บทคัดย่อ

ชื่อโครงงานวิจัย	การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพของเกษตรกรในจังหวัดพัทลุง และการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับพัฒนาเป็นหัวเชื้อเพื่อการผลิตปุ๋ย Bio-organic fertilizer production in Phatthalung and Selection of effective microorganisms for improvement of bio-organic fertilizer production	
รายนามคณะผู้วิจัย	ชัยสิทธิ์ นิยะสม	หัวหน้าโครงการ
	วิชุดา เกตุใหม่	นักวิจัย
	สมพงศ์ โอทอง	นักวิจัย
สถานที่ทำงาน	สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง	

จากการศึกษารูปแบบสารพันธุกรรมของกลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคียด้วยเทคนิค DGGE ในปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ 15 ตัวอย่าง สามารถแบ่งปุ๋ยตัวอย่างตามความเหมือนของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียได้ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เด่นด้วยแบคทีเรียกลุ่ม Betaproteobacteria Bacillus และ Clostridium กลุ่มที่ 2 เด่นด้วย Thiorhodococcus Clostridium Betaproteobacteria และ Gammaproteobacteria กลุ่มที่ 3 เด่นด้วย Actinobacteria Bacillus และ Clostridium จากโครงสร้างของประชากรอาร์เคียสามารถแบ่งตัวอย่างปุ๋ยออกเป็น 3 กลุ่มเช่นกัน คือกลุ่มที่ 1 เด่นด้วยอาร์เคียกลุ่ม Thermoprotei กลุ่มที่ 2 เด่น Halobacteria Thermoprotei และ Methanomicrobia กลุ่มที่ 3 เด่นด้วย Methanomicrobia และ Thermoprotei และพบว่าโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ในปุ๋ยหมักไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดของหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิต จากการคัดแยกแอคติโนมัยสีทและ *Bacillus* sp. จากตัวอย่างโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารในห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างไฮโดรไลติกเอนไซม์ (เซลลูเลส โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส) และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Fusarium* sp. *Alternaria* sp. *Curvularia* sp. และ *Colletotrichum gloeosporioides* สามารถคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สร้างเอนไซม์โปรเติเอส ไลเปส เซลลูเลส และอะไมเลสได้ จำนวน 200, 98, 173 และ 81 ไอโซเลท ตามลำดับ และไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จำนวน 209 ไอโซเลท และสามารถคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่สร้างเอนไซม์โปรเติเอส ไลเปส เซลลูเลส และอะไมเลสได้ จำนวน 130, 15, 160 และ 22 ไอโซเลท ตามลำดับ และไอโซเลทที่สามารถยับยั้ง

การเจริญของเชื้อราทดสอบได้จำนวน 38 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกจะรวบรวมไว้เพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพต่อไป

คำสำคัญ : ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ, ความหลากหลาย, ดีจีจีอี, แอคติโนมัยสีท, บาซิลลัส

Abstract

Microbial communities of the fifteen different bio-organic fertilizers in Phatthalung Province were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). DGGE results showed three different types of bacterial community structure. First group were dominated by Betaproteobacteria, Bacillus and Clostridium, second dominated by Thiorhodococcus, Clostridium, Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria and third dominated by Actinobacteria, Bacillus and Clostridium. DGGE results also showed three different types of archaeal community structure. First group were dominated by Thermoprotei, second dominated by Halobacteria, Thermoprotei and Methanomicrobia and third group dominated by Methanomicrobia and Thermoprotei. Microbial community structure did not have relationship with the inocula used in compost processing. In this study, actinomycetes and *Bacillus* spp. were isolated and tested for extracellular hydrolytic enzyme (cellulase, amylase, protease and lipase) production and antifugal activity against 4 plant pathogenic fungi such as *Fusarium* sp. *Alternaria* sp. *Curvularia* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides*. The results showed that 200, 98, 173, and 81 actinomycete isolates were positive for protease, lipase, cellulase and amylase production, respectively, and 209 isolates showed antifungal activity against pathogenic fungi. Moreover, 130, 15, 160 and 22 *Bacillus* spp. isolates were positive for protease, lipase, cellulase and amylase production, respectively, and 38 isolates showed antifungal activity against plant pathogenic fungi. All these isolates were selected for the development of seed inocula used in bio-organic composting process and kept for further study.

Keywords : bio-organic fertilizer, diversity, DGGE, actinomycete**,** *Bacillus*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงมิได้ หากปราศจากความกรุณาจากบุคคลและหน่วยงานต่างๆ ซึ่งผู้วิจัยขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณสำหรับการดำเนินวิจัย

ขอขอบพระคุณ เกษตรกรทุกท่านที่กรุณาเสียสละเวลาและคอยช่วยเหลือ ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่งในการเก็บข้อมูลภาคสนามจนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(6)
สารบัญภาพ	(7)
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ที่มาและความสำคัญ	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
3. ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
4. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1. ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ	5
2. จุลินทรีย์ในปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ	6
3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ	8
4. ตัวอย่างการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพในจังหวัดพัทลุง	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	13
1. รวบรวมข้อมูลภูมิปัญญาเกี่ยวกับการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ จากกลุ่มเกษตรกร หรือเกษตรกรรายย่อยในพื้นที่จังหวัดพัทลุง	13
2. คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ	13
3. คุณสมบัติทางชีวภาพของปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ	13
4. แยกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากตัวอย่างปุ๋ย ศึกษาคุณสมบัติ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง	15
บทที่ 4 ผลการศึกษา	19
1. ภูมิปัญญาการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพของเกษตรกรในจังหวัดพัทลุง	19
2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี (ความชื้น pH ธาตุอาหารหลัก)	27
3. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ โดยการเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก ด้วยเทคนิค DGGE	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4. การคัดแยกและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์	50
บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	59
1. สรุปผลการศึกษา	59
2. ข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก ก การลงพื้นที่เก็บข้อมูลในการผลิตปุ๋ยหมักชีวภาพ และการเก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักชีวภาพ	64
ภาคผนวก ข แบบสอบถามในการสัมภาษณ์การผลิตปุ๋ยหมักชีวภาพของเกษตรกรในจังหวัดพัทลุง	65

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 กลุ่มตัวอย่างที่ผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพในจังหวัดพัทลุง 20
4.2 วัตถุดิบในการหมักหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ 23
4.3 วัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ 25
4.4 การจัดกลุ่มในผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพโดยใช้ชนิดของหัวเชื้อในการผลิตและรูปแบบของการผลิตปุ๋ยเป็นเกณฑ์ 27
4.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพจากแหล่งต่างๆ 31
4.6 แสดงผลการการเปรียบเทียบลำดับทางพันธุกรรมของแบคทีเรียแต่ละแบนที่ตัดจาก DGGE เจลกับฐานข้อมูล RDP 37
4.7 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับทางพันธุกรรมของอาเคียร์แต่ละแถบ DNA ที่ตัดจาก DGGE เจลกับฐานข้อมูล RDP 47
4.8 การวิเคราะห์ปริมาณแอคติโนมัยสีทในปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพจากแหล่งต่างๆ 51
4.9 การจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทตามลักษณะสีของโคโลนี สีของสปอร์ และการสร้างสารสี บนอาหาร ISP2 57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	กรอบแนวคิดโครงการวิจัย	4
2.1	กระบวนการเปลี่ยนแปลงของวัสดุหมักในระหว่างการทำปุ๋ยหมักชีวภาพ	6
3.1	การทดสอบความสามารถของแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี Dual culture	16
3.2	การทดสอบความสามารถของ *Bacillus* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี Dual culture	18
4.1	แผนที่แหล่งผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพในจังหวัดพัทลุง	19
4.2	การเปรียบเทียบความเหมือนของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในปุ๋ยหมัก	33
4.3	โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในปุ๋ยหมักจากแหล่งผลิตต่างในจังหวัดพัทลุง	36
4.4	Phylogenetic tree ของแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพที่ผลิตในจังหวัดพัทลุง	43
4.5	โครงสร้างประชากรอาเคียในปุ๋ยหมักจากแหล่งผลิตต่างในจังหวัดพัทลุง	46
4.6	Phylogenetic tree ของอาเคียที่พบในปุ๋ยหมักผลิตในจังหวัดพัทลุง	50
4.7	ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพบน SCA	51
4.8	ความสามารถของแอคติโนมัยสีทในการสร้างไฮโดรไลติกเอนไซม์	52
4.9	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชของแอคติโนมัยสีท	53
4.10	ความสามารถของ *Bacillus* sp. ในการสร้างไฮโดรไลติกเอนไซม์	54
4.11	ความสามารถของ *Bacillus* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช	55
4.12	ลักษณะเส้นใยและการจัดเรียงตัวของสปอร์ของแอคติโนมัยสีท	56
4.13	PCR product ขนาดประมาณ 1.4 kb จากการเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA	58