รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยกากขี้แป้ง

โดย ซูไฮมิน เจ๊ะมะลี และคณะ

สิงหาคม 2556

สัญญาเลขที่ RDG5550071

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยกากขี้แป้ง

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นายซูไฮมิน เจ๊ะมะลี	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอิสลามยะลา
2. นางสาวสะเราะ นิยมเดชา	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอิสลามยะลา
3. นายดุลลาเต๊ะ อาแวกะจิ	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอิสลามยะลา
4. นางสาวรอกีเยาะ อาแซ	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอิสลามยะลา

ชุดโครงการ โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอิสลามยะลา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช. – สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยกากขี้แป้ง

(ภาษาอังกฤษ) Isolation of Effective Microorganisms to Degrade Sludge

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ซูไฮมิน เจ๊ะมะลี

หน่วยงาน สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีฯ มหาวิทยาลัยอิสลามยะลา

ที่อยู่ 135/8 ม. 3 ต.เขาตูม อ. ยะรัง จ.ปัตตานี 94160

โทรศัพท์/โทรสาร 073-418609 **E-mail address** s4545305@hotmail.com

ผู้ร่วมวิจัย 1. นางสาวสะเราะ นิยมเดชา

2. นายดุลลาเต๊ะ อาแวกะจิ

3. นางสาวรอกีเยาะ อาแซ

งบประมาณทั้งโครงการ 140,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2555 – ถึงวันที่ 31 กรกฎาคม 2556

ปัญหาและความสำคัญของโครงการ

กากขี้แป้งเป็นของเสียที่เกิดจากกระบวนการปั่นน้ำยางสดในอุตสาหกรรมผลิตน้ำยางข้น มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาวหรือสีเหลืองอ่อน เนื่องจากมีแมกนีเซียมและฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ นอกจากนี้กากขี้แป้งมีธาตุอาหารที่สามารถนำไปใช้ในการปลูกพืช ดังนั้น จึงมีการนำกากขี้แป้งไปประยุกต์ใช้ในการทำปุ๋ย ซึ่งการใช้จุลินทรีย์เพื่อช่วยย่อยสลายกากขี้แป้งจะทำให้มีการปลดปล่อยธาตุอาหารจากแหล่งธาตุอาหารให้กับพืชได้รวดเร็วยิ่งขึ้น โดยปัจจุบันจะมีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขายตามท้องตลาด แต่หัวเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้านั้น อาจจะไม่มีส่วนช่วยในการย่อยกากขี้แป้งเลย ดังนั้นหากสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยกากขี้แป้งได้อย่างรวดเร็วก็สามารถนำกากขี้แป้งไปใช้ประโยชน์ได้ดียิ่งขึ้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการคัดแยกเพื่อหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยกากขี้แป้ง เพื่อนำกากขี้แป้งไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากขี้แป้ง
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายกากขี้แป้ง
3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งของจุลินทรีย์ที่แยกได้กับหัวเชื้อทางการค้า

ผลการดำเนินงาน

เก็บตัวอย่างกากขี้แป้งที่กองทับถมรอบๆ โรงงานอุตสาหกรรมน้ำยางข้นทั้ง 3 แหล่ง ได้แก่ เก็บในกระสอบเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ 1 เดือน และ 3 เดือน คัดเลือกและแยกจุลินทรีย์โดยการผสมกากขี้แป้งในอาหาร NA ความเข้มข้นต่างๆ คือร้อยละ 10 20 30 40 และ 50 พบว่า ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารที่ผสมกากขี้แป้งที่เก็บเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในทุกความเข้มข้น แต่พบจุลินทรีย์บนอาหารที่ผสมกากขี้แป้งความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่เก็บเป็นเวลา 1 เดือน ในขณะที่กากขี้แป้งที่เก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน พบจุลินทรีย์เมื่อผสมในการอาหารที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20 อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่พบมีน้อย สังเกตและแยกความแตกต่างได้ยาก เนื่องจากตะกอนกากขี้แป้งมีสีที่กลมกลืนกับเชื้อ จึงได้แยกเชื้อเพิ่มเติมด้วยวิธีการ pour plate จากการละลายกากขี้แป้งด้วยสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.5 และทำการเจือจางระดับต่างๆ พบว่าสารละลายกากขี้แป้งที่เจือจาง 10^{-2} สามารถตรวจนับจุลินทรีย์และแยกจุลินทรีย์ที่มีความแตกต่างได้

คัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความแตกต่างของลักษณะโคโลนีเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยสังเกตภายใต้กล้องสเตอริโอ พบว่า จุลินทรีย์ในกากขี้แป้งมีทั้งจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ โดยสามารถแยกความแตกต่างของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศได้ 6 ไอโซเลท และไม่ใช้อากาศได้ 2 ไอโซเลท และนำจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศมา streak plate บนอาหาร NA 2-3 รอบ เพื่อให้แน่ใจว่าได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) และสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะเซลล์จุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียติดสีแกรมบวกทุกไอโซเลทยกเว้นไอโซเลทที่ 2 เป็นเชื้อรา

นำเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์จากแต่ละไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อคัดเลือกเชื้อที่เจริญได้ดีบนอาหารวุ้น (agar) ที่ผสมกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 15 พบว่า เชื้อแต่ละชนิดสามารถเจริญได้บนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้งแตกต่างกัน คือ เชื้อไอโซเลทที่ 4 เจริญได้ดีที่สุดโดยให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยสูงสุด 2.13 เซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือ เชื้อไอโซเลทที่ 1 ให้เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.58 เซนติเมตร ในขณะที่เชื้อไอโซเลทที่ 2 3 5 และ 6 ให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีไม่แตกต่างทางสถิติ

ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากขี้แป้งต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเลือกศึกษาเฉพาะเชื้อไอโซเลทที่ 4 ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญได้ดีที่สุด มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น (agar) ที่ผสมกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 10 20 30 40 และ 50 พบว่า ความเข้มข้นกากขี้แป้งเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การขยายขนาดโคโลนีเพิ่มขึ้น และเมื่อบ่มเป็นระยะเวลานานขึ้น กากขี้แป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 ให้การขยายขนาดโคโลนีมากไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อบ่มที่ระยะเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นกากขี้แป้งที่ร้อยละ 50 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโดยกลุ่มเชื้อต่อไป

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์เดี่ยวๆ บนอาหารที่เติมกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 50 โดยแบ่งกลุ่มเชื้อ 2 กลุ่ม คือ เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 และเชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยวไอโซเลทที่ 4 พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 ให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยสูงที่สุด 3.3 เซนติเมตร รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 ให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 2.98 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อบ่มที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ทดสอบการย่อยสลายกากขี้แป้งโดยการหมักแต่ละทรีตเมนต์ของเชื้อคือ เชื้อเดี่ยวไอโซเลทที่ 4 เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 เชื้อกลุ่มไอโซเลทที่ 1-8 เปรียบเทียบกับหัวเชื้อทางการค้า (EM) และชุดควบคุม (หมักด้วยน้ำ) ซึ่งแต่ละทรีตเมนท์ทำการหมัก 2 แบบ คือ หมักแบบแห้ง (dry) ใช้จุลินทรีย์ที่ขยายในกากน้ำตาลจำนวน 10^6 CFU/ml เข้มข้นร้อยละ 10 และหมักแบบเปียก (submerge) ใช้จุลินทรีย์ที่ขยายในกากน้ำตาลจำนวน 10^6 CFU/ml เข้มข้นร้อยละ 50 ทำการวิเคราะห์ pH อุณหภูมิ และจำนวนจุลินทรีย์รวมทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 30 วัน และวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด ความชื้น ของแข็งที่ระเหยได้ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ก่อนและหลังหมัก 30 วัน จากการทดลองพบว่า กากขี้แป้งที่หมักแบบ submerge โดยเชื้อไอโซเลทที่ 4 ให้ค่า pH สูงสุด 7.78 ให้ค่าอุณหภูมิสูงสุด 30.5 องศาเซลเซียส และให้จำนวนจุลินทรีย์รวมมากที่สุด 25.5×10^{12} CFU/ml รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 เชื้อกลุ่มไอโซเลทที่ 1-8 หัวเชื้อทางการค้า (EM) และชุดควบคุม (หมักด้วยน้ำ) ตามลำดับ หลังจากหมัก 20 วัน สำหรับสมบัติทางกายภาพ พบว่า กากขี้แป้งที่ได้จากการหมักโดยเชื้อไอโซเลทที่ 4 ให้ปริมาณของแข็งทั้งหมดมีค่าลดลงจากเดิมมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 15.64 โดยน้ำหนัก ในขณะที่ความชื้นมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของแข็งที่ระเหยได้มีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิมมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 18.13 โดยน้ำหนัก แต่ปริมาณของแข็งที่คงอยู่กลับลดลงมากที่สุด นอกจากนี้ศึกษาสมบัติของการให้ธาตุอาหารพืช พบว่า ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดลดลงจากเดิมมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 36.15 โดยน้ำหนัก ในขณะที่ฟอสฟอรัสทั้งหมดและโพแทสเซียมมีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิมมาก

ที่สุดคิดเป็นร้อยละ 82.34 และ 46.42 ตามลำดับ รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 เชื้อกลุ่มไอโซเลทที่ 1-8 หัวเชื้อทางการค้า (EM) และชุดควบคุม (หมักด้วยน้ำ) ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากขี้แป้ง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายกากขี้แป้ง และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งของจุลินทรีย์ที่แยกได้กับหัวเชื้อทางการค้า จากการทดลองสามารถคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์จากกากขี้แป้งได้โดยผสมกากขี้แป้งที่ทับถมเป็นเวลานานๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสมกากขี้แป้งเข้มข้นน้อยๆ หรือแยกได้โดยผสมกากขี้แป้งในสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.5 และเจือจางที่ระดับต่างๆ จากนั้น ทำการ pour plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ที่ระดับเจือจาง 10^{-2} สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์รวมเท่ากับ 6.53×10^{5} CFU/g และแยกจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยการ streak plate สังเกตความแตกต่างของลักษณะโคโลนีและโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากกากขี้แป้งทั้ง 2 วิธีมีทั้งหมด 8 ไอโซเลท แบ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ 5 ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศ 2 ไอโลเลท โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ยกเว้นไอโซเลทที่ 2 เป็นเชื้อรา เมื่อได้จุลินทรีย์แล้วจึงทดสอบการย่อยกากขี้แป้งในจานเพาะเลี้ยงโดยเชื้อเดี่ยวๆ พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 มีการขยายขนาดโคโลนีบนอาหารวุ้น (agar) ที่ผสมกากขี้แป้งร้อยละ 15 สูงกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นๆ จากนั้นนำเชื้อไอโซเลทที่ 4 มาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจากการทดลองกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 40-50 ที่ผสมในอาหารวุ้น (agar) ส่งเสริมการขยายขนาดโคโลนีได้ดี หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และทดสอบการย่อยกากขี้แป้งโดยกลุ่มเชื้อเปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยวไอโซเลทที่ 4 พบว่า เชื้อเดี่ยวไอโซเลทที่ 4 ให้การขยายขนาดโคโลนีสูงกว่ากลุ่มเชื้อในชุดทดลองอื่นๆ เมื่อทดสอบการย่อยสลายกากขี้แป้งในสภาพการหมักเป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ย่อยกากขี้แป้งได้ดีในการหมักแบบเปียกโดยใช้จุลินทรีย์ที่ขยายในกากน้ำตาลต่อกากขี้แป้ง 1:1 โดยน้ำหนัก โดยเชื้อไอโซเลทที่ 4 ย่อยสลายกากขี้แป้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 ไอโซเลทรวม 1-8 เชื้อทางการค้า (effective microorganism) และชุดที่หมักด้วยน้ำ ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดสอบการย่อยสลายกากขี้แป้งในจานเพาะเชื้อในเบื้องต้น โดยสังเกตจากค่า pH อุณหภูมิและปริมาณจุลินทรีย์รวมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัดในทุกๆ 5 วัน ปริมาณของแข็งรวม ปริมาณของแข็งที่คงอยู่และปริมาณไนโตรเจนรวมมีค่าลดลง ปริมาณความชื้น ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าเริ่มต้นและค่าที่ได้หลังการหมัก 30 วัน มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน และเมื่อนำเชื้อไอโซเลทที่ 4 ไปตรวจวิเคราะห์ปรากฏว่าเป็นเชื้อในกลุ่มบาซิลัส (*Bacillus spp.*)

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าควรวิจัยเพิ่มเติมและวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

การวิจัยนี้มุ่งหวังในการย่อยกากขี้แป้งที่เป็นของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำยางข้นโดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ กากขี้แป้งที่ผ่านการย่อยสลายและทำให้แห้ง สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยได้ หากบริษัทนำกลับมาใช้ประโยชน์ อาจจำหน่ายเชิงการค้าได้ เพิ่มมูลค่าของเสียจากอุตสาหรรมน้ำยางข้น ลดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้

กากขี้แป้งที่หมักร่วมกับ *Bacillus spp.* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูง ซึ่งใช้กากขี้แป้งผสมที่ทับถมมาแล้ว 1 สัปดาห์ 1 เดือน 3 เดือน คลุกเคล้ากัน ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ดังนั้นควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับการนำกากขี้แป้งสดมาหมักร่วมกับจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาผลของกากขี้แป้งสดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อและระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งในทางปฏิบัติจริง ถ้าสามารถนำกากขี้แป้งสดจากโรงงานมาหมักโดยจุลินทรีย์ได้ทันทีก็สามารถลดต้นทุนในการนึ่งฆ่าเชื้อกากขี้แป้งได้ ลดอิทธิพลของเชื้ออื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ *B. spp* และลดปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมได้

ศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับการขยายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพด้วยต้นทุนต่ำ และศึกษาวิธีการหมักกากขี้แป้งปริมาณมากที่ไม่ยุ่งยาก เพื่อให้บริษัทสามารถนำวิธีการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ได้

ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้วัสดุอื่นที่เป็นกากอินทรีย์หมักร่วมกับกากขี้แป้งและจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ในกรณีที่กากขี้แป้งสดมีผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ หรือในกรณีที่ต้องการร่นระยะเวลาในการย่อยสลาย หรือในกรณีที่ต้องการเพิ่มธาตุอาหารพืชให้เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

ผลงานทางวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

งานวิจัยนี้กำลังนำมาเขียนผลงานวิชาการเพื่อนำเสนอในที่ประชุมวิชาการหรือตีพิมพ์ในวารสารต่อไป

รหัสโครงการ : RDG5550071
ชื่อโครงการ : การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยกากขี้แป้ง
ชื่อนักวิจัย : ซูไฮมิน เจ๊ะมะลี
สังกัด : สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีฯ มหาวิทยาลัยอิสลามยะลา
โทรศัพท์ : 073418609
E-mail : s4545305@hotmail.com
ระยะเวลาโครงการ : 1 สิงหาคม 2555 ถึง 31 กรกฎาคม 2556

บทคัดย่อ

กากขี้แป้งเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำยางข้น มีองค์ประกอบของธาตุอาหารพืช แต่ย่อยสลายช้าตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยกากขี้แป้ง ซึ่งช่วยลดกลิ่นและสามารถนำกากขี้แป้งไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมปุ๋ย งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกจุลินทรีย์จากกากขี้แป้งที่ทับถมเป็นเวลา 1 สัปดาห์ 1 และ 3 เดือน ผสมคลุกเคล้ากัน โดยวิธีการผสมกากขี้แป้งร้อยละ 15 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และอีกวิธีคือ ผสมกากขี้แป้งในสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.5 และทำการ pour plate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จากการทดลองพบว่า จุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากกากขี้แป้งและทำการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA สังเกตความแตกต่างของลักษณะโคโลนีและโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีทั้งหมด 8 ไอโซเลท เมื่อได้จุลินทรีย์แล้วจึงทดสอบการย่อยกากขี้แป้งในจานเพาะเลี้ยงโดยเชื้อเดี่ยวๆ พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 มีการขยายขนาดโคโลนีบนอาหารวุ้น (agar) ที่ผสมกากขี้แป้งร้อยละ 15 สูงกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นๆ จากนั้นศึกษาความเข้มข้นกากขี้แป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อไอโซเลทที่ 4 พบว่า กากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 40-50 ที่ผสมในอาหาร วุ้น (agar) ส่งเสริมการขยายขนาดโคโลนีได้ดี และทดสอบการย่อยกากขี้แป้งโดยเชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 เชื้อกลุ่มไอโซเลทที่ 1-8 เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยวไอโซเลทที่ 4 ในจานเพาะเลี้ยงที่มีกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 50 พบว่าเชื้อเดี่ยวไอโซเลทที่ 4 ยังคงให้การขยายขนาดโคโลนีสูงกว่ากลุ่มเชื้อในชุดทดลองอื่นๆ และทดสอบการย่อยสลายกากขี้แป้งในสภาพการหมักแบบเปียก (จุลินทรีย์ต่อกากขี้แป้ง 1:1 โดยน้ำหนัก) และแบบแห้ง (จุลินทรีย์ต่อกากขี้แป้ง 1:5 โดยน้ำหนัก) เป็นเวลา 30 วัน โดยใช้จุลินทรีย์ที่ขยายแต่ละชุดทดลองจำนวน 10^6 CFU/ml พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 ย่อยสลายกากขี้แป้งได้ดีกว่ากลุ่มเชื้ออื่นๆ รวมทั้งกลุ่มเชื้อทางการค้าด้วย โดยจุลินทรีย์ย่อยกากขี้แป้งได้ดีในการหมักแบบเปียกที่ใช้จุลินทรีย์ขยายต่อกากขี้แป้ง 1:1 โดยน้ำหนัก สอดคล้องกับผลการทดสอบการย่อยสลายกากขี้แป้งในจานเพาะเชื้อในเบื้องต้น โดยสังเกตจากค่า pH อุณหภูมิและปริมาณจุลินทรีย์รวมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเห็นได้ชัดในทุกๆ 5 วัน ปริมาณของแข็งรวม ปริมาณของแข็งที่คงอยู่และปริมาณไนโตรเจนรวมมีค่าลดลง ในขณะที่ปริมาณความชื้น ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าที่ได้ก่อนและหลังการหมัก 30 วัน มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน และเมื่อนำเชื้อไอโซเลทที่ 4 ไปตรวจวิเคราะห์ปรากฏว่าเป็นเชื้อ *Bacillus spp.*

Project code: RDG5550071
Project title: Isolation of Effective Microorganisms to Degrade Sludge
Investigator: Suhaimin Chehmalee
Telephone number: 073-418609
E-mail: s4545305@hotmail.com
Project duration: 1 August 2012 to 31 July 2013

Abstract

Centrifuged sludge is waste from concentrated latex manufacturing process containing some plant nutrient elements, but slowly degrades naturally. Thus, the isolation of effective microorganism to degrade sludge could reduce odor and used as industrial fertilizer. In this study, isolation of microorganism from sludge at 1 week, 1 and 3 months old were carried out on nutrient agar (NA) added with 15% sludge as well pour plate technique of 0.5% peptone solution with varied amount of sludge. Eight isolates were isolated on NA. Each isolate were used for screening of sludge-degrading ability on NA supplemented with 15% sludge by using point inoculation technique. It was found that isolate 4 gave higher colony diameter than another isolate. Concentration of sludge on colony diameter of isolate 4 was investigated. The result showed that 40-50% sludge containing agar gave the highest colony diameter. The sludge degradation efficiency by mixed isolate (1,4 and 8 and 1-8) compared with single isolate 4 were compared on agar adding 50% sludge. Isolate 4 also gave higher colony diameter than mixed isolate. The sludge degradation efficiency of the microorganisms was monitored for 30 days. Comparing submerge (microorganism: sludge as the ratio of 1:1 (w/w)) and dry (1:5 (w/w)) system of fermentation using 10^6 CFU/ml of total microbial count from each treatment. The studied found that Isolate 4 gave the highest pH, temperature and total microbial count when compared with mixed isolate and commercial microorganisms (EM; effective microorganism) by submerge system for 20 days. Total solid content, fixed solid content and total nitrogen were lowered whereas moisture content, total phosphorous and potassium were higher when compared between initial and after 30 days of fermentation, the isolate 4 was identified as *Bacillus spp.*

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปของผู้บริหาร	i
บทคัดย่อ	v
Abstract	vi
สารบัญ	vii
สารบัญตาราง	viii
สารบัญรูปภาพ	ix
เนื้อหาวิจัย	
1. ความสำคัญของโครงการ	1
2. วัตถุประสงค์	1
3. แนวคิดในการวิจัย	2
4. วิธีการ	2
5. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	4
5.1 เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและธาตุ N P และ K	4
5.2 คัดเลือกจุลินทรีย์จากกากขี้แป้งและทำให้บริสุทธิ์	5
5.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งโดยจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อ	9
5.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโดยเชื้อเดี่ยว	9
5.3.2 ทดสอบความเข้มข้นกากขี้แป้งที่เหมาะสมต่อการย่อยโดยเชื้อจุลินทรีย์	10
5.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโดยเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม	12
5.4 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งโดยจุลินทรีย์ในสภาพการหมัก	12
6. สรุปผลการทดลอง	24
7. ข้อเสนอแนะ	24
8. เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก ก ขั้นตอนการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์	27
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อในการย่อยกากขี้แป้ง	28
ภาคผนวก ค รูปจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ	29
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร	30
ภาคผนวก จ ตอบข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	31

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ AOAC (2000)	4
ตารางที่ 2	สมบัติทางกายภาพและทางเคมีเบื้องต้นของตัวอย่างกากขี้แป้ง	4
ตารางที่ 3	การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่ผสมกากขี้แป้งความเข้มข้นต่างๆ	6
ตารางที่ 4	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total microbial) จากการ pour plate สารละลายตัวอย่างกากขี้แป้งที่เจือจางระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร NA	6
ตารางที่ 5	ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศแต่ละไอโซเลท บนอาหาร NA ที่แยกได้จากกากขี้แป้ง	8
ตารางที่ 6	การขยายขนาดโคโลนีจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทบนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้งร้อยละ 15	10
ตารางที่ 7	การเจริญของโคโลนีไอโซเลทที่ 4 บนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้งความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มเป็นระยะเวลาต่างๆ	11
ตารางที่ 8	การขยายขนาดโคโลนีแต่ละทรีตเมนต์บนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 50 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาต่าง ๆ	12

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	การเก็บตัวอย่างกากขี้แป้งจากแหล่งต่างๆ รอบๆ โรงงาน	5
รูปที่ 2	ลักษณะจุลินทรีย์ที่เจริญบนกากขี้แป้งจากการทับถมเป็นเวลา 3 เดือน ที่ผสมในอาหารเข้มข้นร้อยละ 15	6
รูปที่ 3	ปริมาณจุลินทรีย์ที่เจือจางระดับความเข้มข้นต่างๆ จากน้อยไปมาก ก: 10^{-1} ข: 10^{-2} ค: 10^{-3} ง: 10^{-4} และ จ: 10^{-5} ตามลำดับ	7
รูปที่ 4	ลักษณะของโคโลนีจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทที่ได้จากการ streak plate บนอาหาร NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	8
รูปที่ 5	ลักษณะและรูปร่างของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ผ่านการย้อมแกรม	9
รูปที่ 6	ลักษณะของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 ที่ขยายขนาดเพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับการเพิ่มขึ้นของกากขี้แป้งร้อยละ 10(ก) 20(ข) 30(ค) 40(ง) และ 50(จ) บนอาหารวุ้น (agar) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	11
รูปที่ 7	การขยายขนาดโคโลนีแต่ละทรีตเมนต์บนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 50 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	12
รูปที่ 8	ค่า pH กากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบแห้ง	13
รูปที่ 9	ค่า pH กากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบเปียก	14
รูปที่ 10	ค่าอุณหภูมิกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบแห้ง	15
รูปที่ 11	ค่าอุณหภูมิกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบเปียก	15
รูปที่ 12	จำนวนจุลินทรีย์รวมในกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบแห้ง	16
รูปที่ 13	จำนวนจุลินทรีย์รวมในกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบเปียก	17
รูปที่ 14	ปริมาณของแข็งรวมของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน	18
รูปที่ 15	ปริมาณความชื้นของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน	19
รูปที่ 16	ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน	20
รูปที่ 17	ปริมาณของแข็งที่คงอยู่ของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน	21
รูปที่ 18	ปริมาณไนโตรเจนของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน	22
รูปที่ 19	ปริมาณฟอสฟอรัสของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน	23
รูปที่ 20	ปริมาณโพแทสเซียมของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน	23

เนื้อหาวิจัย

1. ความสำคัญของโครงการ

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางมากถึง 14.3 ล้านไร่ (สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง, 2550) จึงทำให้มีโรงงานอุตสาหกรรมยางพาราเป็นจำนวนมาก ซึ่งกระบวนการผลิตและส่งออกจะนิยมทำในรูปของน้ำยางข้น หรือยางแผ่น โดยกระบวนการผลิตน้ำยางข้นส่วนใหญ่จะนิยมใช้การปั่นเหวี่ยงซึ่งจะก่อให้เกิดของเสียที่เรียกว่า กากขี้แป้ง ที่เกิดจากส่วนของการตกตะกอนในถังพักน้ำยางสดและกระบวนการปั่นน้ำยางสดในอุตสาหกรรมผลิตน้ำยางข้น (วันชัย, 2540) ลักษณะของกากขี้แป้ง เป็นของแข็ง สีขาวหรือสีเหลืองอ่อน เนื่องจากมีแมกนีเซียมและฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ (สมทิพย์ และคณะ, 2545) ในทางเคมีเรียกว่า ตะกอนของแมกนีเซียม แอมโมเนียมฟอสเฟต ซึ่งเกิดจากการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและสังกะสีออกไซด์ (Sathyaseelan, 2006) เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำยางที่มีอยู่เดิม โดยอัตราการเกิดกากขี้แป้งต่อน้ำยางสด พบว่า น้ำยางสด 1 ตัน ทำให้เกิดกากขี้แป้งเฉลี่ย 9.7 กิโลกรัม (วราศรี, 2543) นอกจากนี้กากขี้แป้งยังประกอบด้วย สิ่งเจือปนต่างๆ เช่น ฝุ่น ทรายเปลือกไม้ มีนักวิจัยหลายท่านที่ศึกษาเกี่ยวกับสมบัติของกากขี้แป้งและพบว่า กากขี้แป้ง สามารถที่จะนำไปใช้ในการปลูกพืชได้ เนื่องจากมีธาตุอาหาร ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แมกนีเซียม และสังกะสีอยู่ในช่วง 3.40-3.71, 11.32-15.79, 0.64-1.56, 5.44-14.34 และ 0.16-0.51 ร้อยละโดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ (สะเราะ, 2552) โดยปริมาณสังกะสีเมื่อนำไปปลูกพืชและวิเคราะห์แล้วพบว่า อยู่ในช่วงที่ยอมรับให้มีได้ในดินเพื่อการเกษตร คือไม่เกิน 280-300 mg/kg (วลัยพร, 2547) กากขี้แป้งที่เกิดขึ้นเป็นของเสียที่มีความชื้นสูง และมีค่าสัดส่วนของ BOD ต่อ COD ของของเหลวที่สกัดได้มากกว่า 0.5 ดังนั้น กากขี้แป้งเมื่อละลายน้ำมีสมบัติที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ (ธนธรณ์, 2546) ในปัจจุบันจึงมีการนำกากขี้แป้งไปประยุกต์ใช้ในการทำปุ๋ย วัสดุปลูก หรือวัสดุปรับปรุงดิน หรืออาจมีการนำไปหมักเป็นปุ๋ยเหลว หรือปุ๋ยหมัก ซึ่งการใช้จุลินทรีย์เพื่อช่วยย่อยสลายกากขี้แป้งจะทำให้มีการปลดปล่อยธาตุอาหารจากแหล่งธาตุอาหารให้กับพืชได้รวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้การเจริญของพืชและสมบัติของดินดีขึ้นเมื่อเติมสารอินทรีย์ที่เป็นปุ๋ยชีวภาพ (Soumaré *et al.*, 2002) การเติมจุลินทรีย์ลงไปไม่เพียงแต่เพิ่มการดูดซึมธาตุอาหารของพืชเท่านั้นแต่ยังปรับปรุงคุณภาพของดินด้วย เช่น ปริมาณอินทรียวัตถุและปริมาณไนโตรเจนในดิน เชื้อราไมคอร์ไรซา มีอัตราการเข้าสู่รากเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมแบคทีเรียลงไป (Wu *et al.* 2005) โดยปัจจุบันจะมีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขายตามท้องตลาด เช่น การเติมหัวเชื้อ EM ซึ่งสามารถย่อยสลายกากขี้แป้งได้ในระบบหมักแบบใช้อากาศ แต่หัวเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้านั้น (สะเราะ, 2552) จะประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายกลุ่มโดยบางชนิดอาจจะไม่มีส่วนช่วยในการย่อยกากขี้แป้งเลย ดังนั้นหากสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยกากขี้แป้งได้อย่างรวดเร็วก็สามารถนำกากขี้แป้งไปใช้ประโยชน์ได้ดียิ่งขึ้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการคัดแยกเพื่อหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง ย่อยกากขี้แป้งได้ดีและรวดเร็วเพื่อนำกากขี้แป้งไปใช้ประโยชน์ต่อไป เช่น ใช้ในการทำปุ๋ย ใช้ในการหมักเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพ เป็นต้น

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากขี้แป้ง
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายกากขี้แป้ง
3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งของจุลินทรีย์ที่แยกได้กับหัวเชื้อทางการค้า

3. แนวคิดในการวิจัย

ปริมาณกากขี้แป้งที่เพิ่มขึ้นตามความต้องการผลิตน้ำยางข้น โดยของเสียในรูปกากขี้แป้งจากกระบวนการผลิตน้ำยางข้นจะมีประมาณ 0.39-1.58 ตันต่อวันต่อโรงงาน (วันชัย, 2540) ซึ่งกากขี้แป้งที่เกิดขึ้นแทนที่จะทิ้งเป็นของเสียสะสมและส่งกลิ่นเหม็นอยู่บริเวณโรงงาน สามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นได้อีก เช่น นำไปผลิตเป็นปุ๋ย สารปรับปรุงดิน หรือวัสดุปลูก เนื่องจากมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะธาตุอาหารหลัก NPK และธาตุอาหารรอง Mg, Zn และ Ca (เสาวนีย์และคณะ, 2547) และสามารถนำกากขี้แป้งไปทำเป็นปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยน้ำชีวภาพได้ มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ EM ในด้านการเกษตร โดย กนัฐยาและอุบล (2549) พบว่าจุลินทรีย์ EM ย่อยสลายกากขี้แป้งได้และทำให้ปริมาณของแข็งในกากขี้แป้งมีค่าลดลงเหลือร้อยละ 38.8-50.5 ซึ่งการนำกากขี้แป้งมาหมักหรือทำให้เกิดกระบวนการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ เมื่อนำไปใช้ในการปลูกพืชจะทำให้พืชดูดมาใช้ง่ายขึ้น เนื่องจากสามารถดูดซึมธาตุอาหารได้ดีและดินมีคุณภาพที่ดีขึ้น แต่ในการใช้ย่อยสลายโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์โดยทั่วไป ไม่สามารถทราบได้ว่าจุลินทรีย์ชนิดใดที่สามารถย่อยสลายกากขี้แป้งได้ ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงต้องการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากขี้แป้ง ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่และมีตะกอนของแมกนีเซียม แอมโมเนียมฟอสเฟต ที่ย่อยสลายได้ยาก โดยเมื่อได้จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายกากขี้แป้งได้ ก็สามารถที่จะทำการขยายหัวเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตปุ๋ยหมัก ปุ๋ยน้ำชีวภาพ และการหมักกากขี้แป้งเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เป็นการใช้ประโยชน์กากขี้แป้งได้มากขึ้น ลดปริมาณกากขี้แป้งในโรงงานและลดการใช้จุลินทรีย์ทางการค้าที่ไม่ทราบกลุ่มจุลินทรีย์ที่แน่นอน

4. วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและธาตุ N P และ K

เก็บตัวอย่างกากขี้แป้งที่กองทับถมรอบๆ บริษัท วิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของกากขี้แป้งเพื่อดูความแปรปรวน โดยวิเคราะห์ ค่า pH อุณหภูมิ ความชื้น ของแข็งรวม ของแข็งที่ระเหยได้ ของแข็งที่คงอยู่ ปริมาณจุลินทรีย์รวมและปริมาณธาตุไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และ โพแทสเซียม (K)

2. คัดเลือกจุลินทรีย์จากกากขี้แป้ง ทำให้บริสุทธิ์ และขยายเชื้อ

นำตัวอย่างกากขี้แป้งที่เก็บทับถมในกระสอบเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ 1 เดือน และ 3 เดือน ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในตัวอย่างกากขี้แป้งโดยผสมกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 10 20 30 40 และ 50 โดยน้ำหนัก (w/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น สังเกตลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันและทำการแยกโดยการ streak plate จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining)

ชั่งตัวอย่างกากขี้แป้ง 10 g ที่เก็บทับถมในกระสอบเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ 1 เดือน และ 3 เดือน ผสมคลุกเคล้ากันผสมกับสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.5 ปริมาตร 100 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที และนำสารละลายเชื้อที่ได้ เจือจางระดับต่างๆ คือ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้น ทำการ pour plate บนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีเชื้อเจริญสังเกตลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันและทำการแยกโดยการ streak plate จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining)

นำเชื้อที่แยกได้มาชนิดละหนึ่งลูปเป็นเชื้อเริ่มต้นนำมาขยายเพื่อให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ขยายโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์: กากน้ำตาล: น้ำ ในอัตราส่วน 1:1:20 v/v ทำการขยายจนเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นสูงสุด ประมาณ

10^6 CFU/ml จากนั้นเตรียมเชื้อผสมที่ย่อยได้ดี 3 ไอโซเลทแรก และเชื้อรวมทุกไอโซเลทแยกได้ทั้งหมด ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (v/v) เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการย่อยสลายกากขี้แป้งโดยการหมัก

3. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งโดยจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อ

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโดยเชื้อเดี่ยว

นำเชื้อแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากข้อ 2 มาจุดหรือแต้ม (spot) บนอาหารวุ้น (agar) ที่ผสมกากขี้แป้งร้อยละ 15 โดยแตะจำนวน 4 จุดต่อจานเพาะเชื้อ แต่ละเชื้อทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 จานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น บันทึกการขยายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

3.2 ทดสอบความเข้มข้นกากขี้แป้งที่เหมาะสมต่อการย่อยโดยเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อไอโซเลทที่ขยายขนาดโคโลนีมากที่สุดจากข้อ 4.1 มาจุดบนอาหารวุ้น (agar) ที่ผสมกากขี้แป้งความเข้มข้นต่างๆ คือ ร้อยละ 10 20 30 40 และ 50 (w/v) โดยจำนวน 4 จุดต่อจานเพาะเชื้อ แต่ละเชื้อทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 จานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C บันทึกการขยายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเป็นเวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโดยเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม

นำเชื้อไอโซเลทที่ดีที่สุด เชื้อผสมไอโซเลทที่ดี 3 ไอโซเลทแรก และเชื้อรวมทุกไอโซเลท เลี้ยงในอาหารเหลว NB (Nutrient broth) ขยายเชื้อให้ได้ปริมาณ 10^6 CFU/ml จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโดยหยดสารละลายเชื้อแต่ละทรีตเมนท์ ลงในหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร บนอาหารวุ้น (agar) ที่ผสมกากขี้แป้งร้อยละ 50 แต่ละทรีตเมนท์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 จานเพาะเลี้ยง จานละ 3 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C บันทึกการขยายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเป็นเวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง

4. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งโดยจุลินทรีย์ในสภาพการหมัก

นำกากขี้แป้งที่ต้องการทดสอบ ปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 30 และนึ่งฆ่าเชื้อ ยกเว้นชุดควบคุมที่หมักด้วยน้ำเปล่า เติมเชื้อแต่ละทรีตเมนท์ คือ ไอโซเลทที่ดีที่สุด เชื้อผสมไอโซเลทที่ดี 3 ไอโซเลทแรก และเชื้อรวมทุกไอโซเลท ที่ขยายส่วนในกากน้ำตาลจนได้ปริมาณ 10^6 CFU/ml เปรียบเทียบกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพทางการค้า (EM, Kyusei) ลงในกากขี้แป้ง ในอัตราส่วนร้อยละ 10 (หมักแบบแห้ง ; Dry) และร้อยละ 50 (หมักแบบเปียก ; Submerge) (w/w) หมักในระบบปิดเป็นเวลา 30 วัน เขย่าทุกวันเช้าเย็น ติดตามประสิทธิภาพการหมักโดยเก็บตัวอย่างทุก 5 วัน วิเคราะห์พารามิเตอร์ตามตารางที่ 1 (ข้อ 1-3) และทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ตามตารางที่ 1 (ข้อ 4-10) ก่อนและหลังการหมักครบ 30 วัน

หลังจากได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยกากขี้แป้ง จึงได้ทำการจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยวิธีการทดสอบทางชีวเคมีด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ (VITEK 2 Compact) ต่อไป

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ AOAC (2000)

Parameters	Methods
1. pH	pH meter
2. Temperature	Thermometer
3. Total microbial	Plate count agar
4. Total Solids Content	Gravimetric method
5. Moisture Content	Gravimetric method
6. Volatile Solids Content	Gravimetric method
7. Fixed Solid Content	Gravimetric method
8. Total Nitrogen (N)	Kjeldahl method
9. Phosphorus (P_2O_5)	Spectrophotometer molybdovanadophosphate method
10. Potassium (K_2O)	Atomic absorption spectrophotometer

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

5. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

5.1 เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและธาตุ N P และ K

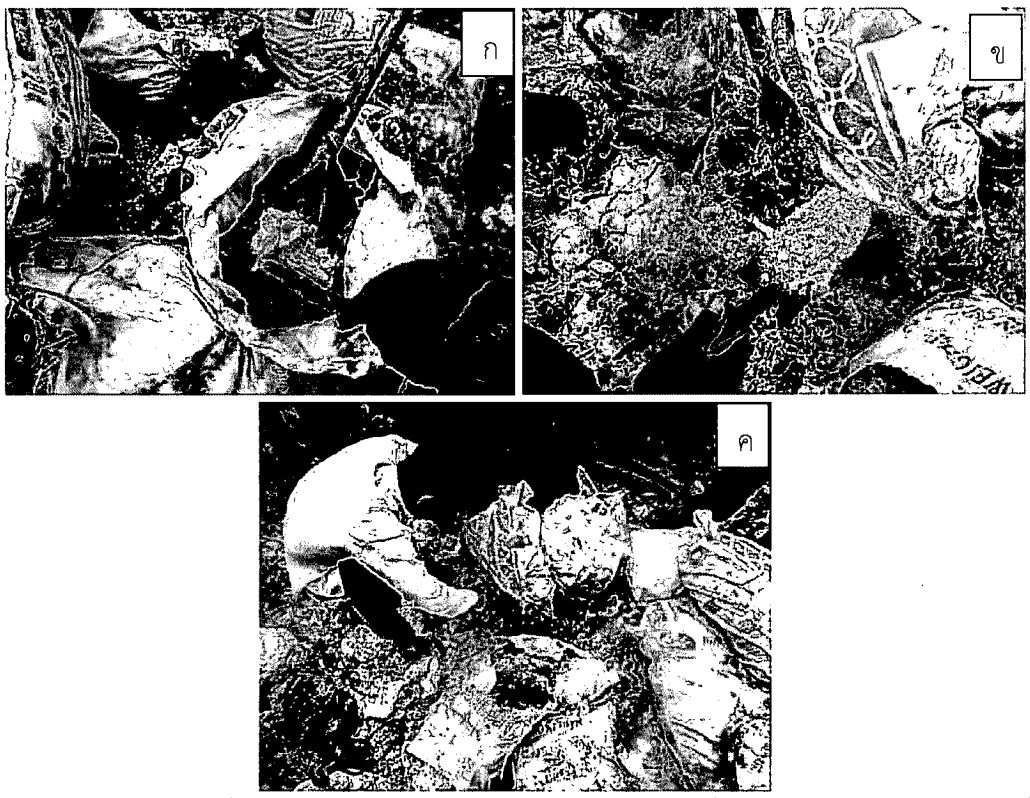
กากขี้แป้งมีค่า pH เฉลี่ย 6.3 ซึ่งมีสภาพเป็นกรดอ่อน ในขณะที่การศึกษาของเสานีย์และคณะ (2547) พบว่ามีค่า pH อยู่ในช่วงเป็นกลาง คือ 7.38-7.74 เนื่องจากมีการเติมแอมโมเนียในขั้นตอนการผลิตน้ำยางข้น แต่ค่า pH ที่ได้จากการทดลองได้จากตัวอย่างกากขี้แป้งที่ทับถมเป็นเวลานานจึงทำให้แอมโมเนียที่เติมลงไประเหยออกได้ ทำให้ค่า pH ลดลง ปริมาณความชื้นลดลงด้วย แต่มีปริมาณของแข็งรวมสูงพบร้อยละ 74.72 ของแข็งส่วนใหญ่ประกอบด้วยฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากการเติม DAHP เพื่อตกตะกอนไอออนแมกนีเซียม (เสานีย์และคณะ, 2547) ส่วนของแข็งที่ระเหยได้พบมากกว่าของแข็งที่คงอยู่เล็กน้อย สอดคล้องกับการทดลองของสะเราะ (2552) พบว่ากากขี้แป้งมีปริมาณของแข็งที่คงอยู่และของแข็งที่ระเหยได้ใกล้เคียงกัน โดยปริมาณของแข็งที่คงอยู่ในกากขี้แป้งส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารพวกขี้เถ้า และโลหะหนักที่เหลือจากการเผาที่อุณหภูมิ 550 ± 50°C ส่วนสารอินทรีย์อื่นที่มีอยู่ เช่น คาร์บอนจะเกิดการระเหยออกไป เมื่อตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด พบว่า มีจุลินทรีย์รวม 6.53×10^5 โคโลนี/กรัม แสดงว่าจุลินทรีย์มีการย่อยกากขี้แป้งตามธรรมชาติ แต่อาจต้องใช้เวลานาน เนื่องจากมีส่วนประกอบของยางปะปนอยู่ ดังนั้นการใช้จุลิ-นทรีที่มีประสิทธิภาพและปริมาณมากจึงน่าจะย่อยกากขี้แป้งได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ กากขี้แป้งมีธาตุฟอสฟอรัสค่อนข้างสูง เนื่องจากมีการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ เพื่อตกตะกอนแมกนีเซียมในน้ำยาง รองลงมาคือ ธาตุไนโตรเจนและโพแทสเซียม ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งแต่ละธาตุที่พบในกากขี้แป้งมีค่ามากเกินมาตรฐานปุ๋ยหมัก (มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2548) ดังนั้น กากขี้แป้งจึงมีความเป็นไปได้ในการนำมาแปรรูปเป็นปุ๋ย

ตารางที่ 2 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีเบื้องต้นของตัวอย่างกากขี้แป้ง

pH	อุณหภูมิ (°C)	ความชื้น (%)	ของแข็งรวม (%)	ของแข็งที่ระเหยได้ (%)	ของแข็งที่คงอยู่ (%)	จุลินทรีย์รวม ($CFU\times10^5/g$)	N, P, K (%)
6.3	26	25.28	74.72	57.50	42.50	6.53	3.15, 5.84, 0.52

5.2 คัดเลือกจุลินทรีย์จากกากขี้แป้งและทำให้บริสุทธิ์

คัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งกากขี้แป้งที่กองทับถมรอบๆ โรงงานทั้ง 3 แหล่ง ได้แก่ เก็บในกระสอบเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ 1 เดือน และ 3 เดือน (รูปที่ 1ก ข และ ค ตามลำดับ) โดยการผสมกากขี้แป้งในอาหาร NA ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 20 30 40 และ 50 พบว่า ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารที่ผสมกากขี้แป้งที่ทับถมเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในทุกความเข้มข้น และพบจุลินทรีย์บนอาหารที่ผสมกากขี้แป้งความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ทับถมเป็นเวลา 1 เดือน ในขณะที่กากขี้แป้งที่ทับถมเป็นเวลา 3 เดือน พบจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20 (ตารางที่ 3) กากขี้แป้งที่ออกจากถังปั่นเหวี่ยงใหม่ๆ มีกลิ่นแรงเนื่องจากการเติม NH_3 TMTD ZnO และ DAHP ในขั้นตอนการผลิตน้ำยางข้น มีลักษณะเป็นโคลนตมสีเหลืองขาว ซึ่งสภาพดังกล่าวไม่เหมาะต่อการอยู่และเจริญของจุลินทรีย์ แต่กากขี้แป้งมีสภาพไม่คงตัวถูกชะล้างได้ง่าย (วราศรี. 2543) ดังนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในสภาพที่เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์เมื่อกากขี้แป้งทับถมเป็นระยะเวลานานขึ้น นอกจากนี้ กากขี้แป้งยังมีสิ่งเจือปนของสารอินทรีย์ ได้แก่ สารพวกแป้ง ไขมัน โปรตีน (เสาวนีย์และคณะ, 2547) ซึ่งเป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ด้วย อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่พบ มีลักษณะคล้ายกันมากหลังจากสังเกตภายใต้กล้องสเตอริโอ (รูปที่ 2) พบว่า มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 2 ไอโซเลท เกิดขึ้นบริเวณที่มีกากขี้แป้ง จึงได้แยกมาทำการ sreak plate บนอาหาร NA เนื่องจากตะกอนกากขี้แป้งมีสีที่กลมกลืนกับเชื้อทำให้สังเกตความแตกต่างได้ยาก จึงได้แยกเชื้อเพิ่มเติมด้วยวิธีการ pour plate จากการละลายกากขี้แป้งด้วยสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.5 และทำการเจือจางระดับต่างๆ (serial dilution) คือ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} พบว่า สารละลายกากขี้แป้งที่เจือจาง 10^{-2} สามารถตรวจนับจุลินทรีย์รวมได้ 6.53×10^{5} CFU/g (ตารางที่ 4) โดยจุลินทรีย์เจริญบนอาหารและใต้อาหาร (รูปที่ 3) และแยกจุลินทรีย์ที่มีความแตกต่างได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท จึงได้แยกมาทำการ streak plate บนอาหาร NA ดังรูปที่ 4



รูปที่ 1 การเก็บตัวอย่างกากขี้แป้งจากแหล่งต่างๆ รอบๆ โรงงาน ก: กากขี้แป้งอายุ 1 สัปดาห์ ข: กากขี้แป้งอายุ 1 เดือน และ ค: กากขี้แป้งอายุ 3 เดือน

ตารางที่ 3 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่ผสมกากขี้แป้งความเข้มข้นต่างๆ

กากขี้แป้งที่ผสมใน	ระยะเวลากากขี้แป้งหลังจากออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยง		
อาหาร (%)	1 สัปดาห์	1 เดือน	3 เดือน
10	-	+	+
20	-	-	+
30	-	-	-
40	-	-	-
50	-	-	-

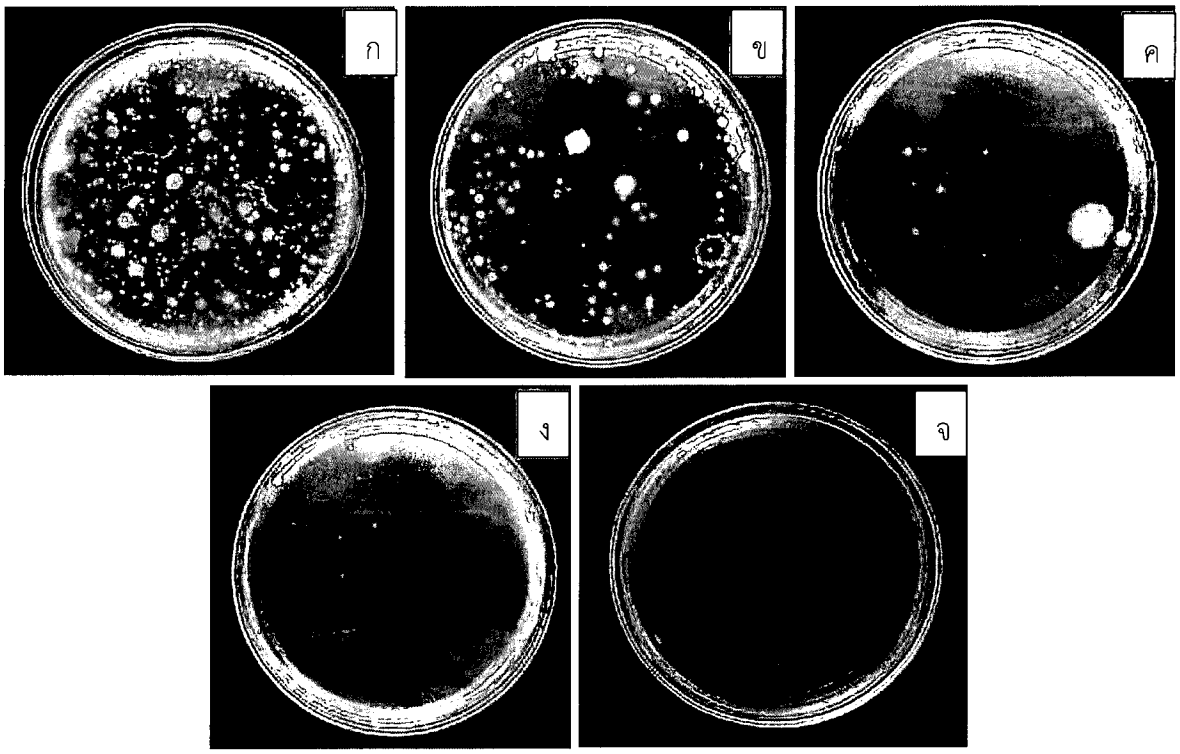
หมายเหตุ : + พบโคโลนี
- ไม่พบโคโลนี

รูปที่ 2 ลักษณะจุลินทรีย์ที่เจริญบนกากขี้แป้งจากการทับถมเป็นเวลา 3 เดือน ที่ผสมในอาหารเข้มข้นร้อยละ 15

ตารางที่ 4 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total microbial) จากการ pour plate สารละลายตัวอย่างกากขี้แป้งที่เจือจางระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร NA

ระดับการเจือจาง	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/g) ($\times 10^4$)
10	+++
10^{-2}	++ (65.33)
10^{-3}	+
10^{-4}	+
10^{-5}	-

หมายเหตุ : +++ มากกว่า 300 โคโลนี
++ 30 – 300 โคโลนี
+ น้อยกว่า 30 โคโลนี
- ไม่พบโคโลนี



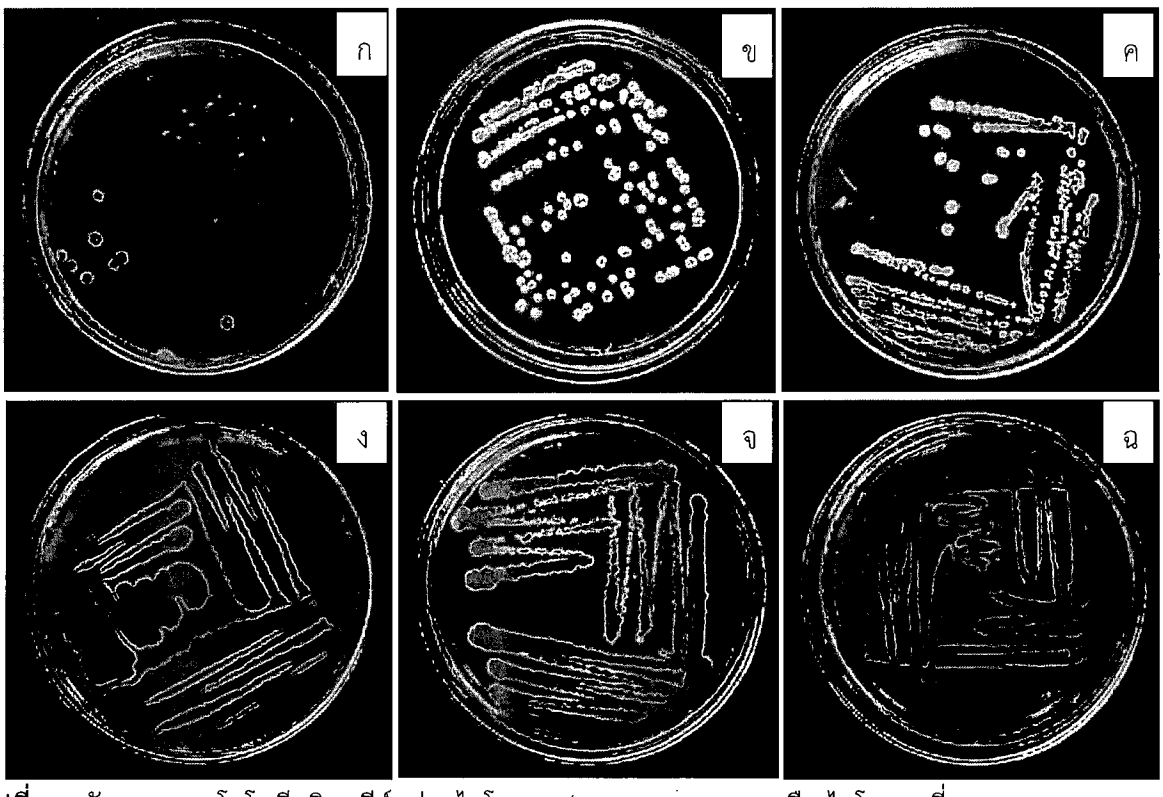
รูปที่ 3 ปริมาณจุลินทรีย์ที่เจือจางระดับความเข้มข้นต่างๆ จากน้อยไปมาก ก: 10^{-1} ข: 10^{-2} ค: 10^{-3} ง: 10^{-4} และ จ: 10^{-5} ตามลำดับ

จากการคัดแยกความแตกต่างของลักษณะโคโลนี พบว่า จุลินทรีย์ในกากขี้แป้งมีทั้งจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ โดยสามารถแยกความแตกต่างของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศได้ 6 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทที่ 1-6 และไม่ใช้อากาศได้ 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทที่ 7 และ 8 จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากกากขี้แป้งมีค่อนข้างน้อยเนื่องจากกากขี้แป้งที่ทับถมถูกบรรจุในกระสอบอย่างดีและมีกากขี้แป้งสดรวมอยู่ด้วย จึงทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ตามธรรมชาติมีโอกาสปนเปื้อนได้น้อย และยังมีลักษณะทางกายภาพและเคมีที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์มากนัก จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่ได้มา streak plate บนอาหาร NA พบลักษณะต่างๆ ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 5 จากนั้นทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) พบลักษณะเซลล์จุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียติดสีแกรมบวกทุกไอโซเลท (รูปที่ 5) เนื่องจากย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลท ยกเว้นไอโซเลทที่ 2 เป็นเชื้อรา

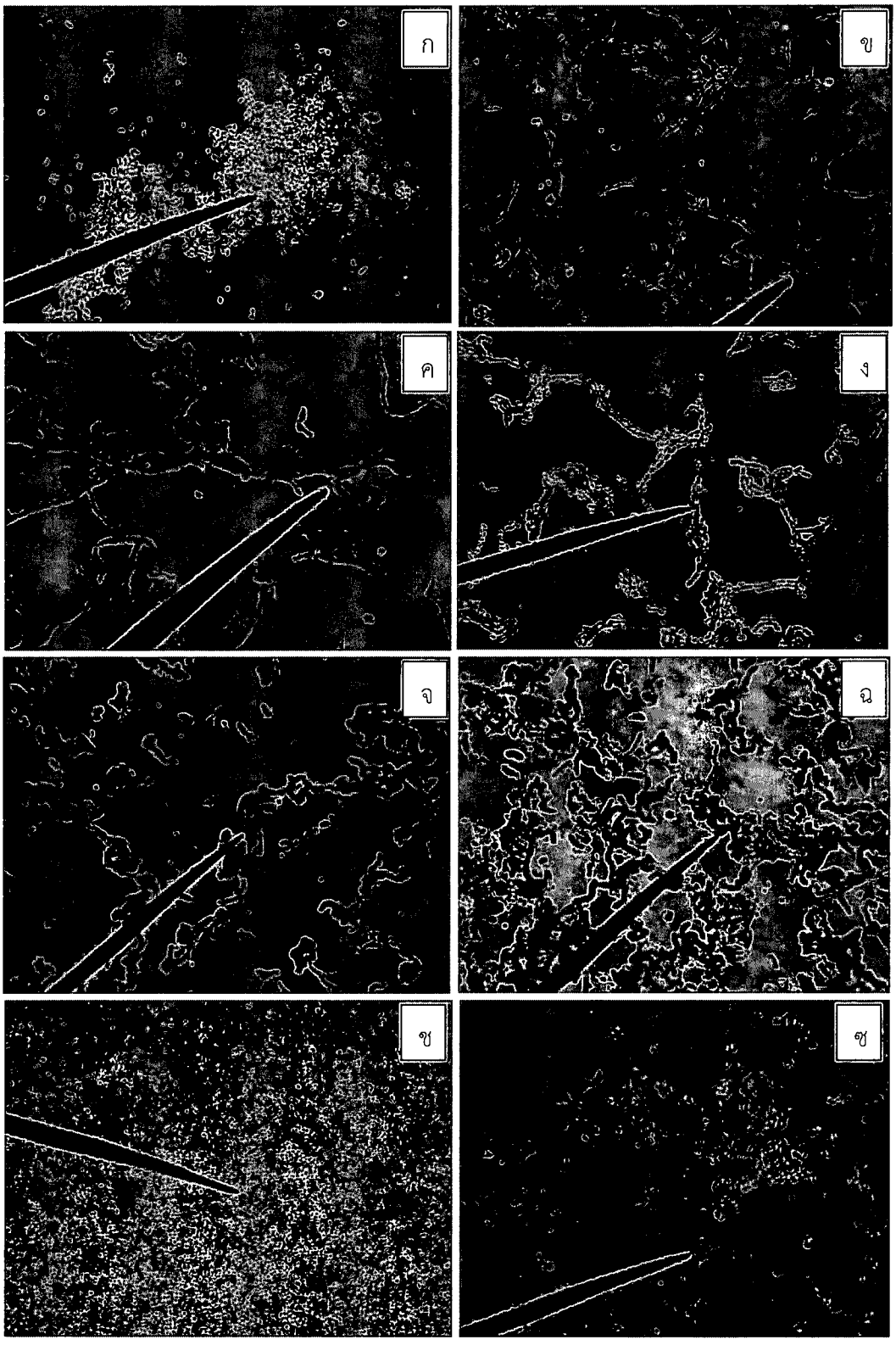
ตารางที่ 5 ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศแต่ละไอโซเลท บนอาหาร NA ที่แยกได้จากกากขี้แป้ง

โคโลนีที่ได้จากการ pour plate	โคโลนีที่ได้จากการ streak plate	โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์
1. กลม ขาวใส ขอบเรียบ	1. กลม ขาวใส ขอบเรียบ	1. ติดสีม่วง รูปร่างเป็นท่อนอยู่เดี่ยวๆ
2. กลม ขาวขุ่น ขอบเรียบ	2. ราสีขาว ตรงกลางสีน้ำตาล ขอบมีรอยแตก	2. เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาล
3. กลม เหลืองขุ่น ขอบหยัก	3. กลม เหลืองขุ่น ตรงกลางแตกเป็นแฉก ขอบหยัก	3. ติดสีม่วง รูปร่างท่อนโค้ง ต่อเป็นสายยาว
4. ขาวขุ่น แผ่ลาม ขอบหยัก	4. ขาวขุ่น แผ่ลาม ขอบหยัก	4. ติดสีม่วง รูปร่างท่อน ต่อเป็นสายยาว
5. ขาวอมเหลือง แผ่ลาม ขอบหยัก	5. ขาวอมเหลือง แผ่ลาม ขอบหยัก	5. ติดสีม่วง รูปร่างกลม ต่อเป็นสายยาว
6. เหลืองใส เป็นเมือก แผ่ลาม ขอบหยัก	6. เหลืองใส เป็นเมือก แผ่ลาม ขอบหยัก	6. ติดสีม่วง รูปร่างกึ่งกลมกึ่งท่อน ต่อเป็นสายยาว
7. ขาวขุ่น ขอบเรียบ	7. กลม ขาวขุ่น ขอบเรียบ	7. ติดสีม่วง รูปร่างท่อน อยู่เดี่ยวๆ
8. เหลืองใส แผ่ลาม ขอบหยัก	8. เหลืองใส แผ่ลาม ขอบหยัก	8. ติดสีม่วง รูปร่างกลม ต่อเป็นสายยาว

จุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศไอโซเลทที่ 7 และ 8 เจริญบริเวณใต้อาหารวุ้น จากนั้น นำทั้ง 2 ไอโซเลท มาเลี้ยงขยายในอาหารเหลวเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป



รูปที่ 4 ลักษณะของโคโลนีจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท (ก ข ค ง จ และ ฉ คือ ไอโซเลทที่ 1 2 3 4 5 และ 6 ตามลำดับ) ที่ได้จากการ streak plate บนอาหาร NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 5 ลักษณะและรูปร่างของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ก ข ค ง จ ฉ ช และ ซ คือ ไอโซเลทที่ 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 ตามลำดับ) ที่ผ่านการย้อมแกรม (กำลังขยาย 100 เท่า ยกเว้น ข กำลังขยาย 40 เท่า)

5.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งโดยจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อ

5.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโดยเชื้อเดี่ยว

จากการทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท เพื่อคัดเลือกเชื้อที่เจริญได้ดีบนอาหารที่ผสมกากขี้แป้งร้อยละ 15 พบว่า เชื้อแต่ละไอโซเลทสามารถเจริญได้บนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้ง แตกต่างกัน คือ เชื้อไอโซเลทที่ 4 เจริญได้ดีที่สุดโดยให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยสูงสุด 2.13 เซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือ เชื้อไอโซเลทที่ 1 ให้เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.58 เซนติเมตร ในขณะที่เชื้อไอโซเลทที่ 2 3 5 และ 6 ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 6) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีของจุลินทรีย์ที่ขยายขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อเขี่ยเชื้อแล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบจุลินทรีย์จำนวนมากแสดงว่าเกิดจากการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มากขึ้น เชื้อไอโซเลทที่ 4 มีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีกากขี้แป้งดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยกากขี้แป้งเพื่อดูดซึมอาหารไปใช้ในการแบ่งเซลล์เจริญเติบโต สอดคล้องกับการทดลองของ Diaz-Ruiz และคณะ (2003) ที่ทดสอบการย่อยแป้งโดยจุลินทรีย์ในจานเลี้ยงเชื้อพบว่า แบคทีเรียที่สามารถย่อยแป้งได้ มีการขยายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพิ่มขึ้นเท่ากับ 7-18 มิลลิเมตร

ตารางที่ 6 การขยายขนาดโคโลนีจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทบนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้งร้อยละ 15

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย (ซม.)
1	1.58 ± 0.58b
2	0.43 ± 0.05c
3	0.78 ± 0.41c
4	2.13 ± 0.28a
5	0.58 ± 0.20c
6	0.85 ± 0.20c
F-test	*
C.V.	31.70

หมายเหตุ : * แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

5.3.2 ทดสอบความเข้มข้นกากขี้แป้งที่เหมาะสมต่อการย่อยโดยเชื้อจุลินทรีย์

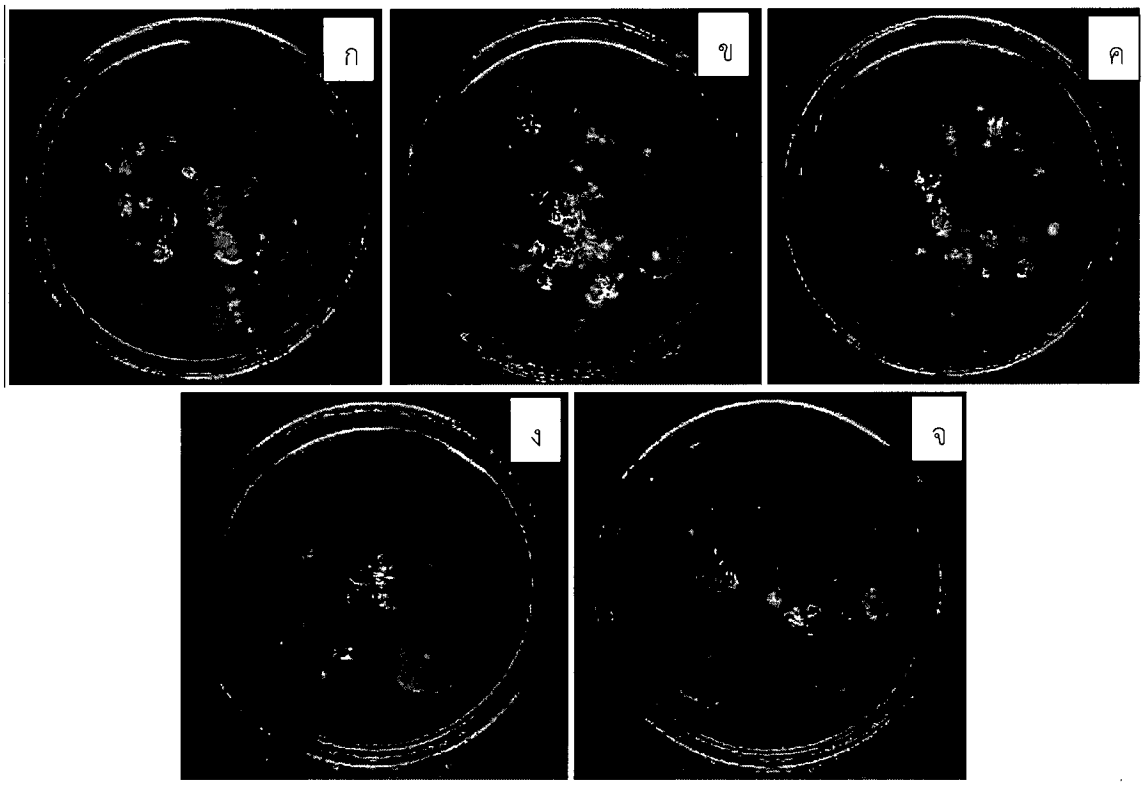
จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งโดยเชื้อแต่ละไอโซเลท พบว่า ไอโซเลทที่ 4 ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญได้ดีที่สุด นำมาศึกษาปริมาณกากขี้แป้งที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ปริมาณกากขี้แป้งเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การขยายขนาดโคโลนีเพิ่มขึ้น และเมื่อบ่มเป็นระยะเวลานานขึ้น กากขี้แป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 40 ให้การขยายขนาดโคโลนีมากไม่แตกต่างทางสถิติ เท่ากับ 2.57 และ 2.41 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อบ่มที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 7) และให้ลักษณะการเจริญของโคโลนีดังรูปที่ 6 กากขี้แป้งที่ใช้ทดลองเป็นกากขี้แป้งที่ผสมกันระหว่างกากขี้แป้งที่ทับถม 1 สัปดาห์ 1 เดือนและ 3 เดือนในอัตราส่วนที่เท่ากัน ซึ่งกากขี้แป้ง 1 สัปดาห์อาจอยู่ในสภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เนื่องจากการทดลองเบื้องต้นของกากขี้แป้ง 1 สัปดาห์ ไม่พบจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และในกระบวนการผลิตน้ำยางข้นมีการเติมซิงค์ออกไซด์ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำยางโดยใช้ประมาณร้อยละ 0.025 โดยน้ำหนัก (สมทิพย์, 2545) การย่อยสลายกากขี้แป้งจึงควรพิจารณาความเข้มข้นของกากขี้แป้งต่อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมด้วย ทั้งนี้จุลินทรีย์ต้องการอาหารที่มีความเข้มข้นพอเหมาะสำหรับการเจริญและเพิ่ม

จำนวนของจุลินทรีย์ (สุพจน์ และคณะ, 2548) ดังนั้นจึงเลือกกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 50 เพื่อทดสอบการย่อยกากขี้แป้งโดยกลุ่มจุลินทรีย์ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 7 การเจริญของโคโลนีไอโซเลทที่ 4 บนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้งความเข้มข้นต่างๆ หลังจากบ่มเป็นระยะเวลาต่างๆ

กากขี้แป้ง (%)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย (ซม.±SD) เมื่อบ่มเป็นระยะเวลาต่างๆ		
	24	48	96
10	0.79 ± 0.22d	1.05 ± 0.21d	1.32 ± 0.36b
20	0.91 ± 0.07cd	1.38 ± 0.16c	1.84 ± 0.40ab
30	1.12 ± 0.09c	1.73 ± 0.06b	1.99 ± 0.57ab
40	1.83 ± 0.08b	2.14 ± 0.12a	2.41 ± 0.06a
50	2.08 ± 0.07a	2.38 ± 0.05a	2.57 ± 0.22a
F-test	*	*	*
C.V. (%)	9.74	8.34	20.11

หมายเหตุ: * แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ
ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 6 ลักษณะของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 ที่ขยายขนาดเพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับการเพิ่มขึ้นของกากขี้แป้งร้อยละ 10(ก) 20(ข) 30(ค) 40(ง) และ 50(จ) บนอาหารวุ้น (agar) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

5.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโดยเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม

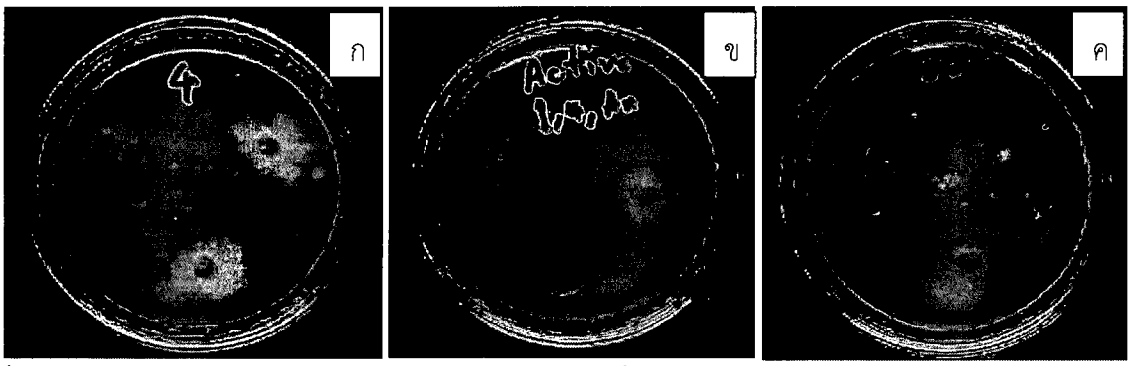
จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งโดยเชื้อไอโซเลทที่ 4 เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 และเชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 ให้การขยายขนาดโคโลนีมากที่สุด 3.3 เซนติเมตร รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 ให้การขยายขนาดโคโลนี 2.98 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 8) และให้ลักษณะการเจริญของโคโลนีดังรูปที่ 7 แสดงให้เห็นว่า เชื้อเดี่ยวไอโซเลทที่ 4 ย่อยกากขี้แป้งได้ดีกว่าเชื้อผสม และเชื้อรวม ซึ่งเชื้ออื่นๆ ที่ผสมอยู่ด้วยในกากขี้มีผลต่อการชะลอการเจริญของเชื้อไอโซเลทที่ 4 ส่งผลให้ย่อยสลายลดลงด้วย ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีอิทธิพลซึ่งกันและกันในการเจริญเติบโต อาจมีผลในการเสริมกันหรือยับยั้งซึ่งกันและกัน (สุพจน์และคณะ, 2548)

ตารางที่ 8 การขยายขนาดโคโลนีแต่ละทรีตเมนต์บนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 50 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาต่าง ๆ

ไอโซเลทที่	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย (ซม.±SD) เมื่อบ่มเป็นระยะเวลาต่างๆ		
	24	48	96
4	2.86 ± 0.27a	3.17 ± 0.26a	3.30a ± 0.39a
1 4 8	2.40b ± 0.37b	2.63 ± 0.45b	2.98a ± 0.51a
1-8	1.87d ± 0.10c	1.95 ± 0.05c	2.00b ± 0.06b
F-test	*	*	*
C.V. (%)	12.25	11.50	13.12

หมายเหตุ: * แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

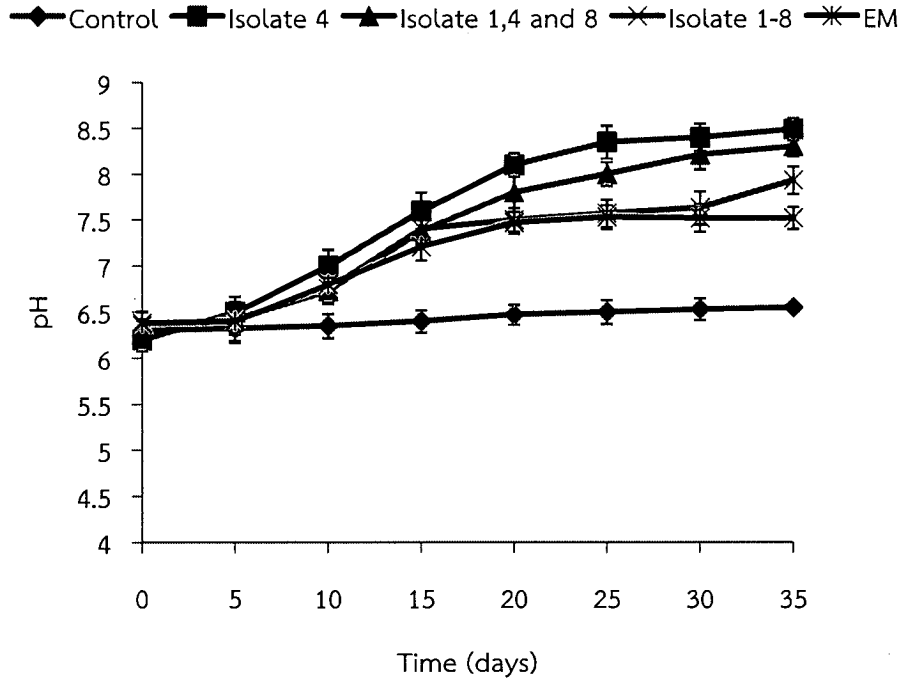


รูปที่ 7 การขยายขนาดโคโลนีแต่ละทรีตเมนต์ (ก: ไอโซเลทที่ 4 ข: ไอโซเลท 1, 4 และ 8 และ ค: ไอโซเลท 1-8) บนอาหารวุ้น (agar) ที่มีกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 50 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

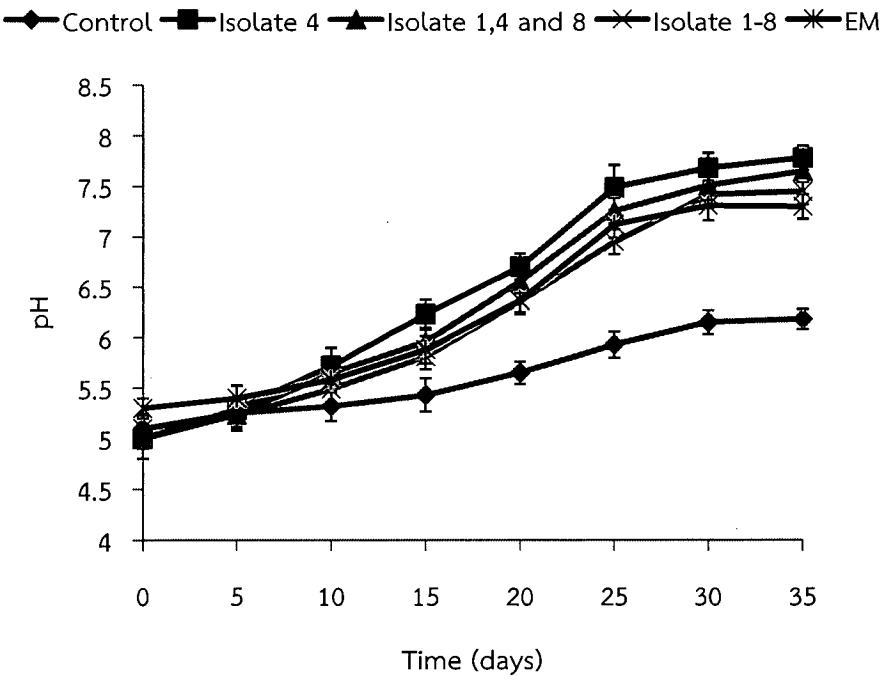
5.4 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งโดยจุลินทรีย์ในสภาพการหมัก

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายกากขี้แป้งโดยเชื้อไอโซเลทที่ 4 เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 หัวเชื้อทางการค้า (EM) และชุดควบคุม (หมักด้วยน้ำเปล่า) พบว่า ค่า pH ของ

กากขี้แป้งที่ได้จากการหมักแบบเปียก มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นมากกว่าการหมักแบบแห้ง การหมักแบบแห้งให้ค่า pH ที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 10 ถึง 20 วัน หลังจากนั้น ค่า pH เริ่มลดลงและคงที่ ในขณะที่ การหมักแบบเปียกให้ค่า pH ที่สูงขึ้นในช่วง 5 ถึง 25 วันหลังการหมัก กากขี้แป้งมีคุณสมบัติเป็นด่าง เนื่องจากการตกตะกอนของแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟต (เสาวนีย์และคณะ, 2547) หลังจากถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ทำให้เกิดการแตกตัวของไอออนดังกล่าวจึงแสดงความเป็นด่างมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย่อยโดยเชื้อแต่ละทรีตเมนท์จากการหมักแบบเปียก พบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 ให้ค่า pH สูงที่สุด เท่ากับ 7.78 รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 และหัวเชื้อทางการค้า (EM) ตามลำดับ ซึ่งให้ค่า pH เท่ากับ 7.65 7.45 และ 7.31 ตามลำดับ (รูปที่ 8 และ 9) ในขณะที่ชุดควบคุมให้ค่า pH น้อยที่สุด เท่ากับ 6.18 การเติมจุลินทรีย์ที่มากขึ้นในการหมักแบบเปียกส่งผลให้เกิดการย่อยสลายได้ดี อย่างไรก็ตาม ค่า pH ที่ทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ดีอยู่ในช่วง 6.7-9.0 (De Bertoldi *et al.*, 1983) ซึ่งค่า pH ที่มากกว่า 7.5 ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย (Mari *et al.*, 2005)

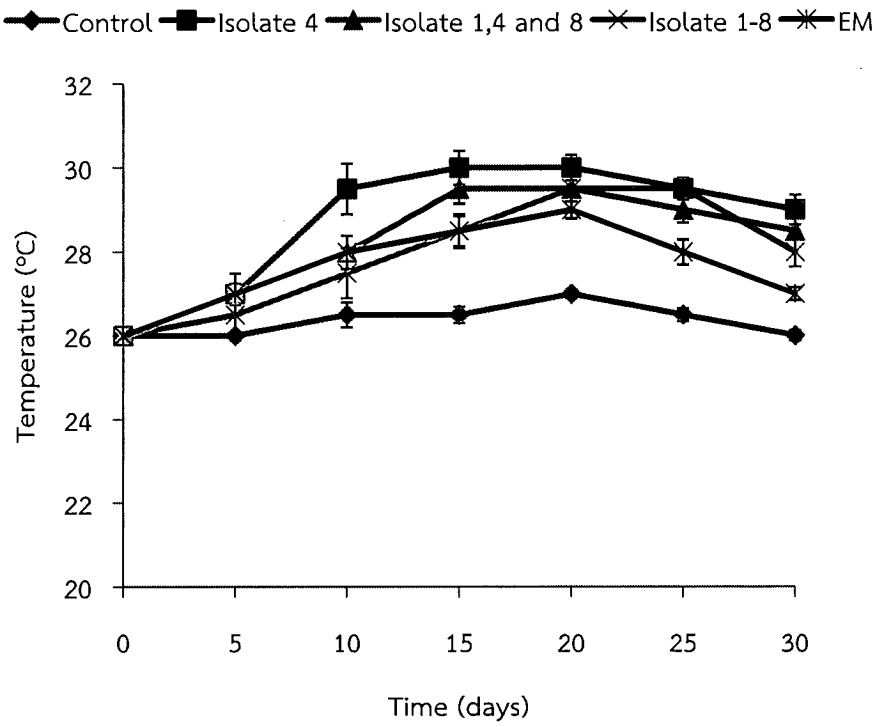


รูปที่ 8 ค่า pH กากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบแห้ง

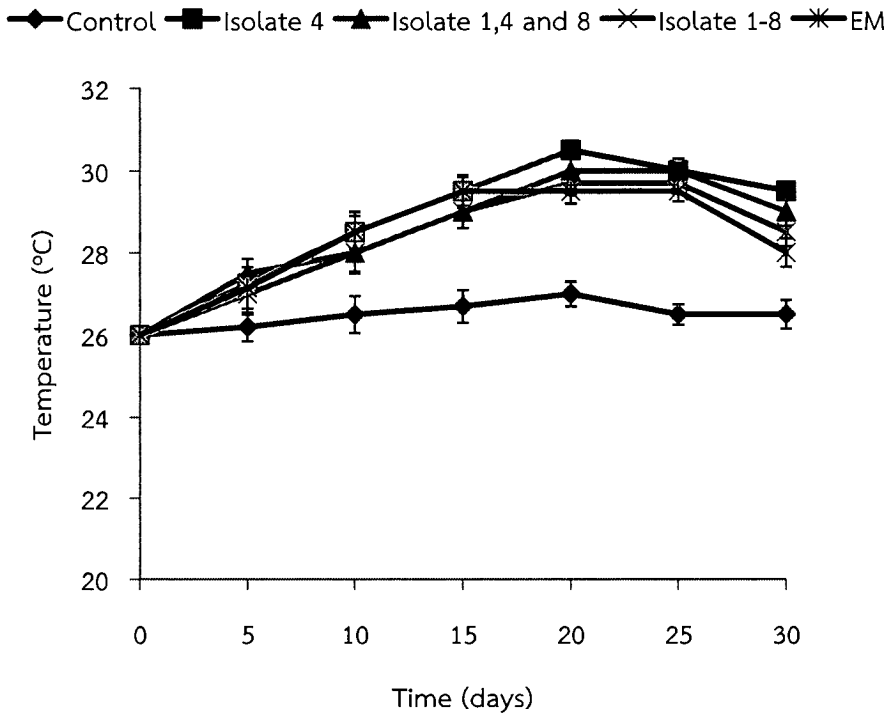


รูปที่ 9 ค่า pH กากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบเปียก

อุณหภูมิของกากขี้แป้งที่ได้จากการหมักแบบแห้ง มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ในช่วง 5-15 วัน หลังจากนั้น อุณหภูมิคงที่และลดลง ในขณะที่การหมักแบบเปียกมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มหมักไปจนถึง 20 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่กว้างกว่า หลังจากนั้น อุณหภูมิคงที่และลดลง (รูปที่ 10 และ 11) อุณหภูมิที่สูงขึ้นแสดงถึงการหมักเกิดขึ้นได้ดี การหมักแบบเปียกให้ค่าอุณหภูมิสูงกว่าการหมักแบบแห้งเล็กน้อย การหมักแบบเปียกใช้ปริมาณจุลินทรีย์ที่มากกว่าการหมักแบบแห้ง ดังนั้นจึงเกิดการย่อยสลายได้ดี เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย่อยโดยเชื้อแต่ละทรีตเมนท์ในสภาพการหมักแบบเปียก พบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 ให้ค่าอุณหภูมิสูงที่สุดหลังหมัก 20 วัน เท่ากับ 30.5 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 และหัวเชื้อทางการค้า (EM) โดยให้ค่าอุณหภูมิเท่ากับ 30 29.7 และ 29.5 ตามลำดับ แสดงว่า จุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 มีประสิทธิภาพในการย่อยกากขี้แป้งได้ดีที่สุด ในขณะที่ชุดควบคุมให้ค่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่ากับ 27 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม หลังจาก 25 วัน อุณหภูมิเริ่มลดลง แสดงถึงการย่อยสลายของกากขี้แป้งลดลง กระบวนการหมักเริ่มเกิดขึ้นหลังจากอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วง 5 วันแรก และอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5-20 วัน เป็นช่วงที่จุลินทรีย์ย่อยสลายกากขี้แป้งได้มากที่สุด ในขณะที่ De Bertoldi และคณะ (1983) กล่าวว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักอยู่ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิการหมักขึ้นอยู่ประเภทของสารอินทรีย์ ชนิดจุลินทรีย์และระบบของการหมัก หลังจาก 20 วัน อุณหภูมิเริ่มลดลง เป็นช่วงที่จุลินทรีย์ย่อยสลายกากขี้แป้งสิ้นสุดลง โดย Bernal และคณะ (2009) กล่าวว่า อุณหภูมิของการหมักเริ่มลดลงแสดงให้เห็นว่าสารอินทรีย์ได้ผ่านการหมักที่สมบูรณ์ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้



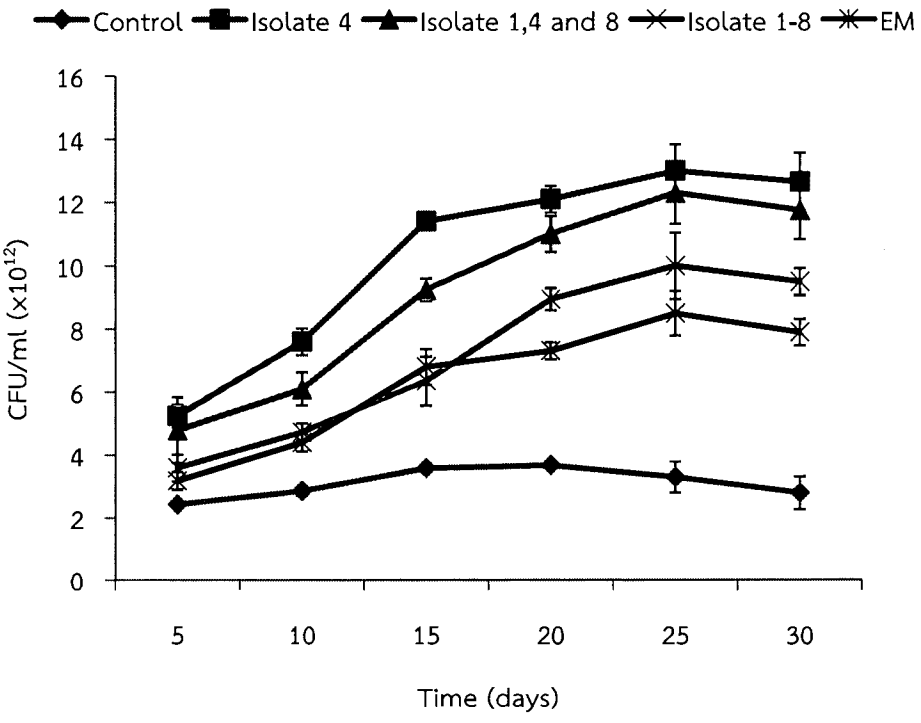
รูปที่ 10 ค่าอุณหภูมิกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบแห้ง



รูปที่ 11 ค่าอุณหภูมิกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบเปียก

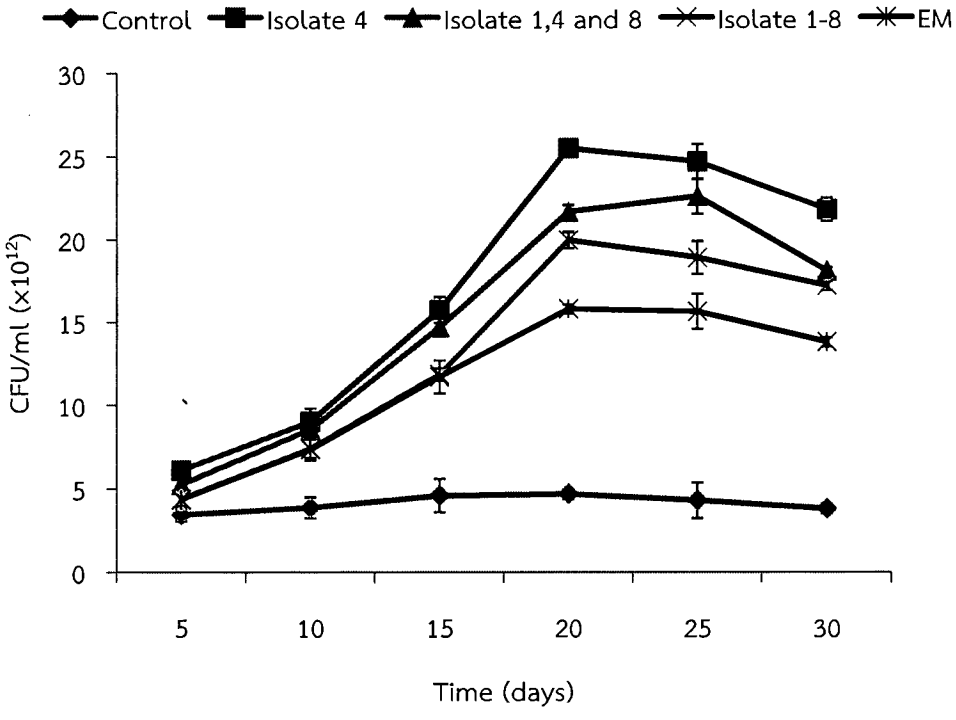
จำนวนจุลินทรีย์รวมที่ได้จากกากขี้แป้งหมักแบบแห้งเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วง 5-10 วัน และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 10-15 วัน และเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ หลังจากนั้นเริ่มลดจำนวนลงในช่วง 25-30 วัน ในขณะที่

กากขี้แป้งหมักแบบเปียกให้จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 10-20 วัน หลังจากนั้นเริ่มลดจำนวนลง (รูปที่ 12 และ 13) แสดงว่า การหมักแบบเปียกมีช่วงของการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่กว้างกว่าการหมักแบบแห้ง และให้จำนวนจุลินทรีย์ที่มากกว่าการหมักแบบแห้ง จำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นแสดงว่าจุลินทรีย์ย่อยสลายกากขี้แป้งมากขึ้นเพื่อใช้เป็นอาหารในการแบ่งเซลล์เจริญเติบโต เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย่อยกากขี้แป้งแบบเปียกโดยเชื้อแต่ละทรีตเมนท์ พบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 ให้จำนวนจุลินทรีย์มากที่สุด เท่ากับ 25.5×10^{12} CFU/ml หลังหมัก 20 วัน รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 ให้จำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ 22.6×10^{12} CFU/ml หลังหมัก 25 วัน เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 และหัวเชื้อทางการค้า (EM) โดยให้จำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ 19.95×10^{12} CFU/ml และ 15.8×10^{12} CFU/ml ตามลำดับ หลังหมัก 20 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมให้จำนวนจุลินทรีย์น้อยที่สุด 3.8×10^{5} CFU/ml นอกจากนี้จำนวนจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 ที่ได้จากการหมักแบบเปียกเพิ่มขึ้นโดยมีความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นเดียวกันในวันที่ 20 ของการหมัก ส่งผลให้เกิดการย่อยกากขี้แป้งได้ดี ในขณะที่การทดลองของสะเราะ (2552) ที่ใช้ EM หมักกากขี้แป้งร่วมกับกากอินทรีย์ พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรามีจำนวนเพิ่มขึ้น และมีจำนวนมากที่สุดในวันที่ 15 โดยช่วงแรกจุลินทรีย์จะย่อยสลายสารอินทรีย์ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ง่ายก่อน จากนั้นจะย่อยสลายสารที่ย่อยสลายได้ยากหรือมีโมเลกุลใหญ่โดยในช่วงนี้อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นมาก (Wu *et al.*, 2005) หลังจากนั้นจำนวนจุลินทรีย์มีปริมาณลดลงเล็กน้อย



หมายเหตุ : จำนวนจุลินทรีย์รวมชุด control ($\times10^{5}$)

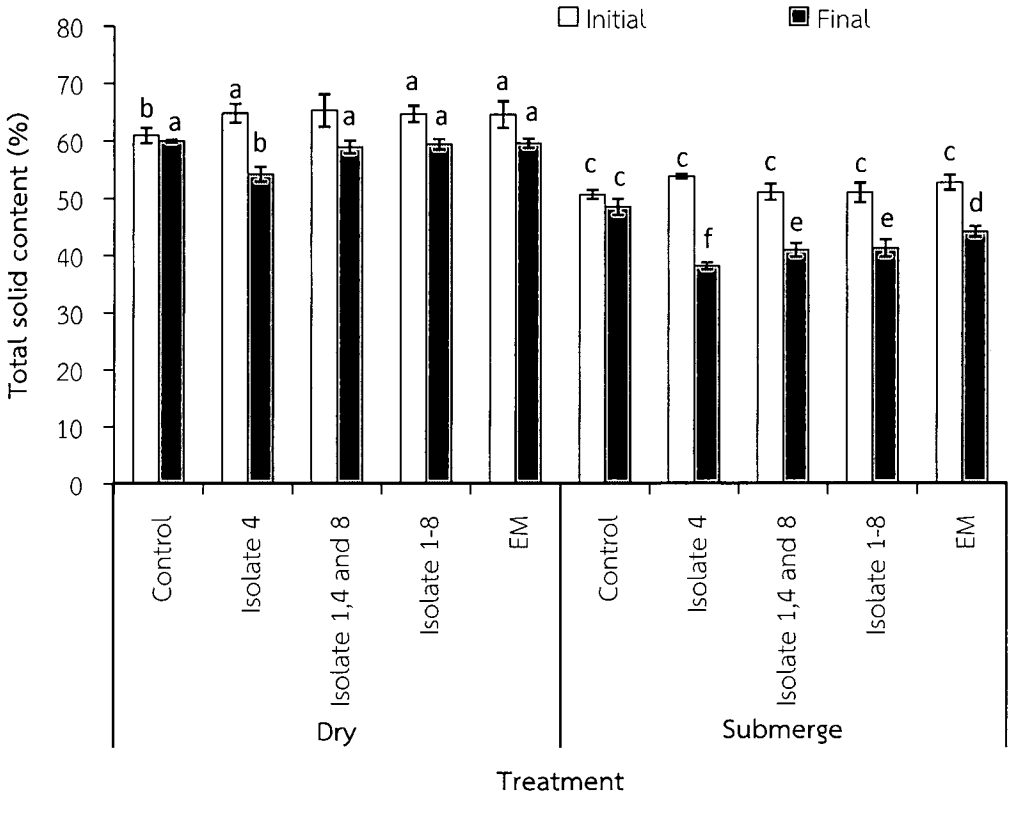
รูปที่ 12 จำนวนจุลินทรีย์รวมในกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบแห้ง



หมายเหตุ: จำนวนจุลินทรีย์รวมชุด control ($\times 10^5$)

รูปที่ 13 จำนวนจุลินทรีย์รวมในกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบเปียก

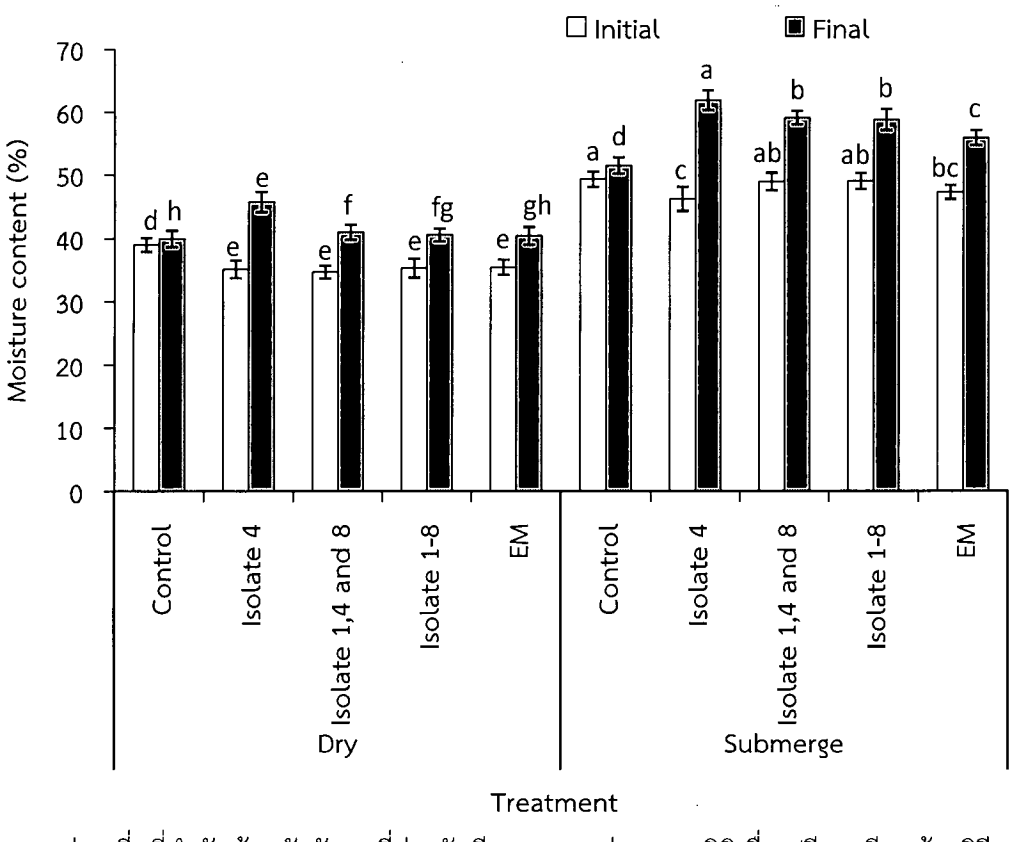
ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ได้จากกากขี้แป้งก่อนและหลังหมัก 30 วัน พบว่า ปริมาณของแข็งลดลงทุกทรีตเมนท์ โดยการหมักแบบเปียกให้ปริมาณของแข็งที่ลดลงมากกว่าการหมักแบบแห้ง (รูปที่ 14) เนื่องจากการหมักแบบเปียกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากขี้แป้งได้ดีกว่าการหมักแบบแห้ง ส่งผลให้ปริมาณของแข็งลดลง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละทรีตเมนท์ที่ได้จากการหมักแบบเปียกโดยสังเกตปริมาณของแข็งที่ลดลงจากเดิม พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 ให้ปริมาณของแข็งลดลงจากเดิมมากที่สุดร้อยละ 15.64 รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 และหัวเชื้อทางการค้า (EM) โดยให้ปริมาณของแข็งลดลงจากเดิมเท่ากับร้อยละ 10.10 9.69 และ 8.58 ตามลำดับ หลังหมัก 30 วัน เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ โดยจุลินทรีย์ย่อยสลายอินทรีย์คาร์บอนสายโซ่ยาวให้กลายเป็นคาร์บอนที่มีสายโซ่โมเลกุลสั้นๆ ซึ่งสามารถระเหยได้ง่าย ทำให้ปริมาณของแข็งทั้งหมดลดลง (สะ-เราะ, 2552)



ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

รูปที่ 14 ปริมาณของแข็งรวมของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน

ปริมาณความชื้นที่ได้จากกากขี้แป้งก่อนและหลังหมัก 30 วัน พบว่า ปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นทุกทรีตเมนท์ การหมักแบบเปียกให้ปริมาณความชื้นมากกว่าการหมักแบบแห้ง (รูปที่ 15) เนื่องจากใช้ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลายกากน้ำตาลมากกว่า ซึ่งมีปริมาณน้ำที่มากกว่า กากขี้แป้งถูกย่อยสลายทำให้ความชื้นเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณของแข็งลดลง ดังนั้นการหมักแบบเปียกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากขี้แป้งได้ดีกว่าการหมักแบบแห้ง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละทรีตเมนท์ที่ได้จากการหมักแบบเปียก พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 ให้ปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นจากเดิมมากที่สุด รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 และหัวเชื้อทางการค้า (EM) ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมให้ปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหลังหมัก 30 วัน จุลินทรีย์ทำงานได้ดีเมื่อมีความชื้นพอควร (สุพจน์, 2548) หากความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 50 ความสามารถในการทำงานของจุลินทรีย์น้อยลง และหากความชื้นมีค่ามากกว่าร้อยละ 60 จะทำให้ออกซิเจนเคลื่อนที่เข้ามาในระบบได้ยาก ทำให้กลายเป็นการหมักแบบไม่ใช้อากาศ (Das and Keener, 1997) ซึ่งมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์แบบใช้อากาศ ดังนั้นการหมักกากขี้แป้งแบบเปียกโดยใช้สัดส่วนกากขี้แป้งต่อจุลินทรีย์ที่เท่ากันคือ 1:1 โดยน้ำหนัก เป็นสัดส่วนที่ทำให้กากขี้แป้งมีความชื้นอยู่ระหว่างร้อยละ 50-60 ซึ่งเหมาะสมต่อการย่อยสลายได้ดี



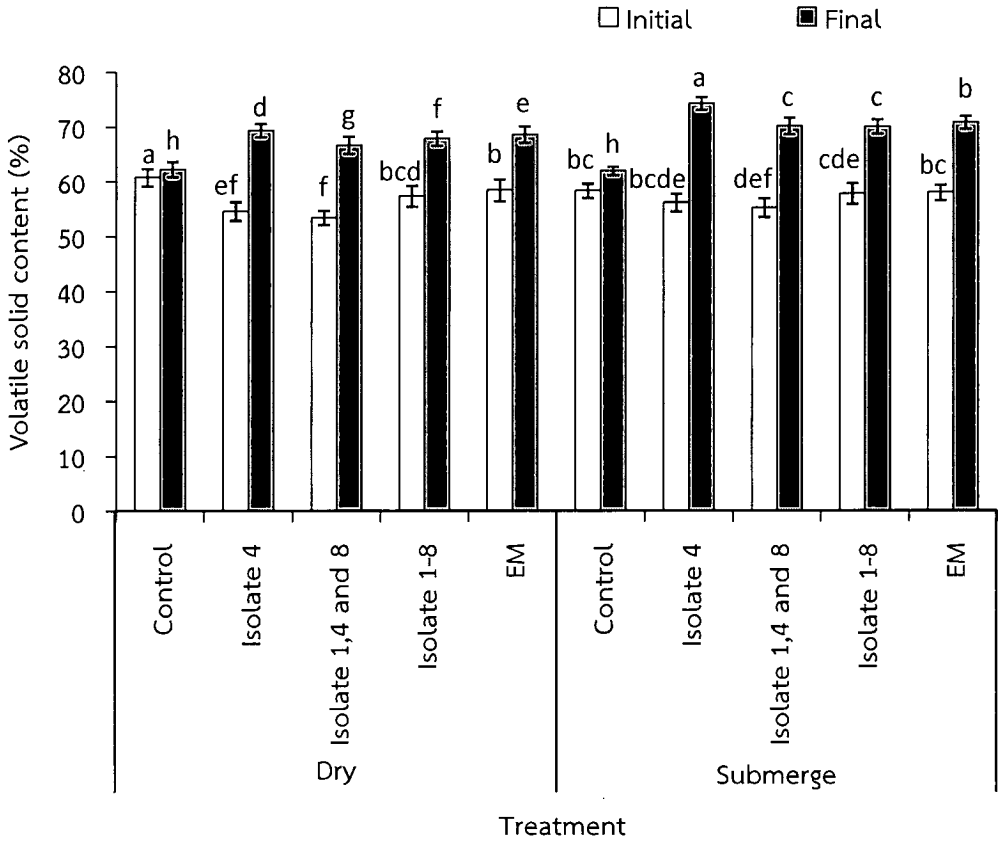
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

รูปที่ 15 ปริมาณความชื้นของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน

ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้จากกากขี้แป้งก่อนและหลังหมัก 30 วัน พบว่า มีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกทรีตเมนท์ การหมักแบบเปียกให้ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้สูงกว่าการหมักแบบแห้ง (รูปที่ 16) ดังนั้นการหมักแบบเปียกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากขี้แป้งได้ดีกว่าการหมักแบบแห้ง โดยจุลินทรีย์ย่อยสลายอินทรีย์คาร์บอนจากโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นโมเลกุลเล็กลง จนสามารถระเหยได้ง่ายทำให้ของแข็งที่ระเหยได้มีค่าเพิ่มมากขึ้น (Bernal *et al*, 2009) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละทรีตเมนท์ที่ได้จากการหมักแบบเปียกโดยสังเกตปริมาณของแข็งที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นจากเดิม พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 ให้ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นจากเดิมมากที่สุดร้อยละ 18.13 รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 หัวเชื้อทางการค้า (EM) และเชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 โดยให้ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นจากเดิมเท่ากับร้อยละ 14.89 12.77 และ 12.23 ตามลำดับ หลังหมัก 30 วัน

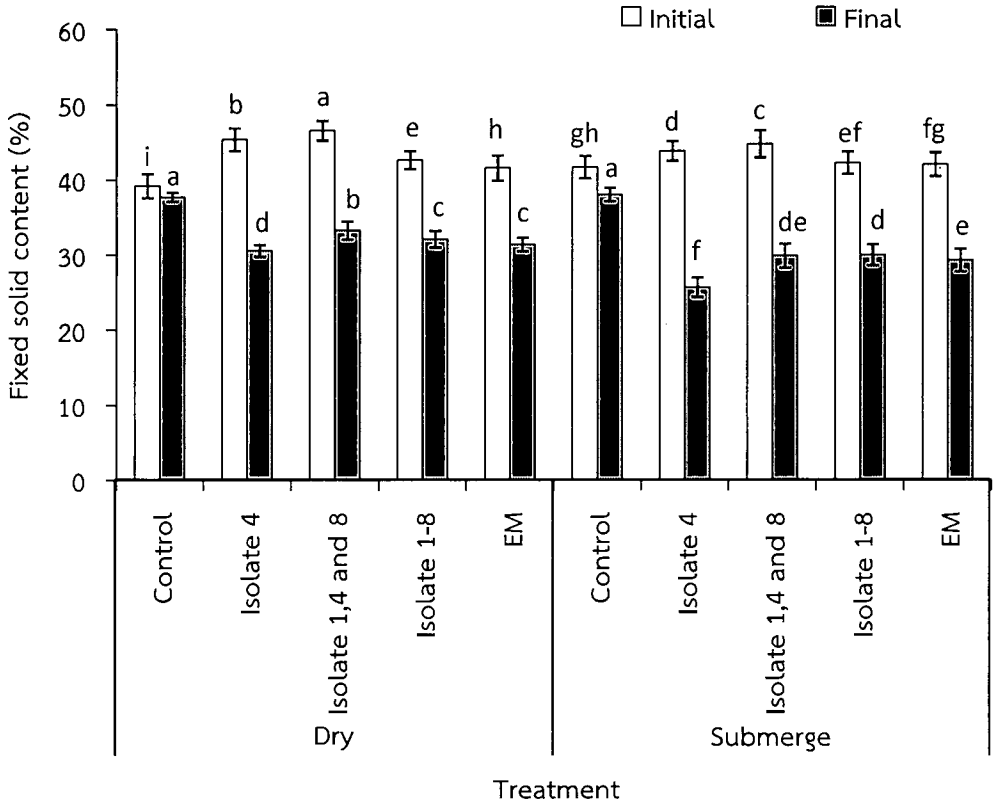
ในขณะที่ปริมาณของแข็งที่คงอยู่จากกากขี้แป้งก่อนและหลังหมัก 30 วัน พบว่า มีปริมาณลดลงทุกทรีตเมนท์ การหมักแบบเปียกให้ปริมาณของแข็งที่คงอยู่ลดลงมากกว่าการหมักแบบแห้ง (รูปที่ 17) กากขี้แป้งถูกย่อยสลายทำให้ปริมาณของแข็งที่คงอยู่ลดลง ดังนั้นการหมักแบบเปียกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากขี้แป้งได้ดีกว่าการหมักแบบแห้ง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละทรีตเมนท์ที่ได้จากการหมักแบบเปียก พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 ให้ปริมาณของแข็งที่คงอยู่ลดลงจากเดิมมากที่สุด รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 หัวเชื้อทางการค้า (EM) และเชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมให้ปริมาณของแข็งที่คงอยู่ลดลงเพียงเล็กน้อยหลังหมัก 30 วัน ปริมาณของแข็งที่คงอยู่ลดลงเนื่องจากเกิดการ

ย่อยสลายแปรผกผันกับปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ ซึ่งค่าที่ได้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของ pH อุณหภูมิ และจำนวนจุลินทรีย์



ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

รูปที่ 16 ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน



ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

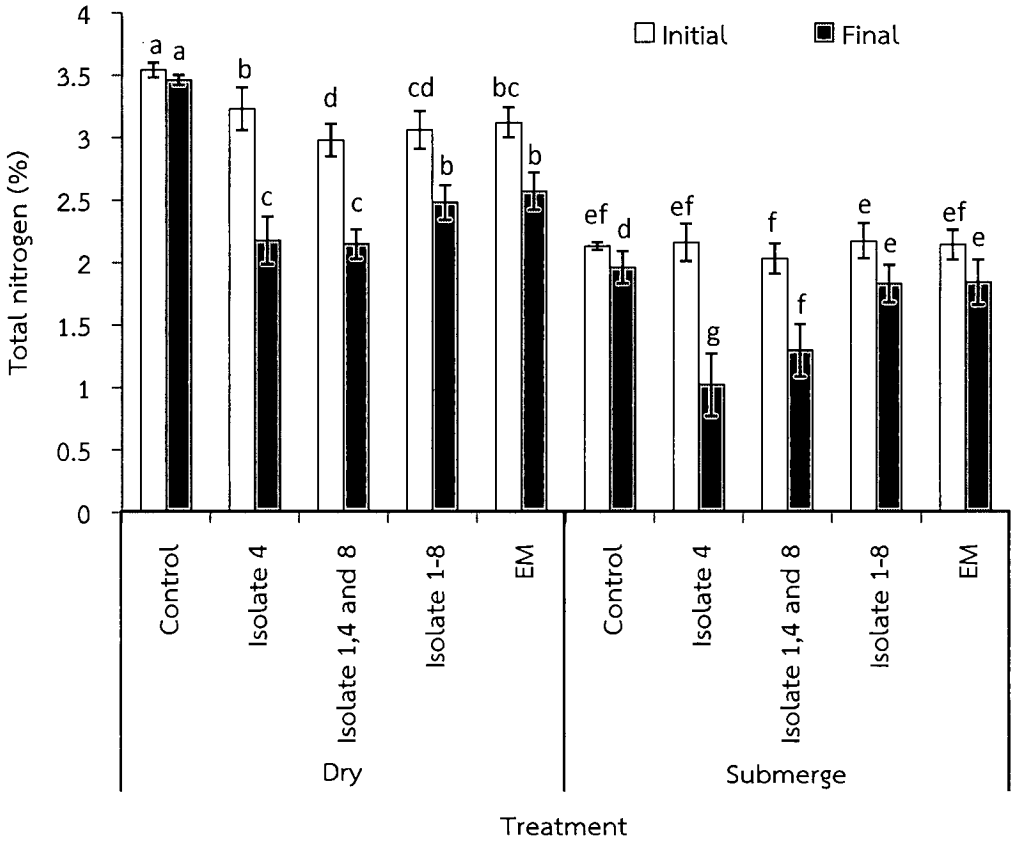
รูปที่ 17 ปริมาณของแข็งที่คงอยู่ของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมีค่าลดลงหลังจากหมัก 30 วัน โดยการหมักแบบเปียกมีแนวโน้มในการให้ปริมาณไนโตรเจนลดลงจากเดิมมากกว่าการหมักแบบแห้ง (รูปที่ 18) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างทรีตเมนท์จากการหมักแบบเปียกพบว่า กากขี้แป้งจากการหมักโดยจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 ให้ปริมาณไนโตรเจนลดลงมากที่สุดร้อยละ 52.77 รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 และหัวเชื้อทางการค้า (EM) โดยให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดลดลงเท่ากับร้อยละ 36.15 15.71 และ 13.97 ตามลำดับ หลังหมัก 30 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมให้ปริมาณไนโตรเจนลดลงน้อยที่สุดร้อยละ 7.98 เนื่องจากไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบของกากขี้แป้งถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เมื่ออยู่สภาพการหมักที่อุณหภูมิสูง และ pH ที่มากกว่า 7.5 โดยเฉพาะทรีตเมนท์จากไอโซเลทที่ 4 และเชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 ไนโตรเจนเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนียและระเหยสู่บรรยากาศ จึงทำให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลง (Tiquia, 2002)

ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากหมัก 30 วัน โดยการหมักแบบเปียกมีแนวโน้มในการให้ปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นจากเดิมมากกว่าการหมักแบบแห้ง (รูปที่ 19) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างทรีตเมนท์จากการหมักแบบเปียกพบว่า กากขี้แป้งจากการหมักโดยจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 ให้ปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นมากที่สุดร้อยละ 94.37 รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 และหัวเชื้อทางการค้า (EM) โดยให้ปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นเท่ากับร้อยละ 82.34 70.96 และ 47.11 ตามลำดับ หลังหมัก 30 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมให้ปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเท่ากับร้อยละ 17.16 ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่พบมากที่สุด นอกจากได้จากน้ำยางแล้วยังได้จากกการเติม DAHP เพื่อตกตะกอนแมกนีเซียม (สะเราะ, 2552)

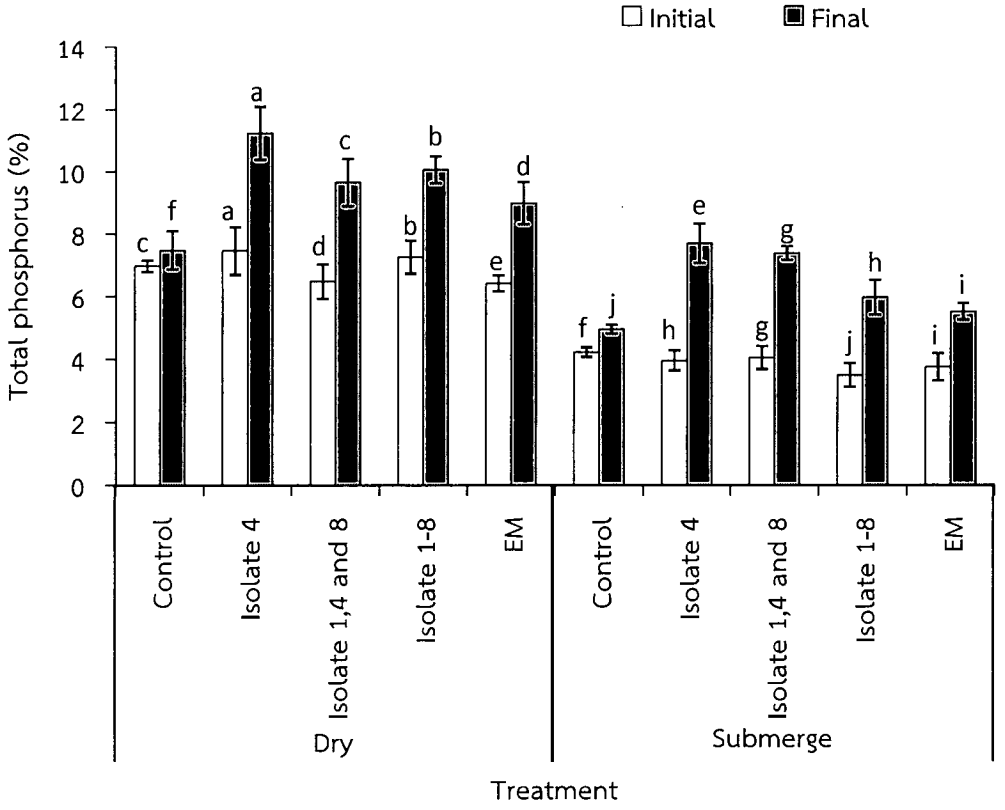
เมื่อกากขี้แป้งที่มีส่วนของแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตเกิดการย่อยสลายได้ดีจึงเกิดเป็นฟอสฟอรัสปริมาณมากซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยได้

ปริมาณโพแทสเซียมมีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากหมัก 30 วัน โดยการหมักแบบเปียกมีแนวโน้มในการให้ปริมาณโพแทสเซียมเพิ่มขึ้นจากเดิมมากกว่าการหมักแบบแห้ง (รูปที่ 20) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างทรีตเมนท์จากการหมักแบบเปียกพบว่า กากขี้แป้งจากการหมักโดยจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 ให้ปริมาณโพแทสเซียมเพิ่มขึ้นมากที่สุดร้อยละ 46.42 รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลท 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลทที่ 1-8 และหัวเชื้อทางการค้า (EM) โดยให้ปริมาณโพแทสเซียมเพิ่มขึ้นเท่ากับร้อยละ 25.86 18.87 และ 14.54 ตามลำดับ หลังหมัก 30 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมให้ปริมาณโพแทสเซียมเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเท่ากับร้อยละ 5.35 ซึ่งปริมาณโพแทสเซียมหลังหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ 4 เท่ากับร้อยละ 0.82 สอดคล้องกับเสาวนีย์และคณะ (2547) ที่ศึกษาปริมาณโพแทสเซียมในตัวอย่างกากขี้แป้งพบว่ามีปริมาณน้อย (ร้อยละ 0.64–1.56) ซึ่งมีที่มาจากโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบของธาตุอาหารในดินที่ต้นยางพาราดูดมาเลี้ยงลำต้น และเป็นองค์ประกอบของอนุภาคยาง เมื่อนำน้ำยางมาทำการเซ็นตริฟิวจ์ โพแทสเซียมบางส่วนตกตะกอนลงสู่ภาชนะรวมอยู่ในกากขี้แป้งในกระบวนการผลิต



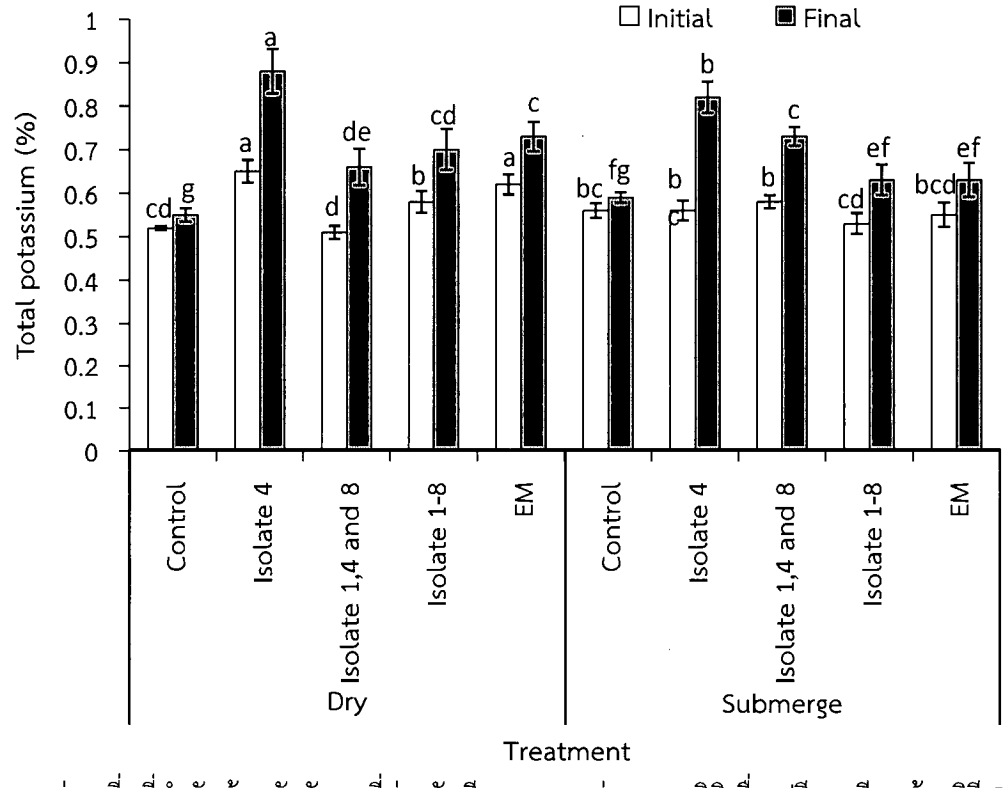
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

รูปที่ 18 ปริมาณไนโตรเจนของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน



ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

รูปที่ 19 ปริมาณฟอสฟอรัสของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน



ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

รูปที่ 20 ปริมาณโพแทสเซียมของกากขี้แป้งที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังหมัก 30 วัน

6. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสามารถคัดเลือกและแยกจุลินทรีย์จากกากขี้แป้งได้โดยผสมกากขี้แป้งที่ทับถมเป็นเวลานานๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสมกากขี้แป้งเข้มข้นน้อยๆ หรือแยกได้โดยผสมกากขี้แป้งในสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.5 และเจือจางที่ระดับต่างๆ จากนั้น ทำการ pour plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ที่ระดับเจือจาง 10^{-2} สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์รวมเท่ากับ 6.53×10^{5} CFU/g และแยกจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยการ streak plate สังเกตความแตกต่างของลักษณะโคโลนีและโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากกากขี้แป้งทั้ง 2 วิธีมีทั้งหมด 8 ไอโซเลท แบ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ 5 ไอโซเลท และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศ 2 ไอโลเลท โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ยกเว้นไอโซเลทที่ 2 เป็นเชื้อรา

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งในจานเพาะเลี้ยงโดยเชื้อจุลินทรีย์เดี่ยวๆ ที่แยกได้ พบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 4 มีการขยายขนาดโคโลนีบนอาหารวุ้น (agar) ที่ผสมกากขี้แป้งร้อยละ 15 สูงกว่าเชื้อไอโซเลทอื่นๆ จากนั้นนำเชื้อไอโซเลทที่ 4 มาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ จากการทดลองกากขี้แป้งเข้มข้นร้อยละ 40-50 ที่ผสมในอาหารวุ้น (agar) ส่งเสริมการขยายขนาดโคโลนีได้ดี หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และทดสอบการย่อยกากขี้แป้งโดยกลุ่มเชื้อเปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยวไอโซเลทที่ 4 พบว่า เชื้อเดี่ยวไอโซเลทที่ 4 ให้การขยายขนาดโคโลนีสูงกว่ากลุ่มเชื้อในชุดทดลองอื่นๆ คือ เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลท 1-8 ดังนั้น เชื้อไอโซเลทที่ 4 มีประสิทธิภาพในการย่อยกากขี้แป้งได้ดี

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายกากขี้แป้งในสภาพการหมักเป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ย่อยกากขี้แป้งได้ดีในการหมักแบบเปียกโดยใช้จุลินทรีย์ที่ขยายในกากน้ำตาลต่อกากขี้แป้ง 1:1 โดยน้ำหนัก โดยเชื้อไอโซเลทที่ 4 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากขี้แป้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เชื้อผสมไอโซเลทที่ 1 4 และ 8 เชื้อรวมไอโซเลท 1-8 เชื้อทางการค้า (EM) และชุดที่หมักด้วยน้ำ ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดสอบการย่อยสลายกากขี้แป้งในจานเพาะเชื้อในเบื้องต้น โดยสังเกตจากค่า pH อุณหภูมิและปริมาณจุลินทรีย์รวมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัดในทุกๆ 5 วัน ปริมาณของแข็งรวม ปริมาณของแข็งที่คงอยู่และปริมาณไนโตรเจนรวมมีค่าลดลง ปริมาณความชื้น ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าเริ่มต้นและค่าที่ได้หลังการหมัก 30 วัน มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน และเมื่อนำเชื้อไอโซเลทที่ 4 ไปตรวจวิเคราะห์ปรากฏว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus spp.*

7. ข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้มุ่งหวังในการย่อยกากขี้แป้งที่เป็นของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำยางข้นโดยการใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ กากขี้แป้งที่ผ่านการย่อยสลายและทำให้แห้ง สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยได้ หากบริษัทนำกลับมาใช้ประโยชน์ อาจจำหน่ายเชิงการค้าได้ เพิ่มมูลค่าของเสียจากอุตสาหรรมน้ำยางข้น ลดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้

กากขี้แป้งที่หมักร่วมกับจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus spp.* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูง ซึ่งใช้กากขี้แป้งผสมที่ทับถมมาแล้ว 1 สัปดาห์ 1 เดือน 3 เดือน คลุกเคล้ากัน ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ดังนั้นควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับการนำกากขี้แป้งสดมาหมักร่วมกับจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาผลของกากขี้แป้งสดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อและระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งในทางปฏิบัติจริง ถ้าสามารถนำกากขี้แป้งสดจากโรงงานมาหมักโดยจุลินทรีย์ได้ทันทีก็สามารถลดต้นทุนในการนึ่งฆ่าเชื้อกากขี้แป้งได้ ลดอิทธิพลของเชื้ออื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญของ *Bacillus spp.* และลดปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมได้

ศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับการขยายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพด้วยต้นทุนต่ำจากวัสดุเหลือที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น และศึกษาวิธีการหมักกากขี้แป้งปริมาณมากที่ไม่ยุ่งยาก เพื่อให้บริษัทสามารถนำวิธีการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ได้

ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเกี่ยวกับการใช้วัสดุอื่นที่เป็นกากอินทรีย์หมักร่วมกับกากขี้แป้งและจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ในกรณีที่กากขี้แป้งสดมีผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ หรือในกรณีที่ต้องการร่นระยะเวลาในการย่อยสลาย หรือในกรณีที่ต้องการเพิ่มธาตุอาหารพืชให้เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

8. เอกสารอ้างอิง

กนัฐยา รัตนะ และอุบล บุญชู. การเตรียมปุ๋ยหมักชีวภาพจากกากขี้แป้งด้วยกลุ่มจุลินทรีย์. โครงงานวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต (ศึกษาศาสตร์) สาขาวิชาชีววิทยา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2549.

ธนธรณ์ นวลปาน. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเตรียมปุ๋ยเหลวจากกากขี้แป้งน้ำยางข้น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยียาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2546.

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ปุ๋ยหมัก. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548.

วันชัย แก้วยอด. การตรวจสอบการจัดการน้ำเสียโรงงานยาง: กรณีศึกษาจังหวัดสงขลาวิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2540.

วลัยพร ผ่อนผัน. การใช้ประโยชน์กากขี้แป้งจากโรงงานผลิตน้ำยางข้นในรูปสารบำรุงดินวิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547.

วราศรี เถกประสิทธิ์. การนำกากขี้แป้งจากอุตสาหกรรมน้ำยางข้นมาใช้ประโยชน์เพื่อการทำเป็นวัสดุบำรุงดิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อมคณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2543.

วิภาพรรณ อุบล. การใช้ประโยชน์กากอินทรีย์อุตสาหกรรมน้ำยางข้น แปรรูปสัตว์น้ำและน้ำมันปาล์ม ในการเตรียมวัสดุปลูกหญ้าสนาม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีประยุกต์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2550.

สะเราะ นิยมเดชา. การเตรียมสารปรับปรุงดินจากกากขี้แป้งน้ำยางข้นโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเคมีประยุกต์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2552.

สุพจน์ กาเซ็ม ฉวีวงศ์ สำราญอยู่ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. การพัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ในการควบคุมโรคใบจุดนูนถั่วเหลือง ใน รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2548, 70-77.

สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง. ยางพารา (ออนไลน์). 2550. สืบค้นจาก http:/www. rubber thai.com. [21 พฤษภาคม 2551].

เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังษี วิไลรัตน์ ชีวเศรษฐธรรม ธนธรณ์ นวลปาน และ ณัฐพงศ์ นิธิอุทัย. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเตรียมปุ๋ยเหลวจากกากขี้แป้งน้ำยางข้น. ชุดโครงการพัฒนาอุตสาหกรรมยางพารา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สัญญาเลขที่ RDG4750017. 2547.

สมทิพย์ ด่านธีรวนิชย์ อุดมผล พืชน์ไพบูลย์ จรัญ บุญกาญจน์ เสาวลักษณ์ รุ่งตะวันเรืองศรี นิทัศน์ เพราแก้ว อัษฎาวุธ หิรัญรักษ์ สุวลักษณ์ วิสุนทร วิบูลย์ ป้องกันภัย และนฤเทพ บุญเรืองขาว. การตรวจสอบการจัดการของเสียของโรงงานน้ำยางข้น. โครงการวิจัย 05011505. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2545.

AOAC. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., U.S.A. 2000.

Bernal, M.P., Alburquerque, J.A. and Moral, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. Bio resource Technology. 2009, 100, 5444-5453.

Das, K. and Keener, H.M. Moisture effect on compaction and permeability in composts. Environmental Engineering, 1997, 123: 275–281.

De Bertoldi, M., Vallini, G. and Pera, A. The biology of composting: a review. Waste Manage. Res. 1983, 1, 157–176.

Diaz-Ruiz, G., J.P. Guyot, F. Ruiz-Teran, J. Morlon-Guyot and C. Wacher. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol, a Mexican fermented maize beverage. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 4364-4374.

Mari, I., Ehaliotis, C., Kotsou, M., Chatzipavlidis, I. and Georgakakis, D. Use of sulfur to control pH in composts derived from olive processing by-products. Compost Sci. Util. 2005, 13, 281–287.

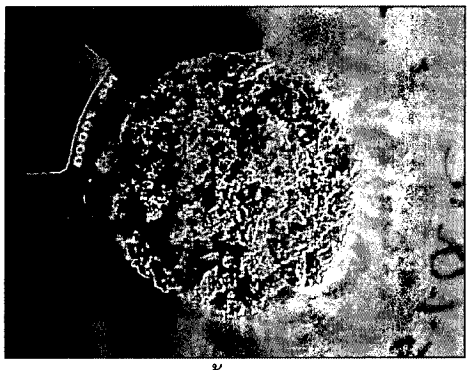
Sathyaseelan, S. Latex Sludge: An Alternate Cheap Phosphorus Source in Croup Production. World congress of soil science 18th Philadephia Pennsylvania, USA, July. 9-15, 2006, 154-158.

Soumaré , M., Tack , F. M. G. and Verloo, M. G. Effects of a municipal solid waste compost and mineral fertilization on plant growth in two tropical agricultural soils of Mali. Bioresource Technology. 2002, 86, 15-20.

Tiquia, S. and Tam, N. Characterization and composting of poultry litter in forcedaeration piles. Process Biochem. 2002, 37, 869–880.

Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C. and Wong, M.H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. Geoderma. 2005, 125, 155–166.

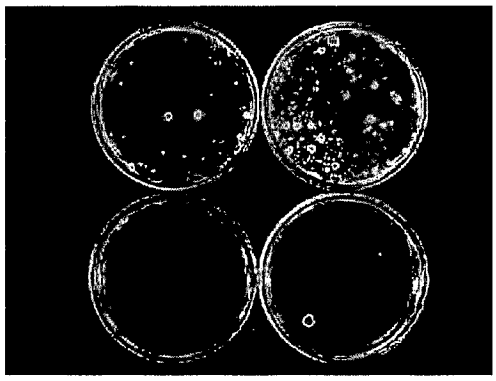
ภาคผนวก ก
ขั้นตอนการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์



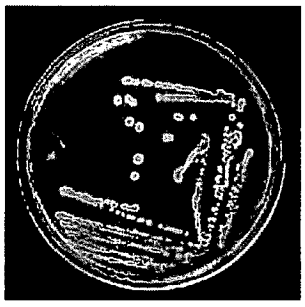
เตรียมตัวอย่างกากขี้แป้งโดยบดให้ละเอียด

เติม 0.5% peptone
และเจือจาง Serial dilution

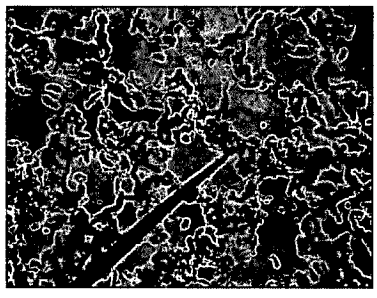
เทอาหารเลี้ยงบนสาระลายกากขี้แป้ง



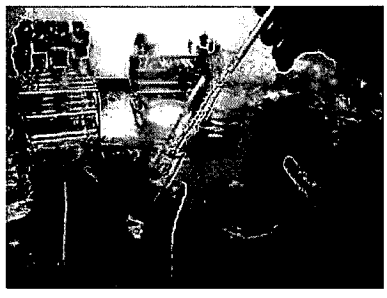
ตรวจนับจุลินทรีย์



แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ
streak plate

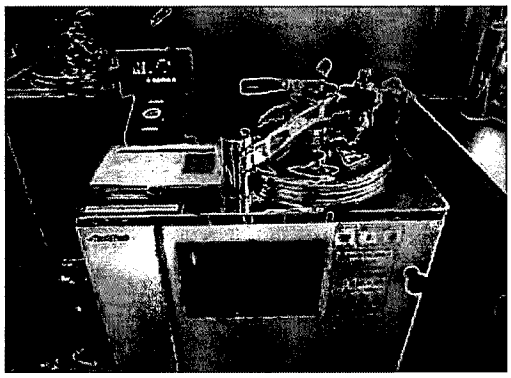


ย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะเชื้อ

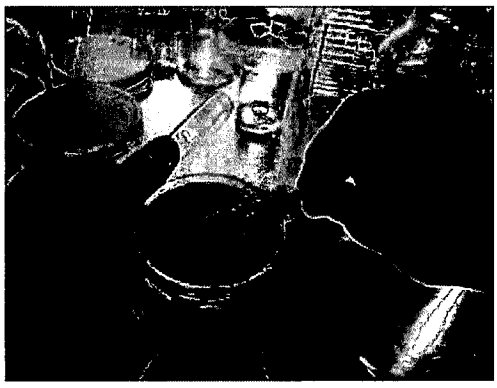


เก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ใน broth

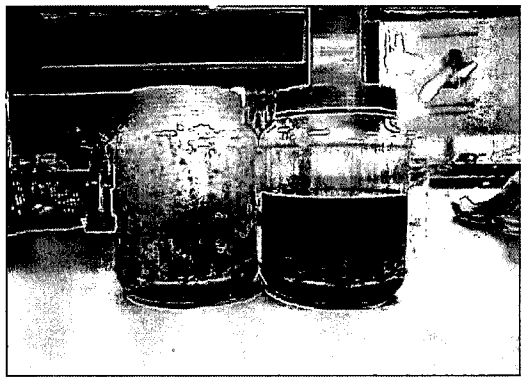
ภาคผนวก ข
ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อในการย่อยกากขี้แป้ง



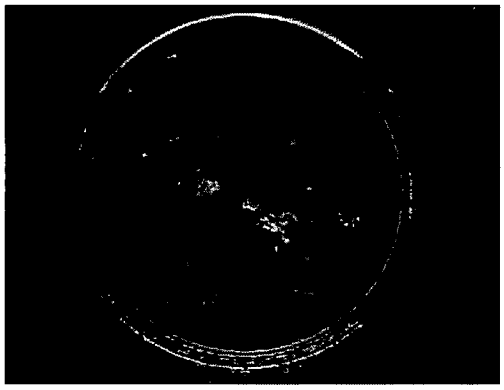
นึ่งฆ่าเชื้ออาหารและกากขี้แป้งที่บดละเอียด



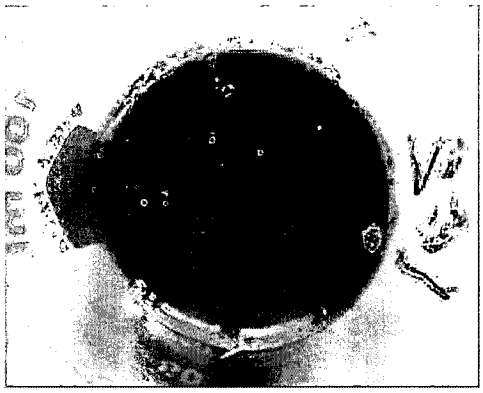
ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งในจานเพาะเชื้อ



ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยกากขี้แป้งโดยการหมักในระบบปิด

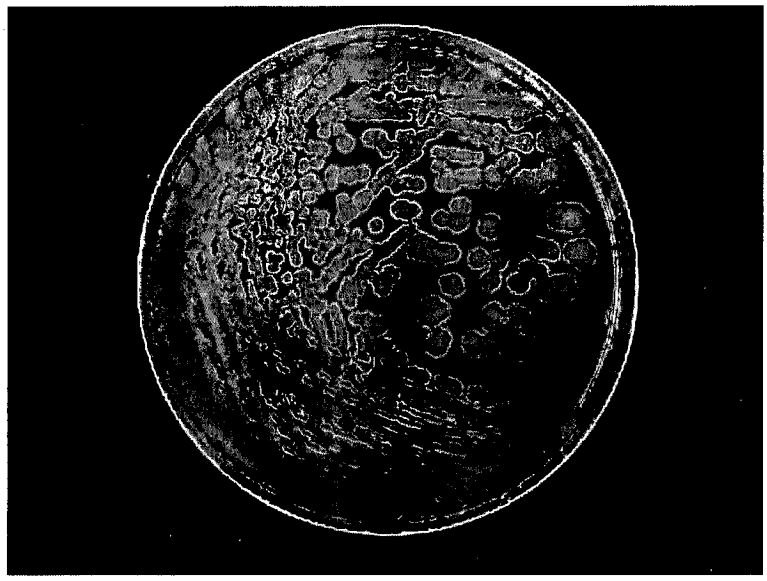


เปรียบเทียบการขยายขนาดโคโลนีของเชื้อแต่ละไอโซเลท

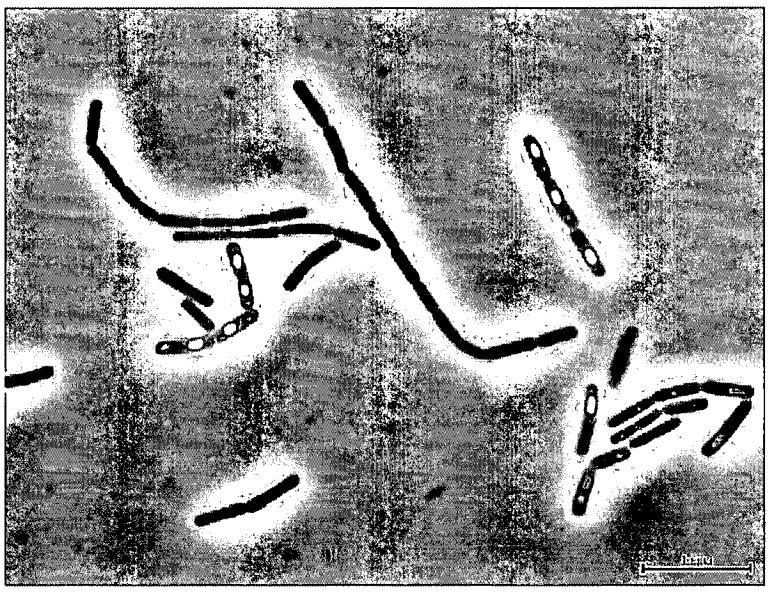


สภาพกากขี้แป้งที่ผ่านการย่อยโดยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ

ภาคผนวก ค
รูปจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ

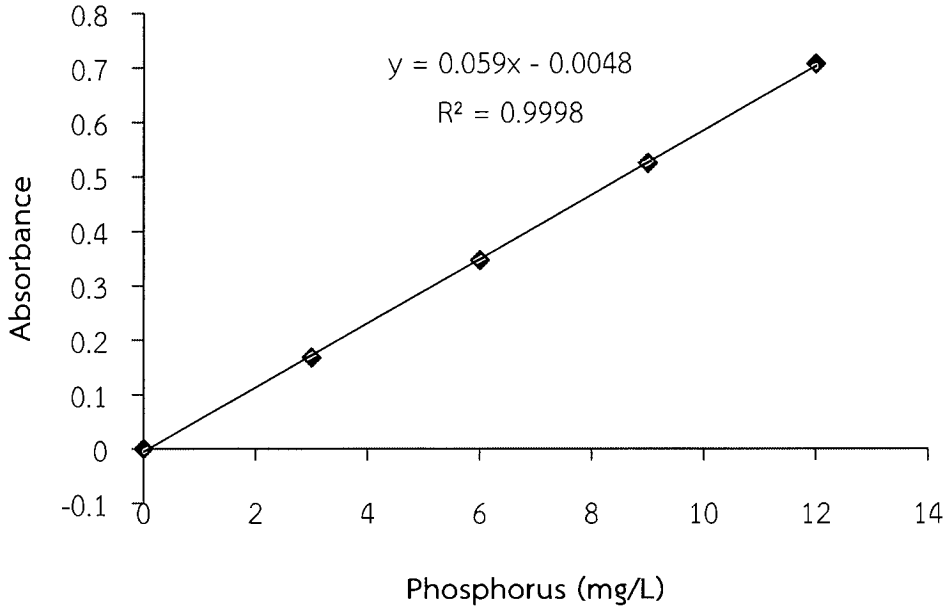


ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus spp.* (จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ) ที่ได้จากการ streak plate บนอาหาร NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

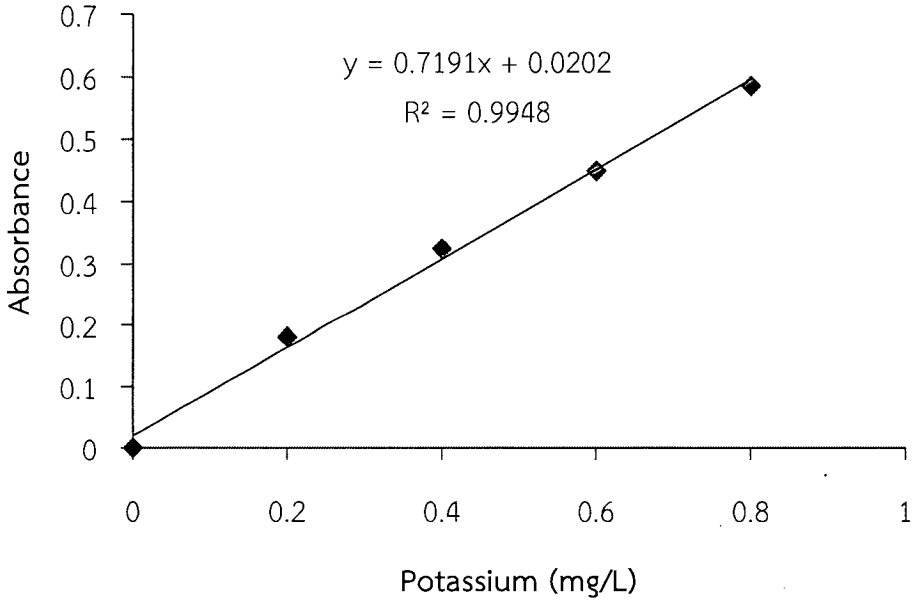


ลักษณะและรูปร่างของจุลินทรีย์ *Bacillus spp.* ที่ผ่านการด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ (VITEK 2 Compact) (บาร์ = 10 ไมครอน)

ภาคผนวก ง
กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร



กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส



กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม

ภาคผนวก จ
ตอบข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ

ตอบข้อคิดเห็นจากผู้ทรงคุณวุฒิ ท่านที่ 1

1. ผู้วิจัยออกแบบการทดลองและทำการทดลองทุกขั้นตอนจนสามารถวิเคราะห์และสรุปผลได้

2. ผู้วิจัยได้แก้ไขคำผิดในบทคัดย่อภาษาอังกฤษตามสำเนาเอกสารที่แนบมา

3. ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพิ่มเติมตามข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ ทำให้สามารถอธิบายผลการทดลองอย่างเป็นเหตุเป็นผลได้ชัดเจน

4. จากการทดลองสรุปได้ว่า เชื้อไอโซเลทที่ 4 ย่อยสลายกากขี้แป้งได้ดีที่สุดโดยวัดจากการขยายขนาดโคโลนีบนอาหารวุ้นที่เติมกากขี้แป้งในเบื้องต้น จากนั้น ทดสอบการย่อยโดยการหมักกากขี้แป้งด้วยเชื้อเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการย่อยสลายที่เกิดขึ้น โดยพบว่า ค่า pH อุณหภูมิและปริมาณจุลินทรีย์รวมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ ปริมาณของแข็งรวม ปริมาณของแข็งที่คงอยู่ ปริมาณความชื้น ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ ปริมาณไนโตรเจนรวม ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ซึ่งให้ค่าเริ่มต้นและค่าที่ได้หลังการหมัก 30 วัน มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน

5. ผู้วิจัยได้เพิ่มเติมขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดจุลินทรีย์ในวิธีวิจัย และพบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 4 เป็นเชื้อในกลุ่มบาซิลัส (*Bacillus spp.*)

ตอบข้อคิดเห็นจากผู้ทรงคุณวุฒิ ท่านที่ 2

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมในขั้นตอนการทดสอบการย่อยกากขี้แป้งในจานเพาะเชื้อ โดยการเปลี่ยนจากอาหาร NA เป็นอาหารวุ้น agar ผสมกากขี้แป้ง ผลการทดลองพบว่า ลักษณะการขยายขนาดโคโลนีจะตรงกันข้ามกับการทดลองเดิมที่ใช้ NA ผสมกากขี้แป้ง โดยสัดส่วนกากขี้แป้งที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการขยายขนาดโคโลนีเพิ่มขึ้นด้วย

ตอบข้อคิดเห็นจากผู้ทรงคุณวุฒิ ท่านที่ 3

1.งานวิจัยมีการตรวจธาตุอาหาร อุณหภูมิ และ pH ของกากขี้แป้งหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อก่อนการทดสอบการย่อยโดยจุลินทรีย์ และมีการตรวจปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แยกได้จากกากขี้แป้งที่แน่นอนก่อนการทดสอบการย่อย และมีการเปรียบเทียบค่า ธาตุอาหาร อุณหภูมิ pH และปริมาณเชื้อก่อน ระหว่างการหมักและหลังหมัก เพื่อดูประสิทธิภาพการย่อยสลายที่เกิดขึ้น

2. กากขี้แป้งมีองค์ประกอบของสารหลายอย่างรวมทั้งเศษยางด้วยจึงมีการจับตัวเป็นก้อน ดังนั้นก่อนการทดลองจึงต้องทำการบดและร่อน กากขี้แป้งที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและผสมในอาหารวุ้น ทำให้อาหารขุ่นและบางส่วนเกิดการจับตัวเป็นก้อน และทดลองโดยนำสารละลายเชื้อที่ขยายในอาหารเหลวและทราบปริมาณที่แน่นอนหยดลงในหลุมบนอาหารวุ้นที่ผสมกากขี้แป้งแล้วปรากฏว่า ไม่มีการเกิด clear zone ในอาหาร แต่มีการเจริญและขยายขนาดโคโลนีบนอาหารแทน ในทางกลับกัน ได้ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยกากขี้แป้งโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA แล้วหยดสารละลายกากขี้แป้งโดยวิธี *Disc diffusion method* พบว่า ไม่เกิด clear zone โดยเชื้อเจริญร่วมกับกากขี้แป้งได้

3. มีการทดสอบการย่อยกากขี้แป้งด้วยวิธีการหมักในระบบปิดเพื่อยืนยันผลที่ได้จากการทดสอบการย่อยในจานเพาะเชื้อ โดยมีชุดควบคุมคือ ชุดที่หมักด้วยน้ำเปล่า ชุดที่หมักด้วย EM เปรียบเทียบกับชุดที่หมักด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้ ซึ่งพบว่า ค่า pH อุณหภูมิและปริมาณจุลินทรีย์รวมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้

ชัด ปริมาณของแข็งรวม ปริมาณของแข็งที่คงอยู่ ปริมาณความชื้น ปริมาณของแข็งที่ระเหยได้ ปริมาณไนโตรเจนรวม ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม มีการเปลี่ยนแปลงและแตกต่างอย่างอย่างชัดเจนก่อนและหลังหมักระหว่างเชื้อที่มีประสิทธิภาพกับชุดควบคุม

4. เชื้อบางไอโซเลทไม่มีประสิทธิภาพ จึงไม่จำเป็นต้องส่งตรวจ และการรวมเชื้อหลายไอโซเลท พบว่า มีประสิทธิภาพในการย่อยได้ไม่ดีเท่ากับไอโซเลทเดียว

5. จากการทดลองได้เก็บรักษาเชื้อเดี่ยวๆ ในอาหารเหลว และทำการขยายเชื้อให้ได้ปริมาณมากโดยใช้กากน้ำตาล ซึ่งมีขั้นตอนที่ง่ายและต้นทุนต่ำด้วย