

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้
จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรและการจำแนก
ชนิดด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

ผู้เขียน

นางสาวนันทนา จันทร์แก้ว

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) ปฐพีศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. อำพรธ ปรมศิริ ประธานกรรมการ
รศ. ดร. สมพร ชุนห์ลือชานนท์ กรรมการ

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากตัวอย่างปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก ใบไม้แห้ง และหัวเชื้อตัวเร่งการทำปุ๋ยหมัก รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ได้เชื้อแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส และเชื้อรา รวมทั้งหมด 189 ไอโซเลท เป็นเชื้อประเภท mesophile และ thermophile 108 และ 81 ไอโซเลท ตามลำดับ จากการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการพิจารณาจาก อัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone กับ โคโลนีของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ได้เชื้อจุลินทรีย์ประเภท thermophile และ mesophile ที่มีประสิทธิภาพดีจำนวน 12 และ 22 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุของโรคพืชจำนวน 4 ชนิด โดยใช้เชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย่อยสลายเซลลูโลสห้าอันดับแรก ในแต่ละประเภทในการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียประเภท thermophile จำนวน 1 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากกองใบไม้แห้งในสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ และแอคติโนมัยซีสประเภท mesophile จำนวน 1 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากกองปุ๋ยหมักจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ ซึ่งเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย่อยสลายเซลลูโลส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุของโรคพืช 4 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Fusarium spp.*, *Collectotrichum fragariae*, *Rhizoctonia spp.* และ

Sclerotium rolfsii จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนของ 16s rDNA พบว่าเชื้อแอสคิโนมัยซีสที่แยกได้มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces* spp. CHR28 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อแบคทีเรียมีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* YJ 001 99 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอสคิโนมัยซีสและแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทในการย่อยสลายและปลดปล่อยธาตุอาหารพืชจากวัสดุเหลือใช้ 4 ประเภท ได้แก่ ตะกอนที่ได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่ง ของเหลือใช้จากการเพาะเห็ด ตะกอนหม้อกรองโรงงานน้ำตาล และเศษเหลือของไบยาซูบ โดยใส่วัสดุเหลือใช้แต่ละประเภทลงในดินชุดสันทรายและดินที่เก็บจากสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ(ดินแม่เหียะ) ในอัตราที่ให้ไนโตรเจน 200 mg N/kg ในกรณีของตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสีย และของเหลือใช้จากการเพาะเห็ด ส่วนตะกอนหม้อกรองใช้ในอัตราที่ให้ฟอสฟอรัส 200 mg P/kg และเศษเหลือจากไบยาซูบใช้ในอัตราที่ให้โพแทสเซียม 200 mg K/kg ในการทดลองใช้วิธีการบ่มดินในถุงพลาสติกเป็นเวลา 2 เดือน ภายใต้อุณหภูมิห้อง และที่ระดับความชื้น 50% ของความชื้นที่ดินสามารถอุ้มไว้ได้สูงสุด

ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ดินและวัสดุที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ การใส่เชื้อแอสคิโนมัยซีสและแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส มีผลทำให้การปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนจากดินชุดสันทรายที่ใส่ตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสียเพิ่มขึ้นที่ระยะการบ่มครบ 1 และ 2 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใส่เชื้อ และเชื้อแอสคิโนมัยซีสให้ผลดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย สำหรับดินแม่เหียะที่ระยะการบ่ม 1 เดือน ได้ผลเช่นเดียวกับดินชุดสันทราย แต่ที่ระยะ 2 เดือน มีเฉพาะการใส่เชื้อแอสคิโนมัยซีสที่ทำให้ปริมาณ อนินทรีย์ไนโตรเจนในดินมีมากกว่าการไม่ใส่เชื้อ การใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลต่อการปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนในดินทั้ง 2 ชนิดที่ใส่ของเหลือใช้จากการเพาะเห็ด

เมื่อใช้ดินและวัสดุที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าในดินชุดสันทราย ปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างการใส่เชื้อจุลินทรีย์กับชนิดของวัสดุเหลือใช้ไม่มีผลต่อการปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนทั้งที่ระยะ 1 และ 2 เดือนของการบ่ม การใช้เชื้อแอสคิโนมัยซีสและแบคทีเรียให้ผลไม่แตกต่างกัน และเชื้อทั้งสองชนิดทำให้การปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนในดินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ วัสดุเหลือใช้ที่ทำให้อนินทรีย์ไนโตรเจนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญคือกากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสีย สำหรับดินแม่เหียะพบว่าในช่วง 1 เดือนของการบ่ม การใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้การปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนในดินที่ใส่กากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น ในขณะที่ดินที่ใส่ของเหลือใช้จากการเพาะเห็ดมีการปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับดินที่ไม่มีการใส่วัสดุเหลือใช้ ส่วนการใส่เชื้อแอสคิโนมัยซีสไม่มีผลต่อการปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนในดินในทางสถิติ เมื่อบ่มดินครบ 2 เดือน พบว่าการปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนของดินแม่เหียะที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อมีการใส่วัสดุเหลือใช้ทั้ง 2 ประเภท

และการใส่เชื้อแบคทีเรียให้ผลดีกว่าการใส่เชื้อแอกติโนมัยซีส ในแง่ของการเพิ่มการปลดปล่อยอนินทรีย์ไนโตรเจนในดิน

สำหรับผลการใส่จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสต่อการปลดปล่อยฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้ในดินที่ใส่ตะกอนหม้อกรอง พบว่าในดินชุดสันทรายและแม่เหิยะที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ผลเหมือนกัน คือการใส่เชื้อแบคทีเรียและแอกติโนมัยซีสทำให้การปลดปล่อยฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 1 เดือนและเชื้อแบคทีเรียให้ผลดีกว่าแอกติโนมัยซีสสำหรับระยะ 2 เดือนพบว่า มีเฉพาะการใส่เชื้อแบคทีเรียที่มีผลทำให้การปลดปล่อยฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้จากดินที่ใส่ตะกอนหม้อกรองเพิ่มขึ้น ในกรณีของดินและวัสดุที่ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่า ทั้งดินชุดสันทรายและดินแม่เหิยะมีการปลดปล่อยฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อมีการใส่ตะกอนหม้อกรองและเชื้อแบคทีเรียทำให้การปลดปล่อยฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้เพิ่มขึ้น

การใส่เศษเหลือของไບยาสูบลงในดินที่ไม่ฆ่าเชื้อพบว่า มีผลทำให้การปลดปล่อยโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ได้ในดินชุดสันทรายและแม่เหิยะเพิ่มขึ้น การใส่เชื้อแบคทีเรียและแอกติโนมัยซีสให้ผลดีไม่แตกต่างกันในการเพิ่มการปลดปล่อยโพแทสเซียมในดินชุดสันทรายในระยะ 1 เดือน แต่ในระยะ 2 เดือน แบคทีเรียให้ผลดีกว่าแอกติโนมัยซีส เมื่อใช้ดินและวัสดุที่ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่า การใส่เศษเหลือของไບยาสูบ ทำให้การปลดปล่อยโพแทสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในดินชุดสันทรายและดินแม่เหิยะ ในดินแม่เหิยะ การใช้แบคทีเรียมีผลทำให้การปลดปล่อยโพแทสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ในดินที่ระยะ 2 เดือนเพิ่มขึ้น ส่วนการใช้แอกติโนมัยซีสไม่มีผลแต่อย่างใด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

Thesis Title	Effective Microorganisms for Agricultural and Agroindustrial Waste Degradation and Molecular Techniques for Identification	
Author	Miss. Nanphana Chankaew	
Degree	Master of Science (Agriculture) Soil Science	
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Ampan Bhromsiri	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Somporn Choonluchanon	Member

Abstract

Ten samples of manures, compost, dry leaves and compost inoculant were used for isolation of cellulolytic microorganisms. The total numbers of 189 microbial isolates were obtained consisting of 108 mesophilic isolates and 81 thermophilic ones. Based on diameter of clear zone to colony ratio and CMCase activities, 12 effective cellulolytic mesophilic microbial isolates and 22 thermophilic ones were selected. The first five effective cellulolytic isolates of thermophilic and mesophilic microbes were used for antagonistic activities against four fungal disease pathogens. It was found that one isolate of thermophilic bacterium from the pile of dry leaves at Mae Hae research station and training center and one isolate of mesophilic actinomycete isolated from the compost at Faculty of Agriculture showed their antagonistic activities against 4 fungal disease pathogens namely, *Fusarium spp.*, *Colletotrichum fragariae*, *Rhizoctonia spp.* and *Sclerotium rolfsii*. Based on base sequence of 16s rDNA, the selected actinomycete isolate was similar to *Streptomyces spp.* up to 99% while the selected bacterial isolate was similar to *Bacillus subtilis* up to 99%.

These two cellulolytic microbial isolates were tested for their effects on N, P and K releasing from decomposition of four types of waste material in Sansai soil series and the soil collected from Mae Hae Research station and training center (Mae Hae soil). The tested wastes

were sewage sludge from oxidation pond of potato processing factory, mushroom compost waste, filter cake from sugar cane mill and the waste from tobacco leaves. Sewage sludge and mushroom compost were added into each soil at the rate of 200 mg N/kg while filter cake and tobacco leaf were added at the rate of 200 mg P/kg and 200 mg K/kg respectively. The soils with and without addition of each waste material were incubated in the plastic bags under room temperature and at soil moisture level of 50% of WHC for 2 months. It was found that inoculation of both cellulolytic microbes resulted in significant increasing of mineralizable N of sewage sludge added San Sai soil at one and two months after incubation. Actinomycete inoculation was significantly better than bacterial one. The similar result as San Sai soil was found for Mae Hae soil for 1 month incubation period but at 2 months after incubation only actinomycete had significant effect on improvement of mineralizable N as compared to uninoculated control treatment. No effects of cellulolytic microbial inoculations on mineralizable N of mushroom compost waste added soils were found when sterile soils and waste materials were used. There was no interaction effect of microbial inoculation and type of waste material on mineralizable N at both 1 and 2 months after incubation. There was no significant difference between the two cellulolytic microbial inoculation and both resulted in increasing of the amount of mineralizable N released from the waste added San Sai soil. Addition of sewage sludge increased significantly the amount of released mineralizable N in sterile Mae Hae soil while that in mushroom compost waste added one reduced significantly compared to the control soil without waste material addition. The effect of actinomycete inoculation on released mineralizable N from sterile Mae Hae soil was not significant. At two months after incubation, the addition of both sewage sludge and mushroom compost waste increased the amount of released mineralizable N of sterile Mae Hae soil and the stimulation effect from bacterial inoculation was significantly better than the actinomycete one.

In nonsterile filter cake added soils, inoculation of cellulolytic microbes resulted in significant improvement of the amount of released available P at 1 month after incubation. Bacterial inoculation was better than actinomycete at both incubation periods. In sterile soils, only bacterial inoculation had significant stimulation effect on improvement of available P released from filter cake added soils.

In nonsterile tobacco leaf added soils, both cellulolytic microbial inoculations had significant effects on improvement of the amount of exchangeable K of both San Sai soil series and Mae Hae soil. There was no difference between bacterial and actinomycete inoculations on the effects on improvement of K releasing of San Sai soil series at 1 month incubation period but

at two months after incubation bacterial inoculation was significantly better than actinomycete. In sterile soils, addition of tobacco leaf waste, improved significantly the amount of exchangeable K and only bacterial incubation showed significant stimulation effect.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved