดผสมกัน ทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความร้อน 121°C นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Kovac's reagent

- Para – dimethylaminobenzaldehyde 5 g
- Butyl alcohol 75 ml
- Hydrochloric acid concentrate 20 ml

ละลาย Para – dimethylaminobenzaldehyde จนหมดใน Butyl alcohol เติมกรด Hydrochloric acid concentrate ซ้ำๆ คนสารละลายตลอดเวลา จะได้น้ำยาสีเลืองอ่อน (ถ้าน้ำยาเป็นสีน้ำตาลเข้มห้ามนำมาใช้) ให้เก็บน้ำยาในตู้เย็น

Alpha – nepthol solution

- Alpha – nepthol 6 g
- Ethanol, 95% 100 ml

ละลายสารทั้ง 2 ชนิดให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชา

Potassium hydroxide (KOH)

- KOH 40 g
- Distilled water 100 ml

นำสารทั้งสองมาผสมกันแล้วเก็บในขวดสีชา

Methyl red solution

- Methyl red 0.10 g
- Ethanol, 95% 300 ml
- Distilled water 200 ml

นำ Methyl red มาละลายใน Ethanol, 95% จากนั้นมาผสมใน Distilled water

การเตรียม Acetate buffer 0.1 M pH 5.0

สารละลาย A 0.2 M Acetic acid; เตรียมโดยปิเปต Acetic acid 11.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย B 0.2 M Sodium acetate; เตรียมโดยชั่ง Sodium acetate 16.4 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ตารางที่ 12 การปรับพีเอชของสาร Acetate buffer 0.1 M pH 5.0

สารละลาย A ปริมาตร (มิลลิลิตร)	สารละลาย B ปริมาตร (มิลลิลิตร)	pH
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.3	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.2	30.5	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.2	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

ปรับปริมาตรจนเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ 0.1 M Acetate buffer pH 5.0

การเตรียมสารละลายคองโกเรด

สารละลายคองโกเรดประกอบด้วย คองโกเรด 0.2 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

การเตรียม Low-alkalinity of Somogyi (สารละลาย Somogyi)

การเตรียมสารละลายแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

1. สารละลายโปแตสเซียม-โซเดียมตาร์เตรท 12 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม $CuSO_4.5\ H_2O$ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนให้สารละลายผสมกัน จากนั้นเติม $NaHCO_3$ 16 กรัม

2. สาระลาย anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็นหลังจากนั้น นำสารละลายในข้อ 2 เติมลงในสารละลายในข้อ 1 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้

การเตรียม Arsenomolybdate reagent of Nelson (สารละลาย Nelson)

การเตรียมสารละลายนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. ละลาย Ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร

2. ละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายในข้อ 2 เติมลงในสารละลายในข้อ 1 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วันก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์เอนไซม์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสหรือไซลาเนส

1. สับสเตรทที่ใช้คือ สารละลาย Carboxymethylcellulose หรือสารละลาย xylan (Oat spelt) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย อะซิเตต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 นำไปให้ความร้อนอย่าให้เดือดเพื่อสับสเตรท ละลาย แล้วนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร

2. เตรียมสารละลายเอนไซม์เพื่อนำไปหากิจกรรมโดยเจือจาง Crude enzyme ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้สารละลาย อะซิเตต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0

3. นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

4. เติมสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีสับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 30 นาที

5. หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง

6. นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ตามวิธีการ Nelson-Somogyi

การเตรียมสารละลายกลูโคสและไซโลสมาตรฐาน

ชั่งน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสมาตรฐาน (ซึ่งผ่านการอบที่ 95 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง และเก็บอยู่ในโถดูดความชื้น) มา 0.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ Volumetric flask จะได้สารละลายน้ำตาลเข้มข้น 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เป็น stock solution จากนั้นนำ Stock solution มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางที่ 13 การเตรียมสารละลายกลูโคสและไซโลสมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Nelson-Somogyi

หลอดที่	ความเข้มข้นเริ่มต้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	2500	1	9	250
2	250	8	2	200
3	200	6	2	150
4	150	4	2	100
5	100	2	2	50
6	0	0	3	0

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Nelson-Somogyi (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

1. ดูดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หรือสารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ 25x150 มิลลิลิตร ทำ 2 ซ้ำ ใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์

2. เติม Low-alkalinity of Somogyi ลงไป 1.0 มิลลิลิตร

3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยใส่ในลังน้ำแข็ง

4. เติม Arsenomolybdate reagent of Nelson ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อทำให้คิวปรัสออกไซด์ ละลายหมด

5. เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายกลูโคสหรือไซโลสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไปเขียนกราฟ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสง ใช้เป็นกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสหรือไซโลสในสารละลายตัวอย่าง นำไปหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสหรือไซลาเนส

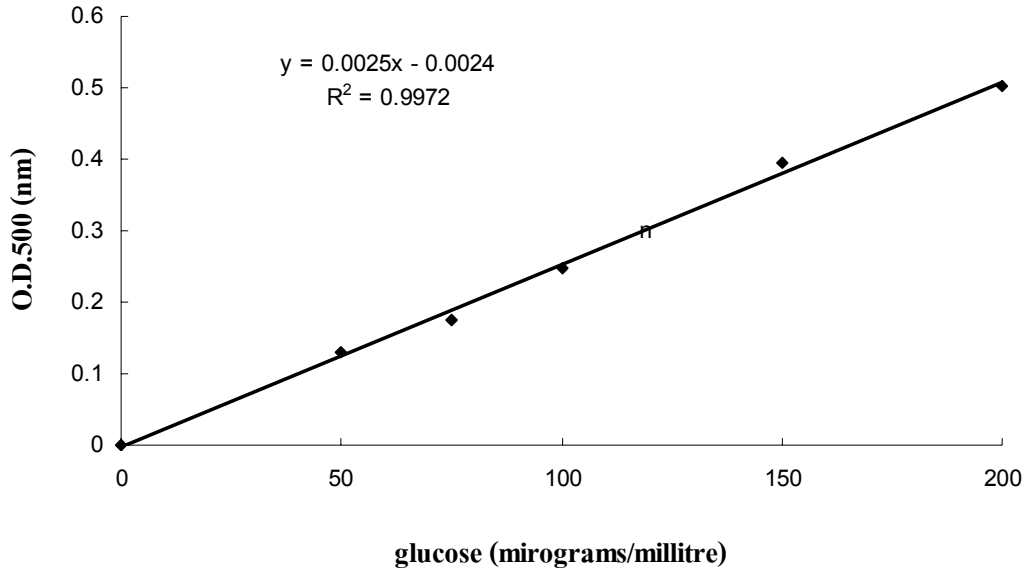
การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

เมื่อทราบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ นำไปหาค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยใช้สูตร

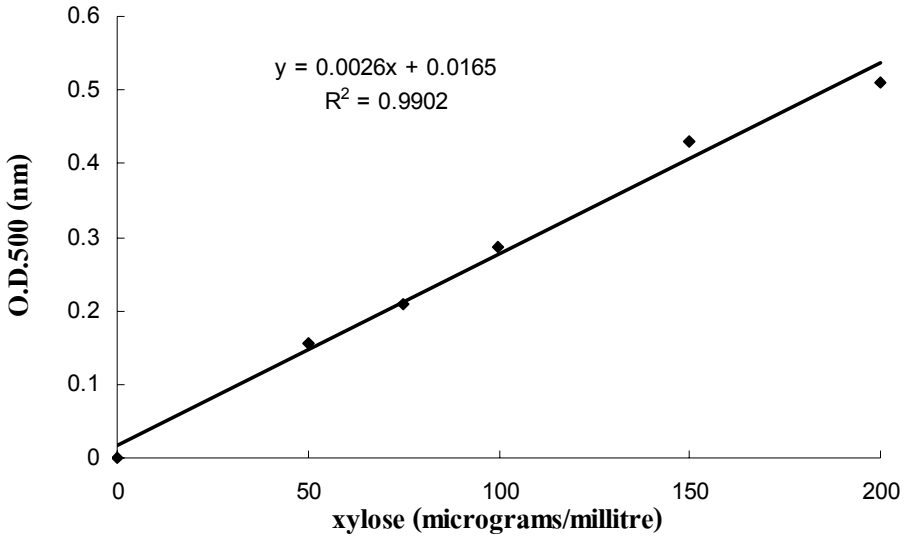
$$\text{Unit/ml} = \frac{\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล x 2 x Dilution factor}}{\text{มวลโมเลกุลของน้ำตาล x 30}}$$

หมายเหตุ มวลโมเลกุลของกลูโคสเท่ากับ 180
มวลโมเลกุลของไซโลสเท่ากับ 105.1

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรทความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 แล้วเกิดน้ำตาลขึ้น 1 ไมโครโมลต่อ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



รูปที่ 30 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัม



รูปที่ 31 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัม

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้น

นำตัวอย่าง อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตักแบ่งตัวอย่างแต่ละชนิดใส่ถ้วยโลหะที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ถ้วยละ 5 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตรต่างๆกันตั้งแต่ 10 จนถึง 20 มิลลิลิตร (เพิ่มขึ้นครั้งละ 1 มิลลิลิตร) ผสมสับสเตรทและน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นปิดปากถ้วยด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันน้ำระเหย ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักสดด้วยเครื่องชั่งน้ำหนัก 3 ตำแหน่ง นำไปอบในตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 2 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นดังสูตรข้างล่าง

$$\text{ความชื้นของปุ๋ยหมัก (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

ตารางที่ 14 ปริมาตรน้ำกลั่นและ Berg's mineral salts medium ที่เติมลงในสับสเตรทแต่ละชนิดเพื่อปรับความชื้นให้ได้ 70 เปอร์เซ็นต์

สับสเตรท	ปริมาณน้ำกลั่น (มล.) ต่อสับสเตรท 70 กรัม	ปริมาณ Berg's mineral salts medium (มล.) ต่อสับสเตรท 70 กรัม	% ความชื้นที่ได้
ผักตบชวา	32	150	69.66
ขุยมะพร้าว	18		64.54
ฟางข้าว	4		68.75
ซังข้าวโพด	4		67.94

ตารางที่15 ปริมาตรน้ำกลั่นและ Berg's mineral salts medium ที่เติมลงในผักตบชวาผสมขุยมะพร้าวให้ได้ความชื้นช่วง 50 - 80 เปอร์เซ็นต์

ช่วง% ความชื้น	%ความชื้นที่ได้	ปริมาณ Berg's mineral salts medium (มล.) ต่อสับสเตรท 70 กรัม	ปริมาณน้ำกลั่น (มล.) ต่อสับสเตรท 70 กรัม
50	53.03	70	0
60	66.11		56
70	72.49		112
80	85.87		168

McFarland standard

วิธีเตรียม

นำ H_2SO_4 1 เปอร์เซ็นต์ v/v ผสมกับ $BaCl_2.2H_2O$ 1.175 เปอร์เซ็นต์ w/v จะได้ตะกอนขาวขุ่นของ $BaSO_4$

อัตราส่วนของ H_2SO_4 1 เปอร์เซ็นต์ และ $BaCl_2.2H_2O$ 1.175 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียม McFarland standard หมายเลขต่างๆดังตาราง

ตารางที่16 การเตรียม McFarland standard

McFarland standard No.	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Sulfuric acid (ml)	9.96	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx. cell density ($x10^8$/ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Escherichia coli* (IMViC test)

วิธีการวิเคราะห์ *E. coli* เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการตรวจหาโคลิฟอร์มโดยวิธี MPN โดยนำหลอดอาหารเหลว EC ที่ให้ผลเป็นบวกไปเขย่าให้เข้ากัน แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจากหลอดดังกล่าว แล้วนำไปขีด (streak) แยกเชื้อบนอาหารแข็ง eosin methylene blue (EMB) agar จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่สงสัย ซึ่งมีจุดดำตรงกลาง มีหรือไม่มีสีตะกั่วตัด (metallic sheen) นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่อไปดังนี้

การทดสอบปฏิกิริยาการเกิดอินโดล (indole test) โดยการถ่ายเชื้อที่สงสัยจากจานอาหารแข็ง EMB จำนวน 1 ห่วง ใส่ในหลอดอาหารเหลว tryptone broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยดน้ำยา Kovac's reagent ประมาณ 1 – 2 หยด แล้วอ่านผล ถ้าปรากฏวงแหวนสีแดงบนผิวด้านบนให้อ่านผลเป็นบวก

การทดสอบ VP – test (Voges – Proskauer reaction compounds) โดยการถ่ายเชื้อที่สงสัยจำนวน 1 ห่วง ลงในอาหารเหลว M□ – VP broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อนี้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปใส่ในหลอดที่ปราศจากเชื้อ แล้วหยดสารละลายแอลฟา-แนพทอล (alpha – nepthol solution) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และใส่สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นอ่านผล ถ้ามีสีแดง ให้อ่านผลเป็นบวก (positive)

การทดสอบ MR – test (methyl red reaction compounds) โดยการนำอาหารเหลว M□-VP broth ที่เหลือจากการทดสอบ VP – test ไปใส่ สารละลายเมทธิล เรด (methyl red solution) ลงไปจำนวน 5 หยด เขย่าให้เข้ากันแล้วอ่านผล ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดง ให้อ่านผลเป็นบวก ถ้าอาหารมีสีเหลือง ให้อ่านผลเป็นลบ

การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate test) โดยการถ่ายเชื้อที่สงสัยจำนวน 1 ห่วง streak บนอาหารเอียงซิมมอน ซิเตรท (simmon citrate agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปอ่านผลโดยการดูการเปลี่ยนสีของบรอมไทมอล บลู (bromthymol blue)

นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับตาราง MPN ค่าที่อ่านได้ คือ จำนวน MPN ของ *E. coli* ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

ตารางที่17 ตาราง MPN ต่อ 1 กรัม เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม ปริมาตรละ 5 หลอด

Combination of Positives	MPN Index/ g	95% Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/ g	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper			Lower	Upper
0-0-0	<1.8	-	6.8	2-2-0	9.3	3.4	22
0-0-1	1.8	0.090	6.8	2-2-1	12	4.1	26
0-1-0	1.8	0.090	6.9	2-2-2	14	5.9	36
0-1-1	3.6	0.70	10	2-3-0	12	4.1	26
0-2-0	3.7	0.70	10	2-3-1	14	5.9	36
0-2-1	5.5	1.8	15	2-4-0	15	5.9	36
0-3-0	5.6	1.8	15	3-0-0	7.8	2.1	22
1-0-0	2.0	0.10	10	3-0-1	11	3.5	23
1-0-1	4.0	0.70	10	3-0-2	13	5.6	35
1-0-2	6.0	1.8	15	3-1-0	11	3.5	26
1-1-0	4.0	0.71	12	3-1-1	14	5.6	36
1-1-1	6.1	1.8	15	3-1-2	17	6.0	36
1-1-2	8.1	3.4	22	3-2-0	14	5.7	36
1-2-0	6.1	1.8	15	3-2-1	17	6.8	40
1-2-1	8.2	3.4	22	3-2-2	20	6.8	40
1-3-0	8.3	3.4	22	3-3-0	17	6.8	40
1-3-1	10	3.5	22	3-3-1	21	6.8	40
1-4-0	10	3.5	22	3-3-2	24	9.8	70
2-0-0	4.5	0.79	15	3-4-0	21	6.8	40
2-0-1	6.8	1.8	15	3-4-1	24	9.8	70
2-0-2	9.1	3.4	22	3-5-0	25	9.8	70
2-1-0	6.8	1.8	17	4-0-0	13	4.1	35
2-1-1	9.2	3.4	22	4-0-1	17	5.9	36
2-1-2	12	4.1	26	4-0-2	21	6.8	40

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Combination of Positives	MPN Index/ g	95% Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/ g	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper			Lower	Upper
4-0-3	25	9.8	70	5-1-3	84	34	220
4-1-0	17	6.0	40	5-2-0	49	15	150
4-1-1	21	6.8	42	5-2-1	70	22	170
4-1-2	26	9.8	70	5-2-2	94	34	230
4-1-3	31	10	70	5-2-3	120	36	250
4-2-0	22	6.8	50	5-2-4	150	58	400
4-2-1	26	9.8	70	5-3-0	79	22	220
4-2-2	32	10	70	5-3-1	110	34	250
4-2-3	38	14	100	5-3-2	140	52	400
4-3-0	27	9.9	70	5-3-3	170	70	400
4-3-1	33	10	70	5-3-4	210	70	400
4-3-2	39	14	100	5-4-0	130	36	400
4-4-0	34	14	100	5-4-1	170	58	400
4-4-1	40	14	100	5-4-2	220	70	440
4-4-2	47	15	120	5-4-3	280	100	710
4-5-0	41	14	100	5-4-4	350	100	710
4-5-1	48	15	120	5-4-5	430	150	1100
5-0-0	23	6.8	70	5-5-0	240	70	710
5-0-1	31	10	70	5-5-1	350	100	1100
5-0-2	43	14	100	5-5-2	540	150	1700
5-0-3	58	22	150	5-5-3	920	220	2600
5-1-0	33	10	100	5-5-4	1600	400	4600
5-1-1	46	14	120	5-5-5	>1600	700	-
5-1-2	63	22	150				

ที่มา : http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-a2.html

ภาคผนวก จ

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Sample Name : B4

---

481 bp Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments: SCORE E VALUE

FJ348028 Bacillus sp. GGC-P1
868 0.0
FJ348011 Bacillus sp. GGC-P5A2
868 0.0
FJ234439 Bacillus pumilus strain ZH1-6
868 0.0
FJ384546 Uncultured Bacillus sp. clone QJNY94
868 0.0
FJ384511 Uncultured Bacillus sp. clone QNSW19-2
868 0.0

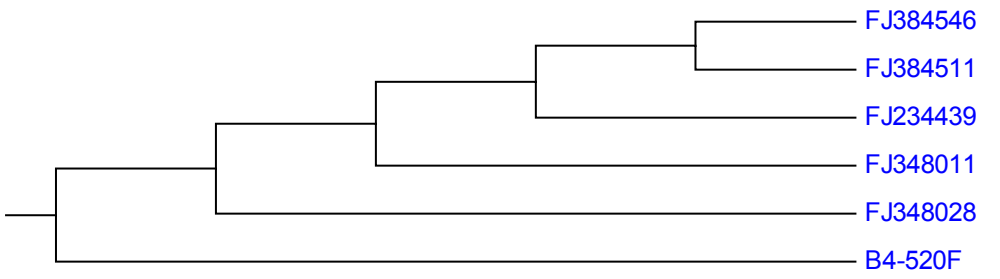
BLASTN 2.2.18+
Reference:
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: GSE86FHU013

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
7,692,188 sequences; 25,266,579,029 total letters

Query= B4-520F Length=481
>B4-520F
ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC
GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
C

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)



> gb|FJ348028.1| Bacillus sp. GGC-P1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1385

Score = 868 bits (962), Expect = 0.0
Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  536   ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA
595

Query  61    AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC
120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  596   AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC
655

Query  121   GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  656   GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
715

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  716   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
775

Query  241   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  776   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
835

Query  301   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  836   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
895

Query  361   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  896   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
955

Query  421   CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
480
```

```
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  956  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
1015

Query  481  C  481
            |
Sbjct  1016 C  1016
```

> gb|FJ348011.1| Bacillus sp. GGC-P5A2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1449

```
 Score =  868 bits (962),  Expect = 0.0
 Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  576  ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA
635

Query  61   AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC
120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  636  AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC
695

Query  121  GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  696  GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
755

Query  181  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  756  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
815

Query  241  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  816  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
875

Query  301  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  876  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
935

Query  361  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  936  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
995

Query  421  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  996  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
1055

Query  481  C  481
```

```
            |
Sbjct  1056  C  1056


> gb|FJ234439.1|  Bacillus pumilus strain ZH1-6 16S ribosomal RNA gene,
partial
Sequence Length=1428

 Score =  868 bits (962),  Expect = 0.0
 Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  593   ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA
652

Query  61    AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC
120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  653   AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC
712

Query  121   GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  713   GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
772

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  773   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
832

Query  241   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  833   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
892

Query  301   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  893   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
952

Query  361   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  953   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
1012

Query  421   CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1013  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
1072

Query  481   C  481
             |
Sbjct  1073  C  1073
```

```
> gb|FJ384546.1|  Uncultured Bacillus sp. clone QJNY94 16S ribosomal RNA
gene,
partial sequence
Length=839

 Score =  868 bits (962),  Expect = 0.0
 Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  259  ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA  318

Query  61   AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  319  AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC  378

Query  121  GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  379  GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  438

Query  181  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  439  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA  498

Query  241  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  499  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  558

Query  301  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  559  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  618

Query  361  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  619  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG  678

Query  421  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  679  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  738

Query  481  C  481
            |
Sbjct  739  C  739


> gb|FJ384511.1|  Uncultured Bacillus sp. clone QNSW19-2 16S ribosomal RNA
gene,
partial sequence Length=822

 Score =  868 bits (962),  Expect = 0.0
 Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  259  ATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA  318

Query  61   AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  319  AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGAC  378

Query  121  GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct  379  GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  438

Query  181  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  439  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA  498

Query  241  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  499  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  558

Query  301  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  559  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  618

Query  361  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  619  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG  678

Query  421  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  679  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  738

Query  481  C  481
            |
Sbjct  739  C  739
```

```
LOCUS       FJ348028               1385 bp    DNA     linear   BCT 29-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus sp. GGC-P1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   FJ348028
VERSION     FJ348028.1  GI:209967828
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus sp. GGC-P1
  ORGANISM  Bacillus sp. GGC-P1
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1385)
  AUTHORS   Banks,E.D., Taylor,N.M., Lubbers,B.R., Giarrizzo,J.G., Gulley,J.,
            Hoehler,T.M., Bullen,H.A. and Barton,H.A.
  TITLE     Does Bacterial Calcium Homeostasis Contribute to the Development
of
            Speleothems (Cave Formations)?
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1385)
  AUTHORS   Banks,E.D., Taylor,N.M., Lubbers,B.R., Giarrizzo,J.G., Gulley,J.,
            Hoehler,T.M., Bullen,H.A. and Barton,H.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (02-OCT-2008) Biological Sciences, Northern Kentucky
            University, SC 204D Nunn Drive, Highland Heights, KY 41076, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1385
                     /organism="Bacillus sp. GGC-P1"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="GGC-P1"
                     /isolation_source="cave coralloid speleothem"
                     /db_xref="taxon:570735"
                     /country="USA: Wayne County, Kentucky"
     rRNA            <1..>1385
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 acgggtgagt aacacgtggg taacctgcct gtaagactgg gataactccg ggaaaccgga
       61 gctaataccg gatagttcct tgaaccgcat ggttcaagga tgaaagacgg tttcggctgt
      121 cacttacaga tggacccgcg gcgcattagc tagttggtgg ggtaatggct caccaaggcg
```

```
      181 acgatgcgta gccgacctga gagggtgatc ggccacactg ggactgagac acggcccaga
      241 ctcctacggg aggcagcagt agggaatctt ccgcaatgga cgaaagtctg acggagcaac
      301 gccgcgtgag tgatgaaggt tttcggatcg taaagctctg ttgttaggga agaacaagtg
      361 cgagagtaac tgctcgcacc ttgacggtac ctaaccagaa agccacggct aactacgtgc
      421 cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgttgtccgg aattattggg cgtaaagggc
      481 tcgcaggcgg tttcttaagt ctgatgtgaa agccccggct caaccgggga gggtcattgg
      541 aaactgggaa acttgagtgc agaagaggag agtggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc
      601 gtagagatgt ggaggaacac cagtggcgaa ggcgactctc tggtctgtaa ctgacgctga
      661 ggagcgaaag cgtggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga
      721 tgagtgctaa gtgttagggg gtttccgccc cttagtgctg cagctaacgc attaagcact
      781 ccgcctgggg agtacggtcg caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa
      841 gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc
      901 ctctgacaac cctagagata gggctttccc ttcggggaca gagtgacagg tggtgcatgg
      961 ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccttga
     1021 tcttagttgc cagcattcag ttgggcactc taaggtgact gccggtgaca aaccggagga
     1081 aggtggggat gacgtcaaat catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa
     1141 tggacagaac aaagggctgc caagaccgca aggtttagcc aatcccataa atctgttctc
     1201 agttcggatc gcagtctgca actcgactgc gtgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat
     1261 cagcatgccg cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccacgaga
     1321 gtttgcaaca cccgaagtcg gtgaggtacc ttatggagca gcggcgagtg gggcagatga
     1381 ttggg


LOCUS       FJ348011                1449 bp    DNA     linear   BCT 29-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus sp. GGC-P5A2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   FJ348011
VERSION     FJ348011.1  GI:209967811
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus sp. GGC-P5A2
  ORGANISM  Bacillus sp. GGC-P5A2
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1449)
  AUTHORS   Banks,E.D., Taylor,N.M., Lubbers,B.R., Giarrizzo,J.G., Gulley,J.,
            Hoehler,T.M., Bullen,H.A. and Barton,H.A.
  TITLE     Does Bacterial Calcium Homeostasis Contribute to the Development
of
            Speleothems (Cave Formations)?
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1449)
  AUTHORS   Banks,E.D., Taylor,N.M., Lubbers,B.R., Giarrizzo,J.G., Gulley,J.,
            Hoehler,T.M., Bullen,H.A. and Barton,H.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (02-OCT-2008) Biological Sciences, Northern Kentucky
            University, SC 204D Nunn Drive, Highland Heights, KY 41076, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1449
                     /organism="Bacillus sp. GGC-P5A2"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="GGC-P5A2"
                     /isolation_source="cave coralloid speleothem"
                     /db_xref="taxon:570674"
                     /country="USA: Wayne County, Kentucky"
     rRNA            <1..>1449
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gcggacagaa gggagcttgc tcccggatgt tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggt
       61 aacctgcctg taagactggg ataactccgg gaaaccggag ctaataccgg atagttcctt
      121 gaaccgcatg gttcaaggat gaaagacggt ttcggctgtc acttacagat ggacccgcgg
      181 cgcattagct agttggtggg gtaatggctc accaaggcga cgatgcgtag ccgacctgag
      241 agggtgatcg gccacactgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagta
      301 gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga cggagcaacg ccgcgtgagt gatgaaggtt
      361 ttcggatcgt aaagctctgt tgttagggaa gaacaagtgc gagagtaact gctcgcacct
      421 tgacggtacc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta
```

```
      481 ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagggct cgcaggcggt ttcttaagtc
      541 tgatgtgaaa gcccccggct caaccgggga gggtcattgg aaactgggaa acttgagtgc
      601 agaagaggag agtggaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaacac
      661 cagtggcgaa ggcgactctc tggtctgtaa ctgacgctga ggagcgaaag cgtggggagc
      721 gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagggg
      781 gtttccgccc cttagtgctg cagctaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggtcg
      841 caagactgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta
      901 attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaac cctagagata
      961 gggctttccc ttcggggaca gagtgacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt
     1021 gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccttga tcttagttgc cagcattcag
     1081 ttgggcactc taaggtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaaat
     1141 catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggacagaac aaagggctgc
     1201 aagaccgcaa ggtttagcca atcccataaa tctgttctca gttcggatcg cagtctgcaa
     1261 ctcgactgcg tgaagctgga atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg
     1321 ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag tttgcaacac ccgaagtcgg
     1381 tgaggtaacc tttatggagc cagccgccga aggtggggca gatgattggg gtgaagtcgt
     1441 aacaaggt
```

```
LOCUS       FJ234439                1428 bp    DNA     linear   BCT 27-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus pumilus strain ZH1-6 16S ribosomal RNA gene, partial
            sequence.
ACCESSION   FJ234439
VERSION     FJ234439.1  GI:209892790
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus pumilus
  ORGANISM  Bacillus pumilus
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1428)
  AUTHORS   Li,X. and Lei,X.
  TITLE     Study of identification and biological characteristics of a
strain
            of marine Bacillus ZH1-6
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1428)
  AUTHORS   Li,X. and Lei,X.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (24-SEP-2008) Food Science and Technology, Guangdong
            Ocean University, 40 East Jiefang Road, Xiashan, Zhanjiang,
            Guangdong 524025, P.R. China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1428
                     /organism="Bacillus pumilus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="ZH1-6"
                     /host="Crassostrea rivularis Gould"
                     /db_xref="taxon:1408"
                     /country="China"
     rRNA            <1..>1428
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 taatacatgc aagtcgagcg gacagaaggg agcttgctcc cggatgttag cggcggacgg
       61 gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggagcta
      121 ataccggata gttccttgaa ccgcatggtt caaggatgaa agacggtttc ggctgtcact
      181 tacagatgga cccgcggcgc attagctagt tggtgaggta acggctcacc aaggcgacga
      241 tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc
      301 tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg
      361 cgtgagtgat gaaggttttc ggatcgtaaa gctctgttgt tagggaagaa caagtgcaag
      421 agtaactgct tgcaccttga cggtacctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc
      481 agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta aagggctcgc
      541 aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc cccggctcaa ccggggaggg tcattggaaa
      601 ctgggaaact tgagtgcaga agaggagagt ggaattccac gtgtagcggt gaaatgcgta
      661 gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc gactctctgg tctgtaactg acgctgagga
      721 gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga
```

```
      781 gtgctaagtg ttagggggtt tccgcccctt agtgctgcag ctaacgcatt aagcactccg
      841 cctggggagt acggtcgcaa gactgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg
      901 gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcctc
      961 tgacaaccct agagataggg ctttcccttc ggggacagag tgacaggtgg tgcatggttg
     1021 tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttgatct
     1081 tagttgccag cattcagttg ggcactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac cggaggaagg
     1141 tggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg
     1201 acagaacaaa gggctgcgag accgcaaggt ttagccaatc ccacaaatct gttctcagtt
     1261 cggatcgcag tctgcaactc gactgcgtga agctggaatc gctagtaatc gcggatcagc
     1321 atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc acgagagttt
     1381 gcaacacccg aagtcggtga ggtaaccttt atggagccag ccgccgaa


LOCUS       FJ384546                839 bp    DNA     linear   ENV 26-OCT-
2008
DEFINITION  Uncultured Bacillus sp. clone QJNY94 16S ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   FJ384546
VERSION     FJ384546.1  GI:209865099
KEYWORDS    ENV.
SOURCE      uncultured Bacillus sp.
  ORGANISM  uncultured Bacillus sp.
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;
            environmental samples.
REFERENCE   1  (bases 1 to 839)
  AUTHORS   Hong,X., Zhang,J., Qu,L. and Sun,X.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-SEP-2008) Marine Ecology, First Institute of
            Oceanography, 6 Xianxialing Road, Hi-Tech Industrial Park,
Qingdao,
            Shandong 266061, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..839
                     /organism="uncultured Bacillus sp."
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolation_source="Yellow Sea sediment isolated in
winter"
                     /db_xref="taxon:83428"
                     /clone="QJNY94"
                     /environmental_sample
                     /country="China: Huanghai"
     rRNA            <1..>839
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tggacgaagt ctgacggagc acgccgcgtg agtgatgaag gttttcggat cgtaaagctc
       61 tgttgttagg gaagaacaag tgcaagagta actgcttgca ccttgacggt acctaaccag
      121 aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtaggtggca agcgttgtcc
      181 ggaattattg ggcgtaaagg gctcgcaggc ggtttcttaa gtctgatgtg aaagccccccg
      241 gctcaaccgg ggagggtcat tggaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gagagtggaa
      301 ttccacgtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa caccagtggc gaaggcgact
      361 ctctggtctg taactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg agcgaacagg attagatacc
      421 ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgagtgc taagtgttag ggggtttccg ccccttagtg
      481 ctgcagctaa cgcattaagc actccgcctg gggagtacgg tcgcaagact gaaactcaaa
      541 ggaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa
      601 gaaccttacc aggtcttgac atcctctgac aaccctagag atagggcttt cccttcgggg
      661 acagagtgac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt
      721 cccgcaacga gcgcaaccct tgatcttagt tgccagcatt cagttgggca ctctaaggtg
      781 actgccggtg acaaaccgga ggaagggtgg gggatgacgt caaatcatca tgcccctta
```

```
LOCUS       FJ384511                 822 bp    DNA     linear   ENV 26-OCT-
2008
DEFINITION  Uncultured Bacillus sp. clone QNSW19-2 16S ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   FJ384511
VERSION     FJ384511.1  GI:209865064
KEYWORDS    ENV.
SOURCE      uncultured Bacillus sp.
  ORGANISM  uncultured Bacillus sp.
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;
            environmental samples.
REFERENCE   1  (bases 1 to 822)
  AUTHORS   Hong,X., Zhang,J., Qu,L. and Sun,X.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-SEP-2008) Marine Ecology, First Institute of
            Oceanography, 6 Xianxialing Road, Hi-Tech Industrial Park,
Qingdao,
            Shandong 266061, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..822
                     /organism="uncultured Bacillus sp."
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolation_source="Yellow Sea sediment isolated in
winter"
                     /db_xref="taxon:83428"
                     /clone="QNSW19-2"
                     /environmental_sample
                     /country="China: Huanghai"
     rRNA            <1..>822
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tggacgaagt ctgacggagc acgccgcgtg agtgatgaag gttttcggat cgtaaagctc
       61 tgttgttagg gaagaacaag tgcaagagta actgcttgca ccttgacggt acctaaccag
      121 aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtaggtggca agcgttgtcc
      181 ggaattattg ggcgtaaagg gctcgcaggc ggtttcttaa gtctgatgtg aaagcccccg
      241 gctcaaccgg ggagggtcat tggaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gagagtggaa
      301 ttccacgtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa caccagtggc gaaggcgact
      361 ctctggtctg taactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg agcgaacagg attagatacc
      421 ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgagtgc taagtgttag ggggtttccg ccccttagtg
      481 ctgcagctaa cgcattaagc actccgcctg gggagtacgg tcgcaagact gaaactcaaa
      541 ggaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa
      601 gaaccttacc aggtcttgac atcctctgac aaccctagag atagggcttt cccttcgggg
      661 acagagtgac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt
      721 cccgcaacga gcgcaaccct tgatcttagt tgccagcatt cagttgggca ctctaaggtg
      781 actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca aa
```

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Sample Name : B91

---

481 bp Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments: SCORE
E VALUE

FJ227139 Bacillus sp. KD178 868
0.0
FJ267613 Bacillus cereus strain SK 868
0.0
FJ217159 Bacillus sp. S2-3 868
0.0
EU984074 Bacillus sp. ERI 44 868
0.0
EU440975 Bacillus thuringiensis strain 2PR56-10 868
0.0

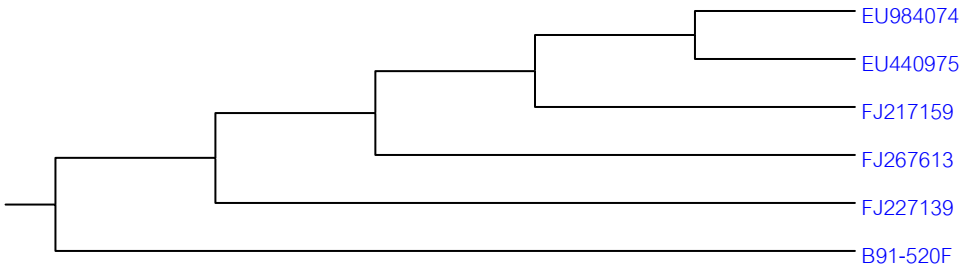
BLASTN 2.2.18+
Reference:
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: GSN3XCV3011

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
7,692,188 sequences; 25,266,579,029 total letters

Query= B91-520F Length=481
>B91-520F
ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
C

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)



> gb|FJ227139.1| Bacillus sp. KD178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=706

Score = 868 bits (962), Expect = 0.0
Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  60   ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  119

Query  61   AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  120  AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC  179

Query  121  ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  180  ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  239

Query  181  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  240  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA  299

Query  241  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  300  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  359

Query  301  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  360  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  419

Query  361  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  420  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG  479

Query  421  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  480  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  539

Query  481  C  481
            |
Sbjct  540  C  540
```

> gb|FJ267613.1| Bacillus cereus strain SK 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1516

Score = 868 bits (962), Expect = 0.0
Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)

```
 Strand=Plus/Plus

Query  1     ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  637   ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
696

Query  61    AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  697   AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
756

Query  121   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  757   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
816

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  817   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
876

Query  241   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  877   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
936

Query  301   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  937   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
996

Query  361   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  997   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
1056

Query  421   CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1057  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
1116

Query  481   C  481
             |
Sbjct  1117  C  1117


> gb|FJ217159.1|  Bacillus sp. S2-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1475

 Score =  868 bits (962),  Expect = 0.0
 Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  604   ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
663
```

```
Query  61    AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  664   AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
723

Query  121   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  724   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
783

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  784   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
843

Query  241   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  844   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
903

Query  301   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  904   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
963

Query  361   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  964   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
1023

Query  421   CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1024  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
1083

Query  481   C  481
             |
Sbjct  1084  C  1084
```

> gb|EU984074.1| Bacillus sp. ERI 44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1424

```
 Score =  868 bits (962),  Expect = 0.0
 Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  594   ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
653

Query  61    AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
120
```

```
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  654  AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
713

Query  121  ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  714  ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
773

Query  181  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  774  AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
833

Query  241  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  834  GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
893

Query  301  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  894  CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
953

Query  361  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  954  ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
1013

Query  421  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1014 CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
1073

Query  481  C  481
            |
Sbjct  1074 C  1074
```

> gb|EU440975.1| Bacillus thuringiensis strain 2PR56-10 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence Length=1518

```
 Score =  868 bits (962),  Expect = 0.0
 Identities = 481/481 (100%), Gaps = 0/481 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  638  ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
697

Query  61   AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  698  AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGAC
757
```

```
Query  121   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  758   ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
817

Query  181   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  818   AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
877

Query  241   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  878   GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
937

Query  301   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  938   CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
997

Query  361   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  998   ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
1057

Query  421   CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1058  CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
1117

Query  481   C  481
             |
Sbjct  1118  C  1118
```

```
LOCUS       FJ227139                706 bp    DNA     linear   BCT 15-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus sp. KD178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   FJ227139
VERSION     FJ227139.1  GI:209401539
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus sp. KD178
  ORGANISM  Bacillus sp. KD178
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 706)
  AUTHORS   Yang,H. and Lu,Y.
  TITLE     Isolation and Characterization of Chlorobenzene Degrading
Bacteria
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 706)
  AUTHORS   Yang,H. and Lu,Y.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-SEP-2008) Bioengineering, Tianjin University of
            Science & Technology, 29, Slot 8, 13th Street, TEDA, Tianjin
            300457, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..706
                     /organism="Bacillus sp. KD178"
```

```
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="KD178"
                     /isolation_source="chemical plant sludge"
                     /db_xref="taxon:566702"
                     /country="China: Tainjin"
                     /lat_lon="39.25 N 117.83 E"
                     /note="PCR_primers=fwd_name: 517F, rev_name: 1406R"
     rRNA            <1..>706
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 cgcgcgcagg tggtttctta agtctgatgt gaaagcccac ggctcaaccg tggagggtca
       61 ttggaaactg ggagacttga gtgcagaaga ggaaagtgga attccatgtg tagcggtgaa
      121 atgcgtagag atatggagga acaccagtgg cgaaggcgac tttctggtct gtaactgaca
      181 ctgaggcgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa
      241 acgatgagtg ctaagtgtta gagggtttcc gcccctttagt gctgaagtta acgcattaag
      301 cactccgcct ggggagtacg gccgcaaggc tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc
      361 acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggtcttga
      421 catcctctga caaccctaga gatagggctt ctccttcggg agcagagtga caggtggtgc
      481 atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc
      541 ttgatcttag ttgccatcat taagttgggc actctaaggt gactgccggt gacaaaccgg
      601 aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg acctgggcta cacacgtgct
      661 acaatggacg gtacaaagag ctgcaagacc gcgaggtgga gctaat


LOCUS       FJ267613                1516 bp    DNA     linear   BCT 15-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus cereus strain SK 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.
ACCESSION   FJ267613
VERSION     FJ267613.1  GI:209365654
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus cereus
  ORGANISM  Bacillus cereus
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus
            cereus group.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1516)
  AUTHORS   Sathishkumar,K., Padmavathy,S., Asha Devi,N.K. and
Balakrishnan,K.
  TITLE     Isolation and identification of alkaline protease producing
            microorganisms from salt pan of Tuticurin coastal region
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1516)
  AUTHORS   Sathishkumar,K., Padmavathy,S., Asha Devi,N.K. and
Balakrishnan,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (25-SEP-2008) Microbiology, Thiagarajar College, 139-
140,
            Kamarajar Salai, Madurai, Tamilnadu 625009, India
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1516
                     /organism="Bacillus cereus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="SK"
                     /isolation_source="salt pan of Tuticurin costal region"
                     /db_xref="taxon:1396"
                     /country="India: Tamilnadu"
     rRNA            <1..>1516
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc
       61 gaatggatta agagcttgct cttatgaagt tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggt
      121 aacctgccca taagactggg ataactccgg gaaaccgggg ctaataccgg ataatatttt
      181 gaaccgcatg gttcgaaatt gaaaggggggc ttcggttgtc acttatggat ggacccgcgt
      241 cgcattagct agttggtgag gtaacggctc accaaggcaa cgatgcgtag ccgacctgag
```

```
      301 agggtgatcg gccacactgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagta
      361 gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga cggagcaacg ccgcgtgagt gatgaaggct
      421 ttcgggtcgt aaaactctgt tgttagggaa gaacaagtgc tagttgaata agctggcacc
      481 ttgacggtac ctaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt
      541 aggtggcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagcgc gcgcaggtgg tttcttaagt
      601 ctgatgtgaa agcccacggc tcaaccgtgg agggtcattg gaaactggga gacttgagtg
      661 cagaagagga aagtggaatt ccatgtgtag cggtgaaatg cgtagagata tggaggaaca
      721 ccagtggcga aggcgacttt ctggtctgta actgacactg aggcgcgaaa gcgtggggag
      781 caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgagtgcta agtgttagag
      841 ggtttccgcc ctttagtgct gaagttaacg cattaagcac tccgcctggg gagtacggcc
      901 gcaaggctga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggtggag catgtggttt
      961 aattcgaagc aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cctctgacaa ccctagagat
     1021 agggcttctc cttcgggagc agagtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg
     1081 tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg atcttagttg ccatcattta
     1141 gttgggcact ctaaggtgac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaaa
     1201 tcatcatgcc ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggacggta caaagagctg
     1261 caagaccgcg aggtggagct aatctcataa aaccgttctc agttcggatt gtaggctgca
     1321 actcgcctac atgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagcatgccg cggtgaatac
     1381 gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccacgaga gtttgtaaca cccgaagtcg
     1441 gtggggtaac ctttttggag ccagccgcct aaggtgggac agatgattgg ggtgaagtcg
     1501 taacaaggta accgta


LOCUS       FJ217159                1475 bp    DNA     linear   BCT 14-OCT-
2008
DEFINITION  Bacillus sp. S2-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   FJ217159
VERSION     FJ217159.1  GI:209360716
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus sp. S2-3
  ORGANISM  Bacillus sp. S2-3
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1475)
  AUTHORS   Chukeatirote,E., Arfarita,N. and Boonkumklao,P.
  TITLE     Characterization of protease-producing bacteria isolated from
            terasi
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1475)
  AUTHORS   Chukeatirote,E., Arfarita,N. and Boonkumklao,P.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-SEP-2008) Biotechnology, Mae Fah Luang University,
            Tasud, Muang, Chiang Rai 57100, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1475
                     /organism="Bacillus sp. S2-3"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="S2-3"
                     /isolation_source="terasi (fermented food)"
                     /db_xref="taxon:565531"
                     /country="Indonesia"
     rRNA            <1..>1475
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ggcgtgccta atacatgcaa gtcgagcgaa tggattaaga gcttgctctt atgaagttag
       61 cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccataa gactgggata actccgggaa
      121 accggggcta ataccggata acattttgaa ccgcatggtt cgaaattgaa aggcggcttc
      181 ggctgtcact tatggatgga cccgcgtcgc attagctagt tggtgaggta acggctcacc
      241 aaggcaacga tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc acactgggac tgagacacgg
      301 cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg
      361 agcaacgccg cgtgagtgat gaaggctttc gggtcgtaaa actctgttgt tagggaagaa
      421 caagtgctag ttgaataagc tggcaccttg acggtaccta accagaaagc cacggctaac
      481 tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tatccggaat tattgggcgt
      541 aaagcgcgcg caggtggttt cttaagtctg atgtgaaagc ccacggctca accgtggagg
      601 gtcattggaa actgggagac ttgagtgcag aagaggaaag tggaattcca tgtgtagcgg
      661 tgaaatgcgt agagatatgg aggaacacca gtggcgaagg cgactttctg gtctgtaact
```

```
      721 gacactgagg cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc
      781 gtaaacgatg agtgctaagt gttagagggt ttccgccctt tagtgctgaa gttaacgcat
      841 taagcactcc gcctggggag tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat tgacgggggc
      901 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc
      961 ttgacatcct ctgacaaccc tagagatagg gcttctcctt cgggagcaga gtgacaggtg
     1021 gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca
     1081 acccttgatc ttagttgcca tcatttagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa
     1141 ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg
     1201 tgctacaatg ggacggtaca aagagctgca agaccgcgag ggtggagcta atctcataaa
     1261 accgttctca gttcggattg taggctgcaa ctcgcctaca tgaagctgga atcgctagta
     1321 atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac
     1381 accacgagag tttgtaacac ccgaagtcgg tggggtaacc tttttggagc cagccgccta
     1441 aggtgggaca gatgattggg gtgaagtcgt aacaa


LOCUS       EU984074                1424 bp    DNA     linear   BCT 31-AUG-
2008
DEFINITION  Bacillus sp. ERI 44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   EU984074
VERSION     EU984074.1  GI:197293721
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus sp. ERI 44
  ORGANISM  Bacillus sp. ERI 44
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1424)
  AUTHORS   Duraipandiyan,V., Valanarasu,M. and Ignacimuthu,S.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (26-JUL-2008) Division of Microbiology, Entomology
            Research Institute, Loyola College, Chennai, TamilNadu 600034,
            India
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1424
                     /organism="Bacillus sp. ERI 44"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="ERI 44"
                     /isolation_source="soil"
                     /db_xref="taxon:555609"
                     /country="India: Lloyd Botanical Garden, Darjeeling,
West
                     Bengal"
     rRNA            <1..>1424
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 atacatgcaa gtcgagcgaa tggattaaga gcttgctctt atgaagttag cggcggacgg
       61 gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccataa gactgggata actccgggaa accggggcta
      121 ataccggata acattttgaa ccgcatggtt cgaaattgaa aggcggcttc ggctgtcact
      181 tatggatgga cccgcgtcgc attagctagt tggtgaggta acggctcacc aaggcaacga
      241 tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc
      301 tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg
      361 cgtgagtgat gaaggctttc gggtcgtaaa actctgttgt tagggaagaa caagtgctag
      421 ttgaataagc tggcaccttg acggtaccta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag
      481 cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tatccggaat tattgggcgt aaagcgcgcg
      541 caggtggttt cttaagtctg atgtgaaagc ccacggctca accgtggagg gtcattggaa
      601 actgggagac ttgagtgcag aagaggaaag tggaattcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt
      661 agagatatgg aggaacacca gtggcgaagg cgactttctg gtctgtaact gacactgagg
      721 cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg
      781 agtgctaagt gttagagggt ttccgccctt tagtgctgaa gttaacgcat taagcactcc
      841 gcctggggag tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc
      901 ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct
      961 ctgacaaccc tagagatagg gcttctcctt cgggagcaga gtgacaggtg gtgcatggtt
     1021 gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttgatc
     1081 ttagttgcca tcatttagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag
     1141 gtggggatga cgtcaaatca tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg
     1201 gacggtacaa agagctgcaa gaccgcgagg tggagctaat ctcataaaac cgttctcagt
     1261 tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagctggaat cgctagtaat cgcggatcag
```

```
     1321 catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cacgagagtt
     1381 tgtaacaccc gaagtcggtg gggtaacctt ttggagccag ccgc


LOCUS       EU440975               1518 bp    DNA     linear   BCT 31-AUG-
2008
DEFINITION  Bacillus thuringiensis strain 2PR56-10 16S ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   EU440975
VERSION     EU440975.1  GI:167508028
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus thuringiensis
  ORGANISM  Bacillus thuringiensis
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus
            cereus group.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1518)
  AUTHORS   Yuan,J., Lai,Q., Zheng,T. and Shao,Z.
  TITLE     PAH-Degrading Bacteria in the Southwest Indian Ocean Deep Sea
Water
            Column
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1518)
  AUTHORS   Yuan,J., Lai,Q., Zheng,T. and Shao,Z.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (30-JAN-2008) State of Oceanic Administration (SOA),
The
            Third Institute of Oceanography, Room 329, Daxue Road 184#,
Xiamen,
            Fujian 361005, P.R. China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1518
                     /organism="Bacillus thuringiensis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="2PR56-10"
                     /db_xref="taxon:1428"
     rRNA            <1..>1518
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tagagtttga tcctggctca ggatgaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgag
       61 cgaatggatt aagagcttgc tcttatgaag ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg
      121 taacctgccc ataagactgg gataactccg ggaaaccggg gctaataccg gataacattt
      181 tgaaccgcat ggttcgaaat tgaaaggcgg cttcggctgt cacttatgga tggacccgcg
      241 tcgcattagc tagttggtga ggtaacggct caccaaggca acgatgcgta gccgacctga
      301 gagggtgatc ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctcctacggg aggcagcagt
      361 agggaatctt ccgcaatgga cgaaagtctg acggagcaac gccgcgtgag tgatgaaggc
      421 tttcgggtcg taaaactctg ttgttaggga agaacaagtg ctagttgaat aagctggcac
      481 cttgacggta cctaaccaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg
      541 taggtggcaa gcgttatccg gaattattgg gcgtaaagcg cgcgcaggtg gtttcttaag
      601 tctgatgtga aagcccacgg ctcaaccgtg gagggtcatt ggaaactggg agacttgagt
      661 gcagaagagg aaagtggaat tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagagat atggaggaac
      721 accagtggcg aaggcgactt tctggtctgt aactgacact gaggcgcgaa agcgtgggga
      781 gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgagtgct aagtgttaga
      841 gggtttccgc cctttagtgc tgaagttaac gcattaagca ctccgcctgg ggagtacggc
      901 cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt
      961 taattcgaag caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcctctgaca accctagaga
     1021 tagggcttct ccttcgggag cagagtgaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc
     1081 gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gatcttagtt gccatcatta
     1141 agttgggcac tctaaggtga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa
     1201 atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggacggt acaaagagct
     1261 gcaagaccgc gaggtggagc taatctcata aaaccgttct cagttcggat tgtaggctgc
     1321 aactcgccta catgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata
     1381 cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc acaccacgag agtttgtaac acccgaagtc
     1441 ggtggggtaa ccttttttgaa cccggccgcc taaggggggaa caaatgatgg gggggaattc
     1501 taaaagggga aacccgta
```

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายณัฐพล ศรีเมือง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4910220034

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Srimuang, N., Dissara, Y. and Umsakul, K. 2009. Investigation of Physical and Biological Parameters of the Water Hyacinth Composting. Proceeding of the Graduate esearch Conference. Thammasat University, March 19, 2010.