



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในการผลิต
ปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสำหรับปลูกอ้อย

The Optimum Conditions for Growth of *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 in the
Production of Biofertilizer for Improvement of Nitrogen Fixation in Sugar Cane
Cultivation

นามผู้วิจัย นางสาวภาณุจิรา ภูมิไกล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094
ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสำหรับปลูกอ้อย

The Optimum Conditions for Growth of *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094
in the Production of Biofertilizer for Improvement of Nitrogen Fixation
in Sugar Cane Cultivation

โดย

นางสาวภาณุจิรา ภูมิไกล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2556

การุจิร ภูมิไกล 2556: สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสำหรับปลูกอ้อย ปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนนา, Ph.D. 94 หน้า

ปัญหาดินเสื่อมคุณภาพจากการใช้ปุ๋ยเคมีทำให้ความนิยมในการใช้ปุ๋ยชีวภาพเพื่อการปรับปรุงคุณภาพของดินและพืชได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณการผลิตหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในรากพืช รวมถึงลดต้นทุนการผลิตโดยใช้กากน้ำตาลผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่า เชื้อเจริญได้สูงสุดที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำหนักต่อปริมาตร อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 vvm และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 โดยที่สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตเชื้อได้ปริมาณ 7.50×10^9 CFU/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อนำหัวเชื้อที่ผลิตได้ไปทดสอบกับการปลูกอ้อยในระดับปฏิบัติการโดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเตรียมท่อนอ้อย ดินที่ปลูก และการรดปุ๋ยน้ำชีวภาพ พบว่า การทดลองที่ 12 (ท่อนอ้อยแช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย) ดินอ้อยมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 136.35 เซนติเมตร ในขณะที่การทดลองที่ 1 (ท่อนอ้อยไม่แช่-ดินวันดี-รดน้ำ) ความสูงของอ้อยเฉลี่ยต่ำสุด 74.80 เซนติเมตร หลังจากการทดลองปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน นำรากอ้อยทดสอบ และดินบริเวณใกล้ราก ไปศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 พบว่า รากอ้อยจากการทดลองที่ 10 (ท่อนอ้อยแช่น้ำ-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย) แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนสสูงที่สุด $37.70 \text{ mmolC}_2\text{H}_2/\text{g/hr}$ ในขณะที่รากอ้อยจากการทดลองที่ 7 (ท่อนอ้อยไม่แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนสต่ำสุด ($14.86 \text{ mmolC}_2\text{H}_2/\text{g/hr}$) นอกจากนี้ยังพบว่ารากอ้อยและดินที่รดด้วยปุ๋ยน้ำชีวภาพมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนสสูงกว่าตัวอย่างที่รดด้วยน้ำธรรมดา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในปุ๋ยน้ำช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนบริเวณรากอ้อย และส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย ดังนั้นการประยุกต์ใช้ปุ๋ยชีวภาพในการเพาะปลูกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีและเป็นการลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรอีกทางหนึ่งด้วย

Parujee Phumklai 2013: The Optimum Conditions for Growth of *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 in the Production of Biofertilizer for Improvement of Nitrogen Fixation in Sugar Cane Cultivation. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Wirat Vanichsriratanana, Ph.D. 94 pages

The problem of soil degradation resulting from using of chemical fertilizers caused the bio-fertilizers to receive attention for improving soil quality. This research is to study the optimal conditions to increase the biomass yield of *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 biofertilizer inoculum, the bacteria which are capable of nitrogen fixation in the rhizosphere of plants and to reduce production costs by using molasses byproduct of sugar factory as a raw material. From the study to find the optimum parameters for the growth of bacteria in a 50 L fermentor, the result showed that the bacteria could grow at maximum at the molasses concentration of 4 percent (w/v), agitation rate 150 rpm, aeration rate at 2 vvm and control the pH to 7.0. By these conditions, the amount of bacteria can produce 7.50×10^9 CFU / ml at 24 h.

To study the effect of the produced inoculums to the sugarcane growth in lab scale, Experimentation on stem cane preparation, soil and using liquid biofertilizer were carried out. It was found that in the experiment 12 (cane stem soaked fertilizer-Wan Dee Soil+filter cake-liquid fertilizer), the sugarcane had the highest at 136.35 cm, while in the experiment 1 (non cane soaked-Wan Dee Soil-watering) the sugarcane had lowest at 74.80 cm. After testing for 3 months, the roots and soil around were collected to determine the efficiency of nitrogen fixation of *A. vinelandii* TISTR 1094. The experiment 10 (cane soaked water – Wan Dee Soil + filter cake – liquid fertilizer) showed the highest nitrogenase activity (nitrogen fixation) at $37.70 \text{ mmolC}_2\text{H}_2/\text{g/h}$. While the experiment 7 (non cane soaked – Wan Dee Soil + filter cane - watering) showed lowest nitrogenase activity ($14.86 \text{ mmolC}_2\text{H}_2/\text{g/hr}$). Moreover, it can also be concluded that the roots and soil watering with a liquid biofertilizer, offered higher nitrogenase activity than watering with only water. This suggested that biofertilizer with *A. vinelandii* TISTR 1094 enhances nitrogen fixation around cane root and promote the growth of sugarcane. Therefore, the application of biofertilizers in agriculture is an interesting alternative. It also can reduces the amount of chemical fertilizers and reduce the production cost for farmers.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนา ประธานกรรมการที่
กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาเรื่องการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ รองศาสตราจารย์กล้าณรงค์
ศรีรอด ประธานการสอบ และรองศาสตราจารย์อรไท สุขเจริญ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจ
แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ขอบคุณภาควิชาปฐพี คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
สำหรับความช่วยเหลือเครื่องมือในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์

ขอขอบคุณ ดร. วลัยพร ทิมบุญธรรม ที่คอยให้คำแนะนำอย่างดียิ่งเรื่องงานวิจัยด้วยดีเสมอ
มา ขอขอบคุณพี่ป้อ พี่ออย พี่กวาง พี่อ๊อฟ พี่ฝ่าย ตาล หลี บิ๊ก น้องตาล น้องจุ่ม น้องเจน และเพื่อนๆ พี่ๆ
น้องๆ ทุกท่านสำหรับทุกกำลังใจและความช่วยเหลือ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนให้
วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จด้วยดี

กราบขอบพระคุณพ่อ แม่ พี่สาว ที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนทุกเรื่องโดยเสมอมา คุณ
งามความดีที่เกิดจากงานวิจัยนี้ขอยกขึ้นบูชาคุณบิดามารดา คุณครูบาอาจารย์ และท่านผู้มีพระคุณ
ทั้งปวง หากมีข้อผิดพลาดประการใดก็ขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ภาณุจิร ภูมิไกล

มีนาคม 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	66
สรุป	66
ข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	74
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	75
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	77
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	81
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	94

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณความต้องการปุ๋ยของโลกระหว่างปี 2008-2012	6
2 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลอ้อย	25
3 วิตามินที่พบในกากน้ำตาลอ้อย	26
4 ส่วนประกอบทางเคมีของกากหม้อกรอง	27
5 การทดลองการปรับปรุงพีระระดับห้องปฏิบัติการ	32
6 ลักษณะการสร้างชีสท์ของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับฟลาस्कที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลและน้ำตาลซูโครส 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	46
7 การสร้างชีสท์ของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	49
8 ปริมาณไนโตรเจนของปุ๋ยชีวภาพระหว่างการเก็บรักษา	58
9 แสดงความสูงของต้นอ้อยอายุ 1 และ 3 เดือน ที่ปลูกกระถางในระดับปฏิบัติการ	61
10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของรากอ้อยที่ปลูกเป็นเวลา 3 เดือน	63
11 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสในดินที่ปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน	64

พ.ศ. ๒๕๕๖

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค1 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	82
ค2 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	82
ค3 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	82
ค4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	83
ค5 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	83
ค6 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	83
ค7 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	84
ค8 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	84
ค9 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่สภาวะเลี้ยงที่แตกต่างกัน	84
ค10 การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการเลี้ยงเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ค11	การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	85
ค12	การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญเติบโตของ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	86
ค13	การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	86
ค14	ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเจริญเติบโตของ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	87
ค15	การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	87
ค16	การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	88
ค17	การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	88
ค18	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในปุ๋ยน้ำระหว่างการเก็บรักษา	89
ค19	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในปุ๋ยน้ำผสมกากหม้อกรองระหว่างการเก็บรักษา	90
ค20	ความสูงท่อนอ้อยที่ปลูกในกระถางทดลองเป็นเวลา 30 และ 90 วัน	92
ค21	ปริมาณไนโตรเจนในดินจากกระถางทดลองที่ปลูกอ้อยเป็นเวลา 30 และ 90 วัน	93
ค22	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนส ของรากอ้อยที่ปลูกในดินเป็นเวลา 3 เดือน	93

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 <i>Azotobacter vinelandii</i>	12
2 การเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียของแบคทีเรีย	14
3 แผนภาพอย่างง่ายของการผลิตน้ำตาลของโรงงานน้ำตาลทรายและการได้กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้	21
4 การเปลี่ยนแปลงฟิโอสในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่อัตราการเขย่า 200 และ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส	35
5 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่อัตราการเขย่า 200 และ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส	37
6 การเจริญของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในสภาวะที่แตกต่างกัน	38
7 การเปลี่ยนแปลงของฟิโอสระหว่างการเจริญของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	40
8 การเจริญของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	40
9 การเปลี่ยนแปลงของฟิโอสระหว่างการเจริญของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลและน้ำตาลซูโครส 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	42
10 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลและน้ำตาลซูโครส 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	42
11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลและน้ำตาลซูโครส 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	43
12 ลักษณะสีของ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	44
13 การเจริญของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	48
14 การเจริญของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15 การเจริญของเชื้อ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	54
16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในปุ๋ยน้ำระหว่างการเก็บรักษา	56
17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ <i>A. vinelandii</i> TISTR 1094 ในปุ๋ยน้ำผสมกากหม้อกรองระหว่างการเก็บรักษา	57
18 ต้นอ้อยอายุ 3 เดือน ที่ปลูกกระถางในระดับปฏิบัติการ	60
19 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดินหลังการปลูกอ้อยเป็นเวลา 1 และ 3 เดือน	62

**สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในการ
ผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสำหรับปลูกอ้อย**

**The Optimum Conditions for Growth of *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094
in the Production of Biofertilizer for Improvement of Nitrogen Fixation
in Sugar Cane Cultivation**

คำนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นวัตถุดิบสำคัญในอุตสาหกรรมน้ำตาล ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตน้ำตาลจากอ้อยเป็นลำดับที่ 6 ของโลก และจัดเป็นประเทศผู้ส่งออกน้ำตาลเป็นอันดับ 4 ของโลก นำเข้าเงินตราต่างประเทศได้ปีละประมาณ 20,000-30,000 ล้านบาท ประเทศไทยมีการขยายพื้นที่ปลูกอ้อยเพิ่มขึ้นทุกปี ในปีการผลิต 2554/55 มีพื้นที่ปลูกอ้อยจำนวน 8,998 ล้านไร่ โดยมีพื้นที่ปลูกอ้อยเพิ่มขึ้นจากการผลิต 2553/54 จำนวน 5.37 ล้านไร่ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2555) เนื่องจากมีปัจจัยสนับสนุนด้านราคาอ้อยที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มผลผลิตอ้อยต่อพื้นที่โดยไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอ้อยถือเป็นปัจจัยที่ควรให้ความสนใจ ปัจจุบันพบว่าพื้นที่ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการปลูกอ้อยมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ เนื่องจากการขาดการบำรุงดินที่เหมาะสม ทำให้ดินขาดธาตุอาหารหลักที่จำเป็น การปรับปรุงคุณภาพของพืชและดินโดยการเติมปุ๋ยเป็นวิธีการที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักของพืชที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่ดินที่ใช้ปลูกอ้อยส่วนใหญ่มีกขาดธาตุไนโตรเจนเพราะธรรมชาติของธาตุไนโตรเจนจะอยู่ในดินได้ไม่นานนัก ปัจจุบันการเสริมธาตุอาหารให้แก่ดินและพืช เกษตรกรจะใช้ปุ๋ยเคมีเป็นส่วนใหญ่ซึ่งมีการนำเข้าจากต่างประเทศ ปี 2554 ประเทศไทยมีการนำเข้าปุ๋ยเคมีจากต่างประเทศ จำนวน 6,149,228 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 71,800 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ในบรรดาปุ๋ยเคมีที่นำเข้าเป็นปุ๋ยไนโตรเจนประมาณร้อยละ 40 อย่างไรก็ตามการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนปริมาณมากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและทรัพยากรดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารไนเตรทที่มีมากเกินไปทำให้ดินเสื่อมโทรม เกิดสารพิษตกค้างและส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตระยะสร้างดินและใบมากเกินไป ทำให้เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากให้ผลต่อพืชไปในทางบวกมากกว่าทางลบ ทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อ

ปุ๋ยเคมี การพัฒนาปุ๋ยไนโตรเจนโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศมาใช้ประโยชน์จึงนับว่ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจและน่าสนใจอย่างยิ่ง

Azotobacter vinelandii เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาพที่มีอากาศและสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนในอากาศให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ มีรายงานว่าการคลุกผสม *Azotobacter* กับเมล็ดพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวเจ้า มะเขือเทศ กะหล่ำปลี และพืชอื่น ๆ ช่วยให้พืชมีผลผลิตเพิ่มขึ้น นอกจากนี้เชื่อกันว่ายังส่งเสริมการงอกของเมล็ดและความแข็งแรงของพืชในระยะแรก ๆ ได้ *Azotobacter* สามารถสร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าซิสต์ โดยจะสร้างเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต ซิสต์จะมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายใน และภายในซิสต์จะมีการสะสม poly-β-hydroxy butyric acid (PHB) เมื่อสภาวะเหมาะสมซิสต์ก็จะเจริญเป็นเซลล์ปกติต่อไป โดยปกติแล้วซิสต์จะทนทานต่อสารเคมีและสภาพแวดล้อมมากกว่าเซลล์ปกติ ได้แก่ ความแห้งแล้ง รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา และทนความร้อนได้เล็กน้อย ซิสต์จะทนอยู่ในสภาพแห้งแล้งได้นาน 2 สัปดาห์ โดยไม่ตาย แต่ถ้าเป็นเซลล์ปกติจะตายเกือบหมด จากคุณสมบัติข้างต้นจึงมีความน่าสนใจในการนำเชื้อ *Azotobacter* มาผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตอ้อย

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพจากกากน้ำตาลโดยใช้ *A. vinelandii* TISTR 1094 เป็นหัวเชื้อในการผลิต โดยศึกษาสภาวะและความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับฟลask และระดับถังหมัก และศึกษาการสร้างซิสต์ของเชื้อมากกว่าที่สภาวะต่างๆ ตลอดจนพัฒนารูปแบบในการผลิตปุ๋ยชีวภาพที่เหมาะสมต่อการใช้งานและการปรับปรุงคุณภาพของพืชและดิน โดยนำกากน้ำตาล (molasses) และกากหมักกรอง (Filter Cake) ซึ่งเป็นของเหลือใช้ (by-products) จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อขยายผลไปสู่การนำไปใช้ในภาคเกษตรกรรมหรืออุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปุ๋ยชีวภาพจากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาสก์และระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 50 ลิตร
2. เพื่อศึกษาการสร้างชีสต์ของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาสก์และระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร
3. เพื่อพัฒนารูปแบบปุ๋ยชีวภาพจากเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่เหมาะสมและสะดวกต่อการนำไปใช้
4. เพื่อศึกษาผลของปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ต่อการเจริญเติบโตของอ้อย

การตรวจเอกสาร

1. ปุ๋ยชีวภาพ

1.1 ความหมายของปุ๋ยและปุ๋ยชีวภาพ

ปุ๋ย (fertilizers) หมายความว่า สารอินทรีย์ อินทรีย์สังเคราะห์ อนินทรีย์ หรือจุลินทรีย์ ไม่ว่าจะเกิดขึ้นโดยธรรมชาติหรือทำขึ้นก็ตาม สำหรับใช้เป็นธาตุอาหารพืชได้ไม่ว่าโดยวิธีใด หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี กายภาพ หรือชีวภาพในดินเพื่อบำรุงความเติบโตให้แก่พืช (พระราชบัญญัติปุ๋ย, 2550)

ปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) หมายความว่า ปุ๋ยที่ได้จากการนำจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่สามารถสร้างธาตุอาหาร หรือช่วยให้ธาตุอาหารเป็นประโยชน์กับพืช มาใช้ในการปรับปรุงบำรุงดินทางชีวภาพ ทางกายภาพ หรือทางชีวเคมี และให้หมายรวมถึงหัวเชื้อจุลินทรีย์ (พระราชบัญญัติปุ๋ย, 2550)

1.2 การแบ่งประเภทของปุ๋ยชีวภาพ (ธงชัย, 2550; ราเชนทร์ และ ศิริธรรม, 2551)

การแบ่งประเภทของปุ๋ยชีวภาพนั้นสามารถแบ่งตามกลุ่มของจุลินทรีย์ได้ 3 กลุ่ม คือ

1.2.1 จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixing microorganism) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนจากอากาศไปเป็นแอมโมเนีย โดยแอมโมเนียที่ได้นี้ทั้งจุลินทรีย์และพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1.2.1.1 จุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนได้แบบพึ่งพาอาศัยกันและกัน เรียกจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ว่า symbiotic nitrogen fixing microorganisms ได้แก่ *Rhizobium* sp. ในพืชตระกูลถั่ว (leguminous plant), *Frankia* sp. ในพืชที่ไม่ใช่ถั่ว (non-leguminous plant), *Azotobacter paspali* ในหญ้า *Paspalum* ssp., *Klebsiella* sp. ในข้าวและพืชตระกูลหญ้า (rice and Gramineae), *Nostoc* sp. ในพืชพวก Cycad หรือ liverwort

1.2.1.2 จุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนได้อย่างอิสระ เรียกพวกนี้ว่า non-symbiotic nitrogen fixing microorganisms ได้แก่

- แบคทีเรีย เช่น *Clostridium* sp., *Azotobacter* sp., *Azomonas* sp., *Azospirillum* sp. เป็นต้น ส่วนใหญ่แล้วพืชที่ได้รับประโยชน์จะเป็นพืชตระกูลหญ้า เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าว อ้อย และหญ้าอื่นๆ
- สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae; cyanobacteria) เช่น *Tolypothrix*, *Calotrix*, *Nostoc*, *Cylindrospermum* เป็นต้น

1.2.2 จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolytic microorganisms; cellulolytic decomposers) ได้แก่ จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสหรือเศษพืช ประกอบไปด้วย แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีต เช่น *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Tricoderma*, *Thermoactinomyces* เป็นต้น จุลินทรีย์พวกนี้พบได้ทั่วไปในระหว่างการสลายตัวของเศษพืช กิ่งไม้ เศษหญ้าต่างๆ ก่อให้เกิดปุ๋ยอินทรีย์ชนิดต่างๆ ขึ้นมาได้ เช่น ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก และปุ๋ยพืชสด เป็นต้น

1.2.3 จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตและธาตุอาหารพืชธาตุอื่นๆ (phosphate and other nutrient elements solubilizing microorganisms) จุลินทรีย์พวกนี้สามารถทำให้ธาตุอาหารพืชหลายชนิด เช่น ฟอสฟอรัส เหล็ก สังกะสี ทองแดง และแมงกานีส ในรูปที่โดยทั่วไปแล้วไม่ละลายให้ละลายออกมา รวมทั้งจุลินทรีย์ที่สามารถส่งเสริมให้พืชดูดกินธาตุอาหารซึ่งโดยปกติแล้วรากพืชไม่สามารถดูดกินได้ จุลินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ *Bacillus*, *Aspergillus*, *Thiobacillus* และเชื้อราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza fungi) เป็นต้น

1.3 บทบาทของปุ๋ยชีวภาพทางการเกษตร

ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับปุ๋ยชีวภาพเป็นจำนวนมาก และให้ผลการตอบสนองต่อพืชออกไปทางบวกมากกว่าทางลบ ความสนใจที่จะนำไปใช้ประโยชน์จึงมีมากขึ้นเป็นลำดับ สาเหตุสำคัญที่ปุ๋ยชีวภาพเข้ามามีบทบาททางการเกษตรมากขึ้นทั่วโลกมีดังนี้

1.3.1 ปุ๋ยเคมีมีราคาแพงและมีแนวโน้มแพงขึ้นเรื่อยๆ ทำให้ต้นทุนในการผลิตพืชสูงขึ้นมาก แต่ผลผลิตของพืชกลับมีราคาไม่แน่นอน

1.3.2 การขาดแคลนปุ๋ยเคมีในประเทศที่กำลังพัฒนา ปริมาณความต้องการปุ๋ยมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี จากการคาดการณ์ปริมาณความต้องการปุ๋ยในโตรเจนของโลกเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 2.6 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งถึงปี 2012 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008) ปริมาณปุ๋ยในโตรเจนที่โลกต้องการเพื่อผลิตพืชนั้นเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ แต่ในปัจจุบันมีการผลิตปุ๋ยในโตรเจนทางเคมีได้ประมาณปีละ 40 ล้านตัน ซึ่งยังไม่เพียงพอต่อความต้องการตลอดจนในประเทศที่กำลังพัฒนาที่ไม่มีกำลังเงินที่จะจัดซื้อได้อย่างเพียงพอกับความต้องการ จึงเป็นสาเหตุให้ความสำคัญของปุ๋ยชีวภาพโดดเด่นขึ้นมาเป็นลำดับ

ตารางที่ 1 ปริมาณความต้องการปุ๋ยของโลกระหว่างปี 2008-2012 (ล้านตัน)

	2008	2009	2010	2011	2012
Total nitrogen demand	132	136	139	143	146
Total phosphoric acid demand	32	33	35	36	38
Total potash demand	34	35	36	37	38
Total demand	198	204	210	216	222

ที่มา: ดัดแปลงจาก Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008)

1.3.3 กิจกรรมของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพดำเนินไปอย่างรวดเร็ว โดยเกิดขึ้นในดินหรือบริเวณที่ใกล้กับรากพืช ซึ่งพืชมีโอกาสดูดน้ำไปใช้ได้ง่ายและรวดเร็ว

1.3.4 ใช้พลังงานในการทำให้เกิดกระบวนการน้อยกว่าการผลิตปุ๋ยเคมีทางอุตสาหกรรม เช่น การตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมที่อาศัยอยู่ที่ปมรากถั่ว และการผลิตปุ๋ยแอมโมเนียจาก Harber-Bosch Process ขบวนการหลังนี้ต้องใช้พลังงานสูงมาก มีทั้งการใช้ความดันและความร้อนสูง เพื่อที่จะรีดิวส์ไนโตรเจน (N_2) ให้เกิดเป็นแอมโมเนีย (NH_3) ขึ้นมา

1.3.5 เกษตรกรสามารถผลิตปุ๋ยชีวภาพไว้ใช้ได้เองทั้งเกษตรกรรายเล็กและรายใหญ่

1.3.6 การใช้ปุ๋ยชีวภาพบางชนิดเป็นการนำวัสดุเหลือใช้หรือเศษเหลือจากทางอุตสาหกรรมเกษตรกลับมาใช้ได้อีก (recycling) ซึ่งเป็นประโยชน์อีกทางหนึ่งด้วย

1.3.7 ดินบางแห่งมีปัญหา เช่น แน่นทึบ แข็ง เสื่อมโทรม หรือมีมลพิษจากสารเคมีต่างๆ ที่เติมลงดินอย่างขาดหลักการและขาดความระมัดระวัง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องบำบัดโดยใช้ปุ๋ยชีวภาพตามความเหมาะสม

1.4 คุณสมบัติของปุ๋ยชีวภาพ

1.4.1 สามารถผลิตธาตุอาหารและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้

1.4.2 เจริญเติบโตได้รวดเร็วและสามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมาก

1.4.3 ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีและมีความคงทนต่อยาปราบศัตรูพืช

1.4.4 สามารถปลดปล่อยออกซิเจนออกมาในน้ำทำให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อื่นๆ ในดินเติบโตได้ และสลายอินทรีย์วัตถุได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.4.5 ช่วยยึดเหนี่ยวอนุภาคของดิน ทำให้คงทนต่อการชะล้าง การอุ้มน้ำ และการระบายอากาศของดินดีขึ้น ส่งผลให้รากพืชเจริญได้ดี

1.4.6 มีราคาถูกกว่าปุ๋ยเคมี และเกษตรกรสามารถผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณปุ๋ยชีวภาพไว้ใช้เองได้โดยปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกร

2. ปุ๋ยไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับการเจริญเติบโตของพืช สารประกอบที่เป็นประโยชน์แก่พืชส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเกลือไนเตรท เกลือแอมโมเนียม เป็นต้น ปกติไนโตรเจนในดินจะมีการสูญเสียไปจากดินหรือสูญเสียไปจากบริเวณที่พืชจะไปใช้ประโยชน์ได้ตลอดเวลา เช่น โดยการชะล้างการ (leaching) การสูญเสียไปในรูปของก๊าซโดยขบวนการดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) ของแบคทีเรีย การระเหย (volatilization) และพืชดูดไปใช้ การทำเกษตรโดยการปลูกพืช ติดต่อกันโดยไม่มีการบำรุงดิน กระบวนการเหล่านี้ทำให้ปริมาณไนโตรเจนที่จะเป็นประโยชน์แก่พืชลดลงอยู่เรื่อยๆ การเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนในดินมาจากหลายทาง เช่น การใส่ปุ๋ยเคมี การใส่อินทรีย์วัตถุ หรือไนโตรเจนที่มากับน้ำฝนซึ่งจะเพิ่มไนโตรเจน

แก่ดินไม่มากนัก ช่องทางหนึ่งที่จะเพิ่มไนโตรเจนให้แก่ดินได้นั้นคือการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยจุลินทรีย์ (biological fixation)

2.1 การตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยจุลินทรีย์ (วิทยา, 2526; สายพิน, 2547; ธงชัย, 2550)

การตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยจุลินทรีย์นั้น แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.1.1 การตรึงไนโตรเจนพึ่งพาอาศัย (symbiotic nitrogen fixing) ระหว่างสิ่งมีชีวิตสองชนิด หมายถึง การที่สิ่งมีชีวิตอย่างน้อยสองชนิดอยู่ร่วมกันต่างฝ่ายต่างช่วยเหลือหรือให้ประโยชน์ต่อกัน ในกรณีนี้ฝ่ายหนึ่งจะเป็นฝ่ายที่ให้แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน และอีกฝ่ายหนึ่งคือฝ่ายที่มีความสามารถจับหรือตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้เป็นฝ่ายที่ให้สารประกอบไนโตรเจนแก่อีกฝ่ายหนึ่ง

2.1.2 การตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (non-symbiotic nitrogen fixing) เป็นการตรึงไนโตรเจนหรือจับก๊าซไนโตรเจนจากอากาศแล้วเปลี่ยนเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดินหรือน้ำโดยไม่ต้องพึ่งพาสีสิ่งมีชีวิตอื่น จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการไนโตรเจนแบบอิสระที่ตรึงได้ในปริมาณมากจำแนกเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

2.1.2.1 เฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย (Heterotrophic bacteria) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้แก่ *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus polymyxa*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter* และ *Spirillum lipoferum* (*Azospirillum*)

2.1.2.2 คีโมออโตโทรฟิกแบคทีเรีย (Chemoautotrophic bacteria) จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีเพียงสปีชีส์เดียว คือ *Methanobacillus omelianskii* (ใช้มีเทนเป็นแหล่งพลังงาน)

2.1.2.3 ไซยาโนแบคทีเรีย กลุ่มนี้ได้แก่ *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aulosira*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Tolypothrix*, *Schizothrix*, *Plectonema*, *Gloeotrichia*

2.1.2.4 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ได้แก่ *Chlorobium*, *Chromatium*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*

นอกจากจุลินทรีย์ดังกล่าวแล้ว ยังมีผู้เสนอจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้แต่ปริมาณการตรึงน้อยมากและบางครั้งยังไม่มี การทดลองที่สนับสนุนข้อเสนอจุลินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ *Desulfovibrio*, *Spirillum* แอคติโนมัยซิสท์บางสายพันธุ์ ได้แก่ *Nocardia* พวกฟังไจบางชนิด เช่น *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *phoma* และยีสต์บางชนิด

ในกลุ่มของเฮเทอโรโทรฟิกแบคทีเรีย นั้น *Azotobacter* ดูเหมือนจะมีความสำคัญมากที่สุด เพราะมีขนาดเซลล์โต มีอยู่ในดินเป็นจำนวนมาก และที่สำคัญที่สุดคือตรึงไนโตรเจนได้ในอัตราที่ค่อนข้างสูง

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ

การตรึงไนโตรเจนแบบอิสระของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องก็คือปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) โดยปัจจัยสำคัญๆ ได้แก่

2.2.1 ปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนที่มีในดิน โดยเฉพาะปริมาณแอมโมเนียและเกลือไนเตรทสำคัญมาก เพราะเมื่อมีสารประกอบเหล่านี้ซึ่งอยู่ในรูปที่พร้อมจะใช้ได้อยู่ในดิน จุลินทรีย์จะใช้สารพวกนี้ก่อน การตรึงไนโตรเจนจึงจะจก และเหตุผลหนึ่งคือแอมโมเนียจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

2.2.2 ปริมาณของธาตุอาหารอื่นที่จำเป็นต่อการตรึงไนโตรเจน โดยเฉพาะจำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ได้แก่

2.2.2.1 ปริมาณ โมลิบดีนัม มีความสำคัญที่สุดเพราะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่รีดิวซ์สารประกอบไนโตรเจน เช่น ถดออกซิเจนจากสารประกอบไนโตรเจนหรือเติมไฮโดรเจนให้กับโมเลกุลของก๊าซไนโตรเจน

2.2.2.2 ปริมาณแคลเซียม แคลเซียมเป็นสารที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

2.2.2.3 ปริมาณของเหล็ก เหล็กเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเอนไซม์และมีหน้าที่สำคัญในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในขบวนการตรึงไนโตรเจนหรือไนโตรเจนรีดักชัน

2.2.2.4 ปริมาณของฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสมีผลโดยเป็นส่วนประกอบของสารพลังงานสูง ได้แก่ ATP ซึ่งเป็นตัวกลางในการเก็บและถ่ายทอดพลังงานในเซลล์ ซึ่งการตรึงไนโตรเจนต้องใช้พลังงานในรูปแบบนี้ด้วย

ธาตุอาหารเหล่านี้ต้องมีอยู่ในดินปริมาณมากพอสำหรับการใช้ในกิจกรรม แต่ไม่ต้องมากเกินไปจนเป็นพิษต่อจุลินทรีย์

2.2.3 ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจน แอมโมเนีย ออกซิเจน ไซยาไนต์ ไนตรัสออกไซด์ เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถถูกรีดิวซ์ได้ด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส ถ้ามีสารเหล่านี้อยู่จะเป็นการลดประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย

2.3 กลวิธีการตรึงไนโตรเจน (สายพิณ, 2547; หนึ่ง, 2554)

การตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) จากการศึกษาสารสกัดจากจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เช่น *Azotobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella* หรือไซยาโนแบคทีเรีย สามารถแยกสารอินทรีย์ที่สมบัติคล้ายเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้ และเมื่อแยกให้บริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์ไนโตรจีเนสนั้นมีคุณสมบัติใกล้เคียงกันมากในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วย

1) ตัวให้อิเล็กตรอน (electron doner) แตกต่างกันไปตามสภาพของจุลินทรีย์เหล่านั้น ส่วนใหญ่พบว่าเป็นสารประกอบอินทรีย์ในขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ที่พบมากที่สุดคือ NADPH และ NADP รวมหมายถึงสารอินทรีย์ที่สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับ NADP หรือ NAD^+ นี้ ซึ่งสารเหล่านี้มักจะร่วมอยู่ในการส่งผ่านอิเล็กตรอนของขบวนการหายใจของเซลล์ เช่น ไพรูเวท, ฟอर्मेट, กลูโคส-6-ฟอสเฟต เป็นต้น

2) ตัวส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron carrier) ส่วนใหญ่ที่พบในจุลินทรีย์ต่างๆ คือ พวก non-heme iron protein (NHIP) และสารประกอบพวกฟลาโวโปรตีน (flavoprotein)

3) ตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ได้แก่ ก๊าซไนโตรเจน (N_2), ก๊าซไฮโดรเจน (H_2), ไนตรัสออกไซด์ (N_2O), ไอโซไซยาไนด์ (HCN), อะเซทิลีน (C_2H_2) และอะไซด์ (N_3^-)

4) ATP แหล่งพลังงานสำหรับขบวนการ

5) Divalent metal ion เช่น Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++} , Fe^{++} , Ni^{++} สารเหล่านี้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

สรุปปฏิกิริยารวมสำหรับการตรึงไนโตรเจน



แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกรวมกับกรดแอลฟาคีโตกลูตาริก (α -ketoglutaric acid) โดยขบวนการทรานอะมิเนชัน (transamination) กลายเป็นกรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) แล้วเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนตัวอื่นต่อไป

3. *Azotobacter vinelandii*

3.1 ลักษณะทั่วไปของ *Azotobacter*

Azotobacter เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างเซลล์แบบกลมรี สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ จัดอยู่ในวงศ์ Azotobacteraceae แบคทีเรียในวงศ์นี้มีอยู่ 2 สกุล คือ *Azotobacter* และ *Azomonas* โดยทั่วไป *Azotobacter* จะมีเซลล์เป็นรูปไข่ขนาดใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 ถึง 2.0 ไมโครเมตร หรือใหญ่กว่า รูปร่างสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่เป็นแท่งถึงกลมรีขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและอายุเซลล์ อยู่กันเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม บางครั้งอาจพบว่ามีเกาะกันเป็นเส้นยาวแตกต่างกันออกไป ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) แต่สร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าซิสต์ (cyst) ติดสีแกรมลบ *Azotobacter* บางชนิดเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา (flagella) บางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้ ต้องการออกซิเจนในการเติบโต จัดเป็นพวกเคโมออตาโนโทรฟ

(chemoorganothrope) ใช้น้ำตาล แอลกอฮอล์ และเกลือของกรดอินทรีย์ในการเจริญเติบโตได้ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยทั่วไปตรึงไนโตรเจนได้น้อย 10 มิลลิกรัมของไนโตรเจนต่อกรัมของกลูโคส ต้องการโมลิบดีนัมในการตรึงไนโตรเจน แต่อาจใช้วานาเดียมแทนที่บางส่วนได้ด้วย ไม่ย่อยโปรตีน สามารถใช้ในเตรด แอมโมเนีย และกรดอะมิโนบางชนิดเป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ พืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่มีเกลืออยู่ด้วยอยู่ในช่วง 4.8 ถึง 8.5 แต่พืชที่เหมาะสมสำหรับการตรึงไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 7.0 ถึง 7.5 พบในดินและน้ำ และมีอยู่ชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ที่รากของพืช แบคทีเรียในสกุล *Azotobacter* แบ่งออกได้ 6 ชนิด คือ *A. beijerinckii*, *A. chroococcum*, *A. paspali*, *A. vinelandii*, *A. nigricans* และ *A. armeniacus* (กรมวิชาการเกษตร, 2545; สายพิน, 2547; ชงชัย, 2550)



ภาพที่ 1 *Azotobacter vinelandii*

ที่มา: Surhone *et al.* (2011)

A. vinelandii ตั้งชื่อตาม Vineland ในมลรัฐ New Jersey ประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นสถานที่ที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ของ เชื้อชนิดนี้ได้เป็นครั้งแรก โดยเซลล์อายุ 1-2 วัน เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแอสโตรบเซลล์ซึ่งมีความยาวคลื่น 2.4-2.9 ไมโครเมตร โคโลนีไม่เป็นเมือก แต่การเปลี่ยนแปลง อาจเกิดขึ้นได้เมื่อเซลล์ผลิตโพลีแซคคาไรด์และขับออกมามาก สร้างรงควัตถุสีเขียวเหลืองแสง ละลายน้ำได้ มีแอสโตรบเซลล์ พบทั่วไปในดินและน้ำ ใช้แอมโมเนียและไนเตรดเป็นแหล่งของไนโตรเจน แต่ไม่ยับยั้งการตรึงไนโตรเจน ไม่ไฮโดรไลสแบ่ง จำนวน quinine+cytosine ของ DNA อยู่ระหว่าง 64.9-66.5 เปอร์เซ็นต์ (ชงชัย, 2550)

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. vinelandii* สามารถกระตุ้นได้โดยใช้ L-rhamnose, ethylene glycol, erythritol หรือ D-arabitol เป็นแหล่งคาร์บอน หรืออาจใช้ไซโตเคียมเบนโซเอต 1 เปอร์เซ็นต์ หรือฟีนอล 1 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการเติบโต species อื่นๆ ของ *Azotobacter* ก็ได้ (ธงชัย, 2550)

3.2 การสร้างซิสต์ของ *Azotobacter*

Azotobacter จะสร้างซิสต์เมื่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต แต่ละซิสต์จะมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายใน มีผนัง 2 ชั้น ภายในซิสต์จะมีการสะสม poly-β-hydroxy butyric acid (PHB) เมื่อสภาวะเหมาะสมซิสต์ก็จะเจริญเป็นเซลล์ปกติต่อไป

การเจริญเติบโตในระยะแรกของ stationary phase เชื้อ *A. vinelandii* อาจจะมีการสร้างซิสต์เป็นจำนวนมาก ในซิสต์ๆ หนึ่งมีเซลล์อยู่ภายใน 1 เซลล์ มีเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ และเปลือกซิสต์ (cyst coat) ที่หนาล้อมรอบอยู่และทำหน้าที่ป้องกันโครงสร้างภายในได้ เปลือกซิสต์มี 2 ชั้น คือ เอ็กซ์ทิน (extine) เป็นโครงสร้างซึ่งมีลามลลา (lamella) หลายชั้นซ้อนกันอยู่ เป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเปลือกซิสต์ ประกอบด้วยองค์ประกอบที่ซับซ้อนของ lipoprotein-lipopolysaccharide-lipid ซึ่งมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ด้วย และอินทิน (intine) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ถัดจาก เอ็กซ์ทินเข้าไป มีอยู่ด้วยกัน 2 ชั้น และแยกจากกันโดยมีเยื่อชั้นอยู่ในอินทินนี้จะมีคาร์โบไฮเดรต และไลโปลิสเอร์มากกว่าในเอ็กซ์ทิน มีโปรตีนน้อยกว่าและมีแคลเซียมมากกว่าในเอ็กซ์ทิน (ธงชัย, 2550)

ในระยะก่อนการสร้างซิสต์เพียงเล็กน้อย เซลล์จะสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนไหว ขนาดของเซลล์จะเล็กลงและเปลี่ยนจากรูปแท่งไปเป็นรูปไข่ (coccoid precyst) การสร้างซิสต์ มีความเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับการสังเคราะห์และการสะสม PHB ในเซลล์ของ *Azotobacter* ถ้าไม่มีการสะสม PHB แล้วจะสร้างซิสต์จำนวนน้อย กรณีนี้จะเกิดขึ้นเมื่อเติมเกลือแอมโมเนียมลงไปในขณะที่มีการเลี้ยง *Azotobacter* เมื่อการสร้างซิสต์ของ *Azotobacter* เริ่มขึ้น จะมีการสะสม PHB มากมาย ในระยะ exponential growth ถึงระยะ stationary phase ซึ่งจะพบว่ามีการสะสม PHB ในปริมาณสูงสุด สารที่ได้จากการสลายตัวของ PHB นั้นถูกนำไปใช้ในการสร้างเปลือกซิสต์ ซึ่งต้องการ Ca^{2+} มาก ดังนั้นในการเลี้ยง *Azotobacter* จึงมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตด้วย เพราะนอกจากจะช่วยรักษาระดับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.5 แล้ว ยังเป็นการให้ Ca^{2+} แก่เชื้อจุลินทรีย์ด้วย อย่างไรก็ตามยังพบว่ามี PHB ในเซลล์จุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตเต็มที่ด้วยเช่นกัน

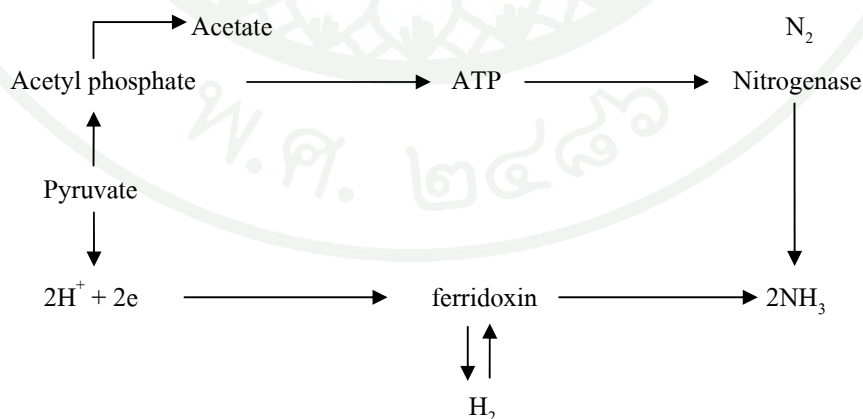
โดยปกติแล้วชีสจะทนทานต่อ desiccation, sonic treatment, รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา และทนความร้อนได้เล็กน้อย ชีสจะทนอยู่ในสภาพ desiccation ได้นาน 2 สัปดาห์ โดยไม่ตาย แต่ถ้าเป็นเซลล์ปกติจะตายเกือบหมด โดยมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่รอดได้เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

3.3 การตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter*

ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้



การรีดิวส์ N_2 ไปเป็น 2NH_3 นี้ ต้องการอิเล็กตรอน 6 ตัว การรีดิวส์ N_2 จำนวน 1 โมล ไปเป็นแอมโมเนีย 2 โมล ต้องใช้ ATP 12 โมล อิเล็กตรอนที่ใช้ในปฏิกิริยาได้จากสารประกอบคาร์บอนต่างๆ เช่น สารประกอบไพรูเวตจะให้อิเล็กตรอนและ ATP ด้วย อิเล็กตรอนเหล่านี้จะผ่านไปยังเฟอร์ริดอกซิน (ferridoxin) ซึ่งเป็น iron-sulfur protein ที่ทำหน้าที่พาอิเล็กตรอนไปด้วย ทำให้ปฏิกิริยา oxidation และ reduction เกิดต่อไปได้ ฟลาโวกดอกซิน (flavodoxin) เป็นตัวพาอิเล็กตรอนในแบบที่เรียบางชนิดที่ตรึงไนโตรเจนได้ จากนั้นอิเล็กตรอนก็ผ่านไปยังเอนไซม์ไนโตรจีเนส และรีดิวส์ไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียต่อไป ซึ่งเขียนเป็นไดอะแกรมได้ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียของแบคทีเรีย

ที่มา: ธงชัย (2550)

Azotobacter เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน การสร้าง ATP ก็ต้องการออกซิเจนด้วย แต่การตรึงไนโตรเจนเป็นขบวนการที่ไม่ต้องการออกซิเจน ออกซิเจนที่มีอยู่จะต้องถูกกันออกไปจากบริเวณที่มีการตรึงไนโตรเจน กรรมวิธีในการป้องกันออกซิเจนในกระบวนการนี้ ได้แก่

- 1) การมีเยื่อล้อมรอบเอนไซม์ในโตรจีเนสเพื่อป้องกันออกซิเจน
- 2) การป้องกันในโตรจีเนสโดยการจัดเรียงตัวกันใหม่ของโครงสร้างทางฟิสิกส์ของในโตรจีเนส เพื่อที่จะทนทานต่อออกซิเจนได้
- 3) การมีสารเมือก (slime) รอบเซลล์ซึ่งทำให้ออกซิเจนแทรกซึมสู่ภายในน้อยที่สุด
- 4) การหายใจที่เพิ่มขึ้นของเชื้อ จะช่วยกันออกซิเจนออกจากในโตรจีเนสได้

3.4 ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter*

Azotobacter สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพอิสระโดยเฉลี่ยประมาณ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนจากก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศต่อการใช้คาร์โบไฮเดรต 1 กรัม (Burgey's Manual, 1984) เศรษฐา และคณะ (2529) รายงานว่า *Azotobacter* ที่คัดเลือกจากบริเวณรากอ้อยสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 480-1210 nmole C_2H_4 /mg protein/วัน อัตราการตรึงไนโตรเจนมีมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และจากรายงานของบรรหาญ และคณะ (2536) พบว่า เชื้อ *Azotobacter* ที่แยกได้บริเวณรากข้าวโพดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ 0.015-79.464 μ mole C_2H_4 / 10^9 cell /วัน

3.5 สภาพที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *Azotobacter*

3.5.1 ความเป็นกรดด่าง

สภาพความเป็นกรดด่างของดินที่ *Azotobacter* เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.9-9.0 แต่การตรึงไนโตรเจนจะเกิดได้ในสภาพดินเป็นกลาง คือ pH 5.5-7.2 (Mishustin and Shil' Nikova, 1971) ดินที่มีสภาพเป็นกรดยับยั้งการเพิ่มจำนวนและกิจกรรมตรึงไนโตรเจน

3.5.2 ออกซิเจน

Azotobacter ต้องการออกซิเจนในการหายใจ แต่ระดับออกซิเจนมีผลกระทบต่อ การตรึงไนโตรเจน ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นเมื่อออกซิเจนลดลง และจะ หยุดชะงักเมื่อมีออกซิเจนสูง ทั้งนี้เพราะก๊าซออกซิเจนไปจะยังยั้งการตรึงไนโตรเจน โดยก๊าซ ออกซิเจนและไนโตรเจนจะแย่งที่ในการจับกับ terminal hydrogen acceptor ของเชื้อ ซึ่งโดยปกติ แล้วออกซิเจนจะมีความสามารถในการจับได้ดีกว่า (Postage, 1978)

การสร้างเมือก (slime) ซึ่งเป็นสารประกอบ polysaccharide ล้อมรอบเซลล์หรือ โคลิโนจะทำให้ให้ออกซิเจนผ่านเข้าได้น้อยจนไม่รบกวนกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ทั้งทำให้ ออกซิเจนเหมาะสมกับกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Dobereiner, 1977)

3.5.3 สารประกอบไนโตรเจน

Azotobacter ใช้ไนโตรเจนได้ทั้งรูปก๊าซและสารประกอบไนโตรเจน ใน สภาพแวดล้อมที่มีสารประกอบไนโตรเจนกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนจะมีอัตราต่ำ สารประกอบ ไนโตรเจนทั้งรูปไนเตรตและแอมโมเนียมมีผลกระทบต่อเอนไซม์ไนโตรจีเนส ทั้งนี้เนื่องจากการ แบ่งพลังงานระหว่างเอนไซม์ไนโตรจีเนสและการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นกรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม ตามสารประกอบไนโตรเจนในบางครั้งก็มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจน ของ *Azotobacter* เช่น เมื่อใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ปริมาณของ *Azotobacter* จะเพิ่มมากขึ้น และเมื่อ สารประกอบไนโตรเจนลดลง กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนก็จะพัฒนาขึ้น ทำให้อัตราการตรึง ไนโตรเจนในระยะนี้สูงมาก

3.5.4 อินทรีย์วัตถุ

การเพิ่มอินทรีย์วัตถุเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนจึงทำให้ *Azotobacter* ตรึง ไนโตรเจนมากขึ้น การใส่อินทรีย์วัตถุเป็นการทำให้ C/N ratio สูงขึ้น ทำให้สภาพแวดล้อม เหมาะสมกับการตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter*

3.5.5 อนินทรีย์วัตถุ

อนินทรีย์วัตถุในดิน เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน เหล็ก และ โมลิบดีนัม จำเป็นต่อกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter* โดยเฉพาะเหล็กและโมลิบดีนัมซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

3.5.6 ความชื้น

ความชื้นที่เหมาะสมกับเชื้อ *Azotobacter* คือ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน เพราะทำให้เชื้อสามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนได้อย่างขึ้น (Ard-El-Malek, 1971) Zhang *et al.* (2004) ศึกษาผลของความชื้นต่อการเจริญเติบโตของ *A. vinelandii* ในการเลี้ยงแบบ solid state ที่ความชื้น 50, 67 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความชื้น 67 เปอร์เซ็นต์ *A. vinelandii* มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 4.2×10^{10} CFU/g of dry rot

3.5.7 อุณหภูมิ

เชื้อบางสายพันธุ์เจริญได้มากที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส ปกติจะเพิ่มจำนวนได้มากที่อุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส และจะลดจำนวนลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อส่วนใหญ่อยู่ที่ 14 องศาเซลเซียส แต่บางสายพันธุ์ *A. nigricans* และ *A. beijerinckii* สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เมื่ออุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่ *A. armeniacus* สายพันธุ์หนึ่งที่เจริญเติบโตได้คือ 28 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Azotobacter* ทั่วไปประมาณ 32 องศาเซลเซียส ยกเว้น *A. vinelandii*, *A. paspali* และบางสายพันธุ์ของ *A. chroococcum* ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อทุกชนิดทนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 นาที และจะตายเมื่ออุณหภูมิสูง 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Toha *et al.*, 1969)

3.6 ความสัมพันธ์ระหว่าง *Azotobacter* กับพืช

โดยทั่วไป *Azotobacter* เจริญอยู่บริเวณรากของพืช โดยรากพืชขับสารอินทรีย์ออกไปสู่ดินบริเวณรอบๆ รากพืช ทำให้ *Azotobacter* ได้รับสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจน พืชต่างชนิดก็มีผลในการตรึงไนโตรเจนของ *Azotobacter* บริเวณรากพืชต่างกัน Doberliner *et al.* (1972) รายงานว่า *Azotobacter paspali* ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณรากของหญ้า Paspalum สามารถตรึงไนโตรเจนได้ 15-93 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ต่อปี ซึ่งปริมาณไนโตรเจนที่เชื้อตรึงได้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของหญ้าตลอดฤดูกาลเก็บเกี่ยวแม้ไม่มีการใส่ปุ๋ยเลย

ในประเทศอินเดียมีการทดลองในแปลงพืชโดยมีการปลูกกล้าเชื้อ *Azotobacter chroococcum* กับพืชต่าง ๆ เช่น ข้าวสาลี ข้าวเจ้า มะเขือเทศ กะหล่ำปลี และพืชอื่น ๆ ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นของพืชจะผันแปรไปตั้งแต่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยไปจนถึงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้การใช้เชื้อ *Azotobacter* ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในประเทศอินเดีย เพราะสามารถใช้ได้กับพืชต่าง ๆ ที่ไม่ใช่ถั่ว รวมทั้งเชื้อนี้สามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดและความแข็งแรงของพืชในระยะแรก ๆ ได้ เนื่องจากการผลิตสารที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตนั่นเอง (Shende *et al.*, 1977)

จากรายงานของ Brown and Burlingham (1968) พบว่าเชื้อ *Azotobacter* สร้างสารช่วยในการเจริญเติบโตของพืชโดยผลิตฮอร์โมนให้แก่พืช เช่น Gibberellin (GA) และ Indolyl-3-acetic acid (IAA) นอกจากนี้พบว่าใช้เชื้อ *Azotobacter* ร่วมกับ *Mycorrhiza* ทำให้ผักกาดหอมให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น

Singh (2006) รายงานว่าการเติมเชื้อ *Azotobacter* ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง นอกจากนี้การเพิ่มเชื้อ *Azotobacter* ในธัญพืชดังกล่าวช่วยลดปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ต้องเติมให้แก่พืชอีกด้วย

Jan *et al.* (2009) ศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพจาก *Azotobacter* ร่วมกับ *Mycorrhizae* และการใช้ปุ๋ยรียต่อการเจริญของถั่วฟาบ่า (Faba beans) พบว่าพืชที่ได้รับปุ๋ยชีวภาพมีปริมาณคลอโรฟิลล์และคาร์โรทีนสูงกว่าพืชที่ได้รับปุ๋ยรีย ทั้งนี้พืชที่ได้รับปุ๋ยชีวภาพยังมีปริมาณไนเตรทและกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเตส (nitrate reductase activity) สูงกว่าชุดควบคุม ในขณะที่พืช

กลุ่มที่ได้รับปุ๋ยยูเรียมีปริมาณโพสทินมากกว่ากลุ่มที่ได้รับปุ๋ยชีวภาพ นอกจากนี้พบว่าในพืชกลุ่มที่ได้รับปุ๋ยชีวภาพมีปริมาณโพสทินสูงกว่าพืชที่ได้รับปุ๋ยยูเรีย

Khan *et al.* (2010) ศึกษาผลของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของ *Brassica Juncea* ซึ่งเป็นพืชน้ำมันของอินเดีย โดยการแช่เมล็ดพืชในน้ำที่มีการเติมเชื้อ *Azotobacter* และ *Azospirillum* จากนั้นวิเคราะห์ความสูงของพืช น้ำหนักลำต้น น้ำหนักราก และผลได้ของเมล็ดพืช พบว่าการแช่เมล็ดพืชในน้ำจุลินทรีย์ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลได้ของพืชสูงขึ้น ทั้งนี้การใช้เชื้อร่วมกัน 2 ชนิด ช่วยให้พืชเจริญเติบโตและให้ผลได้ สูงกว่าการใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวและการสูงกว่าในชุดควบคุมที่ไม่มีการแช่เมล็ดพืชในน้ำจุลินทรีย์ตามลำดับ

Gosal *et al.* (2012) ศึกษาผลของการใช้เชื้อ *Azotobacter* ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตอ้อยในอินเดีย โดยการนำเชื้อ *Azotobacter chroococcum* คลุกผสมกับผงถ่าน (activated charcoal) เพื่อให้อยู่ในรูปของปุ๋ยชีวภาพสำหรับการใช้งาน และนำไปใช้ร่วมกับการปลูกอ้อยที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนสองระดับ คือ 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอ้อยที่ปลูกโดยมีเชื้อ *Azotobacter* ช่วยเพิ่มปริมาณผลได้ของอ้อย นั่นคือ ค่า Commercial Cane Sugar per cent (CCS%) ของอ้อยในแปลงทดลองสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อดังกล่าว

Aly *et al.* (2012) ผลของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* และ *Streptomyces* sp. ต่อการออกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นข้าวสาลี พบว่าการคลุกผสมเมล็ดพืชกับเชื้อ *A. vinelandii* (AZ) หรือเชื้อ *Streptomyces* sp. (SP) หรือเชื้อผสมสองชนิด (AZ+ SP) ส่งผลให้การงอกของเมล็ดข้าวสาลีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การเติมเชื้อ AZ หรือ SP หรือ AZ+ SP ลงในดินช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลี โดยพบว่าความยาวราก ความยาวลำต้น น้ำหนักแห้งของราก และลำต้นของพืชที่ได้รับเชื้อข้างต้นสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในประเทศไทยได้ทำการทดลองใช้เชื้อ *Azotobacter* ร่วมกับการปลูกข้าวโพด พบว่าช่วยให้ข้าวโพดเจริญเติบโตได้ดีกว่าไม่ใช้เชื้อ (บรรหาญ และคณะ, 2527) และจากการทดลองใช้เชื้อร่วมกับการปลูกข้าวฟ่างและข้าวพบว่าช่วยเพิ่มผลผลิตของข้าวฟ่างและข้าว (บรรหาญ และสมปอง, 2536) จากรายงาน พบว่า การใช้เชื้อ *Azotobacter* จะสามารถทำให้ข้าวโพดมีผลผลิตสูงเทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต 5-10 กิโลกรัม-ไนโตรเจน/ไร่ (ธงชัย และคณะ, 2534) และจากศึกษายังพบอีกว่า การคลุกเชื้อโดยวิธีการคลุกเมล็ดจะให้ผลดีกว่าโดยสามารถทำให้ข้าวโพดหวานมีน้ำหนักแห้งของต้น ผลผลิต ความเข้มข้นของไนโตรเจนในพืชและปริมาณเชื้อ

Azotobacter ในดินสูงกว่าอีกวิธีหนึ่ง การใช้ปุ๋ยหมักอัตรา 1,000-2,000 กก./ไร่ เป็นอัตราที่เหมาะสมที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวานเมื่อใช้ร่วมกับเชื้อ *Azotobacter* (ธงชัย และคณะ, 2540)

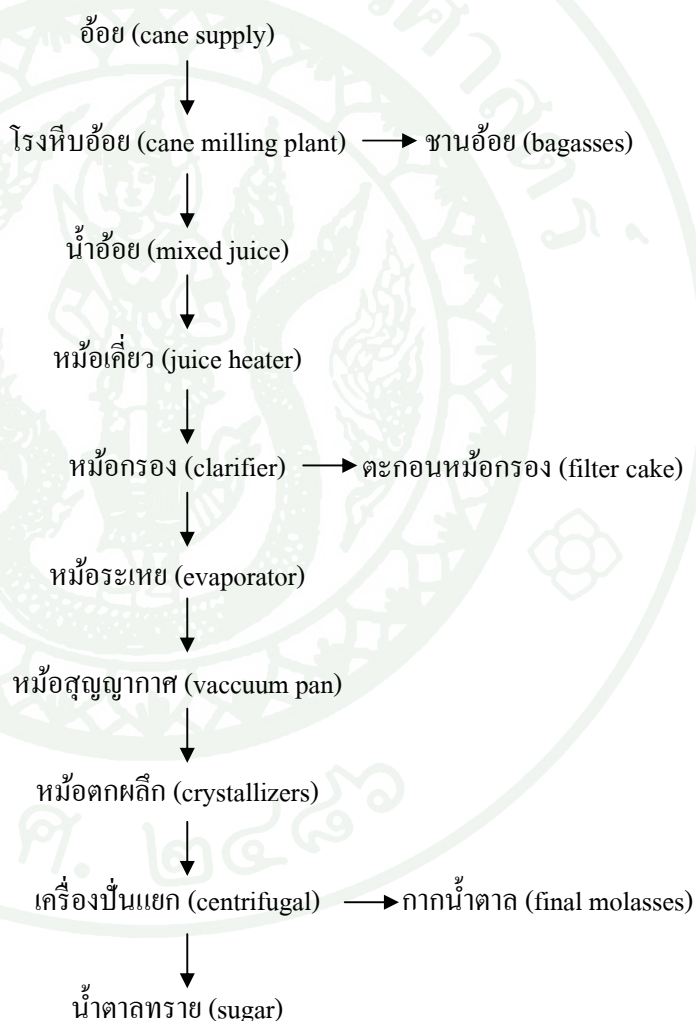
นอกจาก *Azotobacter* จะตรึงไนโตรเจนได้แล้ว ยังสามารถลดปริมาณไนยาไนต์ได้ ซึ่งจากรายงานของคณิตและคณะ (2548) พบว่า *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในอาหารสังเคราะห์ nitrogen free sucrose medium (NFS medium) พบว่าเซลล์ที่อยู่ในช่วงระยะพักตัว (Stationary phase) สามารถลดไนยาไนต์ได้มีประสิทธิภาพกว่าเซลล์ในช่วงกำลังเจริญ (log phase) เมื่อนำเซลล์ในช่วงระยะพักตัวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนยาไนต์เข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 3.0, 4.0 และ 5.0 mM พบว่า *Azotobacter vinelandii* มีประสิทธิภาพในการลดไนยาไนต์ต่างกัน คือ 80.8, 72.0, 71.7, 65.8 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่มีไนยาไนต์เข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, และ 3.0 mM ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพโดยการเติมหัวเชื้อ *Azotobacter* Kapoor และคณะ (2526) รายงานว่า การเติมเชื้อ *Azotobacter* ในปุ๋ยชีวภาพที่หมักเสร็จแล้ว ปริมาณไนโตรเจนจะมีปริมาณสูงขึ้น ในขณะที่การเติมเชื้อ *Azotobacter* ในระหว่างการหมักปุ๋ยจะไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจน ซึ่งสาเหตุเกิดจากช่วงเวลาที่มีการหมักปุ๋ย อุณหภูมิในกองปุ๋ยจะเพิ่มสูงขึ้น ทำให้เชื้อ *Azotobacter* ไม่สามารถอยู่รอดได้ ในขณะที่ Zhang และคณะ (2547) ศึกษาการหมักปุ๋ยชีวภาพในอาหารแข็ง ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ลิกนิน และ Kraft pulping โดยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิในการหมักเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนการใช้ลิกนินต่อ Kraft ที่ 1:0.75 ความหนาของชั้นปุ๋ยคือ 5 เซนติเมตร และควบคุมความชื้นที่ 65 เปอร์เซ็นต์

จากรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อ *Azotobacter* ต่อการเพิ่มผลผลิตในพืชชนิดต่างๆ จึงนำมาสู่งานวิจัยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อเป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ สิ่งสำคัญในกระบวนการหมักซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อค่าใช้จ่ายในการผลิตคือแหล่งของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยควรเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก การเลือกใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลเป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นับว่ามีความน่าสนใจ

4. อ้อยและน้ำตาล

อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลเป็นอุตสาหกรรมเกษตรที่สำคัญของประเทศไทย โดยผลิตน้ำตาลและส่งออกเป็นอันดับ 3 หรือ 4 ของโลก และนำเข้าเงินตราต่างประเทศได้ปีละประมาณ 20,000-30,000 ล้านบาท อุตสาหกรรมนี้มีผลกระทบต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ เกี่ยวเนื่องกับเกษตรกรรมประมาณ 2 แสนราย ซึ่งพื้นที่ปลูกอ้อยทั่วประเทศมีมากกว่า 5 ล้านไร่ กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยมีขั้นตอนดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แผนภาพอย่างง่ายของการผลิตน้ำตาลของโรงงานน้ำตาลทราย และการได้กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้

ที่มา: Paturau (1982)

4.1 กระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย

4.1.1 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ

เมื่อรถบรรทุกนำอ้อยมาส่งโรงงาน อ้อยจะผ่านการชั่งน้ำหนักแล้วลงอ้อยบนสะพานลำเลียงอ้อยและส่งต่อไปยังส่วนของการเตรียมชิ้นอ้อย โดยเริ่มจากใบมีดตัดอ้อยออกเป็นท่อนเล็กๆ แล้วส่งต่อมายังเครื่องฉีกย่อยอ้อยซึ่งทำหน้าที่ฉีกอ้อยออกเป็นฝอย โดยไม่สกัดน้ำอ้อยออก จากนั้นท่อนอ้อยจะเข้าสู่กระบวนการในการผลิตน้ำตาลทรายดิบ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 5 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

1) กระบวนการสกัดน้ำอ้อย (Juice Extraction) : ทำการสกัดน้ำอ้อยโดยผ่านอ้อยเข้าไปในชุดลูกหีบที่ติดตั้งเป็นแถวต่อเนื่องกัน (4-5 ชุด) ชุดหนึ่งประกอบด้วยลูกกลิ้ง 3 ลูก วางในตำแหน่งรูปสามเหลี่ยม มี 2 ลูกเรียงด้านฐาน ลูกหน้าเรียกว่าลูกกลิ้งป้อนอ้อย ลูกหลังเรียกว่าลูกกลิ้งคายกากอ้อย ส่วนอีกลูกหนึ่งอยู่ด้านบนระหว่าง 2 ลูก เรียกว่า ลูกกลิ้งบน การหีบสกัดอ้อยจะใช้น้ำพรม โดยน้ำที่สกัดได้จากลูกหีบแต่ละชุดจะไหลไปเก็บในถังเดียวกัน เรียกว่า น้ำอ้อยรวม (mixed juice) และกากอ้อยที่ผ่านการสกัดน้ำอ้อยจากลูกหีบชุดสุดท้าย จะถูกนำไปเป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้ภายในเตาหม้อไอน้ำ เพื่อผลิตไอน้ำมาใช้ในกระบวนการผลิต และน้ำตาลทราย

2) การทำความสะอาด หรือทำใส่น้ำอ้อย (Juice Purification) : น้ำอ้อยที่สกัดได้ทั้งหมดจะเข้าสู่กระบวนการทำใส เนื่องจากน้ำอ้อยมีสิ่งสกปรกต่าง ๆ จึงต้องแยกเอาส่วนเหล่านี้ ออกโดยผ่านวิธีทางกล เช่น ผ่านเครื่องกรองต่าง ๆ และวิธีทางเคมีโดยการเติมปูนขาวเพื่อปรับพีเอช และตกตะกอนสารพวกกรดอินทรีย์และสารประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่น้ำตาล เช่น ดิน อัลบูมินอยส์ ฟอสเฟต และสารประกอบไนโตรเจน น้ำอ้อยที่ได้นี้เรียกว่า น้ำอ้อยผสมปูนขาว (limed juice) แล้วต้มน้ำอ้อยให้ร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นส่งน้ำอ้อยผสมปูนขาวไปยังถังพักใสและเติมสารช่วยตกตะกอนเพื่อให้ตกตะกอนจะได้น้ำอ้อยใส

3) การต้ม (Evaporation) : น้ำอ้อยที่ผ่านการทำใสแล้วจะถูกนำเข้าสู่ชุดหม้อต้ม (Multiple Evaporator) เพื่อระเหยเอาน้ำออก(ประมาณ 70 %) โดยน้ำอ้อยข้นที่ออกมาจากหม้อต้มลูกสุดท้าย เรียกว่า น้ำเชื่อม (Syrup)

4) การเคี้ยว (Crystallization) : น้ำเชื่อมที่ได้จากการต้มจะถูกนำเข้ามาห้อยเกี่ยวระบบสูญญากาศ (vacuum pan) เพื่อระเหยน้ำออกจนน้ำเชื่อมถึงจุดอิ่มตัว ที่จุดนี้ผลึกน้ำตาลจะเกิดขึ้นมา โดยที่ผลึกน้ำตาลและกากน้ำตาลที่ได้จากการเคี้ยวนี้รวมเรียกว่า แมสคิวท (messecuite)

5) การปั่นแยกผลึกน้ำตาล (Centrifuging) : แมสคิวทที่ได้จากการเคี้ยวจะถูกนำไปปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาล โดยใช้เครื่องปั่น (Centrifugals) ผลึกน้ำตาลที่ได้นี้จะเป็นน้ำตาลดิบ

4.1.2 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลรีไฟน์

น้ำตาลทรายดิบถูกนำไปละลายน้ำ แล้วถูกผ่านเข้า 5 ขั้นตอนการผลิต ดังนี้

1) การปั่นละลาย (Affinated Centrifuging) : นำน้ำตาลดิบมาผสมกับน้ำร้อนหรือน้ำเหลืองจากการปั่นละลาย (Green Molasses) น้ำตาลดิบที่ผสมนี้เรียกว่า แมกมา (Magma) และแมกมานี้จะถูกนำไปปั่นละลายเพื่อล้างคราบน้ำเหลือง หรือกากน้ำตาลออก

2) การทำความสะอาด และฟอกสี (Clarification) : น้ำเชื่อมที่ได้จากหม้อปั่นละลาย (Affinated Syrup) จะถูกนำไปละลายอีกครั้งเพื่อละลายผลึกน้ำตาลบางส่วนที่ยังละลายไม่หมดจากการปั่น และผ่านตะแกรงกรองเข้าผสมกับปูนขาว เข้าฟอกสีโดยผ่านเข้าไปในหม้อฟอก (ปัจจุบันนิยมใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวฟอก) จากนั้นจะผ่านเข้าสู่การกรองโดยหม้อกรองแบบใช้แรงดัน (Pressure Filter) เพื่อแยกตะกอนออก และน้ำเชื่อมที่ได้จะผ่านไปฟอกเป็นครั้งสุดท้ายโดยกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange Resin) จะได้น้ำเชื่อมรีไฟน์ (Fine Liquor)

3) การเคี้ยว (Crystallization): น้ำเชื่อมรีไฟน์ที่ได้จะถูกนำเข้ามาห้อยเกี่ยวระบบสูญญากาศ (Vacuum Pan) เพื่อระเหยน้ำออกจนน้ำเชื่อมถึงจุดอิ่มตัว

4) การปั่นแยกผลึกน้ำตาล (Centrifuging) : แมสคิวทที่ได้จากการเคี้ยวจะถูกนำไปปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาล โดยใช้เครื่องปั่น (Centrifugals) ผลึกน้ำตาลที่ได้นี้จะเป็น น้ำตาลรีไฟน์ และน้ำตาลทรายขาว

5) การอบ (Drying) : ผลึกน้ำตาลรีไฟน์ และน้ำตาลทรายขาวที่ได้จากการปั่นก็จะเข้าหม้ออบ (Dryer) เพื่อไล่ความชื้นออก แล้วบรรจุกระสอบเพื่อจำหน่าย

ขบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อยจะมีผลพลพลอยได้หรือของเหลือใช้ (by-products) หลายชนิด เช่น ชานอ้อย (bagass) กากน้ำตาล (molasses) และกากจี๋หม้อกรอง หรือฟิลเตอร์เค้ก หรือฟิลเตอร์เพรสเค้ก (Filter Press Cake) โดยผลพลอยได้เหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาปศุสัตว์ได้

4.2 กากน้ำตาล

กากน้ำตาล (Molasses) เป็นผลพลอยได้จากการกระบวนการเกี่ยวน้ำตาล โดยมีลักษณะเหนียวข้น มีสีน้ำตาลปนดำ ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ต (invert sugar) และสารเคมี เช่น ปูนขาว ซึ่งใช้ในการตกตะกอนให้น้ำอ้อยใส ถึงแม้กากน้ำตาลจะมีส่วนผสมของน้ำตาลอยู่ แต่มีระดับต่ำเกินกว่าที่จะนำมาสกัดเป็นน้ำตาลได้อีก โดยในการผลิตที่ใช้อ้อย 1 ตัน จะได้กากน้ำตาลประมาณ 45-60 กิโลกรัม กากน้ำตาลสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบในหลายๆ อุตสาหกรรม เช่น การผลิตสุรา การผลิตแอลกอฮอล์ การผลิตผงชูรส และการผลิตเอทานอล กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย สามารถจำแนกเป็น 3 ชนิด ดังนี้ (Paturaul, 1982; Meade, 1985)

4.2.1 Blackstrap molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ หรือมีปริมาณของแข็งเมื่อเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:1 อยู่ประมาณ 42 องศาบริกซ์

4.2.2 Refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์

4.2.3 High test molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการนำน้ำอ้อยมาชั่งด้วยกรดแล้วระเหยให้เข้มข้นเป็นน้ำเชื่อม อาจเรียกว่า invert molasses มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 77 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลอ้อย

กากน้ำตาล		องค์ประกอบ
Usual rang (%)	Indicative average (%)	
17-25	20	น้ำ
30-40	35	น้ำตาลซูโครส
4-9	7	น้ำตาลกลูโคส
5-12	9	น้ำตาลฟรุกโตส
1-5	3	น้ำตาลรีคิซอื่นๆ
2-5	4	คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ
7-15	12	เถ้า
2-6	4.5	Nitrogenous compounds
2-8	5	Non nitrogenous acid
0.1-1	0.4	Wax, Sterols, and Phospholipid (1-tricontanol, Phytosterol, Stigmasterol)
Varying amounts		วิตามิน

ที่มา: Paturau (1982)

ตารางที่ 3 วิตามินที่พบในกากน้ำตาลอ้อย

วิตามิน	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/กรัม)
ไบโอติน (biotin: H)	1-3
โคลีน (choline: B ₄)	880
กรดโฟลิก (folic acid: B ₉)	0.3-0.4
ไนอะซิน (niacine: B ₃)	17-30
กรดแพนโทเทนิค (pantothenic acid: B ₅)	20-60
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin: B ₂)	2-3
ไพริดอกซิน (pyridoxine: B ₆)	1-7
ไทอะมีน (thiamine: B ₁)	0.6-1.0

ที่มา: Paturau (1982)

4.3 กากหม้อกรอง

กากหม้อกรอง หรือกากอ้อยดำ หรือกากจี้กรอง หรือกากตะกอน (filter-cake หรือ filter-mud หรือ press-mud) หมายถึง ตะกอนที่ได้จากการกรองแยกน้ำอ้อยในขบวนการทำใส (clarification process) ของโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล ประกอบด้วย ขี้ผึ้งและไขมัน 5-14 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย 15-30 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาล 5-15 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 5-15 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 9-20 เปอร์เซ็นต์ แร่ธาตุ เช่น ซิลิกอน แคลเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ และใช้เป็นวัตถุปรับปรุงดินได้ ในการผลิตน้ำตาลที่ใช้อ้อย 100 ตัน จะมีกากหม้อกรองประมาณ 3.4 ตัน และจากการประเมินพบว่ากากหม้อกรองมีประมาณ 0.88 ล้านตันต่อปี โดยราคาซื้อขาย ประมาณ 700 บาทต่อตัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2548) กากหม้อกรองจัดว่าเป็นวัสดุเหลือใช้ที่มีอินทรีย์วัตถุสูง เมื่อนำไปใส่ลงในดินอาจช่วยปรับโครงสร้างของดินให้อุ้มน้ำและการถ่ายเทอากาศดีขึ้น ทำให้พืชสามารถดูดธาตุอาหารไปใช้ได้มากขึ้น

Kumar และคณะ (2553) ศึกษาการนำกากหม้อกรองมาหมักร่วมกับเชื้อ *Pleurotus sajorcaju*, *Trichoderma viridae*, *Aspergillus niger* และ *Pseudomonas striatum* พบว่า เป็นการเพิ่มสารอาหารให้กับปุ๋ยที่หมักได้ รวมถึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบทางเคมีของกากหม้อกรอง

ส่วนประกอบทางเคมี	วัลย์กานต์ และคณะ (2549)	Kumar <i>et al.</i> (2010)
pH	7.3	-
Total N (%)	2	0.85
P (%)	1.3	0.53
K (%)	0.58	1.72
Ca (%)	2.99	-
Mg (%)	0.35	-
Mn (ppm)	1,115	-
Cu (ppm)	36	-
Fe (ppm)	5,699	-
Zn (ppm)	155	-

หมายเหตุ - ไม่มีข้อมูล

รายงานผลการทดลองของวิรัชและคณะ (2520) พบว่า การใส่กากหม้อกรอง หรือปุ๋ยคอกอัตรา 2.6 ตัน (น้ำหนักแห้ง) ให้ผลผลิตเมล็ดถั่วเหลืองใกล้เคียงกันคือ 423 และ 448 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งมากกว่าการใส่อินทรีย์วัตถุชนิดอื่นๆ และไม่ใส่อินทรีย์วัตถุ รวมทั้งช่วยเพิ่มปริมาณอินทรีย์วัตถุและ Available P. ในดิน ทำให้ความหนาแน่นรวมของดินในระบบปลูกพืชหมุนเวียนลดลง ซึ่งช่วยให้ดินร่วนซุยเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช

จากความสามารถของ *Azotobacter vinelandii* ในผลิตเอนไซม์ nitrogenase สำหรับการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ และการผลิตสารต่าง ๆ ในวงจรของ *Azotobacter vinelandii* สามารถเกิดประโยชน์ต่อคุณภาพของปุ๋ยชีวภาพ จึงมีความน่าสนใจในการพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพจากเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหาร ตลอดจนพัฒนารูปแบบของปุ๋ยชีวภาพทั้งในรูปปุ๋ยน้ำและปุ๋ยแห้งโดยการนำมาผสมกับกากหม้อกรองซึ่งเป็นเศษเหลือใช้จากโรงงานน้ำตาล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและผลผลิตอ้อย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

Azotobacter vinelandii TISTR 1094 จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) 35 หมู่ 3 เทคโนโลยี อ.เลียบคลองห้า ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลว Basal medium (ภาคผนวก ก)

3. เครื่องมือ

- 3.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific, Edison, U.S.A)
- 3.2 พีเอชมิเตอร์ (sensION1, HACH, United States)
- 3.3 Spectrophotometer (Model Genesys 10 UV, Thermo Spectronic, U.S.A.)
- 3.4 ถังหมักขนาด 5 ลิตร (BEM, B.E.Marubishi with pH controller: Mettler Toledo, Japan)
- 3.5 ถังหมักขนาด 50 ลิตร (Model MSJ-N2 with controller: BEMT-T-50L, B.E.Marubishi, Japan)
- 3.6 High Performance Liquid Chromatography, HPLC (System controller: SCL-10A , Liquid Chromatography: LC-10AD VP, Degasser: DGU-12A, RI detector: RID-10A, UV-Vis detector: SPD-10A VP, Auto injector: SIL-10AD VP, Column oven: CTO-10AS VP, Shimadzu, Japan)
- 3.7 กล้องจุลทรรศน์ (MX4300H, MEIJI, Japan)
- 3.8 เครื่องชั่ง (XB 320M, Precisa, Switzerland)
- 3.9 Autoclave (HVA-85, Hiclave, Japan)

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อ

เก็บเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 จากอาหารวุ้นเอียง (slant) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงในพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี Basal medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตามวิธีการของ วว.) จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติกที่มี Basal medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาตรกล้าเชื้อร้อยละ 10) บ่มต่อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่ได้ 10 มิลลิลิตร ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการทดลองต่อไป

2. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับพลาสติก

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงใน Basal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาตรกล้าเชื้อร้อยละ 10) แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิโดยแปรผันอัตราการเขย่าเป็น 200 และ 250 รอบต่อนาที แปรผันอุณหภูมิเป็น 30 และ 35 องศาเซลเซียส และแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเป็นกรดด้วยพีเอชมิเตอร์ และวัดการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Total Plate Count

3. การศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโตของ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับพลาสติก

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงใน Basal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาตรกล้าเชื้อร้อยละ 10) ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าโดยควบคุมอุณหภูมิความเร็วรอบ และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สถานะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 2

เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเป็นกรดด้วยพีเอชมิเตอร์ และวัดการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Total Plate Count

4. การศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาสก์

ถ่ายกล้ำเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงใน Basal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาตรกล้ำเชื้อร้อยละ 10) ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มต่อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเป็นกรดด้วยพีเอชมิเตอร์ วัดการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Total Plate Count วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโตสที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพื่อสังเกตโครงสร้างของชีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีของ Schaeffer และ Fulton

5. การศึกษาการเจริญเติบโตของ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายกล้ำเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงใน Basal medium ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาตรกล้ำเชื้อร้อยละ 10) ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 4 จำนวน 2 ฟลาสก์ บ่มต่อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้ำเชื้อปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรการทำงาน 3 ลิตร ควบคุมสภาวะการหมักตามสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 4, 8, 30, 48 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเป็นกรดด้วยพีเอชมิเตอร์ วัดการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Total Plate Count วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโตสที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยวิธี HPLC และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพื่อสังเกตโครงสร้างของชีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีของ Schaeffer และ Fulton

6. การศึกษาการเจริญเติบโตของ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับถังหมักขนาด 50 ลิตร

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมได้ลงใน Basal medium ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาตรกล้ำเชื้อร้อยละ 10) ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 4 จำนวน 2 พลาสติก บ่มต่อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้ำเชื้อปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรการทำงาน 3 ลิตร ควบคุมสภาวะการหมักตามสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 3 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่มีปริมาตรการทำงาน 30 ลิตร ความเข้มข้นกากน้ำตาลที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 4 ควบคุมสภาวะการหมักตามสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 4, 8, 30, 48 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเป็นกรดด้วยฟิเอชมิเตอร์ วัดการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Total Plate Count วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโตสที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยวิธี HPLC

7. การศึกษาการทำปฏิกิริยาชีวภาพ

7.1 การทำปฏิกิริยาชีวภาพในรูปแบบน้ำ

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บรรจุในขวดพลาสติกที่สะอาด เก็บรักษาในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 14, 21 และ 28 ทำการทดสอบวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl และวัดการรอดชีวิตของเชื้อด้วยวิธี Total Plate Count

7.2 การทำปฏิกิริยาชีวภาพในรูปแบบแห้ง

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกากหม้อกรองในปริมาณ 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และวางไว้ในที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 14, 21 และ 28 ทำการทดสอบวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl และวัดการรอดชีวิตของเชื้อด้วยวิธี Total Plate Count

8. การศึกษาการปรับปรุงดินและพืชทดสอบ

นำปุ๋ยน้ำที่ได้จากการหมักทดสอบกับพืชทดลองคืออ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 หรือ LK92311 โดยใช้ท่อนอ้อยความยาวประมาณ 8 – 10 เซนติเมตร ดินที่ใช้ในการปลูกอ้อยเป็นดินทางการค้า คือ ดินวันดีการเกษตร และกากหม้อกรองที่ได้จากโรงงานน้ำตาล โดยมีการทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แผนการทดลองการปรับปรุงพีระดับห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่	ดินที่ปลูก	การเตรียมท่อนอ้อยก่อนปลูก			การรดน้ำ	
		ไม่แช่น้ำ	แช่น้ำ	แช่ปุ๋ยน้ำ	รดน้ำ	รดปุ๋ยน้ำ
1	ดินล้วน	✓			✓	
2	ดินล้วน	✓				✓
3	ดินล้วน		✓		✓	
4	ดินล้วน		✓			✓
5	ดินล้วน			✓	✓	
6	ดินล้วน			✓		✓
7	ดินสลับกากหม้อกรอง	✓			✓	
8	ดินสลับกากหม้อกรอง	✓				✓
9	ดินสลับกากหม้อกรอง		✓		✓	
10	ดินสลับกากหม้อกรอง		✓			✓
11	ดินสลับกากหม้อกรอง			✓	✓	
12	ดินสลับกากหม้อกรอง			✓		✓

หมายเหตุ 1 เดือนแรกทุกการทดลองจะรดน้ำอย่างเดียว จนครบ 45 วัน แล้วเริ่มทำการทดลองตามตารางข้างต้นจนครบ 3 เดือน
ระยะเวลาแช่ท่อนอ้อยในน้ำและปุ๋ยน้ำ คือ 12 ชั่วโมง
ปริมาณน้ำหรือปุ๋ยน้ำที่ใช้รดอ้อยคือ 200 มิลลิลิตร ต่อต้น

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ทำการวัดความสูงต้นอ้อยจากแต่ละการทดลองเมื่ออายุครบ 1 และ 3 เดือน วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดินด้วยวิธี Kjeldah method และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจิเนสในรากอ้อยและดินด้วยวิธี Acetylene reduction assay (ภาคผนวก ข)

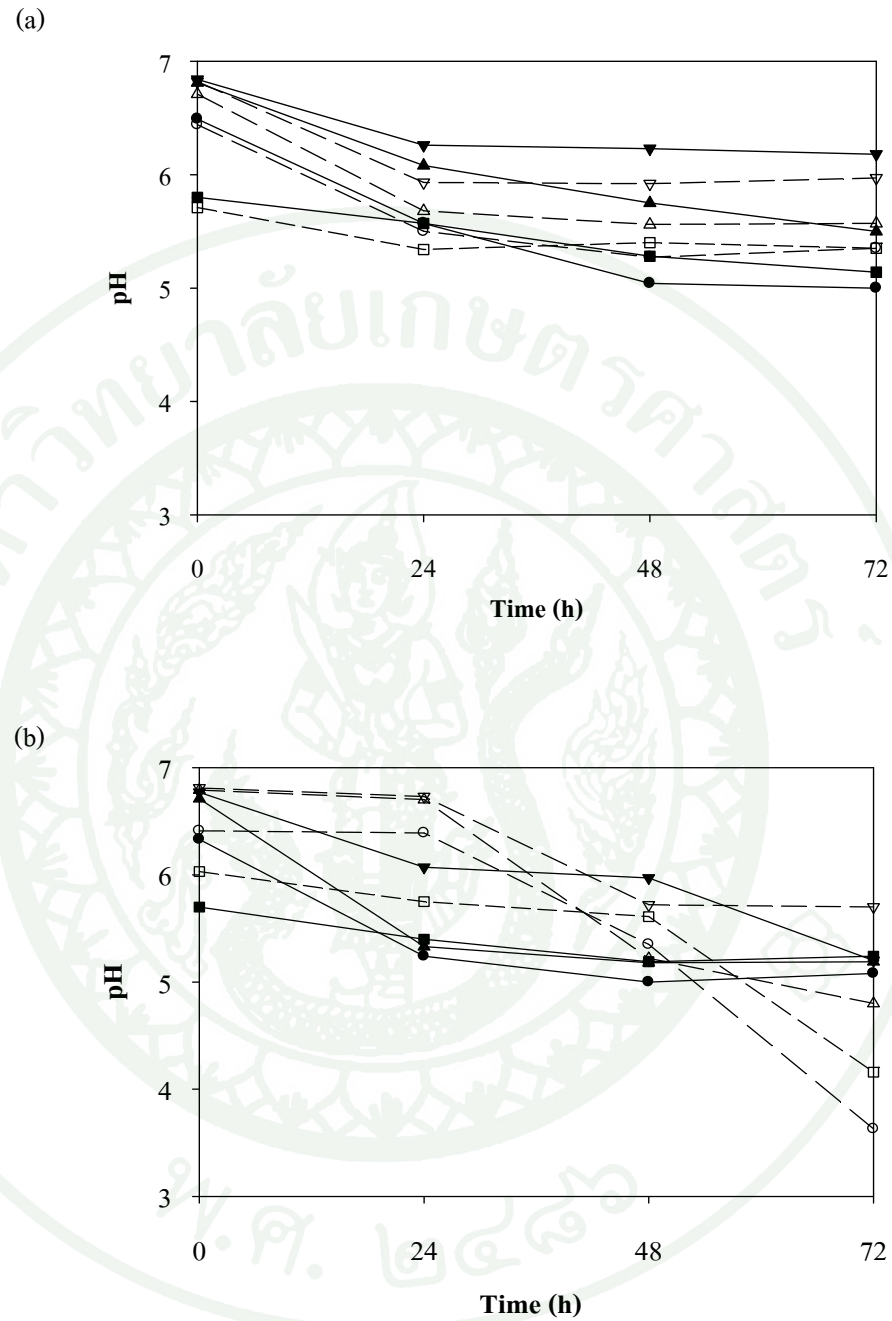
การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการของ Duncan's new multiple range test (DMRT)

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับพลาสติก

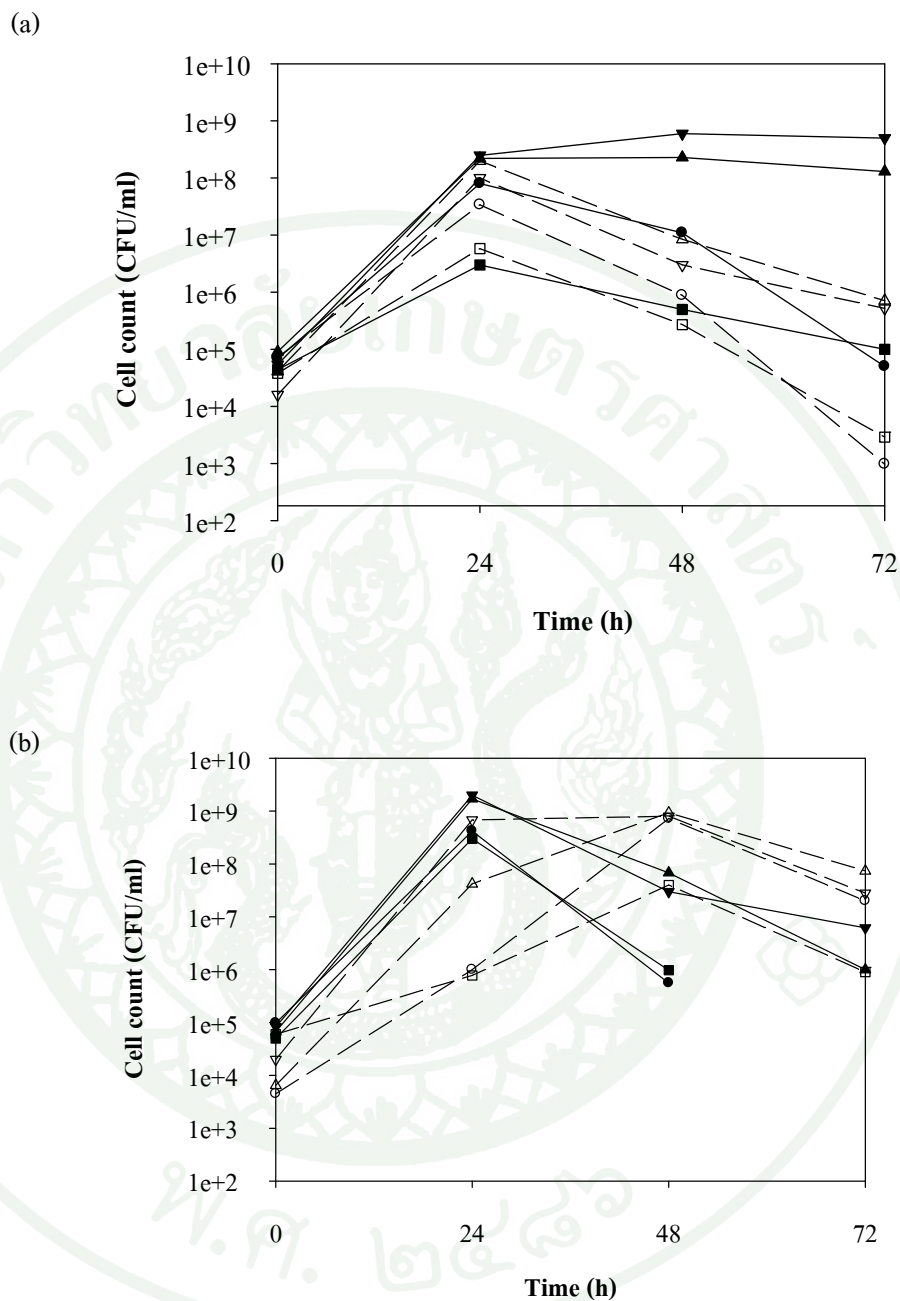
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับพลาสติกโดยแปรผันพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และความเร็วรอบในการเขย่าพบว่า ในทุกสภาวะของการทดลอง เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดต่ำลง ซึ่งการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยหลังจากชั่วโมงที่ 24 และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าระหว่าง 5.0-6.18 สำหรับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจาก 24 ชั่วโมง พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (ระหว่างพีเอช 5.0-5.18) ยกเว้นที่พีเอชเริ่มต้น 7.5 คือ หลังจากชั่วโมงที่ 48 พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัดเจน (จาก 5.97 ลดเหลือ 5.2) ส่วนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า หลังจากชั่วโมงที่ 24 พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ พีเอชลดลงเหลือประมาณ 3.63-4.0 ยกเว้นที่พีเอชเริ่มต้น 7.5 พบว่า หลังจากชั่วโมงที่ 24 พีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว (จาก 6.73 ลดเหลือ 5.72) แต่เมื่อผ่านชั่วโมงที่ 48 พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มคงที่อยู่ที่ประมาณ 5.7 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่สภาวะที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ที่แตกต่างกัน โดย (a) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที (b) อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที (เส้นทึบ (—) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, เส้นปะ (-----) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 6 ■, □; pH 6.5 ○, ●; pH 7 ▲, △ และ pH 7.5 ▼, ▽ ตามลำดับ)

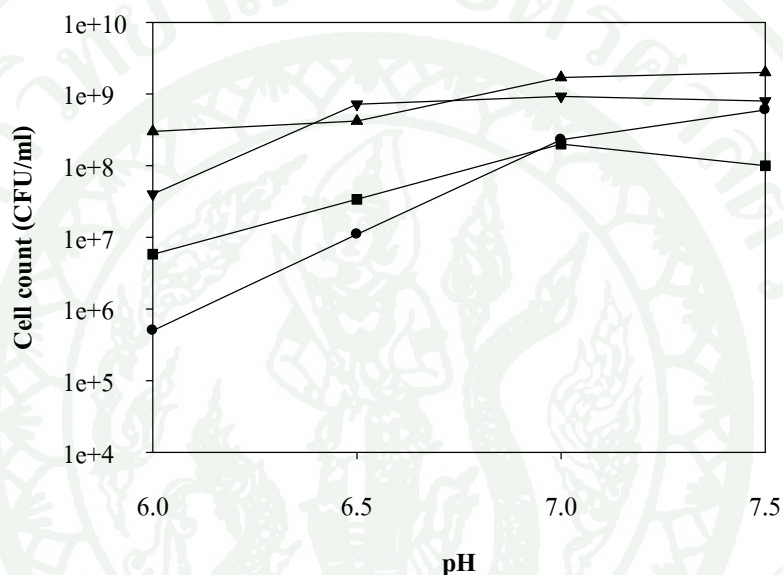
เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันพบว่า ในสภาวะที่มีอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที (ภาพที่ 5 (a)) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 และ 6.5 พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณเชื้อ 3.0×10^6 และ 8.0×10^7 CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ (72 ชั่วโมง) การเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 1.0×10^5 และ 5.0×10^4 CFU/ml ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 7 และ 7.5 พบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อค่อนข้างคงที่ กล่าวคือ ในชั่วโมงที่ 48 เชื้อมีการเจริญเติบโตเท่ากับ 2.3×10^8 และ 6.0×10^8 CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ การเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 1.3×10^8 และ 5.0×10^8 CFU/ml ตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6, 6.5, 7.0 และ 7.5 พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณเชื้อ 5.8×10^6 , 3.4×10^7 , 2.0×10^8 และ 1.0×10^8 CFU/ml ตามลำดับ

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีอัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที (ภาพที่ 5 (b)) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6, 6.5, 7 และ 7.5 พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณ 3.0×10^8 , 4.2×10^8 , 1.7×10^9 และ 2.0×10^9 CFU/ml ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีการเจริญเติบโตลดลงกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ (72 ชั่วโมง) พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6 และ 6.5 เชื้อไม่มีการเจริญเติบโต ส่วนที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 และ 7.5 เชื้อมีปริมาณลดลงเหลือ 1.0×10^6 และ 6.2×10^6 CFU/ml ตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6, 6.5, 7 และ 7.5 จะเห็นได้ว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีปริมาณเชื้อ 4.0×10^7 , 7.2×10^8 , 9.3×10^8 และ 8.0×10^8 CFU/ml ตามลำดับ



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในสภาวะที่แตกต่างกัน โดย (a) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที (b) อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที (เส้นทึบ (—) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, เส้นปะ (---) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 6 ■, □; pH 6.5 ○, ●; pH 7 ▲, △ และ pH 7.5 ▼, ▽ ตามลำดับ)

เมื่อนำปริมาณเชื้อที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดในแต่ละสภาวะมาเปรียบเทียบกับกันดังภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่า เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นจากพีเอช 6.0 เป็น 7.5 เชื้อจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจากประมาณ 10^7 เพิ่มขึ้นเป็น 10^8 CFU/ml โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในการศึกษาครั้งนี้ คืออัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ 7.0 ถึง 7.5



ภาพที่ 6 การเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในสภาวะที่แตกต่างกัน

(●, 200 rpm 30 °C 48 h; ■, 200 rpm 35 °C 24 h; ▲, 250 rpm 30 °C 24 h และ ▼, 250 rpm 35 °C 48 h ตามลำดับ)

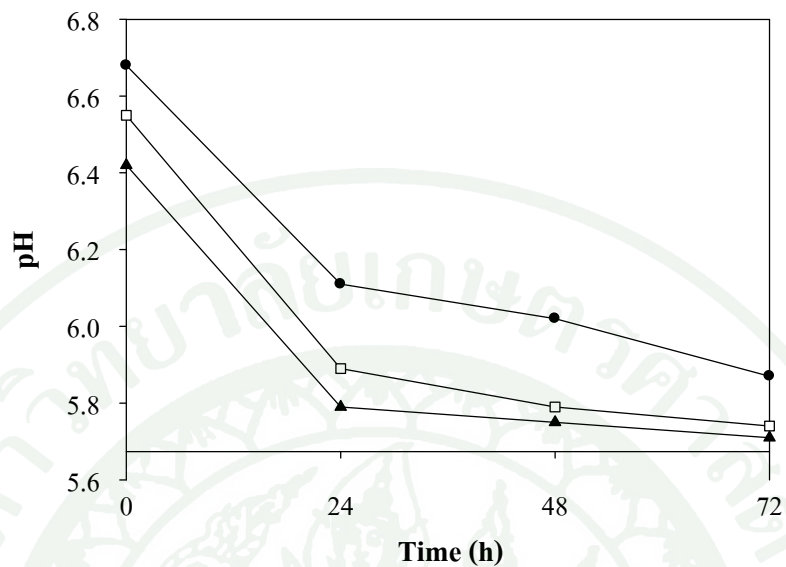
จากผลการทดลองสรุปได้ว่า *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (sticky anaerobe) และสภาวะที่เจริญได้ดีคือสภาวะที่มีความเป็นกรดต่ำประมาณ 7.0 ดังนั้นในการทดลองต่อไปซึ่งเป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ สภาวะที่ใช้ในการทดลองคืออัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

2. การศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาสก์

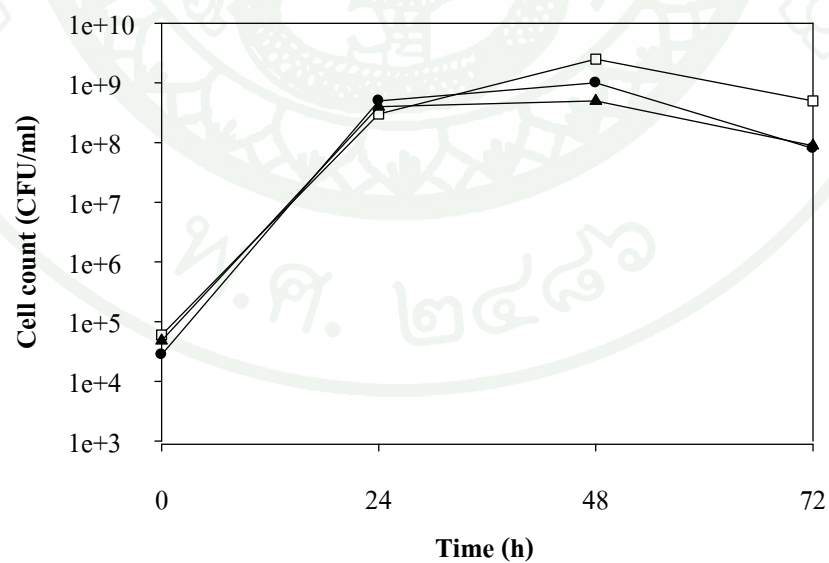
การศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาสก์ สภาวะที่ใช้ในการทดลองคืออัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 พบว่า เมื่อเชื้อเริ่มเจริญเติบโตพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงทุกความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส โดยพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงลดลงเท่ากับ 5.87, 5.74 และ 5.71 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาพที่ 7)

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาพที่ 8) พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.0×10^9 , 2.5×10^9 และ 5.0×10^8 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่า ปริมาณเชื้อของทุกความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณลดลง อยู่ที่ 8.0×10^7 , 5.0×10^8 และ 8.9×10^7 CFU/ml ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 10^9 CFU/ml ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส 1-2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ในขณะที่การทดลองของ Damir *et al.* (2011) ที่ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter chroococcum* เพื่อใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ โดยศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ (1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า ที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อเจริญได้สูงสุด อย่างไรก็ตามยังคงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 120 ชั่วโมง ในขณะที่การเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อเจริญได้น้อยกว่าเพียงเล็กน้อย แต่ปริมาณน้ำตาลเหลือน้อยมากเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส ●, 1%; □, 2% และ ▲, 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส ●, 1%; □, 2% และ ▲, 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

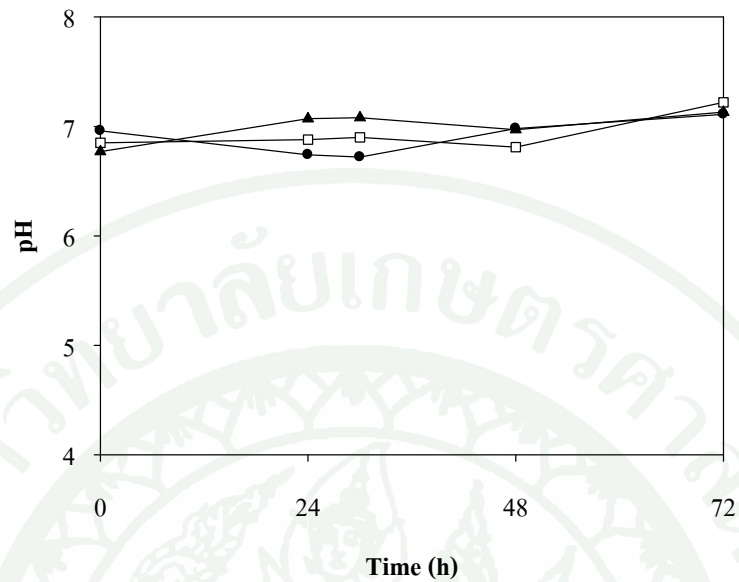
3. การศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลask

3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลask

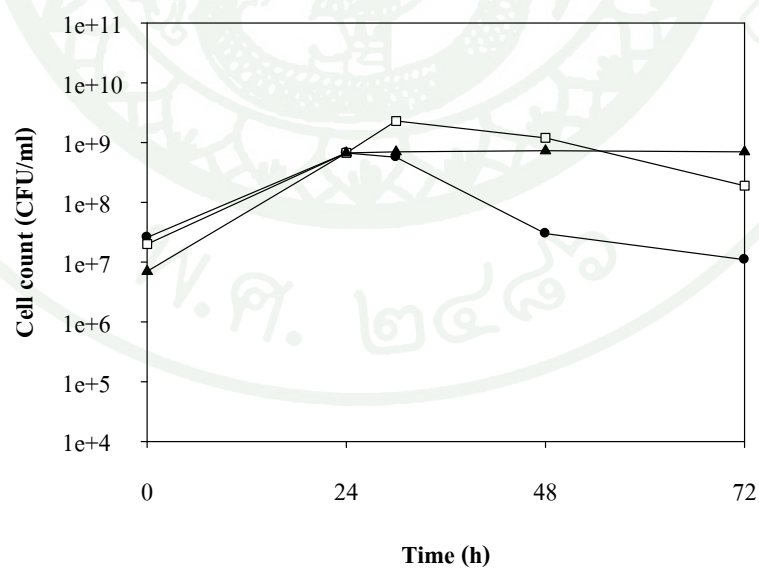
แม้ว่ากลูโคสจะเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์เนื่องจากเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เชื้อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย อย่างไรก็ตามน้ำตาลกลูโคสเป็นวัตถุดิบที่มีราคาแพงและไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตปุ๋ยน้ำชีวภาพ มีรายงานว่าเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย โดยกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกซึ่งยังคงมีสารอาหารและแร่ธาตุที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งนี้กากน้ำตาลมีซูโครสเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง 30-40 เปอร์เซ็นต์ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตส่งผลให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.11, 7.22 และ 7.13 ตามลำดับ (ภาพที่ 9)

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 1, 2, และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาพที่ 10 และ 11) พบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 30 โดยปริมาณเท่ากับ 2.3×10^9 CFU/ml และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง (72 ชั่วโมง) ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 1.9×10^8 CFU/ml โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 11.75 กรัมต่อลิตร เหลือ 0.25 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่าที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อปริมาณน้ำตาลหมดไป ปริมาณเชื้อลดลงมากกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ที่ปริมาณน้ำตาลยังเหลืออยู่

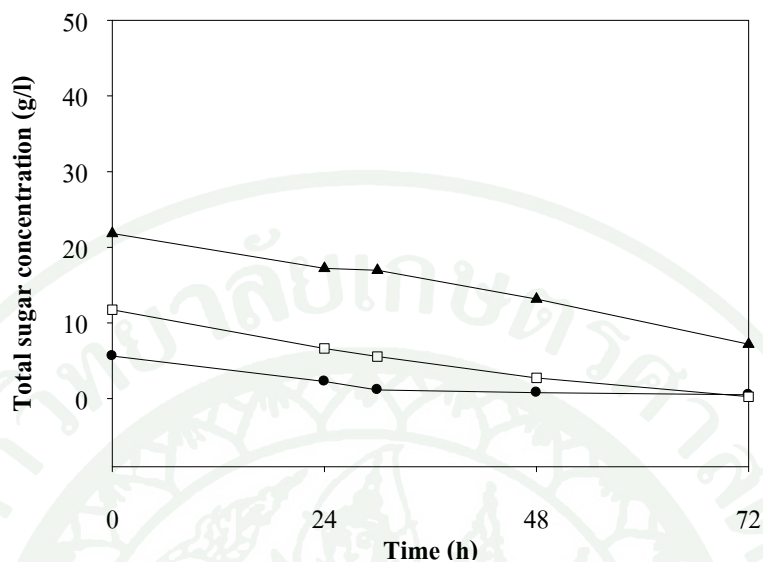
อย่างไรก็ตามการศึกษาในระดับฟลaskยังไม่สามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ เช่น พีเอช อัตราการให้อากาศ ให้งอกที่ได้ตลอดการทดลองซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อได้ ดังนั้นการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาการเจริญของเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีการควบคุมสภาวะต่างๆ



ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล ●, 1%; □, 2% และ ▲, 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



ภาพที่ 10 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล ●, 1%; □, 2% และ ▲, 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



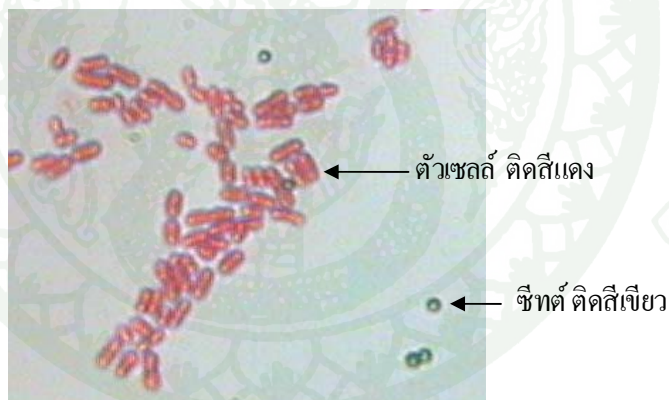
ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล ●, 1%; □, 2% และ ▲, 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

พ.ศ. ๒๕๕๖

3.2 การศึกษาการสร้างชีตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาस्क

Azotobacter สามารถสร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าชีต โดยชีตจะทนทานต่อสารเคมีและสภาพแวดล้อมมากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบสำหรับการนำเชื้อ *Azotobacter* ไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของอ้อยในแปลงปลูกที่มีสภาพแห้งแล้ง ทั้งนี้ชีตสามารถจะเจริญเป็นเซลล์ปกติต่อไปเมื่ออยู่ในสภาวะเหมาะสมกับการเจริญเติบโต

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการสร้างชีตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 เมื่อเพาะเลี้ยงในระดับฟลาस्कโดยแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสี malachite green พบว่าตัวเซลล์จะติดสีแดง ในขณะที่เซลล์ที่สร้างชีตจะย้อมติดสีเขียว ลักษณะการติดสีของชีตและตัวเซลล์แสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ลักษณะชีตของ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100 เท่า)

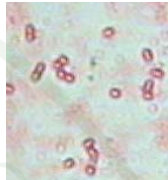
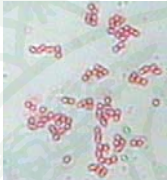
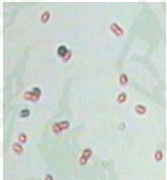
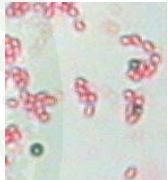
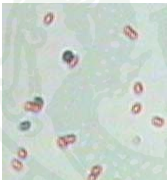
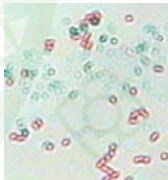
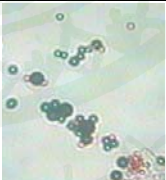
การสร้างชีตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาस्कที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลต่างๆ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 6 โดยพบว่า ที่ชั่วโมงที่ 0 ของทุกความเข้มข้นกากน้ำตาลพบเพียงตัวเซลล์ที่ติดสีแดง แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะตรวจพบการติดสีเขียวของชีตในทุกความเข้มข้นของกากน้ำตาล โดยการติดสีเขียวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณน้ำตาลในฟลาสก์ลดลง เมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหารจึงมีการสร้างชีสต์เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 มีความสามารถในการสร้างชีสต์ซึ่งทำให้เชื้อสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อต่อไป

Stevenson and Socolofsky (1965) ทำการศึกษาการสร้างชีสต์ของเชื้อ *A. vinelandii* ATCC 12837, *A. vinelandii* ATCC 9104 และ *A. vinelandii* สายพันธุ์ O บนอาหาร Burk's nitrogen-free salt agar เมื่อเปรียบเทียบการสร้างชีสต์ของเชื้อที่ระดับความความเข้มข้นกลูโคส 0.01-5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า การสร้างชีสต์ของเชื้อเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นกลูโคส 0.01-0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่เมื่อปริมาณสารอาหารเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การสร้างชีสต์ของเชื้อลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การสร้างชีสต์ของเชื้อ *Azotobacter* สามารถเหนี่ยวนำได้โดยการเติมสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ เช่น บิวทานอล ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการสร้างชีสต์ยังขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง อัตราส่วน (ratio) ระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหาร ชนิดของแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารแข็งจะมีการสร้างชีสต์มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Stevenson and Socolofsky, 1965; Siliman and JR, 1986; Pena *et al.* 2002)

พ.ศ. ๒๕๕๖

ตารางที่ 6 ลักษณะการสร้างชีสค์ของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาस्कที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกากน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)		
	1	2	4
0			
24			
30			
48			
72			

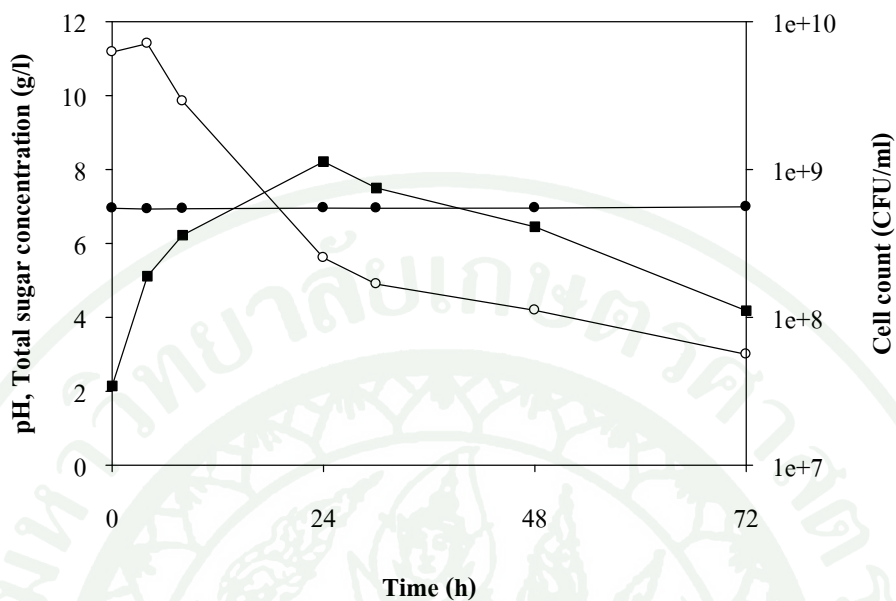
4. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับถังหมัก ขนาด 5 ลิตร

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับปฏิกิริยาชีวภาพ นอกจากจะมีผลต่อปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อยังมีผลต่อค่าใช้จ่ายของกระบวนการผลิต จากผลการทดลองในระดับฟ्लास्कพบว่า ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสภาวะที่เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (2.3×10^9 cfu/ml) และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง มีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในระบบเพียงเล็กน้อย (0.25 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นในการทดลองในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร จึงเลือกใช้กากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีปริมาตรการทำงาน 3 ลิตร ควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และควบคุมการเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มัลแบบอัตโนมัติ ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 13

จากผลการทดลองเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักพบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยงมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.44×10^7 CFU/ml และความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 11.18 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดโดยมีปริมาณเท่ากับ 1.13×10^{10} CFU/ml และปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 5.61 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาในระดับถังหมักซึ่งมีการควบคุมสภาวะต่างๆ เชื้อเจริญเติบโตได้ดีและเร็วกว่าในสภาวะที่ไม่มีการควบคุม (การศึกษาในระดับฟ्लास्क) โดยในถังหมักเชื้อเจริญเติบโตประมาณ 10^9 CFU/ml ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่ระดับฟ्लास्कใช้เวลาประมาณ 30 ชั่วโมง

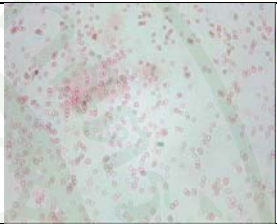
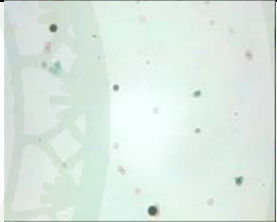
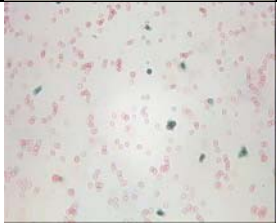


ภาพที่ 13 การเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (● pH; ○ total sugar concentration และ ■ Cell count)

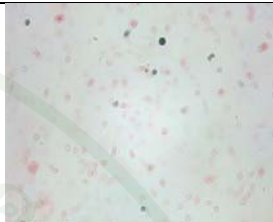
4.2 การศึกษาการสร้างชีสต์ของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

การศึกษาการสร้างชีสต์ของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่เพาะเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการตรวจสอบโดยวิธีการย้อมสีเซลล์ด้วยสี malachite green โดยเซลล์ที่สร้างชีสต์จะย้อมติดสีเขียวซึ่งสามารถเห็นได้เด่นชัดกว่าการย้อมด้วยวิธี Gram's stain และทำการตรวจนับปริมาณชีสต์ด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การสร้างซิสต์ของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Time (h)	pH	Cells count (CFU/ml)	Total sugar concentration (g/l)	Total cysts/ml	Staining of cyst structure
0	6.33	3.67×10^7	8.91	0	ND
4	6.77	3.50×10^7	8.64	0	ND
8	6.63	1.07×10^8	7.64	0	ND
24	6.78	1.60×10^9	4.18	2.00×10^3	
30	6.75	1.50×10^9	2.99	3.50×10^3	
48	6.69	2.40×10^9	0.82	9.50×10^3	
54	6.57	8.67×10^8	0.86	7.50×10^3	
72	6.65	3.00×10^7	0.85	9.50×10^3	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Time (h)	pH	Cells count (CFU/ml)	Total sugar concentration (g/l)	Total cysts/ml	Staining of cyst structure
168	Nd	Nd	Nd	1.55×10^4	
336	Nd	Nd	Nd	7.13×10^3	

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณเท่ากับ 3.67×10^7 CFU/ml และเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อ 2.40×10^9 CFU/ml หลังจากนั้นปริมาณเชื้อมีการลดลงเหลือ 8.67×10^8 และ 3.00×10^7 CFU/ml ที่เวลา 54 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบปริมาณน้ำตาลพบว่า มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 8.91 กรัมต่อลิตร และที่เวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 0.82 กรัมต่อลิตร โดยจากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลน้อยกว่า 1.00 (ขาดแหล่งอาหารคาร์บอน) ส่งผลให้ปริมาณเชื้อเริ่มลดลงเช่นกัน เมื่อตรวจสอบการสร้างซิสต์ของเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงพบว่า เชื้อเริ่มสร้างซิสต์ในชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณ 2.00×10^3 cysts/ml และการสร้างซิสต์เพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง ทำการเก็บน้ำหมักไว้ในขวดที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 168 ชั่วโมง (7 วัน) พบว่า การสร้างซิสต์ของเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 1.55×10^4 cysts/ml และเมื่อครบ 336 ชั่วโมง (14 วัน) ทำการตรวจนับปริมาณซิสต์อีกครั้ง พบว่า การสร้างซิสต์ลดลงเหลือเพียง 7.13×10^3 cysts/ml และมีเชื้อจุลินทรีย์อื่นปนเปื้อนในน้ำหมักปริมาณเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้ปริมาณซิสต์ที่ตรวจพบลดน้อยลง อาจเป็นผลจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น

การสร้างชีสของเชื้อ *Azotobacter* จะเกิดขึ้นเมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า เมื่อสารอาหารเริ่มลดลงเชื้อบางส่วนเริ่มมีการสร้างชีสเพื่อช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญดังกล่าว ทั้งนี้เชื้อที่อยู่ในสภาวะชีสสามารถเจริญเป็นเซลล์ใหม่ได้เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมกับการเจริญเติบโต

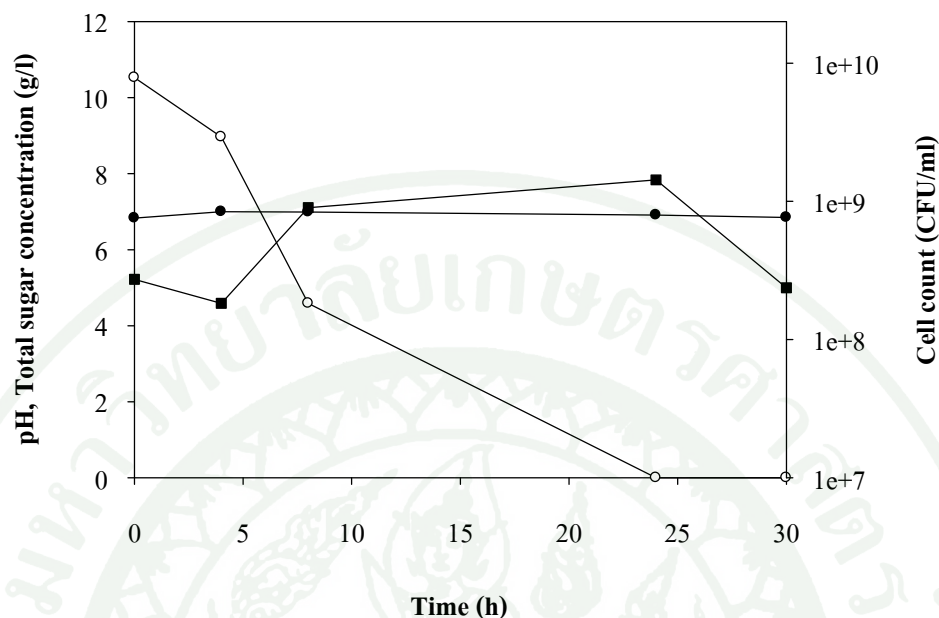
การสร้างชีสของเชื้อ *Azotobacter* สามารถเหนี่ยวนำได้จากหลายปัจจัย เช่น องค์ประกอบของแร่ธาตุในอาหาร โดยอาหารที่มีองค์ประกอบของสารในกลุ่มแอลกอฮอล์คือ บิวทานอล สามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อ *Azotobacter* สร้างชีสได้ Inamdar *et al.* (2000) ศึกษาการผลิตชีสของเชื้อ *Azotobacter* ในสภาวะที่เลี้ยงในอาหารเหลว โดยนำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 30 ลิตร มาเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างชีสโดยการนำมาเลี้ยงในถังที่มีการเติม CaCO_3 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ บิวทานอล 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (phase contrast microscopy) พบว่า เชื้อมีการสร้างชีสเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ Page and Sadoff (1975) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างชีสของเชื้อ *A. vinelandii* (ATCC 12837) คือ การเลี้ยงในอาหารปราศจากไนโตรเจนที่มี B-hydroxybutyrate 0.2 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมไอออน 0.37-0.44 mM Socolofsky and Wyss (1962) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Azotobacter* ในอาหารแข็งที่มีการเติมบิวทานอล 0.2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสร้างชีสเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 5-7 วัน โดยเชื้อจะมีการสร้างชีสเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนหรือเลี้ยงในอาหารเหลว

จากลักษณะดังกล่าวของเชื้อ *Azotobacter* จึงเป็นข้อได้เปรียบของการนำเชื้อนี้เพื่อเป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เมื่อสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อตั้งต้นได้ในปริมาณมากย่อมมีแนวโน้มว่าเชื้อจะสร้างชีสและสามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ที่มีชีวิตและแสดงกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชในแปลงได้ต่อไป

5. ผลการศึกษาการขยายกำลังการผลิตของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมัก ขนาด 50 ลิตร

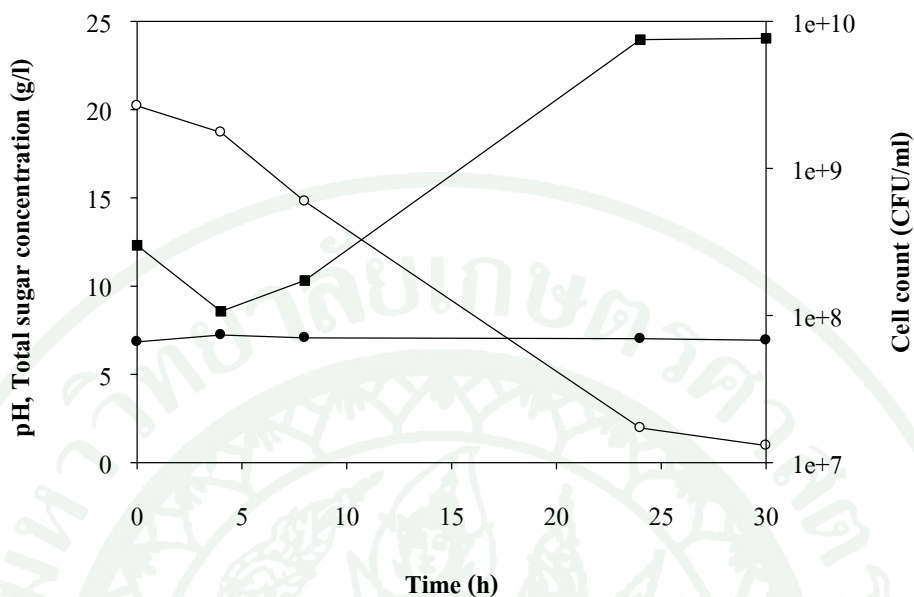
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการขยายกำลังการผลิตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร มีปริมาตรการทำงาน 30 ลิตร ทำการทดลองโดยใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มัลแบบอัตโนมัติ ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจากการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ทำให้อาหารในถังหมักเกิดฟองในปริมาณมากและเป็นผลให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย จึงทำการลดอัตราการกวนเหลือเพียง 150 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อเริ่มต้นมีปริมาณ 1.3×10^8 CFU/ml และหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง สามารถตรวจนับปริมาณเชื้อได้เพียง 6×10^8 CFU/ml ซึ่งน้อยกว่าปริมาณเชื้อที่ผลิตได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาณน้ำตาลลดลงจาก 11.3 กรัมต่อลิตร เหลือ 0.7 กรัมต่อลิตร จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า สภาวะข้างต้นไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 50 ลิตร ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการลดอัตราการกวนผสมซึ่งทำให้อากาศกระจายในถังหมักไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

เมื่อทำการศึกษาโดยเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 2 vvm และควบคุมตัวแปรต่างๆ เช่นเดิม ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 14 จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในถังหมักมีค่าเท่ากับ 2.73×10^8 CFU/ml และเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.43×10^9 CFU/ml เมื่อเวลาเพาะเลี้ยงผ่านไป 30 ชั่วโมง เชื้อมีปริมาณลดลงเหลือเพียง 2.73×10^8 CFU/ml เมื่อสังเกตปริมาณน้ำตาลพบว่า จากน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 10.52 กรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 30 ชั่วโมงไม่ตรวจพบปริมาณน้ำตาลที่เหลืออีก



ภาพที่ 14 การเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (● pH; ○ total sugar concentration และ ■ Cell count)

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลในระบบหมัก หรือเชื้อไม่มีแหล่งอาหารคาร์บอน จะส่งผลให้เชื้อลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นเพื่อเป็นการรักษาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตให้ยังคงมีปริมาณสูงและมีอายุการเก็บรักษาได้นาน จึงปรับปรุงการทดลองโดยเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การเจริญของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (● pH; ○ total sugar concentration และ ■ Cell count)

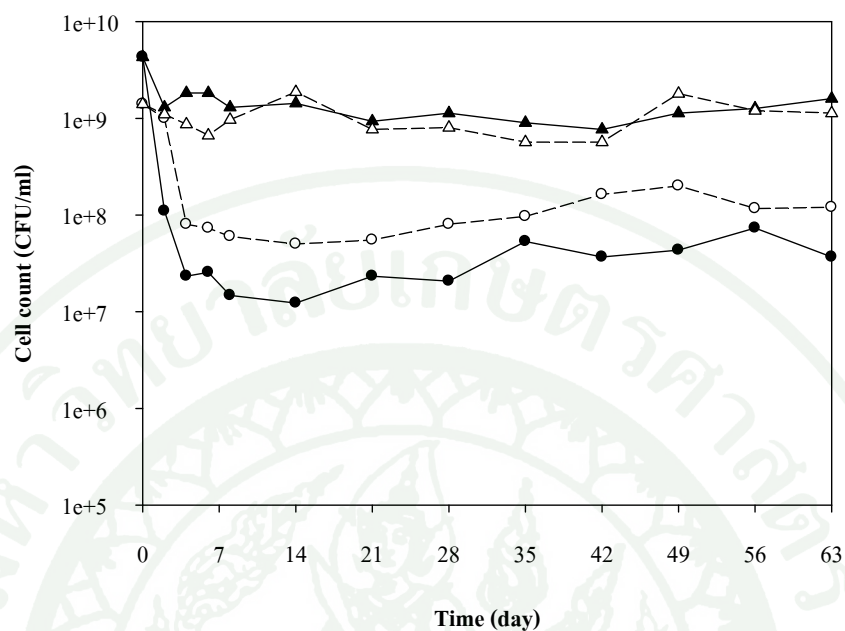
จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นในถังหมักเท่ากับ 3.00×10^8 CFU/ml และเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 7.67×10^9 CFU/ml โดยปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 20.21 กรัมต่อลิตร และที่เวลา 30 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 0.96 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามพบว่าการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตเชื้อได้ปริมาณ 10^9 CFU/ml เช่นกัน จึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นกากน้ำตาลเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อปุ๋ยน้ำชีวภาพและยังคงมีปริมาณน้ำตาลเหลือในระบบเพื่อช่วยรักษาปริมาณเชื้อในปุ๋ยน้ำให้คงที่ (10^9 CFU/ml) ซึ่งสามารถนำหัวเชื้อปุ๋ยน้ำที่ได้ไปเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการขยายกำลังการผลิตและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาก่อนการนำไปใช้งานต่อไป

6. ผลการศึกษาการทำปุ๋ยชีวภาพ

6.1 ผลการศึกษาการทำปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบน้ำ

การศึกษาสภาวะและระยะเวลาในการเก็บรักษาปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบน้ำ ทำการทดลองโดยนำหัวเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ใส่ในขวดพลาสติกที่สะอาด เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ระหว่างการเก็บรักษา ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 16 พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นในปุ๋ยน้ำเท่ากับ 10^9 CFU/ml เมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา 63 วัน ปุ๋ยน้ำที่เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังคงมีปริมาณเชื้อ 10^9 CFU/ml ในขณะที่ปุ๋ยน้ำที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 10^8 CFU/ml นอกจากนี้ยังพบว่า การเก็บรักษาปุ๋ยน้ำที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วย จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาปุ๋ยน้ำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อสูงกว่าสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

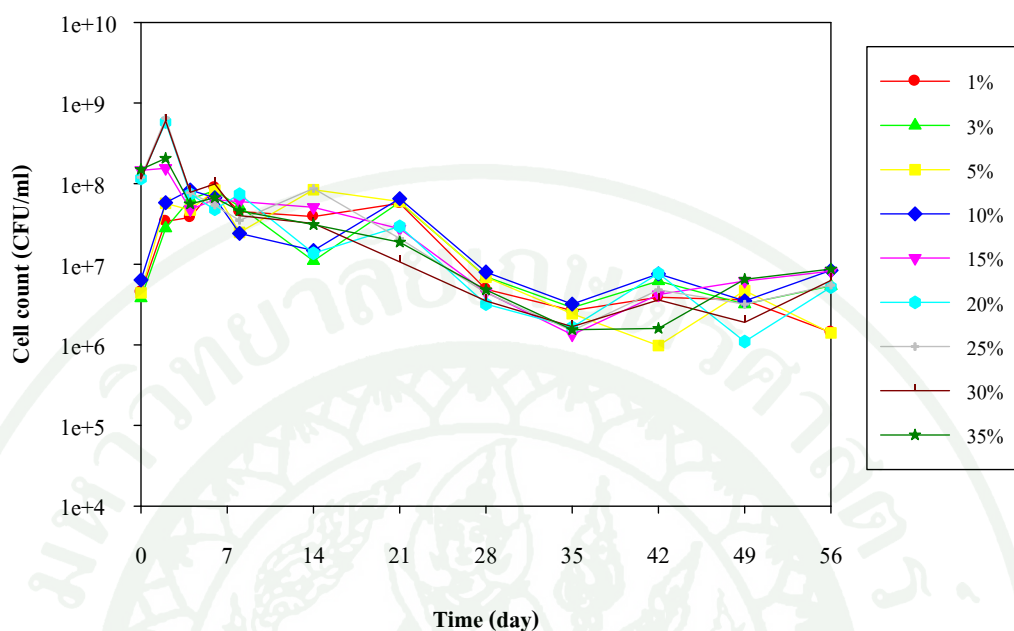
นอกจากนี้จากผลการทดลองในภาพที่ 16 ยังแสดงปริมาณเชื้อที่ตรวจนับหลังการนำปุ๋ยน้ำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการสร้างชีสต์ของเชื้อ โดยมีสมมติฐานที่ว่า เมื่อนำปุ๋ยน้ำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ หากเชื้อมีการสร้างชีสต์ระหว่างการเก็บรักษา ปริมาณเชื้อที่ตรวจนับได้หลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 24 ชั่วโมง ควรมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่าการตรวจนับเชื้อในวันที่เก็บตัวอย่างโดยตรง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเชื้อที่ตรวจนับหลังการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างจากปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดในวันที่เก็บตัวอย่างโดยตรง มีรายงานว่า การงอกของชีสต์สามารถเหนี่ยวนำได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจน (Burk's N-free medium) (Sadoff, 1975; Bonnei and Sadoff, 1973) แต่ในการทดลองนี้ นำปุ๋ยน้ำมาเลี้ยงในอาหาร Basal medium ซึ่งมี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นองค์ประกอบจึงไม่อาจสรุปได้ว่าเชื้อในปุ๋ยน้ำระหว่างการเก็บรักษาไม่มีการสร้างชีสต์เกิดขึ้น



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในปุ๋ยน้ำระหว่างการเก็บรักษา โดย —●— เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง; --○-- เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและนำมาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง; —▲— เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C; ---△--- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และนำมาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง

6.2 ผลการศึกษาการทำปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบแห้ง

การศึกษการทำปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบแห้งทำการทดลองโดยนำหัวเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (ผลการทดลองข้อ 4) คลุกผสมกับกากหม้อกรองในปริมาณ 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณเชื้อที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาแสดงผลดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 ในปุ๋ยน้ำผสมกากหมัก
กรองระหว่างการเก็บรักษา

จากผลการศึกษาพบว่า การผสมหัวเชื้อในอัตราส่วน 1-10 เปอร์เซ็นต์ (อัตราส่วนหัวเชื้อต่ำ) มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml และอัตราส่วน 15-35 เปอร์เซ็นต์ (อัตราส่วนหัวเชื้อสูง) มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/ml เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อที่มีชีวิตในช่วงเวลาต่าง ๆ จะสังเกตได้ว่าที่อัตราส่วนหัวเชื้อต่ำ ในช่วง 21 วันแรกปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดได้เพิ่มขึ้นจาก 10^6 CFU/ml เป็น 10^7 CFU/ml และเริ่มลดลง และคงที่ที่ 10^6 CFU/ml เมื่อเก็บปุ๋ยอยู่ในรูปปุ๋ยแห้งเป็นเวลา 63 วัน ในขณะที่การทดลองที่อัตราส่วนหัวเชื้อสูง พบว่า วันที่ 4 ของการทดลองปริมาณเชื้อลดลงจาก 10^8 CFU/ml เหลือ 10^7 CFU/ml และเมื่อเก็บไว้นานกว่า 21 วัน ปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดได้เป็นเช่นเดียวกับการทดลองที่อัตราส่วนหัวเชื้อต่ำ ทั้งนี้ปริมาณเชื้อที่ตรวจนับในวันที่เก็บตัวอย่าง และการนำปุ๋ยแห้งมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน (ตารางภาคผนวก ที่ ค19)

เมื่อนำปุ๋ยชีวภาพมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนระหว่างการเก็บรักษาแสดงผลการทดลองดังตารางที่ 8 พบว่า ปุ๋ยน้ำมีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และลดลงหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 21 วัน และเมื่อสุ่มตัวอย่างปุ๋ยรูปแบบแห้งมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยแบ่งการ

ทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือที่อัตราส่วนหัวเชื้อต่ำ (5 เปอร์เซ็นต์) และที่อัตราส่วนหัวเชื้อสูง (15 เปอร์เซ็นต์) พบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่ตรวจวัดได้มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบที่เวลาเดียวกันจะเห็นว่า ปุ๋ยแห้งที่ใช้อัตราส่วนหัวเชื้อต่ำ ปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าปุ๋ยแห้งที่ใช้อัตราส่วนหัวเชื้อสูง

จากผลการทดลองการตรวจวัดปริมาณเชื้อที่มีชีวิต และปริมาณไนโตรเจนในปุ๋ยรูปแบบแห้ง พบว่า ที่อัตราส่วนหัวเชื้อต่ำ มีความเหมาะสมทั้งในเรื่องต้นทุน และปริมาณไนโตรเจนที่สูงกว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 8 ปริมาณไนโตรเจนของปุ๋ยชีวภาพระหว่างการเก็บรักษา

วันที่	ตัวอย่าง/ ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)			
	ปุ๋ยน้ำที่อุณหภูมิห้อง	ปุ๋ยน้ำที่อุณหภูมิ 4 °C	ปุ๋ยแห้ง 5%	ปุ๋ยแห้ง 15%
0	0.03*	0.03*	0.27**	0.27**
7	0.03	0.06	0.36	0.36
14	0.04	0.04	0.42	0.38
21	0.04	0.04	0.50	0.42
28	0.01	0.01	0.63	0.44
63	0.02	0.02	0.50	0.61

หมายเหตุ * หมายถึงปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในปุ๋ยน้ำ

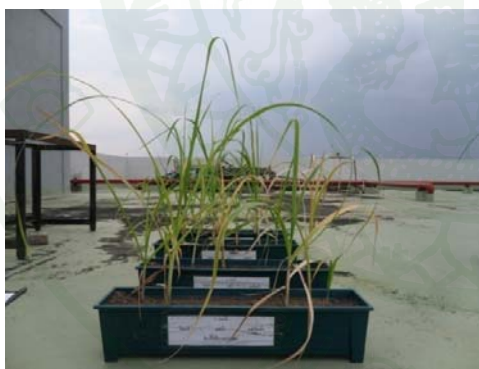
** หมายถึงปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในกากหมักกรอง

สิ่งสำคัญในการพิจารณาประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพคือจุลินทรีย์ที่อยู่ในปุ๋ยว่ายังคงมีชีวิตในระหว่างการผลิต การขนส่งและเก็บรักษา ตลอดจนสามารถแสดงกิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เมื่อนำไปใช้งานในแปลงปลูกพืชจริง Brar *et al.* (2012) รายงานว่าปุ๋ยชีวภาพที่อยู่ในรูปปุ๋ยน้ำมักจะมีอายุในการเก็บรักษาได้ยาวนานกว่าการเก็บในรูปปุ๋ยแห้ง ซึ่งเป็นการนำเอาปุ๋ยน้ำมาคลุกผสมกับสารตัวพา ทั้งนี้ปุ๋ยน้ำมักมีสารอาหารที่ช่วยปกป้องเซลล์และเหนี่ยวนำจุลินทรีย์ให้มีการสร้างสปอร์หรือซิสต์ซึ่งช่วยให้เก็บรักษาได้ยาวนาน

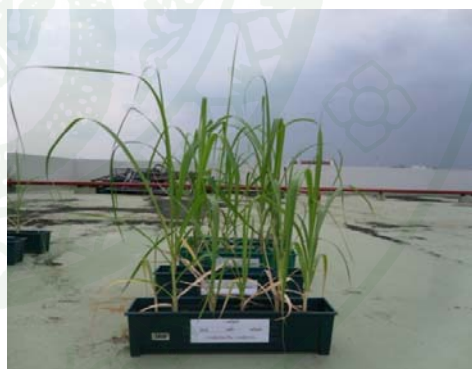
อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบคุณภาพปุ๋ยในการทดลองครั้งนี้ปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบแห้งมีความเหมาะสมมากกว่า ซึ่งอาจเป็นความจำเพาะของเชื้อ *A. vinelandii* นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่ออายุปุ๋ยประมาณ 30 วัน ปริมาณอัตราการรอดของเชื้อในรูปแบบน้ำและแบบแห้งไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ปริมาณไนโตรเจนที่ตรวจวัดได้ ในรูปแบบแห้งมีปริมาณสูงกว่าคือ 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในขณะที่รูปแบบน้ำเท่ากับ 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก สาเหตุมาจากในกากหมักกรองมีองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อทั้งเชื้อจุลินทรีย์ และพืชอยู่แล้ว อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่า ปุ๋ยในรูปแบบใดมีความเหมาะสมต่อการปลูกอ้อยมากกว่ากัน เนื่องจากการปลูกอ้อยปุ๋ยในรูปแบบน้ำ และแบบแห้งจะมีการให้ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งต้องนำไปศึกษาการปลูกอ้อยทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และแปลงทดลองต่อไป

7. การศึกษาการปรับปรุงดินและพืชทดสอบ

การศึกษาการปรับปรุงพืชทดสอบมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบคุณสมบัติของปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตจากหัวเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ต่อประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยทำการทดลองโดยใช้ท่อนพันธุ์อ้อยไม่แช่น้ำ, ท่อนพันธุ์อ้อยแช่น้ำ และท่อนพันธุ์อ้อยแช่ปุ๋ยน้ำ ปลูกในดิน 2 ลักษณะคือ ดินล้วน (ดินวันดีการเกษตร) และดินผสมกากหม้อกรอง โดยเปรียบเทียบความสูงต้นอ้อยในชุดควบคุมที่รดด้วยน้ำธรรมดาและต้นอ้อยที่รดด้วยปุ๋ยน้ำชีวภาพ ลักษณะของต้นอ้อยอายุ 3 เดือน ที่ปลูกในกระถางทดลอง แสดงดังภาพที่ 18 ความสูงเฉลี่ยของต้นอ้อยอายุ 1 และ 3 เดือน ที่ปลูกในกระถางทดลอง แสดงผลดังตารางที่ 9 พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (3 เดือน) อ้อยที่ปลูกด้วยวิธีการที่ 12 คือท่อนอ้อยแช่ปุ๋ยน้ำ ปลูกในดินร่วมกับกากหม้อกรองและรดด้วยปุ๋ยน้ำ มีความสูงเฉลี่ยสูงสุด (136.35 เซนติเมตร) รองลงมาเป็นวิธีการที่ 11 คือท่อนอ้อยแช่น้ำปลูกในดินร่วมกับกากหม้อกรองและรดน้ำ มีความสูงเฉลี่ย 113.40 เซนติเมตร โดยวิธีการที่ 1 คือท่อนอ้อยไม่แช่น้ำ ปลูกในดินล้วน รดด้วยน้ำธรรมดา มีความสูงเฉลี่ยต่ำสุด 74.80 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบความสูงต้นอ้อยที่ปลูกด้วยการเตรียมท่อนพันธุ์และดินชนิดเดียวกันพบว่า อ้อยที่รดด้วยปุ๋ยน้ำชีวภาพมีความสูงเฉลี่ยมากกว่าอ้อยที่รดด้วยน้ำธรรมดา



(a)



(b)

ภาพที่ 18 ต้นอ้อยอายุ 3 เดือน ที่ปลูกกระถางในระดับปฏิบัติการ (a) ต้นอ้อยที่ปลูกในดินวันดีการเกษตร (b) ต้นอ้อยที่ปลูกในดินผสมกากหม้อกรอง

ตารางที่ 9 แสดงความสูงของต้นอ้อยอายุ 1 และ 3 เดือน ที่ปลูกกระถางในระดับปฏิบัติการ

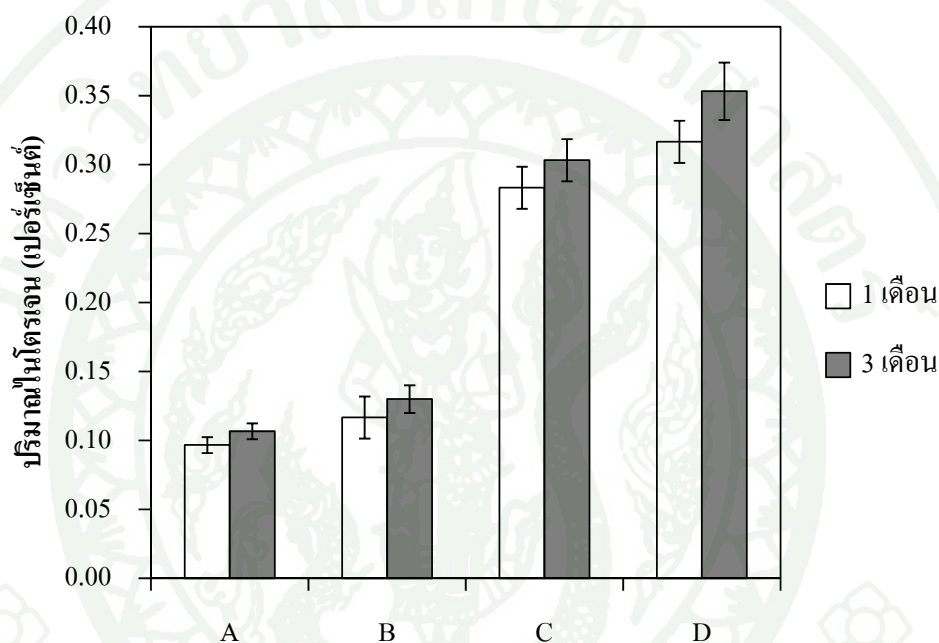
วิธีการ (Treatments, Tr)	ความสูงเฉลี่ยของอ้อย	
	1 เดือน	3 เดือน
1. ไม่แช่-ดินวันดี-รดน้ำ	22.65 ^c	74.80 ^h
2. ไม่แช่-ดินวันดี-รดปุ๋ย	53.75 ^{ab}	87.60 ^{ef}
3. แช่น้ำ-ดินวันดี-รดน้ำ	31.25 ^{de}	85.70 ^{efg}
4. แช่น้ำ-ดินวันดี-รดปุ๋ย	46.20 ^{bc}	97.35 ^d
5. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี-รดน้ำ	48.50 ^{abc}	88.85 ^e
6. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี-รดปุ๋ย	58.60 ^a	97.75 ^d
7. ไม่แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	29.70 ^{de}	82.95 ^{efg}
8. ไม่แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	30.40 ^{de}	82.15 ^{fg}
9. แช่น้ำ-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	39.30 ^{cd}	80.10 ^{gh}
10. แช่น้ำ-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	44.00 ^{bc}	106.05 ^c
11. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	50.80 ^{ab}	113.40 ^b
12. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	52.25 ^{ab}	136.35 ^a
ค่าเฉลี่ย	42.28	94.42
F-test	*	*
CV(%)	27.08	18.34

หมายเหตุ ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษร

เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

* = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

เมื่อนำดินที่ใช้ในการปลูกอ้อยไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldah method พบว่าดินวันดีการเกษตรมีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ และกากหม้อกรองมีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น 0.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำดินและกากหม้อกรองไปปลูกอ้อยตามแผนการทดลอง ปริมาณไนโตรเจนหลังการปลูกอ้อยเป็นเวลา 1 และ 3 เดือน แสดงดังภาพที่ 19 โดยพบว่าในทุกชุดการทดลอง ดินที่รดด้วยปุ๋ยน้ำมีปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าดินที่รดด้วยน้ำธรรมดา



ภาพที่ 19 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดินหลังการปลูกอ้อยเป็นเวลา 1 และ 3 เดือน

เมื่อ A หมายถึง ปลูกด้วยดินล้วน รดน้ำ

B หมายถึง ปลูกด้วยดินล้วน รดปุ๋ยน้ำ

C หมายถึง ปลูกด้วยดินผสมกากหม้อกรอง รดน้ำ

D หมายถึง ปลูกด้วยดินผสมกากหม้อกรอง รดปุ๋ยน้ำ

เนื่องจากการวัดไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl แสดงผลออกมาเป็นปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งไม่อาจบ่งบอกศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter* ได้โดยตรง จึงต้องมีการทดลองเพื่อทดสอบศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter* ที่เติมลงในดิน โดยการเก็บตัวอย่างรากอ้อยและดินที่ใช้ในการปลูกอ้อยไปทดสอบด้วยวิธี Acetylene reduction assay เพื่อประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจิเนส ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนสของรากอ้อยและดินที่ปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน แสดงดังตารางที่ 10 และ 11 ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนส ($\text{mmol C}_2\text{H}_2/\text{g/hr}$) ของรากอ้อยที่ปลูกเป็นเวลา 3 เดือน

วิธีการ (Treatments, Tr)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนส ($\text{mmol C}_2\text{H}_2/\text{g/hr}$)
1. ไม่แช่-ดินวันดี-รดน้ำ	15.54 ± 1.48^c
2. ไม่แช่-ดินวันดี-รดปุ๋ย	34.58 ± 2.47^{bc}
3. แช่น้ำ-ดินวันดี-รดน้ำ	24.22 ± 0.95^d
4. แช่น้ำ-ดินวันดี-รดปุ๋ย	37.48 ± 1.05^{ab}
5. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี-รดน้ำ	22.40 ± 0.81^d
6. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี-รดปุ๋ย	35.10 ± 0.67^{abc}
7. ไม่แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	14.86 ± 0.49^c
8. ไม่แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	33.96 ± 1.18^c
9. แช่น้ำ-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	23.70 ± 1.68^d
10. แช่น้ำ-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	37.70 ± 0.91^a
11. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	24.84 ± 1.37^d
12. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	35.57 ± 0.79^{abc}
ค่าเฉลี่ย	28.33
F-test	*
CV(%)	29.56

หมายเหตุ ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ตัวเลขในสมมติเดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

* = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 11 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ($\text{mmol C}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$) ในดินที่ปลูกอ้อยเป็นเวลา 3 เดือน

วิธีการ (Treatments, Tr)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ($\text{mmol C}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$)
1. ดินวันดี รดน้ำ	2.32 ± 0.70
2. ดินวันดี รดปุ๋ยน้ำ	3.36 ± 1.18
3. ดินผสมกากหม้อกรอง รดน้ำ	3.16 ± 0.74
4. ดินผสมกากหม้อกรอง รดปุ๋ยน้ำ	4.32 ± 0.19
ค่าเฉลี่ย	3.29
F-test	ns
CV(%)	24.99

หมายเหตุ ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ตัวเลขในสมมติเดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์
 ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

จากผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของรากอ้อยในตารางที่ 9 พบว่า รากอ้อยจากการทดลองที่ 10 (แฉ่น้ำ-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย) แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุด $37.70 \text{ mmolC}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$ รองลงมาคือรากอ้อยจากการทดลองที่ 4 ($37.48 \text{ mmolC}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$) และรากอ้อยจากการทดลองที่ 7 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสต่ำสุด ($14.86 \text{ mmolC}_2\text{H}_4/\text{g/hr}$) โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างอ้อยที่ปลูกด้วยวิธีการเดียวกัน พบว่า รากอ้อยที่ได้รับการรดด้วยปุ๋ยน้ำแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงกว่ารากอ้อยที่รดด้วยน้ำธรรมดา ในขณะที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสในดินที่รดด้วยปุ๋ยน้ำสูงกว่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสในดินที่รดด้วยน้ำธรรมดาเช่นกัน (ตารางที่ 10) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Azotobacter* ที่รดลงในดินช่วยส่งเสริมกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนแก่อ้อยและปรับปรุงคุณภาพของดิน นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสในรากอ้อยสูงกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสในดิน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Azotobacter* มักจะอาศัยอยู่บริเวณรากพืช

จากผลการทดลองปลูกอ้อยในระดับปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Azotobacter* สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยช่วยเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย Hari and Srinivasan (2009) ศึกษาการตอบสนองของอ้อยต่อปุ๋ยชีวภาพจากเชื้อ 3 ชนิด คือ *Azotobacter*, *Azospirillum* และ *Gluconacetobacter* พบว่าเชื้อ *Azotobacter* ช่วยให้ผลผลิตอ้อย

ปริมาณน้ำตาล และปริมาณไนโตรเจนในต้นอ้อยเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ นอกจากนี้ Gosal *et al.* (2012) ศึกษาผลของการใช้เชื้อ *Azotobacter* ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตอ้อย โดยการนำเชื้อ *Azotobacter chroococcum* คลุกผสมกับผงถ่าน (activated charcoal) และนำไปใช้ร่วมกับการปลูกอ้อยที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนสองระดับ คือ 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอ้อยที่ได้รับเชื้อ *Azotobacter* มีปริมาณผลได้คือ ค่า Commercial Cane Sugar per cent (CCS%) สูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อดังกล่าว

จากผลการทดลองปลูกอ้อยข้างต้นพบว่า การใช้ดินผสมกากหมักกรองในการปลูกอ้อยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยมากกว่าการปลูกด้วยดินล้วน เนื่องจากกากหมักกรองเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานน้ำตาลซึ่งยังคงมีธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช โดย Gilbert *et al.* (2008) รายงานว่าการใช้ปุ๋ยกากหมักกรองในการปลูกอ้อยช่วยเพิ่มผลได้ของปริมาณน้ำตาลในอ้อยสูงกว่าการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ โดยการใส่กากหมักกรองร่วมกับธาตุอาหารชนิดอื่นช่วยเพิ่มผลได้ของอ้อยมากกว่าการใช้กากหมักกรองเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้แล้วปุ๋ยชีวภาพที่ได้จากการทดลองมีธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ต่ำกว่าปุ๋ยเคมี แต่มีธาตุอาหารอื่นๆ ซึ่งปุ๋ยเคมีไม่มี ดังนั้นจึงควรใช้ปุ๋ยชีวภาพ ร่วมกับวัสดุปรับปรุงคุณภาพดินอื่นๆ เช่น ปุ๋ยเคมี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตให้แก่พืช ทั้งนี้การใช้ปุ๋ยชีวภาพยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อปุ๋ยเคมีลงด้วย

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลักซ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ค่าความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที ตามลำดับ ความเข้มข้นเริ่มต้นกลูโคสอยู่ที่ 1-2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อศึกษาการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตเชื้อโดยใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาลมาแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ พบว่า ความเข้มข้นกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 คือ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งสามารถผลิตเซลล์ได้ประมาณ 10^9 CFU/ml ในระยะเวลา 30 ชั่วโมง และพบว่าเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเชื้อจะมีการสร้างชีสต์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

2. การศึกษาการเพิ่มปริมาณเชื้อโดยขยายการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 50 ลิตร พบว่า ในถังหมักขนาด 5 ลิตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 คือที่สภาวะที่มีการให้อากาศ 1 vvm ความเข้มข้นเริ่มต้นกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 และอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 1.13×10^9 CFU/ml ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในขณะที่การศึกษาในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อคือ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 vvm โดยสามารถผลิตเชื้อได้ปริมาณ 7.50×10^9 CFU/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง

3. การเปรียบเทียบคุณภาพปุ๋ยในรูปแบบน้ำและแบบแห้ง เมื่อวัดจากปริมาณอัตราการรอดของเชื้อพบว่า ปุ๋ยที่อายุประมาณ 30 วัน ปริมาณอัตราการรอดของเชื้อในรูปแบบน้ำและแบบแห้งไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ปริมาณไนโตรเจนที่ตรวจวัดได้ในรูปแบบแห้งมีปริมาณสูงกว่าปุ๋ยน้ำ อาจเนื่องจากในรูปแบบแห้งมีความเข้มข้นสูงกว่า อย่างไรก็ตามปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัยที่กล่าวมายังไม่สามารถสรุปได้ว่า ปุ๋ยในรูปแบบใดมีความเหมาะสมต่อการปลูกอ้อยมากกว่ากัน เนื่องจากการปลูกอ้อยปุ๋ยในรูปแบบน้ำ และแบบแห้งจะมีการให้ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน จึงต้องนำไปศึกษาการปลูกอ้อยทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และแปลงทดลองต่อไป

4. การศึกษาผลของปุ๋ยชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของอ้อย พบว่า การทดลองที่ 12 (ท่อนอ้อยแช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหมักกรอง-รดปุ๋ย) ต้นอ้อยมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 94.30 เซนติเมตร และการทดลองที่ 1 (ท่อนอ้อยไม่แช่-ดินวันดี-รดน้ำ) ความสูงของอ้อยเฉลี่ยต่ำสุด 48.73 เซนติเมตร ทั้งนี้ ปริมาณไนโตรเจนและค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสในกลุ่มตัวอย่างที่รดด้วยปุ๋ยน้ำชีวภาพสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่รดด้วยน้ำธรรมดาเช่นกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการนำปุ๋ยชีวภาพไปใช้ในการทดลองกับพืชในแปลงทดลองต่อไป โดยนอกเหนือจากการวัดความสูงต้นอ้อยแล้ว ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพในการปรับปรุงอ้อยด้านอื่นๆ ควบคู่กันไป เช่น น้ำหนักราก น้ำหนักลำต้น ผลผลิตอ้อย (ปริมาณน้ำตาล ค่าความหวาน) เป็นต้น
2. เนื่องจากปุ๋ยหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำมีธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ต่ำกว่าปุ๋ยเคมี แต่มีธาตุอาหารอื่นๆ ซึ่งปุ๋ยเคมีไม่มี ดังนั้นจึงควรใช้ปุ๋ยหมักชีวภาพ หรือปุ๋ยน้ำร่วมกับปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตให้แก่พืช
3. ในแต่ละช่วงการเจริญเติบโตของพืช พืชมีความต้องการสารอาหารในระดับที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการนำปุ๋ยหมักชีวภาพ หรือปุ๋ยน้ำไปใช้กับพืชแต่ละชนิด จะต้องทำการทดลองหาอัตราการใช้ที่เหมาะสม ระยะเวลาในการฉีดพ่น และปริมาณของปุ๋ยที่ใช้ให้เหมาะสมกับพืชนั้นๆ ด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2545. เอกสารวิชาการปุ๋ยชีวภาพ. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

คณิต วิจิตพันธุ์, พัฒนา เหล่าไพบูลย์, ลักษณะ เหล่าไพบูลย์, สุกานดา วิจิตพันธุ์ และ ศราวุฒิ โกลสุนันท์. 2548. การศึกษาศักยภาพในการใช้ *Azotobacter vinelandii* เพื่อลดปริมาณไนยาในต้นจากน้ำเสียที่มีไนยาในต้นปนเปื้อน. คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิทยา มะเสนา. 2526. จุลชีววิทยาทางดิน. ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ธงชัย มาลา. 2550. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, จิรวัดน์ พุ่มเพชร และ วันทนีย์ พึ่งแสง. 2534. การใช้เชื้อ *Azotobacter* เป็นปุ๋ยชีวภาพ. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, ประยูร เพียตะเณร, จิรวัดน์ พุ่มเพชร และ วันทนีย์ พึ่งแสง. 2540. การใช้เชื้อ *Azotobacter* ปุ๋ยหมักและหินฟอสเฟตเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อการผลิตพืช: II การศึกษาผลกระทบของการใช้เชื้ออะซิโตแบคเตอร์ ร่วมกับปุ๋ยหมักที่มีต่อการผลิตข้าวโพดหวานในชุดดินกำแพงแสน. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บรรหาร แดงจำ, แดน พึ่งแสง, จิรยุทธ ตันวิญกุล และ เย็นใจ วสุวัต. 2527. การศึกษา *Azotobacter* ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนให้แก่ข้าวโพดในแปลงทดลอง. รายงานผลการวิจัยกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

_____ และ สมปอง หมั่นแจ้ง. 2536. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนและปุ๋ยไนโตรเจนต่อการตรึงไนโตรเจน และการเจริญเติบโตของข้าวฟ่าง. รายงานผลการวิจัยจุลินทรีย์ดิน ปี 2536. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ราเชนทร์ วิสุทธิแพทย์ และ ศิริธรรม สิงห์โต. 2551. ปุ๋ยอินทรีย์-ปุ๋ยชีวภาพ ทางเลือกใหม่เพื่อการเกษตร. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, ปทุมธานี .

วลัยกานต์ เจียมเจตจรรยา, วิรัช สุขสรานู และ สมศักดิ์ เกาทอง. 2549. การศึกษาวิจัยการจัดการเพิ่มผลผลิตพืชอาหารสัตว์ในพื้นที่ดินเสื่อมโทรมตำบลเขาชะงุ้ม (การตอบสนองต่อกากอ้อยดำและปุ๋ยไนโตรเจนของพืชอาหารสัตว์ในพื้นที่ดินเสื่อมโทรม). รายงานผลงานวิจัยกองอาหารสัตว์ ประจำปี พ.ศ. 2549. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

วิรัช สุขสรานู, ไพฑูรย์ พลสนะ และ เกียรติศักดิ์ มูลคำภา. 2520. การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของดินหุตราขบุรีโดยใช้อินทรีย์วัตถุ. รายงานประจำปี 2520. สำนักงานเกษตรภาคกลางสำนักงานปลัด กระทรวง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สายพิน ไชยนันท์. 2547. จุลินทรีย์ดิน. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม. 2555. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อย ปีการผลิต 2554/55. แหล่งที่มา: <http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-3963.pdf>, 25 มิถุนายน 2555.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2555. ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าปุ๋ยเคมี. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/download/FactorOfProduct/Fertilizer_value49-54.html, 25 มิถุนายน 2555.

สุกฤกษ์ กลิ่นหวล. 2547. อิทธิพลของระยะแถวปลูกและอัตราปุ๋ยไนโตรเจนที่มีต่อการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของอ้อยปลูก ทั้งข้ามแล้งและต้นฝนในกลุ่มดินเนื้อหยาบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

เศรษฐา สิริพิณฑุ. 2529. อิทธิพลของการใช้เชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของอ้อย
บางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หนึ่ง เตียอำรุง. 2554. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

Ard-El-Malik, Y. 1971. Free living nitrogen fixation bacteria soil and their possible contribution
to soil fertility. **Plant Soil**. Special: 423-442.

Aly, M. M., H. E. A. Sayed, S. D. Jastaniah. 2012. Synergistic effect between *Azotobacter*
vinelandii and *Streptomyces* sp. isolated from saline soil on seed sermination and growth
of wheat plant. **J. Am. Sci.** 8(5): 667-676.

Brown, M.E. and S.K. Burlingham. 1968. Production of plant growth substance by *Azotobacter*
Chroococcum. **Plant Soil** 31: 209-223.

Damir, O., P. Mladen, Š. Božidar and N. Srdan. 2011. Cultivation of the bacterium *Azotobacter*
chroococcum for preparation of biofertilizers. **Afr. J. Biotechnol.** 10(16): 3104-3111.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. **Current world fertilizer trends
and outlook to 2012**. Rome, Italy.

Gilbert, R. A., D. R. Morris, C. R. Rainbolt, J. M. McCray, R. E. Perdomo, B. Eiland, G. Powell
and G. Montes. 2008. Sugarcane response to mill mud, fertilizer, and soybean nutrient
sources on a sandy soil. **Agron. J.** 100(3): 845-854.

Gosal , S. K., A. Kalia, S. K. Uppal, R. Kumar, S. S. Walia K. Singh and H. Singh. 2012.
Assessing the benefits of *Azotobacter* bacterization in sugarcane: a field appraisal. **Sugar
Tech.** 14(1):61-67

- Hari, K. and T.R. Srinivasan. 2005. Response of sugarcane varieties to application of nitrogen fixing bacteria under different nitrogen levels. **Sugar Tech.** 7(2&3): 28-31.
- Inamdar, S., R. U. Kanitkar and M. G. Watve. 2000. Longevity of *Azotobacter* cysts and a model for optimization of cyst density in liquid bioinoculants. **Curr. Sci.** 78(6): 719-722.
- Jan, S., T. Parween, Mahmooduzzafar and T.O. Siddiqi. 2009. Comparative effect of *Azotobacter*, *Mycorrhizal* inoculum and nitrogen fertilizer on biochemical, growth and productivity aspects in *Vicia faba* l. **Am.-Eurasian J. Sustain. Agric.** 3(4): 684-693.
- Kapoor, K.K., Yadav, K.S., Singh, D.P., Mishra, M.M. and P. Tauro. 1983. Enrichment of compost by *Azotobacter* and phosphate solubilising microorganisms. **Agr. Wastes** 5: 125-133.
- Khan, I., A. Masood and A. Ahmad. 2010. Effect of nitrogen fixing bacteria on plant growth and yield of *Brassica juncea*. **J Phytol.** 2(9): 25-27.
- Kumar, R., Verma, D., Singh, B.L., Kumar, U. and Shweta. 2010. Composting of sugar-cane waste by-products through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. **Bioresource Technol.** 101: 6707-6711.
- Layne, J. S. and E. J. Johnson. 1964. Resistant properties of *Azotobacter* cyst induced in response to mineral deficiencies. **J. Bacteriol.** 88 (4): 956-959.
- Shende, S.T., R.G. Apte and T. Singh. 1977. Influence of *Azotobacter* on germination of rice and cotton seeds. **Curr. Sci.** 46: 675.
- Siliman, C. E. and L. E. C. JR. 1986. Cyst formation versus poly- β -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. **Soil Biol. Biochem.** 18 (1): 23-28.
- Socolofsky, M. D. and O. Wyss. 1961. Cysts of *Azotobacter*. **J. Bacteriol.** 81:946-954.

_____. 1962. Resistance of the *Azotobacter* cyst. **J. Bacteriol.** 84: 119-124.

Stevenson L. H. and M. D. Socolofsky. 1966. Cyst formation and poly-3-hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. **J. Bacteriol.** 91(1): 304-310.

Stewart, W.D.P. 1975. **Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganism**. Cambridge University Press, Cambridge, London.

Surhone, L. M., M. T. Tennoe and S. F. Henssonow. 2011. *Azotobacter Vinelandii*. Available Source: <https://www.morebooks.de/store/gb/book/azotobacter-vinelandii/isbn/978-613-7-61616-1>, June 15, 2012.

Muchow, R.C., Robertson M.J., Wood A.W. and B.A. Keating. 1996. Effect of nitrogenb on the time-course accumulation in sugarcane. **Field Crop Res.** 47: 143-153.

Narula, N. 2000. **Azotobacter in Sustainable Agriculture**. CBS Publishers & Distributors, New Delhi.

Pandey, M.B. and S.K. Shukla. 2000. Quality and productivity of promising sugarcane (*Saccharum officinarum*) genotypes under various planting seasons and nitrogen levels in subtropical India. **Indian J. Agron.** 45: 617-623.

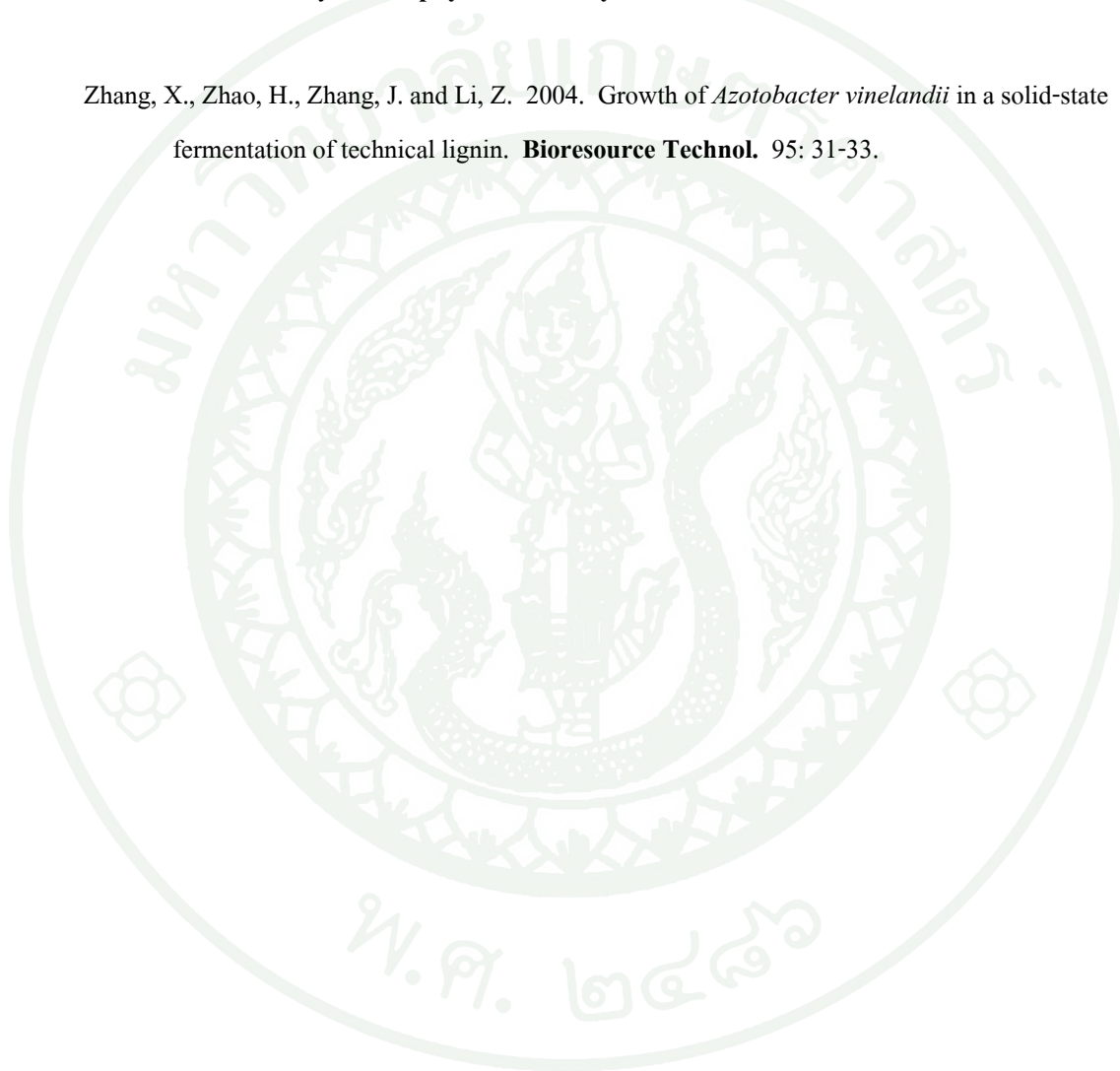
Paturau, J. M. 1989. **By-products of the cane sugar industry: an introduction to their industrial utilization**. Elsevic Publishing Co, Amsterdam.

Pena, C., C. Reyes, P. Larralde-Corona, G. Corkidi and E. Galindo. 2002. Characterization of *Azotobacter vinelandii* aggregation in submerged culture by digital image analysis. **FEMS Microbiol. Lett.** 207: 173-177.

Shende, S.T., R.G. Apte and T. Singh. 1977. Influence of *Azotobacter* on germination of rice and cotton seeds. **Curr. Sci.** 46: 675.

Wyss, O., M. G. Neumann and M. D. Socolofsky. 1961. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. **J Biophys Biochem Cytol.** 10(4): 555–565.

Zhang, X., Zhao, H., Zhang, J. and Li, Z. 2004. Growth of *Azotobacter vinelandii* in a solid-state fermentation of technical lignin. **Bioresource Technol.** 95: 31-33.







อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium

ปริมาณสาร (ต่อลิตร)

Glucose	10	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	กรัม
MgSO_4	0.2	กรัม
CaSO_4	0.1	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
Mo-Fe Solution	2	มิลลิลิตร

หมายเหตุ - Mo-Fe Solution ประกอบด้วย (ต่อลิตร) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.253 กรัม และ

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.45 กรัม

- นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

การศึกษาโครงสร้างของชีสต์ โดยวิธีของ Schaeffer และ Fulton

การศึกษาโครงสร้างของชีสต์โดยวิธีของ Schaeffer และ Fulton ใช้สี malachite green เป็นสีแรกและใช้สี safanin O เป็นสีที่สองหรือสีย้อนทับ มีวิธีการดังนี้

1. เตรียมสไลด์สเมียร์เชื้อและครึ่งเซลล์โดยผ่านเปลวไฟ
2. วางสไลด์พาดบนไอน้ำเดือดพร้อมทั้งหยดสี malachite green ให้ท่วมรอยสเมียร์ คอยเติมสีอย่าให้แห้งจนครบเวลา 10 นาที
3. เมื่อสไลด์เย็นแล้ว นำไปล้างสีออกโดยผ่านน้ำปะปาเบาๆ จนน้ำล้างไม่มีสีติดออกมา ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ
4. ย้อมทับ (counterstain) โดยการหยดสี safanin O ลงไปให้ท่วมบริเวณสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำปะปา ซับให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. ตัวเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ K_2SO_4 อัตราส่วน 0.8:7 (โดยน้ำหนัก)
3. สารละลาย NaOH 15 % (w/w) (สำหรับดักไอกรด)
4. สารละลาย NaOH 40 % (w/w) (สำหรับกลั่น)
5. สารละลายบอริก 4 % (w/w)
6. สารละลายอินดิเคเตอร์ (Bromocresal green และ Methyl red)
7. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.5 – 1.0 กรัม จดน้ำหนักที่แน่นอน (W) ใส่ลงในหลอดย่อย
2. เติมตัวเร่งปฏิกิริยา 1 ช้อน (ประมาณ 7 กรัม) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 – 15

มิลลิลิตร

3. นำเข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 °C ทำการย่อยตัวอย่างในตู้ดูดควัน (เปิดเครื่องดักจับไอกรด) จนตัวอย่างเป็นสารละลายสีเขียวใส ยกหลอดย่อยออกมามัดฟักไว้ให้เย็น

4. นำเข้ากลั่นในชุดกลั่นโดยใส่ขวครูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุกรดบอริก 4% 25 มิลลิลิตร และอินดิเคเตอร์ ในแท่นรองรับไนโตรเจนที่กลั่นได้

5. เมื่อกลั่นเสร็จแล้วนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N เมื่อถึงจุดยุติสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้ (A)

หมายเหตุ Blank วิเคราะห์ตามหัวข้อ 2-5 โดยบันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรท (B)

การคำนวณผล

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{1.4 \times (A - B) \times N}{W}$$

เมื่อ	A	=	ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
	B	=	ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)
	N	=	ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอลิตี)
	W	=	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

พ.ศ. ๒๕๕๖

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วยวิธี Acetylene reduction assay

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วยวิธี Acetylene reduction assay มีวิธีการดังนี้

1. เก็บตัวอย่างรากอ้อยและดิน นำมาล้างและจดน้ำหนักที่แน่นอน
2. นำตัวอย่างใส่ในขวดโหลแก้ว ปิดฝา จากนั้นดูดอากาศออกจากขวดแก้ว 50 ml และฉีดแก๊สอะเซทิลีน 50 ml แทนที่ลงในขวดแก้ว
3. นำขวดตัวอย่างบ่มในดินเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
4. เก็บแก๊สที่อยู่ในขวด 10 ml นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC
5. นำตัวอย่างบางส่วนไปหาปริมาณความชื้นเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณ

การคำนวณปริมาณแก๊สโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

จากกราฟมาตรฐานได้สมการ คือ $y = 9000000x$

ดังนั้น $x = y / 9000000$

โดยที่ y คือ พื้นที่ area ที่มากที่สุดที่ได้ผลการทดลองจาก GC

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มาหาร น.น.แห้ง หาค่าจำนวนชั่วโมงที่บ่ม มีหน่วยเป็น $\text{molC}_2\text{H}_2/\text{hr/g}$

พ.ศ. ๒๕๕๖



1. สภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาस्क

ตารางผนวกที่ ค1 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาस्क ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Time (h)	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	5.80	6.49	6.81	6.84
24	5.57	5.57	6.08	6.26
48	5.28	5.04	5.75	6.23
72	5.14	5.00	5.50	6.18

ตารางผนวกที่ ค2 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาस्क ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Time (h)	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	5.71	6.44	6.71	6.82
24	5.34	5.50	5.68	5.93
48	5.40	5.27	5.56	5.92
72	5.35	5.35	5.57	5.97

ตารางผนวกที่ ค3 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาस्क ที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Time (h)	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	5.70	6.33	6.71	6.77
24	5.40	5.24	5.33	6.07
48	5.19	5.00	5.18	5.97
72	5.24	5.08	5.19	5.20

ตารางผนวกที่ ๔ การเปลี่ยนแปลงพีเอชในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาสก์ ที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Time (h)	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	6.03	6.41	6.79	6.81
24	5.75	6.39	6.70	6.73
48	5.61	5.35	5.22	5.72
72	4.16	3.63	4.80	5.70

ตารางผนวกที่ ๕ การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาสก์ ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Time (h)	ปริมาณเซลล์ (CFU/ml)			
	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	4.40×10^4	6.90×10^4	9.10×10^4	5.40×10^4
24	3.00×10^6	8.00×10^7	2.20×10^8	2.50×10^8
48	5.00×10^5	1.10×10^7	2.30×10^8	6.00×10^8
72	1.00×10^5	5.00×10^4	1.30×10^8	5.00×10^8

ตารางผนวกที่ ๖ การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลาสก์ ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Time (h)	ปริมาณเซลล์ (CFU/ml)			
	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	3.80×10^4	7.20×10^4	4.10×10^4	1.60×10^4
24	5.80×10^6	3.40×10^7	2.00×10^8	1.00×10^8
48	2.70×10^5	8.80×10^5	8.40×10^6	3.00×10^6
72	2.90×10^3	9.70×10^2	7.10×10^5	5.20×10^5

ตารางผนวกที่ ๗ การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับพลาสติก ที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Time (h)	ปริมาณเซลล์ (CFU/ml)			
	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	5.00×10^4	9.80×10^4	6.70×10^4	8.30×10^4
24	3.00×10^8	4.20×10^8	1.70×10^9	2.00×10^9
48	9.80×10^5	5.60×10^5	6.80×10^7	3.00×10^7
72	0.00	0.00	1.00×10^6	6.20×10^6

ตารางผนวกที่ ๘ การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับพลาสติก ที่อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Time (h)	ปริมาณเซลล์ (CFU/ml)			
	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	6.00×10^4	4.50×10^3	6.50×10^3	2.00×10^4
24	7.80×10^5	1.00×10^6	4.20×10^7	6.80×10^8
48	4.00×10^7	7.20×10^8	9.30×10^8	8.00×10^8
72	9.00E+05	2.00×10^7	7.40×10^7	2.80×10^7

ตารางผนวกที่ ๙ การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับพลาสติกที่สภาวะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

pH	30 °C, 200 rpm, 48 h	35 °C, 200 rpm, 24 h	30 °C, 250 rpm, 24 h	35 °C, 250 rpm, 48 h
6.0	5.00×10^5	5.80×10^6	3.00×10^8	4.00×10^7
6.5	1.10×10^7	3.40×10^7	4.20×10^8	7.20×10^8
7.0	2.30×10^8	2.00×10^8	1.70×10^9	9.30×10^8
7.5	6.00×10^8	1.00×10^8	2.00×10^9	8.00×10^8

2. ผลการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับพลาสติก

ตารางผนวกที่ ค10 การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส 1, 2 และ 3 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Time (h)	pH		
	กลูโคส 1 % (w/v)	กลูโคส 2 % (w/v)	กลูโคส 3 % (w/v)
0	6.68	6.55	6.42
24	6.11	5.89	5.79
48	6.02	5.79	5.75
72	5.87	5.74	5.71

ตารางผนวกที่ ค11 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส 1, 2 และ 3 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Time (h)	ปริมาณเซลล์ (CFU/ml)		
	กลูโคส 1 % (w/v)	กลูโคส 2 % (w/v)	กลูโคส 3 % (w/v)
0	2.8×10^4	6.0×10^4	4.8×10^4
24	5.0×10^8	3.0×10^8	4.0×10^8
48	1.0×10^9	2.5×10^9	5.0×10^8
72	8.0×10^7	5.0×10^8	8.9×10^7

3. ผลการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับฟลasks

ตารางผนวกที่ ค12 การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญเติบโตของ *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Time (h)	pH		
	กากน้ำตาล 1 % (w/v)	กากน้ำตาล 2 % (w/v)	กากน้ำตาล 4 % (w/v)
0	6.96	6.85	6.77
24	6.74	6.88	7.07
30	6.72	6.9	7.08
48	6.98	6.81	6.97
72	7.11	7.22	7.13

ตารางผนวกที่ ค13 การเจริญเติบโตของ *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลและน้ำตาลซูโครส 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Time (h)	ปริมาณเซลล์ (CFU/ml)		
	กากน้ำตาล 1 % (w/v)	กากน้ำตาล 2 % (w/v)	กากน้ำตาล 4 % (w/v)
0	2.6×10^7	2.0×10^7	7.0×10^6
24	6.7×10^8	6.7×10^8	6.7×10^8
30	5.7×10^8	2.3×10^9	7.0×10^8
48	3.0×10^7	1.2×10^9	7.3×10^8
72	1.1×10^7	1.9×10^8	7×10^8

ตารางผนวกที่ 14 ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเจริญเติบโตของ *A. vinelandii* TISTR 1094 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาล 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Time (h)	Total sugar (g/l)		
	กากน้ำตาล 1 % (w/v)	กากน้ำตาล 2 % (w/v)	กากน้ำตาล 4 % (w/v)
0	5.63	11.75	21.82
24	2.26	6.62	17.22
30	1.15	5.56	16.97
48	0.79	2.73	13.16
72	0.5	0.25	7.18

4. การศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างชีสของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางผนวกที่ 15 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Time (h)	pH	Cells count (CFU/ml)	Total sugar concentration (g/l)
0	6.95	3.44×10^7	11.18
4	6.93	1.90×10^8	11.41
8	6.94	3.60×10^8	9.85
24	6.96	1.13×10^9	5.61
30	6.95	7.50×10^8	4.90
48	6.96	4.10×10^8	4.19
72	6.99	1.11×10^8	3.00

5. ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในระดับถังหมักขนาด 50 ลิตร

ตารางผนวกที่ ค16 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Time (h)	pH	Cells count (CFU/ml)	Total sugar concentration (g/l)
0	6.83	2.73×10^8	10.52
4	7.00	1.83×10^8	8.97
8	6.99	9.00×10^8	4.59
24	6.91	1.43×10^9	0.00
30	6.85	2.37×10^8	0.00

ตารางผนวกที่ ค17 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Time (h)	pH	Cells count (CFU/ml)	Total sugar concentration (g/l)
0	6.84	3.00×10^8	20.21
4	7.23	1.07×10^8	18.71
8	7.07	1.73×10^8	14.80
24	7.02	7.50×10^9	1.96
30	6.93	7.67×10^9	0.96

6. ผลการศึกษาการทำปฏิกิริยาชีวภาพ

6.1 ผลการศึกษาการทำปฏิกิริยาชีวภาพในรูปแบบน้ำ

ตารางผนวกที่ ค18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในปุ๋ยน้ำระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (วัน)	สถานะการเก็บรักษาตัวอย่าง/ ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)			
	ปุ๋ยน้ำที่อุณหภูมิห้อง		ปุ๋ยน้ำที่อุณหภูมิ 4 °C	
	T	A	T	A
0	4.30×10^9	1.40×10^9	4.30×10^9	1.40×10^9
2	1.10×10^8	1.00×10^9	1.30×10^9	1.10×10^9
4	2.33×10^7	8.00×10^7	1.83×10^9	8.67×10^8
6	2.55×10^7	7.30×10^7	1.83×10^9	6.67×10^8
8	1.47×10^7	6.00×10^7	1.30×10^9	9.67×10^8
14	1.23×10^7	5.00×10^7	1.43×10^9	1.87×10^9
21	2.33×10^7	5.50×10^7	9.33×10^8	7.67×10^8
28	2.07×10^7	8.00×10^7	1.13×10^9	8.00×10^8
35	5.33×10^7	9.67×10^7	9.00×10^8	5.67×10^8
42	3.67×10^7	1.63×10^8	7.67×10^8	5.67×10^8
49	4.33×10^7	2.00×10^8	1.13×10^9	1.80×10^9
56	7.33×10^7	1.17×10^8	1.27×10^9	1.20×10^9
63	3.67×10^7	1.20×10^8	1.60×10^9	1.13×10^9

หมายเหตุ T ตรวจนับทันทีหลังเก็บตัวอย่าง

A ตรวจนับหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในปฏิกิริยาผสมกากหมักกรองระหว่างการเก็บรักษา (1-15%)

ระยะเวลา (วัน)	ตัวอย่างปฏิกิริยาผสมกากหมักกรอง/ ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)									
	1%		3%		5%		10%		15%	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0	4.50×10^6	2.64×10^6	3.80×10^6	1.95×10^6	4.40×10^6	1.81×10^6	6.40×10^6	1.94×10^6	1.46×10^8	9.50×10^8
2	3.40×10^7	4.00×10^7	2.80×10^7	4.00×10^7	5.70×10^7	4.00×10^7	5.80×10^7	4.00×10^7	1.55×10^8	8.90×10^8
4	3.80×10^7	3.60×10^7	6.40×10^7	3.70×10^7	4.70×10^7	4.50×10^7	8.30×10^7	5.30×10^7	4.80×10^7	4.80×10^7
6	8.90×10^7	4.70×10^7	8.20×10^7	6.10×10^7	8.30×10^7	3.60×10^7	6.70×10^7	5.30×10^7	6.30×10^7	8.10×10^7
8	4.50×10^7	3.30×10^7	5.20×10^7	4.80×10^7	2.48×10^7	6.60×10^7	2.42×10^7	3.90×10^7	6.00×10^7	7.10×10^7
14	3.90×10^7	4.20×10^7	1.10×10^7	4.20×10^7	8.40×10^7	5.00×10^7	1.48×10^7	2.40×10^7	5.10×10^7	2.90×10^7
21	5.70×10^7	3.60×10^7	5.90×10^7	4.80×10^7	6.00×10^7	9.80×10^7	6.50×10^7	6.50×10^7	2.75×10^7	4.30×10^7
28	4.90×10^6	8.90×10^6	7.00×10^6	7.20×10^6	6.90×10^6	1.21×10^6	8.00×10^6	7.90×10^6	4.50×10^6	7.30×10^6
35	2.67×10^6	2.85×10^6	2.89×10^6	2.17×10^6	2.44×10^6	2.29×10^6	3.20×10^6	2.28×10^6	1.34×10^6	1.48×10^6
42	3.90×10^6	8.40×10^6	6.20×10^6	8.10×10^6	9.98×10^5	7.70×10^6	7.60×10^6	9.60×10^6	4.20×10^6	8.20×10^6
49	3.60×10^6	8.70×10^6	3.20×10^6	9.20×10^6	4.70×10^6	9.00×10^6	3.50×10^6	5.80×10^6	6.20×10^6	8.80×10^6
56	1.43×10^6	1.62×10^6	5.40×10^6	4.40×10^6	1.41×10^6	7.80×10^6	8.40×10^6	5.40×10^6	8.20×10^6	1.87×10^6
63	3.20×10^6	7.40×10^6	5.10×10^6	6.70×10^6	4.40×10^6	7.60×10^6	6.40×10^6	6.60×10^6	7.20×10^5	4.10×10^6

หมายเหตุ A หมายถึง ปริมาณ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในวันที่เก็บตัวอย่าง

B หมายถึง ปริมาณ *A. vinelandii* TISTR 1094 เมื่อหลังนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค19 (ต่อ)

ระยะเวลา (วัน)	ตัวอย่างปฏิกิริยาผสมกากหมักกรอง/ ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)							
	20%		25%		30%		35%	
	A	B	A	B	A	B	A	B
	1.16×10^8	1.29×10^8	1.20×10^8	3.10×10^8	1.14×10^8	3.00×10^8	1.50×10^8	4.60×10^8
	8.50×10^8	9.30×10^8	9.60×10^8	8.80×10^8	6.00×10^8	2.84×10^8	2.06×10^8	5.80×10^8
	7.40×10^7	4.40×10^7	7.70×10^7	4.80×10^7	7.80×10^7	6.00×10^7	5.60×10^7	6.00×10^7
	4.80×10^7	7.60×10^7	5.40×10^7	3.70×10^7	9.90×10^7	3.20×10^7	6.70×10^7	6.50×10^7
	7.40×10^7	8.10×10^7	3.50×10^7	3.50×10^7	4.00×10^7	4.10×10^7	4.60×10^7	3.20×10^7
	1.37×10^7	3.80×10^7	8.70×10^7	3.40×10^7	3.20×10^7	7.60×10^7	3.10×10^7	3.20×10^7
	2.95×10^7	1.33×10^7	2.09×10^7	4.20×10^7	1.07×10^7	1.47×10^7	1.88×10^7	3.70×10^7
	3.20×10^6	7.50×10^6	4.40×10^6	5.70×10^6	3.50×10^6	5.90×10^6	4.80×10^6	4.30×10^6
	1.65×10^6	1.59×10^6	1.50×10^6	1.07×10^6	1.68×10^6	1.28×10^6	1.54×10^6	1.32×10^6
	7.70×10^6	6.70×10^6	4.80×10^6	8.50×10^6	3.60×10^6	6.80×10^6	1.60×10^6	7.60×10^6
	1.10×10^6	1.71×10^6	3.20×10^6	7.20×10^6	1.90×10^6	7.60×10^6	6.50×10^6	4.60×10^6
	5.20×10^6	1.17×10^6	5.50×10^6	8.90×10^6	6.30×10^6	1.23×10^6	8.70×10^6	1.24×10^6
	3.10×10^6	4.10×10^6	5.30×10^6	4.70×10^6	4.70×10^6	4.60×10^6	5.80×10^6	3.10×10^6

หมายเหตุ A หมายถึง ปริมาณ *A. vinelandii* TISTR 1094 ในวันที่เก็บตัวอย่าง

B หมายถึง ปริมาณ *A. vinelandii* TISTR 1094 เมื่อหลังนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium 24 ชั่วโมง

7. ผลการศึกษาการปรับปรุงพืชทดสอบและดินในระดับห้องปฏิบัติการ

7.1 ผลการศึกษาการปรับปรุงพืช

ตารางผนวกที่ ค20 ความสูงท่อนอ้อยที่ปลูกในกระถางทดลองเป็นเวลา 1 และ 3 เดือน

วิธีการ	ความสูงท่อนอ้อย (เซนติเมตร)			
	1 เดือน		3 เดือน	
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
1. ไม่แช่-ดินวันดี-รดน้ำ	18.60	26.70	77.20	72.40
2. ไม่แช่-ดินวันดี-รดปุ๋ย	50.50	57.00	88.70	86.50
3. แช่-ดินวันดี-รดน้ำ	29.60	32.90	83.10	88.30
4. แช่-ดินวันดี-รดปุ๋ย	40.60	50.80	97.00	97.70
5. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี-รดน้ำ	52.00	45.00	89.00	88.70
6. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี-รดปุ๋ย	62.20	55.00	95.50	100.00
7. ไม่แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	32.30	27.10	84.80	81.10
8. ไม่แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	26.30	34.50	81.40	82.90
9. แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	39.90	38.70	81.00	79.20
10. แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	40.50	47.50	110.10	102.00
11. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	51.00	50.60	111.70	115.10
12. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	49.30	55.20	136.50	136.20

ตารางผนวกที่ ค21 ปริมาณไนโตรเจนในดินจากกระถางทดลองที่ปลูกอ้อยเป็นเวลา 1 และ 3 เดือน

วิธีการ	ปริมาณไนโตรเจนในดินหลังการปลูกอ้อย (เปอร์เซ็นต์)					
	1 เดือน			3 เดือน		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1. ดิน_รดน้ำ	0.10	0.1	0.09	0.10	0.11	0.11
2. ดิน_รดปุ๋ยน้ำ	0.10	0.12	0.13	0.13	0.12	0.14
3. ดิน/กากหม้อกรอง_รดน้ำ	0.27	0.28	0.3	0.29	0.32	0.30
4. ดิน/กากหม้อกรอง_รดปุ๋ยน้ำ	0.30	0.33	0.32	0.36	0.33	0.37

ตารางผนวกที่ ค22 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ของรากอ้อยที่ปลูกในดินเป็นเวลา 3 เดือน

วิธีการ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (mmolC ₂ H ₄ /g/hr)	
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
1. ไม่แช่-ดินวันดี-รดน้ำ	16.58	14.49
2. ไม่แช่-ดินวันดี-รดปุ๋ย	36.33	32.83
3. แช่-ดินวันดี-รดน้ำ	24.89	23.54
4. แช่-ดินวันดี-รดปุ๋ย	38.22	36.73
5. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี-รดน้ำ	22.97	21.82
6. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี-รดปุ๋ย	34.62	35.57
7. ไม่แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	15.2	14.51
8. ไม่แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	34.79	33.12
9. แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	22.51	24.89
10. แช่-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	38.34	37.05
11. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดน้ำ	23.87	25.81
12. แช่ปุ๋ย-ดินวันดี+กากหม้อกรอง-รดปุ๋ย	36.13	35.01

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวภากรจิร ภูมิไกล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	19 พฤษภาคม 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดร้อยเอ็ด
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	เลขานุการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	Joint KU-CIRAD Laboratory of Biochemistry and Technology of Natural Rubber มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	การปกป้อง <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 จากความร้อนโดยการเอ็นแคปซูลชันด้วยเจลอะลูมิเนียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส การขยายกำลังการผลิตปุ๋ยชีวภาพโดยใช้หัวเชื้อ <i>Azotobacter vinelandii</i> TISTR 1094 ร่วมกับกากน้ำตาล
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมการศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนัก กรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ