รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการย่อยที่ 1

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัม ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

โดย ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว และคณะ

กรกฎาคม 2555

สัญญาเลขที่ RDG5450086

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการย่อยที่ 1
การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัม ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นายสิทธัตถ์ สร้อยเพชรเกษม	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. นางอารี ทองทุ่ง	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
4. นางทัศนีย์ มีพยุง	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปย่อรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการย่อยที่ 1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัมที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว

หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ที่อยู่ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์/โทรสาร (055) 964622/ 964770 **E-mail**: nnakaew@hotmail.com

ผู้ร่วมโครงการ

1. นายสิทธัตถ์ สร้อยเพชรเกษม มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นางอารี ทองทุ่ง มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. นางทัศนีย์ มีพยุง มหาวิทยาลัยนเรศวร

ระยะเวลาดำเนินการ 9 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2554 – 31 พฤษภาคม 2555

ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญ

ซีรัม (serum) เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการทำน้ำยางข้น มีรายงานว่าใน serum มีสารอินทรีย์ที่มีประโยชน์ปะปนอยู่มากมาย เช่น L-Quebrachitol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารต่างๆ เช่น สารต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial), สารต้านมะเร็ง (anticancer) และสารต้านเชื้อรา (antifungal) ดังนั้นถ้าได้มีการนำ serum มาใช้เลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อให้แบคทีเรียเปลี่ยนสารตั้งต้นที่มีอยู่ใน serum เป็นสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะนำกลับไปใช้ในการควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในพืชชนิดต่างๆ ก็จะเป็นการลดต้นทุนในการดำเนินงานในระบบบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากปริมาณน้ำเสียลดลง อีกทั้งเป็นการนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยางกลับมาให้เกิดประโยชน์

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัมที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

ผลการดำเนินงาน

จากการนำตัวอย่างดิน น้ำซีรัม และอาหารหมักดองมาทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ แล้วทำการแยกเชื้อโดย พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 81 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อทั้ง 81 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช (*Rigidoporus, Fusarium, Rhizopus*) พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus* และ *Fusarium* ได้ดี คือ SO55, SO35, และ FF1 โดยให้บริเวณยับยั้งมากกว่า 14 มิลลิเมตรขึ้นไป สำหรับเชื้อรา *Rhizopus* พบว่าไม่มีแบคทีเรียไอโซเลทใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญได้

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อรา (ไอโซเลท SO55, SO35 และ FF1) มาทดสอบการหมัก serum และกล้วยน้ำว้าในสภาวะไร้อากาศ โดยการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 3 เดือน ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดยวิธี agar well diffusion พบว่าน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้เลย

เมื่อนำน้ำหมักทุกชุดการทดลองไปวิเคราะห์คุณภาพพบว่าทุกชุดการทดลองมี pH เป็นกรด (3.89-4.22) ทั้งก่อนและหลังการหมัก โดยพบว่าหลังการหมักทุกชุดการทดลองมี pH ลดลงเล็กน้อย น้ำหมักทุกชุดการทดลองมีค่าการนำไฟฟ้า (EC) เพิ่มขึ้นหลังการหมัก โดยหลังการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 9.77-11.09 mS/cm โดยชุดการทดลองที่ 1 มีค่า EC เพิ่มขึ้นสูงสุด หลังการหมักสูตรที่ 4 มีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 11.09 mS/cm ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ให้คำแนะนำ (10 mS/cm) ไว้เล็กน้อย (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2544) ค่าอินทรียวัตถุก่อนหมักอยู่ระหว่าง 5.72-6.72 %w/w หลังหมักพบว่ามีค่าลดลงพอๆกันทุกชุดการทดลอง โดยมีค่าลดลงน้อยกว่า 2 %w/w ในทุกชุดการทดลอง ปริมาณ N, P และ K มีปริมาณลดลงเล็กน้อยในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่ามีค่าลดลงอยู่ระหว่าง 0.03-0.05, 0-0.02 และ 0.05-0.11 %w/w ตามลำดับ ในน้ำหมักชีวภาพทุกชุดการทดลองทั้งก่อนและหลังการหมักมีอัตราส่วนระหว่าง K, N และ P คล้ายๆ กัน โดยมีสัดส่วนของ K สูงสุด และมี P ต่ำสุด โดยมีอัตราส่วนของ N:P:K ประมาณ 30:10:60 หลังการหมักพบว่า P สัดส่วนเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง

สรุปผลการวิจัย

สามารถแยกเชื้อได้ 81 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน น้ำซีรัม และอาหารหมักดอง พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus* และ *Fusarium* ได้ดี คือ SO55, SO35, และ FF1 โดยให้บริเวณยับยั้งมากกว่า 14 มิลลิเมตรขึ้นไป สำหรับเชื้อรา *Rhizopus* พบว่าไม่มีแบคทีเรียไอโซเลทใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญได้

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทดสอบการหมัก serum และกล้วยน้ำว้าในสภาวะไร้อากาศ โดยการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้เลย เมื่อนำน้ำหมักทุกชุดการทดลองไปวิเคราะห์คุณภาพพบว่าทุกชุดการทดลองมี pH เป็นกรด (3.89-4.22) ทั้งก่อนและหลังการหมัก โดยพบว่าหลังการหมักทุก

ชุดการทดลองมี pH ลดลงเล็กน้อย น้ำหมักทุกชุดการทดลองมีค่าการนำไฟฟ้า (EC) เพิ่มขึ้นหลังการหมัก โดยหลังการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 9.77-11.09 mS/cm โดยชุดการทดลองที่ 1 มีค่า EC เพิ่มขึ้นสูงสุด หลังการหมักสูตรที่ 4 มีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 11.09 mS/cm ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ให้คำแนะนำ (10 mS/cm) ไว้เล็กน้อย (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2544) ค่าอินทรียวัตถุก่อนหมักอยู่ระหว่าง 5.72-6.72 %w/w หลังหมักพบว่ามีค่าลดลงพอๆกันทุกชุดการทดลอง โดยมีค่าลดลงน้อยกว่า 2 %w/w ในทุกชุดการทดลอง ปริมาณ N, P และ K มีปริมาณลดลงเล็กน้อยในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่ามีค่าลดลงอยู่ระหว่าง 0.03-0.05, 0-0.02 และ 0.05-0.11 %w/w ตามลำดับ ในน้ำหมักชีวภาพทุกชุดการทดลองทั้งก่อนและหลังการหมักมีอัตราส่วนระหว่าง K, N และ P คล้ายๆ กัน โดยมีสัดส่วนของ K สูงสุด และมี P ต่ำสุด โดยมีอัตราส่วนของ N:P:K ประมาณ 30:10:60 หลังการหมักพบว่า P สัดส่วนเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

จากรายงานที่พบว่าในน้ำซีรัมมีสาร L-Quebrachitol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์สารต้านเชื้อราด้วยวิธีการทางเคมีในทางอุตสาหกรรมนั้น งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์สารต้านเชื้อราโดยใช้สารตั้งต้นที่มีอยู่ในน้ำซีรัมโดยวิธีการง่ายๆ เช่นเดียวกับการหมักน้ำหมักชีวภาพซึ่งใช้ต้นทุนต่ำ และเกษตรกรสามารถทำเองได้ ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจจะทำให้ได้น้ำหมักชีวภาพที่มีสารต้านเชื้อราซึ่งเมื่อนำไปใช้แล้วนอกจากจะช่วยให้พืชเจริญดีเนื่องจากสารอาหารที่เกิดขึ้นจากการหมักแล้วยังอาจช่วยยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้อีกด้วย แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่าในสภาวะที่เป็นกรด และมีออกซิเจนในปริมาณน้อยของน้ำหมัก อาจจะไม่เหมาะสมกับการกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปหรือเชื้ออื่นๆที่มีอยู่ตามธรรมชาติสร้างสารต้านเชื้อราได้ อย่างไรก็ตามถ้าเราปรับสภาวะในการหมัก เช่น ลองปรับ pH ให้เป็นกลาง หรือเป็นเบส ปรับปริมาณของสารตั้งต้นนั่นคือความเข้มข้นของน้ำซีรัม หรือปรับสภาวะการหมักให้มีอากาศมากขึ้นอาจจะทำให้เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราได้อยู่แล้ว จะสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราได้ดียิ่งขึ้น **และ**ควรมีการตรวจหาแบคทีเรียที่เติมลงไปในน้ำหมักว่ายังมีชีวิตอยู่หรือไม่ภายหลังการหมัก

ผลงานวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติในงานนเรศวรวิจัยครั้งที่ 9 ซึ่งจะจัดขึ้นประมาณเดือนกรกฎาคม 2556 โดยกองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร

รหัสโครงการ: RDG5450086

ชื่อโครงการ โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการย่อยที่ 1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัม ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

ชื่อนักวิจัย: ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว

สังกัด: ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ม. นเรศวร

โทรศัพท์: 055 964622

E-mail: nnakaew@hotmail.com

ระยะเวลาดำเนินโครงการ: 1 กันยายน 2554 – 31 พฤษภาคม 2555

บทคัดย่อ

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 81 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน น้ำซีรัม และอาหารหมักดอง พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus* และ *Fusarium* ได้ดี คือ SO55, SO35, และ FF1 โดยให้บริเวณยับยั้งมากกว่า 14 มิลลิเมตรขึ้นไป สำหรับเชื้อรา *Rhizopus* พบว่าไม่มีแบคทีเรียไอโซเลทใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ เมื่อนำแบคทีเรีย ทั้ง 3 สายพันธุ์มาทดสอบการหมัก serum และกล้วยน้ำว้าในสภาวะไร้อากาศ โดยการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 3 เดือน ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดยวิธี agar well diffusion พบว่าน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้เลย

เมื่อนำน้ำหมักทุกชุดการทดลองไปวิเคราะห์คุณภาพพบว่าทุกชุดการทดลองมี pH เป็นกรด(3.89-4.22) ทั้งก่อนและหลังการหมัก โดยพบว่าหลังการหมักทุกชุดการทดลองมี pH ลดลงเล็กน้อย น้ำหมักทุกชุดการทดลองมีค่าการนำไฟฟ้า (EC) เพิ่มขึ้นหลังการหมัก โดยหลังการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 9.77-11.09 mS/cm โดยชุดการทดลองที่ 1 มีค่า EC เพิ่มขึ้นสูงสุด หลังการหมักสูตรที่ 4 มีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 11.09 mS/cm ค่าอินทรียวัตถุก่อนหมักอยู่ระหว่าง 5.72-6.72 %w/w หลังหมักพบว่ามีค่าลดลงพอๆกันทุกชุดการทดลอง โดยมีค่าลดลงน้อยกว่า 2 %w/w ในทุกชุดการทดลอง ปริมาณ N, P และ K มีปริมาณลดลงเล็กน้อยในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่ามีค่าลดลงอยู่ระหว่าง 0.03-0.05, 0-0.02 และ 0.05-0.11 %w/w ตามลำดับ ในน้ำหมักชีวภาพทุกชุดการทดลองทั้งก่อนและหลังการหมักมีอัตราส่วนระหว่าง K, N และ P คล้ายๆ กัน โดยมีอัตราส่วนของ N:P:K ประมาณ 30:10:60 หลังการหมักพบว่า P สัดส่วนเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรียในการสังเคราะห์สารต้านเชื้อราโดยใช้สารตั้งต้นที่มีอยู่ในน้ำซีรัมโดยวิธีการง่ายๆ เช่นเดียวกับการหมักน้ำหมักชีวภาพซึ่งใช้ต้นทุนต่ำ และเกษตรกรสามารถทำเองได้ ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจจะทำให้ได้น้ำหมักชีวภาพที่มีสารต้านเชื้อราซึ่งเมื่อนำไปใช้แล้วนอกจากจะช่วยให้พืชเจริญดีเนื่องจากสารอาหารที่เกิดขึ้นจากการหมักแล้วยังอาจช่วยยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้อีกด้วย แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่าในสภาวะที่เป็นกรด และมีออกซิเจนในปริมาณน้อยของน้ำหมัก อาจจะไม่เหมาะสมกับการกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปหรือเชื้ออื่นๆที่มีอยู่ตามธรรมชาติสร้างสารต้านเชื้อราได้ อย่างไรก็ตามถ้าเราปรับสภาวะในการหมัก เช่น ลองปรับ pH ให้เป็นกลาง หรือเป็นเบส ปรับปริมาณของสารตั้งต้นนั่นคือความเข้มข้นของน้ำซีรัม หรือปรับสภาวะการหมักให้มีอากาศมากขึ้นอาจจะทำให้เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราได้อยู่แล้ว จะสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราได้ดียิ่งขึ้น

Project code: RDG5450086
Project title: Small Project of Rubber Faculty of Medical Science, Naresuan University
Minor Project 1 Screening of bacteria to used as inoculum for bio-organic liquid fertilizer from serum
Investigator: Dr. Nareeluk Nakaew
E-mail Address: nnakaew@hotmail.com
Project Period: 1 September 2554 – 31 May 2555

Abstract

Eighty one strains of bacteria were isolated from soil serum and fermented food. It was found that 3 isolates (SO55, SO35 and FF1) show good antifungal activities against *Rigidoporus* and *Fusarium*. All of them exhibiting inhibition zone more than 14 mm. Thus all of them were used as inoculum for bio-organic liquid fertilizer, using the substrate of serum and banana. Antifungal activities were assay by agar well diffusion method after 3 months of fermentation. No antifungal activities found in all 4 experiments. The bio fertilizer properties were tested in the laboratory. The results presented all experiments showed acidity (3.89-4.22), the electric conductivity was between 9.77-11.09 mS/cm, organic matter in all experiment before fermentation were 5.72-6.72 %w/w and slightly decrease more than 2 %w/w. Nitrogen (N) Phosphorus (P) and Potassium (K) were slightly decrease (0.03-0.05, 0-0.02 and 0.05-0.11 %w/w respectively). NPK ratio value was 30:10:60.

The aim of this research was using antifungal producing bacteria as inoculum for bio-organic liquid fertilizer by easy procedure. Even though in this research the results showed no antifungal activities but bacteria may growth in soil when use it in the field and produce antifungal to control plant pathogen. Thus survival of antifungal producing bacteria in bio fertilizer should be determined.

1. ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

การแปรรูปน้ำยางสดให้เป็นน้ำยางข้นในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ จะใช้เทคนิคการปั่นแยก (Centrifuging) ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะทำให้เกิดของเสีย ได้แก่ serum ซึ่งปนอยู่กับน้ำทิ้งของโรงงาน ใน serum จะมีโปรตีนและน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นอาหารเพื่อการเจริญได้ (Ohya และ Koyama, 2001) จึงทำให้เกิดการเน่าเสียโดยจุลินทรีย์ได้ง่าย ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นรุนแรงและเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อม ทำให้โรงงานต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงในการบำบัดน้ำเสียที่เกิดขึ้น

มีรายงานว่าใน serum มีสารอินทรีย์ที่มีประโยชน์ปะปนอยู่มากมาย เช่น L-Quebrachitol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารต่างๆ เช่น สารต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial), สารต้านมะเร็ง (anticancer) และสารต้านเชื้อรา (antifungal) (จิตต์ลัดดา, 2548)

ดังนั้นถ้าได้มีการนำ serum มาใช้เลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อให้แบคทีเรียเปลี่ยนสารตั้งต้นที่มีอยู่ใน serum เป็นสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะนำกลับไปใช้ในการควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในพืชชนิดต่างๆก็จะเป็นการลดต้นทุนในการดำเนินงานในระบบบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากปริมาณน้ำเสียลดลง อีกทั้งเป็นการนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยางกลับมาให้เกิดประโยชน์

2. วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัมที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

3. ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

น้ำซีรัมเป็นน้ำเสียที่เกิดขึ้นประมาณ 24% ของปริมาณน้ำเสียทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการแปรรูปน้ำยางข้น (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2546) ซึ่งน้ำเสียทั้งหมดจะถูกปล่อยลงบ่อบำบัด ในน้ำซีรัมพบว่ามีโปรตีนและน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหลักซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นอาหารเพื่อการเจริญได้ ทำให้เกิดการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เกิดกลิ่นเหม็นรุนแรงและเป็นปัญหากับชาวบ้านซึ่งอยู่ไกล้เคียงโรงงาน ทำให้โรงงานต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงในการบำบัดน้ำเสียที่เกิดขึ้นนอกจาก serum จะมีส่วนประกอบที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้เป็นอาหารได้ serum ยังมีสารอินทรีย์ที่มีประโยชน์เช่น L-Quebrachitol ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง (35 US$ ต่อ 100 mg) โดยโครงสร้างทางเคมีของ L-quebrachitol เป็น monomethyl ether ของ L-inositol โดยสารนี้มักพบว่าอยู่ในรูปของ L-(-)-2-O-methyl-chiro-inositol และมีอยู่ในซีรัมของน้ำยางธรรมชาติประมาณ 1% สำหรับประโยชน์ของสารชนิดนี้ ได้มีการรายงานว่าสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารจำพวก optically active organic compound ต่างๆ ได้มากมาย อาทิ เป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial) สารต้านเชื้อรา (antifungal) เช่น Sporaricin A และ B, Ovacin และ oudemansin X (Chida และคณะ, 1992; Deushi และคณะ, 1979; Derek และคณะ, 1995) และเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ยา เช่นยาต้านมะเร็งและสารเคมีทางการเกษตรต่างๆ เป็นต้น (จิตต์ลัดดา, 2548) ซึ่งปัจจุบันได้มีความพยายามในการสกัดเอาสารชนิดนี้ออกมาเพื่อเพิ่มมูลค่าของยางพารา

การสังเคราะห์สารต้านเชื้อรา แบคทีเรีย ในทางอุตสาหกรรม โดยใช้สาร L-Quebrachitol เป็นสารตั้งต้น จะใช้การสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี (Chemosynthesis) ยังไม่พบรายงานการสังเคราะห์ด้วยวิธีชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์

น้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักชีวภาพ เป็นการใช้วัตถุดิบชนิดต่างๆ เช่น ส่วนต่างๆของพืชและสัตว์ มาหมักโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งพวกที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศในการเจริญ

จุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพ

จุลินทรีย์หลายประเภท เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา จะมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้ในการหมัก ระยะเวลาการหมัก จุลินทรีย์แต่ละประเภทมีบทบาทในขั้นตอนกระบวนการหมักแตกต่างกัน คือ

1. แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียที่พบมาก คือ แบคทีเรียย่อยสลายวัสดุหมักทั้งพืชและสัตว์ และย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ให้มีโมเลกุลเล็กลง และไม่สร้างสารพิษ จึงไม่มีโทษหรือเป็นอันตรายต่อคน สัตว์ พืช ได้แก่ แบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus*) ซึ่งสามารถผลิตเอ็นไซม์และปลดปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์ เช่น cellulose ทำหน้าที่ย่อยเส้นใยพืช (cellulose) ให้มีโมเลกุลเล็กลง Proterolytic enzyme (Protease) ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลงเป็นกรดอะมิโน และยังสร้างสารปฏิชีวนะได้

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) ทำหน้าที่ย่อยสารอินทรีย์ให้เป็นอาหารของพืช

แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติค (Lactic acid Bacteria) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีอากาศหรือออกซิเจน มีอยู่ในสภาพธรรมชาติ เช่น ผัก ผลไม้ สัตว์ ผลิตภัณฑ์นม ทนต่อสภาพความเป็นกรดรุนแรง ช่วยย่อยสลายสารตกค้างในดิน และไม่ละลายน้ำ เช่น หินฟอสเฟต ซึ่งโดยทั่วไปฟอสฟอรัสพบในดินสูงถึง 20% แต่พืชสามารถนำมาใช้ได้เพียง 3% เท่านั้น

แอคติโนมัยสิท (Actinomycetes) ย่อยอินทรียวัตถุที่สลายยากให้เป็นฮิวมัส และสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลฆ่าเชื้อก่อโรคในดิน

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (Azotobactor) ช่วยตรึงไนโตรเจนในอากาศให้เป็นปุ๋ยไนโตรเจนแก่พืช

2. ยีสต์ (Yeast) เป็นเชื้อราชนิดหนึ่ง พบกระจายทั่วไปตามผิวใบไม้ ผลไม้ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักและพบในน้ำสกัดชีวภาพในสภาพไม่มีอากาศหรือออกซิเจน จะเป็นยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และสกุล *Candida* ได้แก่ *Candida zeylanoides*, *Candida boidinii* และ *Candida krusei* ยีสต์จะใช้น้ำตาลเป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ และเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในช่วงต้นของการหมัก ซึ่งจะได้กลิ่นแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังมีสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ที่เกิดขึ้น ได้แก่ กรดอะซีติค (Acetic acid) กรดอะมิโน (Amino acid) วิตามิน ได้แก่ Purines, Pyrimidines ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีความเป็นกรดรุนแรง ในน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้ผัก ผลไม้ และปลาเป็นวัสดุหมัก จะพบยีสต์ปริมาณมาก และจะลดลงตามระยะเวลาการหมัก และพบน้อยมากในน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้มูลไก่เป็นวัสดุหมัก แต่ไม่พบในน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้มูลสุกรเป็นวัสดุหมัก

3. มีจุลินทรีย์ที่ช่วยละลายหรือแปรสภาพฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปอินทรีย์ฟอสฟอรัส และอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ ที่พืชนำไปใช้ไม่ได้ให้เป็นฟอสฟอรัสที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ จุลินทรีย์สกุล *Bacillus sp.* เชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp.

4. เชื้อราเส้นใย เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจนในการเจริญเติบโต ในสภาพการผลิตน้ำสกัดชีวภาพเป็นการหมักที่ไม่มีอากาศ คือ ไม่มีออกซิเจนหรือมีน้อยมาก สภาพการหมักจึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเส้นใย จึงพบในปริมาณและจำนวนชนิดน้อยในน้ำหมักชีวภาพ ในน้ำสกัดชีวภาพส่วนใหญ่ จะพบเชื้อราในกลุ่ม Phycomycetes บริเวณบนพื้นผิวหน้าน้ำสกัดชีวภาพ และบนพื้นผิวภาชนะที่มีน้ำตาลเกาะติดอยู่ที่สัมผัสกับอากาศ เชื้อรา ช่วยสานตัวเป็นตาข่ายห่อหุ้มเม็ดดินเป็นก้อนๆ ทำให้ดินโปร่ง อุ้มน้ำได้ดี

คุณสมบัติทั่วไปของน้ำสกัดชีวภาพ

1. มีความเป็นกรดสูง น้ำสกัดชีวภาพส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นกรดสูงหรือรุนแรงมีค่าอยู่ระหว่าง 3.0-4.8 ในสภาพของน้ำสกัดชีวภาพที่มีค่าความเป็นกรดรุนแรงจะช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคหรือทำให้เกิดการบูดเน่าเสียได้ น้ำสกัดชีวภาพที่ใช้วัสดุจากพืช จะมีความเป็นกรดรุนแรงกว่าน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้วัสดุจากสัตว์

2. มีค่าการนำไฟฟ้าสูง ค่าการนำไฟฟ้าสูงแสดงว่ามีสิ่งเหล่านี้อยู่ในของเหลวในปริมาณความเข้มข้นมาก น้ำสกัดชีวภาพที่ใช้สัตว์เป็นวัสดุหลักในการหมัก จะมีค่าการนำไฟฟ้าสูงกว่าน้ำสกัดที่ใช้พืชเป็นวัสดุหลักในการหมัก ประโยชน์จะน้อยลงด้วย

3. กรดฮิวมิค จะเกิดขึ้นระหว่างการหมักและย่อยสลายของวัสดุหมัก ปริมาณกรดฮิวมิคในน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้ผักและผลไม้เป็นวัสดุหลักจะสูงกว่าในน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้สัตว์เป็นวัสดุหลักในการหมัก เพราะมีปริมาณลดลงตามระยะเวลาในการหมัก

4. ปริมาณธาตุอาหารในน้ำสกัดชีวภาพ โดยทั่วไปมีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของพืช ธาตุอาหารพืชที่มีในน้ำสกัดชีวภาพ ได้แก่ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และธาตุอาหารเสริม น้ำสกัดชีวภาพที่ใช้สัตว์เป็นวัสดุหลักในการหมัก จะมีปริมาณธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และธาตุอาหารเสริม มากกว่าน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้พืชเป็นวัสดุหลักในการหมัก

5. สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ที่สำคัญ ได้แก่ ออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน หรือที่เรียกว่าฮอร์โมนพืช นอกจากพืชสร้างขึ้นได้เองแล้ว ยังพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยสิท สาหร่ายที่มีขนาดเล็ก สามารถสร้างฮอร์โมนพืชได้ ฮอร์โมนในน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้ผักผลไม้ และสัตว์เป็นวัสดุหมัก จะมีปริมาณและชนิดของฮอร์โมนที่ได้แตกต่างกัน

6. มีสารควบคุมป้องกันแมลง ซึ่งมีคุณสมบัติในการขับไล่แมลง โดยทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังของแมลงและเยื่อจมูก และมีสารดึงดูดหรือขับไล่แมลง น้ำสกัดชีวภาพที่ใช้พืช (ผัก ผลไม้) และสัตว์ (ปลา หอยเชอรี่ และไข่) เป็นวัสดุหลักในการหมัก จะให้สารประกอบกลุ่มแอลกอฮอล์ (Alcohol) กลุ่มเบนซีนไดออล (Benzene diol) กลุ่มฟีนอล (Phenol) กลุ่มเอสเทอร์ (Ester)

7. มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดโรคพืช

น้ำหมักชีวภาพที่ใช้พืชสมุนไพร ผัก ผลไม้ วัชพืชบางชนิดเป็นวัสดุหมักจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืชได้ เช่น น้ำหมักชีวภาพที่ใช้กล้วยน้ำว้าเป็นวัสดุหลักในการหมัก (กรมวิชาการเกษตร, http://www.agriqua.doae.go.th/biogroup/index.html)

เนื่องจากน้ำหรือของเหลวที่ได้จากการหมักน้ำหมักชีวภาพจะประกอบด้วย กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน กรดฮิวมิก เอนไซม์ ฮอร์โมน วิตามิน และแร่ธาตุอาหารพืช ดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ สารประกอบต่างๆเหล่านี้ จะมีมากน้อยต่างกันขึ้นกับวัสดุที่ใช้ในการหมัก

ดังนั้นจึงเป็นที่มาของงานวิจัยในครั้งนี้ซึ่งจะมุ่งเน้นที่นำน้ำ serum ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการแปรรูปน้ำยางสด ซึ่งมีสารอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้ได้ รวมถึงสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ antibiotic มาใช้เป็นวัสดุหลักในการทำน้ำหมักชีวภาพ โดยมีการใช้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นการสังเคราะห์ antibiotic ที่มีอยู่ใน serum เป็นสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย มาใช้ในการหมักร่วมกับจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งทำให้ได้น้ำหมักชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ซึ่งอาจจะนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในพืชชนิดต่างๆ ซึ่งอาจรวมถึงต้นยางพารา เป็นการลดต้นทุนในการดำเนินงานในระบบบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรมแปรรูปน้ำยางข้น อีกทั้งเป็นการนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยางกลับมาให้เกิดประโยชน์

4. วิธีการทดลอง

1. แยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี serum เป็นส่วนประกอบ

นำตัวอย่างดินจากบริเวณรากพืช และอาหารหมักดอง (ผักกาดดอง) มาทำการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำซีรัมเป็นแหล่งอาหารได้โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุด คือ

1. ดิน 1 กรัม ผสมกับซีรัมที่ปราศจากเชื้อ 10 มล.
2. อาหารหมักดอง 1 กรัม ผสมกับซีรัมที่ปราศจากเชื้อ 10 มล.
3. น้ำซีรัมที่ยังไม่ได้ฆ่าเชื้อ 10 มล.

โดยน้ำซีรัมที่ใช้ได้จากการนำน้ำยางสดมาปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นซีรัมด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ปรับ pH ของซีรัมให้เท่ากับ 4 และทำให้ซีรัมปราศจากเชื้อโดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

บ่มชุดการทั้งลองทั้ง 3 ชุด ทิ้งไว้ 2 วัน จากนั้นนำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน อาหารหมัก และ serum ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยวิธี serial ten-fold dilution จากนั้นนำสารละลายที่ความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} spread ลงบนอาหารที่มีซีรัมเป็นส่วนประกอบ (น้ำซีรัม 50 มล., น้ำกลั่น 50 มล., agar 1.7 กรัม)

2. ทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อราก่อโรคในพืช

ทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อราก่อโรคในพืช 3 ชนิด คือ *Rigidoporus, Fusarium, Rhizopus* โดยวิธี agar diffusion method (Bennett *et al.*, 1996) โดยทำการเพาะเชื้อราทั้ง 3 ชนิดลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรีย

ที่แยกได้มาเพาะลงบนจานอาหารที่เชื้อราเจริญอยู่ บ่มทิ้งไว้จนเชื้อราที่อยู่ในจานที่ไม่ได้เพาะเชื้อแบคทีเรีย (ชุดควบคุม) เจริญเต็มจานอาหาร สังเกตุและวัดขนาดของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น

3. ทดสอบการหมักserum โดยเชื้อที่คัดเลือกได้ (การทำน้ำหมักชีวภาพ)

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ให้ขนาดของ inhibition zone กว้างที่สุด 3 อันดับแรก มาทดสอบการหมัก serum ในสภาวะไร้อากาศ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง โดยแบ่งชุดทดลองออกเป็น 4 ชุดดังนี้

ชุดการทดลอง	หัวเชื้อแบคทีเรีย	กล้วยน้ำว้า	กากน้ำตาล	น้ำสะอาด	ซีรัม (pH 4)
1	50 มล.	300 กรัม	100 มล.	1000 มล.	-
2	50 มล.	-	100 มล.	1000 มล.	300 มล.
3	-	300 กรัม	100 มล.	1000 มล.	-
4	-	-	100 มล.	1000 มล.	300 มล.

หมายเหตุ:

- ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เป็นการเปรียบเทียบว่าเมื่อใช้เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทำการหมักโดยใช้ กล้วยน้ำว้า เปรียบเทียบกับซีรัม จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อราเหมือนกันหรือไม่

- ชุดการทดลองที่ 1 และ 3 เป็นการเปรียบเทียบว่าการหมักด้วยกล้วยน้ำว้า โดยใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ กับการไม่ใช้ จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อราเหมือนกันหรือไม่

- ชุดการทดลองที่ 2 และ 4 เป็นการเปรียบเทียบว่าการหมักด้วยซีรัม โดยใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ กับการไม่ใช้ จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อราเหมือนกันหรือไม่ เป็นการพิสูจน์ว่าเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำหมักโดยทำให้น้ำหมักมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้

- ชุดการทดลองที่ 3 และ 4 เป็นชุดควบคุมใช้เปรียบเทียบว่าถ้าไม่เติมเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ลงไปน้ำหมักจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราหรือไม่

วิธีการหมักทำโดยนำกล้วยน้ำว้าสุกมาบดให้เละจากนั้นเติมกากน้ำตาลลงไปผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นเติมน้ำลงไป ,000 มล. การหมักน้ำหมักโดยใช้น้ำซีรัมทำได้โดยเติมกากน้ำตาลลงในน้ำซีรัม ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ครึ่งชั่วโมงจากนั้นเติมน้ำลงไป สำหรับชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เติมแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth นาน 24 ชั่วโมง ลงไป ปิดฝาขวดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 เดือน

4. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักที่ได้จากซีรัมและกล้วยน้ำว้า

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดยวิธี agar well diffusion โดยทำการเพาะเชื้อราลงบนจานอาหาร Mueller Hinton Agar บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ cock borer ทำให้เกิดหลุมลงบนจานอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ นำน้ำหมักจากทั้ง 4 ชุดการทดลองมาปรับ pH ให้เท่ากับ 7 (เพื่อยืนยันว่าผลการยับยั้งที่จะเกิดขึ้นไม่ได้เกิดจ pHที่เป็นกรด) แล้วเติมลงในหลุมหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อราเจริญเต็มจานอาหาร โดยมีชุดควบคุมคือจานอาหารที่ทำการเพาะเชื้อราลงไปแล้วมีการเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วลงในหลุมที่เจาะ

5. เปรียบเทียบคุณภาพของน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลอง

วิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter, ค่าการนำไฟฟ้า (EC) และ ค่าอินทรียวัตถุ (OM), ฮอร์โมนพืช และธาตุอาหารหลัก (N, P และ K) ก่อนและหลังการหมัก เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพการหมักจากกล้วยน้ำว้าและ serum

5. ผลการวิจัย

1. ผลคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี serum เป็นส่วนประกอบ

จากการนำตัวอย่างดิน น้ำซีรัม และอาหารหมักดองมาทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ แล้วทำการแยกเชื้อโดย วิธี serial ten-fold dilution ลงบนอาหารแข็งที่ serum เป็นส่วนประกอบ พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 81 ไอโซเลท โดยในตัวอย่างดินมีปริมาณเชื้อที่แยกได้สูงสุดเท่ากับ 56 ไอโซเลท รองลงมาคือ อาหารหมักดอง และน้ำซีรัม เท่ากับ 15 และ 10 ไอโซเลท ตามลำดับ (ดังตาราง 1)

ตารางที่ 1 ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียและแอคติโนมันสิทจากตัวอย่างดิน อาหารหมักดอง และ น้ำซีรัม

ตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ (ไอโซเลท)		ไอโซเลท
	แบคทีเรีย	แอคติโนมัยสิท	
ดิน	50	6	SO 1-SO 56
อาหารหมักดอง	15	-	FF 1-FF 15
น้ำซีรัม	10	-	SE 1-SE 10
รวม	81		

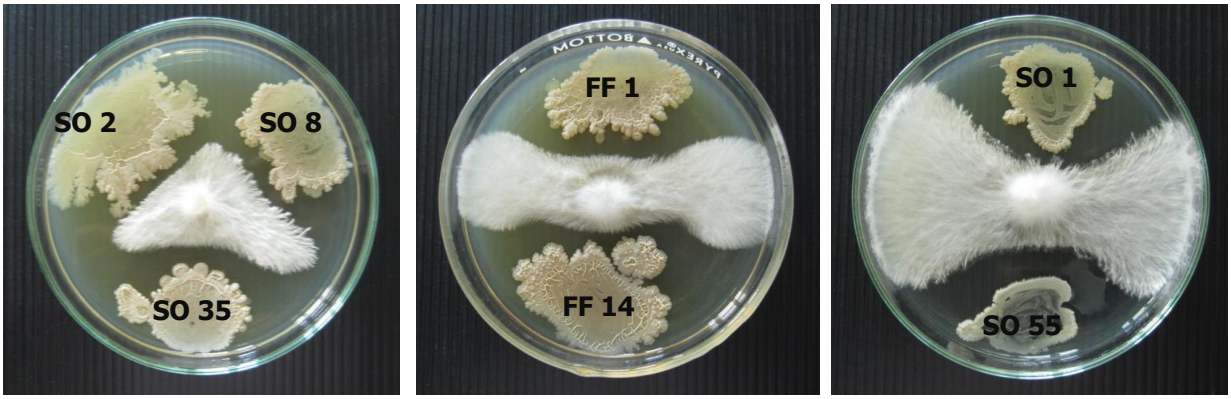
2. ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อราก่อโรคในพืชของเชื้อที่แยกได้

การทดสอบความสามารถของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 81 ไอโซเลท ในการสร้างสารต้านเชื้อราก่อโรคในพืช 3 ชนิด คือ *Rigidoporus, Fusarium, Rhizopus* โดยวิธี Dual culture bioassay พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ ซึ่งพบว่า ไอโซเลท SO 55 ให้ผลการยับยั้งดีสุด รองลงมาคือ SO 35 โดยให้บริเวณการยับยั้งมากที่สุด ในเชื้อรา *Rigidoporus* เท่ากับ 18 และ 16 มิลลิเมตร และเชื้อรา *Fusarium* เท่ากับ 15 และ 16 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อรา *Rhizopus* ไม่มีเชื้อไอโซเลทใดเลยที่สามารถยับยั้งได้ (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 1)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

ไอโซเลท	ขนาดของบริเวณการยับยั้ง (มม.)		
	Rigidoporus	*Fusarium*	*Rhizopus*
SO2, SO8, SO9, SO44, SO48,FF3, FF6, FF9,FF14	<5	<5	0
SO10, FF15	10-13	10-13	0
SO55	18	15	0
SO35	16	16	0
FF1	14	15	0
SO1,SE2, SE3, SE7, SE8	5-10	5-10	0

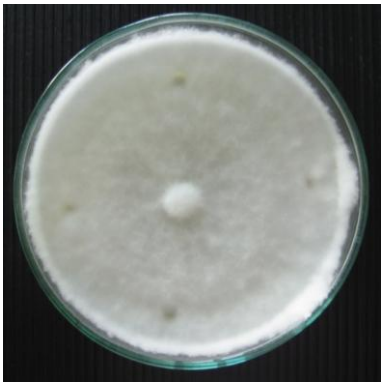
ภาพที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus* ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้



3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักที่ได้จากซีรัมและกล้วยน้ำว้า

จากการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อรา (ไอโซเลท SO55, SO35 และ FF1) มาทดสอบการหมัก serum และกล้วยน้ำว้าในสภาวะไร้อากาศ โดยการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 3 เดือน ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดยวิธี agar well diffusion พบว่าน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้เลย ดังภาพที่ 2

ภาพที่ 2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักหลังทำการหมักเป็นเวลา 3 เดือน



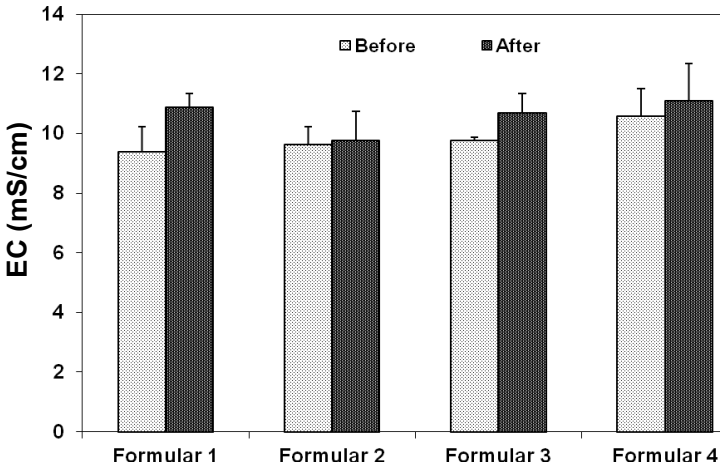
4. ผลเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลอง

ผลวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter, ค่าการนำไฟฟ้า (EC) และค่าอินทรียวัตถุ (OM) และธาตุอาหารหลัก (N, P และ K) ก่อนและหลังการหมัก เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพการหมักจากกล้วยน้ำว้าและ serum พบว่าได้ผลดังตาราง 3 และ ภาพ 3, 4 และ5

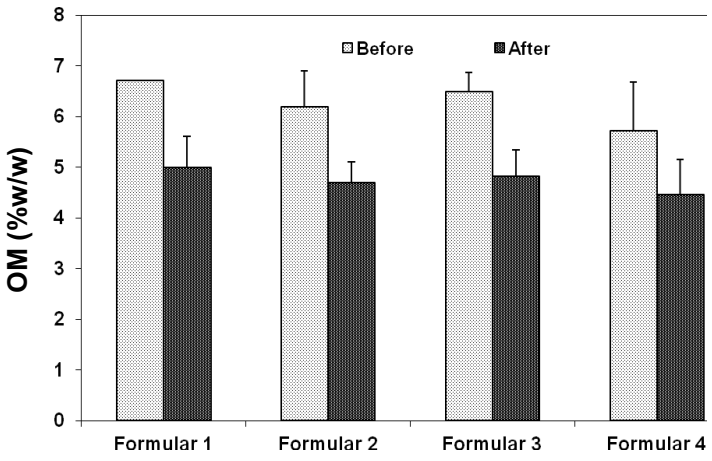
ตารางที่ 3 ผลการเปรียบคุณภาพของน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลอง ก่อนและหลังการหมักเป็นเวลา 90 วัน

ชุดการทดลองที่	1		2		3		4	
	ก่อนหมัก	หลังหมัก	ก่อนหมัก	หลังหมัก	ก่อนหมัก	หลังหมัก	ก่อนหมัก	หลังหมัก
pH	4.01	3.89	4.13	4.01	4.22	4.02	4.09	3.98
EC (mS/cm)	9.38	10.86	9.63	9.77	9.76	10.67	10.56	11.09
OM (%w/w)	6.72	5.01	6.20	4.71	6.49	4.82	5.72	4.46
N (%w/w)	0.12	0.09	0.18	0.13	0.13	0.08	0.17	0.13
P (%w/w)	0.02	0.02	0.04	0.06	0.02	0.03	0.04	0.06
K (%w/w)	0.25	0.20	0.28	0.17	0.26	0.18	0.25	0.20

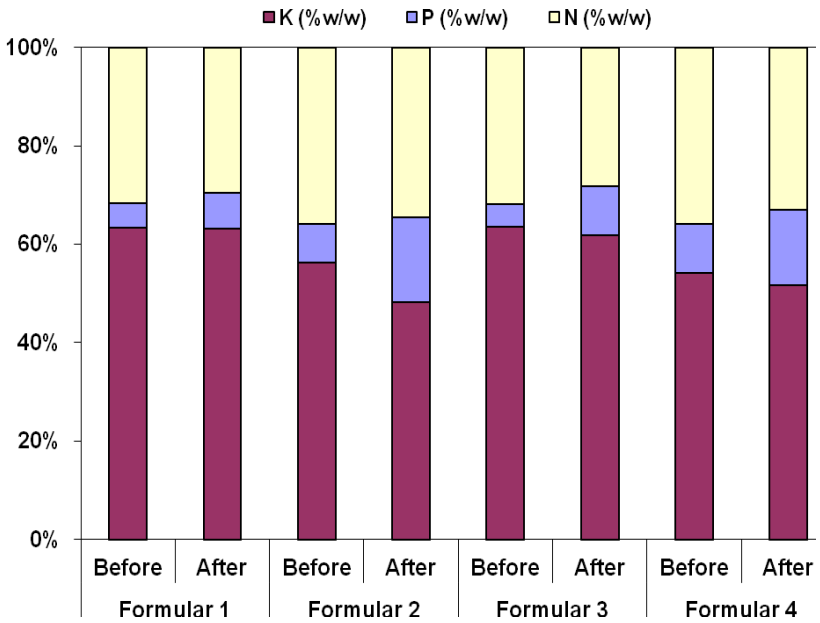
ภาพ 3 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำหมักก่อนและหลังการหมัก



ภาพ 4 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ค่าอินทรียวัตถุของน้ำหมักก่อนและหลังการหมัก



ภาพ 5 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์อัตราส่วนค่า N, P และ K ของน้ำหมักก่อนและหลังการหมัก



จากตารางที่ 3 พบว่าน้ำหมักทุกชุดการทดลองมี pH เป็นกรด (3.89-4.22) ทั้งก่อนและหลังการหมัก โดยพบว่าทุกชุดการทดลองมีpH ลดลงเล็กน้อยหลังการหมักเป็นเวลา 3 เดือน

จากภาพ 4 พบว่าน้ำหมักทุกสูตรมีค่าการนำไฟฟ้า (EC) เพิ่มขึ้นหลังการหมักเป็นเวลา 3 เดือน โดยหลังการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 9.77-11.09 mS/cm โดยชุดการทดลองที่ 1 มีค่า EC เพิ่มขึ้นสูงสุด สูตรที่ 4 มีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุดหลังการหมักโดยมีค่าเท่ากับ 11.09 mS/cm

ภาพที่ 5 พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่าอินทรียวัตถุก่อนหมักอยู่ระหว่าง 5.72-6.72 %w/w หลังหมักพบว่ามีค่าลดลงพอๆกันทุกชุดการทดลอง โดยมีค่าลดลงน้อยกว่า 2 %w/w

ปริมาณ N, P และ K มีปริมาณลดลงเล็กน้อยในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่ามีค่าลดลงอยู่ระหว่าง 0.03-0.05, 0-0.02 และ 0.05-0.11 %w/w ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จากภาพที่ 6 ในน้ำหมักชีวภาพทุกชุดการทดลองทั้งก่อนและหลังการหมักมีอัตราส่วนระหว่าง K, N และ P คล้ายๆ กัน โดยมีสัดส่วนของ K สูงสุด และมี P ต่ำสุด โดยมีอัตราส่วนของ N:P:K ประมาณ 30:10:60 หลังการหมักพบว่า P สัดส่วนเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง

6. วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน น้ำซีรัม และอาหารหมักดอง พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 81 ไอโซเลท โดยในตัวอย่างดินมีปริมาณเชื้อที่แยกได้สูงสุดเท่ากับ 56 ไอโซเลท รองลงมาคืออาหารหมักดอง และน้ำซีรัม เท่ากับ 15 และ 10 ไอโซเลท ตามลำดับ เนื่องจากในดินมีสารอาหารและสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังนั้นดินจึงมีชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าน้ำซีรัมและอาหารหมักดอง ในอาหารหมักดองและซีรัม (pH ประมาณ 4) ค่อนข้างมีความเป็นกรดดังนั้นจึงมีแบคทีเรียเพียงบางกลุ่มที่สามารถเจริญได้

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 81 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช (*Rigidoporus, Fusarium, Rhizopus*) พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus* และ

Fusarium ได้ดี คือ SO55, SO35, และ FF1 โดยให้บริเวณยับยั้งมากกว่า 14 มิลลิเมตรขึ้นไป สำหรับเชื้อรา *Rhizopus* พบว่าไม่มีแบคทีเรียไอโซเลทใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ อาจเนื่องมาจากการยับยั้งเชื้อราเกิดจากการที่เชื้อราสร้างเอนไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เชื้อรา *Rhizopus* เป็นกลุ่มของราชั้นต่ำ ซึ่งต่างจาก *Rigidoporus* และ *Fusarium* ซึ่งเป็นกลุ่มราชั้นสูงซึ่งทั้งสองกลุ่มมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ต่างกัน

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อรา (ไอโซเลท SO55, SO35 และ FF1) มาทดสอบการหมัก serum และกล้วยน้ำว้าในสภาวะไร้อากาศ โดยการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 3 เดือน ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดยวิธี agar well diffusion พบว่าน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้เลย นั่นคือเชื้อที่เติมลงไปอาจจะไม่สามารถเจริญได้ในน้ำหมัก หรือเจริญได้แต่สภาวะของน้ำหมักไม่เหมาะสม จึงไม่สามารถกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปสร้างสารต้านเชื้อราได้ นั่นคือ น้ำหมักชีวภาพมีความเป็นกรด (pH3.89-4.22) แต่ pH ที่เหมาะสมในการสร้างสารต้านเชื้อราของแบคทีเรียคือ 6-10 ตามลำดับ (Cui และคณะ, 2012; Kumar และคณะ, 2009) นั่นคือก่อนที่จะเริ่มต้นการหมักถ้ามีการปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6-10 เชื้อที่เติมลงไปอาจจะเจริญได้และมีการสร้างสารต้านเชื้อรา

น้ำหมักชีวภาพมี pH เป็นกรด (3.89-4.22) ทั้งก่อนและหลังการหมัก โดยพบว่าหลังการหมักทุกชุดการทดลองมีpH ลดลงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ชวนพิศ และคณะ (2547) ซึ่งพบว่าสูตรน้ำหมักจากพืชผักและผลไม้มี pH ประมาณ 3.7-4.6 ผลการสำรวจน้ำหมักชีวภาพของกองเกษตรเคมี (2545) พบว่า ค่า pH มีความแปร ปรวนตั้งแต่ 3.1–8.1 ทั้งนี้ขึ้นกับวัสดุที่นำมาใช้ในการหมัก สุรัตน์ วดี และคณะ (2538) พบว่าความเป็นกรดที่เกิดขึ้นหลังการหมักเกิดขึ้นจากเมื่อจุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำหมักเกิดการย่อยสลายสารอาหารในกล้วยน้ำว้า หรือ ในน้ำซีรีมจะทำให้เกิดกรดที่ระเหยได้ (volatile acid) เช่น กรดน้ำส้ม (Acetic acid) และกรดแลคติก (Lactic acid) เป็นต้น

น้ำหมักทุกสูตรมีค่าการนำไฟฟ้า (EC) เพิ่มขึ้นหลังการหมักเป็นเวลา 3 เดือน โดยหลังการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 9.77-11.09 mS/cm โดยชุดการทดลองที่ 1 มีค่า EC เพิ่มขึ้นสูงสุด สูตรที่ 4 มีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุดหลังการหมักโดยมีค่าเท่ากับ 11.09 mS/cm ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ให้คำแนะนำ (10 mS/cm) ไว้เล็กน้อย (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2544) ทุกชุดการทดลองมีค่าอินทรียวัตถุก่อนหมักอยู่ระหว่าง 5.72-6.72 %w/w หลังหมักพบว่ามีค่าลดลงพอๆกันทุกชุดการทดลอง โดยมีค่าลดลงน้อยกว่า 2 %w/w ในทุกชุดการทดลอง ปริมาณ N, P และ K มีปริมาณลดลงเล็กน้อยในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่ามีค่าลดลงอยู่ระหว่าง 0.03-0.05, 0-0.02 และ 0.05-0.11 %w/w ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จากภาพที่ 6 ในน้ำหมักชีวภาพทุกชุดการทดลองทั้งก่อนและหลังการหมักมีอัตราส่วนระหว่าง K, N และ P คล้ายๆ กัน โดยมีสัดส่วนของ K สูงสุด และมี P ต่ำสุด โดยมีอัตราส่วนของ N:P:K ประมาณ 30:10:60 หลังการหมักพบว่า P สัดส่วนเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง สอดคล้องกับผลสำรวจน้ำหมักชีวภาพของกองเกษตรเคมี (2545) ซึ่งพบว่าน้ำหมักชีวภาพจากผักผลไม้มีธาตุอาหาร K สูงกว่า P และ N

7. สรุปผลการวิจัย

จากการนำตัวอย่างดิน น้ำซีรัม และอาหารหมักดองมาทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ แล้วทำการแยกเชื้อโดย พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 81 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อทั้ง 81 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช (*Rigidoporus, Fusarium, Rhizopus*) พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus* และ *Fusarium* ได้ดี คือ SO 55, SO 35, และ FF 1 โดยให้บริเวณยับยั้งมากกว่า 14 มิลลิเมตรขึ้นไป สำหรับเชื้อรา *Rhizopus* พบว่าไม่มีแบคทีเรียไอโซเลทใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญได้

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อรา (ไอโซเลท SO55, SO35 และ FF1) มาทดสอบการหมัก serum และกล้วยน้ำว้าในสภาวะไร้อากาศ โดยการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 3 เดือน ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดยวิธี agar well diffusion พบว่าน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้เลย

เมื่อนำน้ำหมักทุกชุดการทดลองไปวิเคราะห์คุณภาพพบว่าทุกชุดการทดลองมี pH เป็นกรด (3.89-4.22) ทั้งก่อนและหลังการหมัก โดยพบว่าหลังการหมักทุกชุดการทดลองมี pH ลดลงเล็กน้อย น้ำหมักทุกชุดการทดลองมีค่าการนำไฟฟ้า (EC) เพิ่มขึ้นหลังการหมัก โดยหลังการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 9.77-11.09 mS/cm โดยชุดการทดลองที่ 1 มีค่า EC เพิ่มขึ้นสูงสุด หลังการหมักสูตรที่ 4 มีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 11.09 mS/cm ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ให้คำแนะนำ (10 mS/cm) ไว้เล็กน้อย (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2544) ค่าอินทรียวัตถุก่อนหมักอยู่ระหว่าง 5.72-6.72 %w/w หลังหมักพบว่ามีค่าลดลงพอๆกันทุกชุดการทดลอง โดยมีค่าลดลงน้อยกว่า 2 %w/w ในทุกชุดการทดลอง ปริมาณ N, P และ K มีปริมาณลดลงเล็กน้อยในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่ามีค่าลดลงอยู่ระหว่าง 0.03-0.05, 0-0.02 และ 0.05-0.11 %w/w ตามลำดับ ในน้ำหมักชีวภาพทุกชุดการทดลองทั้งก่อนและหลังการหมักมีอัตราส่วนระหว่าง K, N และ P คล้ายๆ กัน โดยมีสัดส่วนของ K สูงสุด และมี P ต่ำสุด โดยมีอัตราส่วนของ N:P:K ประมาณ 30:10:60 หลังการหมักพบว่า P สัดส่วนเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง

8. ข้อเสนอแนะ

จากรายงานที่พบว่าในน้ำซีรัมมีสาร L-Quebrachitol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์สารต้านเชื้อราด้วยวิธีการทางเคมีในทางอุตสาหกรรมนั้น งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรียในการสังเคราะห์สารต้านเชื้อราโดยใช้สารตั้งต้นที่มีอยู่ในน้ำซีรัมโดยวิธีการง่ายๆ เช่นเดียวกับการหมักน้ำหมักชีวภาพซึ่งใช้ต้นทุนต่ำ และเกษตรกรสามารถทำเองได้ ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจจะทำให้ได้น้ำหมักชีวภาพที่มีสารต้านเชื้อราซึ่งเมื่อนำไปใช้แล้วนอกจากจะช่วยให้พืชเจริญดีเนื่องจากสารอาหารที่เกิดขึ้นจากการหมักแล้วยังอาจช่วยยับยั้งเชื้อรากก่อโรคพืชได้อีกด้วย แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่าในสภาวะที่เป็นกรด และมีออกซิเจนในปริมาณน้อยของน้ำหมัก อาจจะไม่เหมาะสมกับการกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปหรือเชื้ออื่นๆที่มีอยู่ตามธรรมชาติสร้างสารต้านเชื้อราได้ อย่างไรก็ตามถ้าเราปรับสภาวะในการหมัก เช่น ลองปรับ pH ให้เป็นกลาง หรือเป็นเบส ก่อนการหมัก ปรับปริมาณของสารตั้งต้น

นั่นคือความเข้มข้นของน้ำซีรัม หรือปรับสภาวะการหมักให้มีอากาศมากขึ้นอาจจะทำให้เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราได้อยู่แล้ว จะสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราได้ดียิ่งขึ้น

การที่น้ำหมักไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้อาจเนื่องมาจากเชื้อที่เติมลงไปไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะของการหมัก ซึ่งในงานวิจัยครั้งหน้าควรมีการปรับสภาวะแวดล้อมเพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อและควรมีการตรวจหาแบคทีเรียที่เติมลงไปในน้ำหมักว่ายังมีชีวิตอยู่หรือไม่ภายหลังการหมัก อีกประการหนึ่งอาจจะนำสารต้านเชื้อราที่ได้จากแบคทีเรียนั้นไปเติมลงในน้ำหมักชีวภาพหลังการหมักก็น่าจะสามารถบรรลุวัตถุประสงค์ของการผลิตน้ำหมักชีวภาพที่มีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เอกสารอ้างอิง

กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2546. คู่มือการจัดการสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรมน้ำยางข้นและยางแท่ง STR 20, กรุงเทพมหานคร.

กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2545. ฮอร์โมนพืชและธาตุอาหารพืชในน้ำหมักชีวภาพ. 134 น.

จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณิชย์, 2548. การวิจัยและพัฒนายางธรรมชาติ การพัฒนายางสกิมและสารที่มีคุณค่าทางเศรฐกิจจากของเสียที่ได้อุตสาหกรรมน้ำยางธรรมชาติ. Science Technology มหาวิทยาลัยมหิดล http://www.mb.mahidol.ac.th/thalassemia/uploads/0a1401e8-832e-b9e6.pdf

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, รุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล และ ธีรนุต ร่มโพธิ์ภักดิ์ (2547) เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร, กรุงเทพฯ, หน้า 481-488

สุรัตน์วดี จิวะจินดา, ศรีพรรณ มุขสมบัติ, ชวนพิศ อรุณรังสิกุล, มณี ตันติรุ่งกิจ และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล. 2538. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและชีวเคมีของ EM. 3-4 น. ใน การสัมมนาแถลงผลการวิจัยโครงการวิจัย EM และผลของการใช้ต่อการเกษตรและสิ่งแวดล้อม. 3-4 สิงหาคม 2538. กรมวิชาการเกษตร, กทม.

Chida, N, Yamada, K. and Okawa, S (1992) Total synthesis of antibiotic (-)- oudemansin X utilizing L-quebrachitol as chiral pool. Chemistry Letters. 4: 687-690.

Cui, TB, Chai, HY and Jiang, LX (2012) Isolation and Partial Characterization of an Antifungal Protein Produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. Molecules. 17: 7336-7347.

Deushi T, Nakayama M, Watanabe I, Mori T (1979) A new broad-spectrum Aminoglycoside antibiotic complex, sporaricin. III. The structures of sporaricins A and B. J Antibiot (Tokyo). 32(3): 187-92.

Kumar, A, Saini, P and Shrivastava, JN (2009) Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Indian Journal of Experiment Biology. 47: 57-62.

Ohaya, N and Koyama, T (2001) Biodegradation of natural and synthesis rubbers. In Biopolymers. Vol.2.1st ed. (Koyama, T. and Steinbuchel, A., eds.) Wiley-VCH, Weinheim.

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้
และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ผลที่ได้รับ
เพื่อคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสารที่มีอยู่ใน serum ไปเป็นสารต้านการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจาก serum	1. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี serum เป็นส่วนประกอบ	1. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี serum เป็นส่วนประกอบ	-ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี serum เป็นส่วนประกอบ
	2. คัดเลือก สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสาร antibiotic ได้ มาทดสอบการหมักserumในสภาวะไร้อากาศ (การทำน้ำหมักชีวภาพ) เปรียบเทียบกับการหมักด้วยวัสดุอื่นๆ	2. คัดเลือก สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสาร antibiotic ได้ มาทดสอบการหมัก serumในสภาวะไร้อากาศ (การทำน้ำหมักชีวภาพ) เปรียบเทียบกับการหมักด้วยวัสดุอื่นๆ	- ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจาก serum ซึ่งทำให้น้ำหมักมีคุณสมบัติในการสร้างสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย
	3. ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียของน้ำหมักชีวภาพโดยวิธี agar well diffusion	3. ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียของน้ำหมักชีวภาพโดยวิธี agar well diffusion	- ทราบผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียของน้ำหมักชีวภาพโดยวิธี agar well diffusion
	4. วิเคราะห์ค่า pH, EC, OM, ฮอร์โมนพืชและ ธาตุอาหารหลัก (N,Pและ K) ในน้ำหมักชีวภาพ	4. วิเคราะห์ค่า pH, EC, OM, ฮอร์โมนพืชและ ธาตุอาหารหลัก (N,Pและ K) ในน้ำหมักชีวภาพ	- ทราบผลวิเคราะห์ค่า pH, EC, OM, ฮอร์โมนพืชและ ธาตุอาหารหลัก (N,Pและ K) ในน้ำหมักชีวภาพ

สรุปข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิต่อโครงการ
“การคัดเลือกแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัมที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา” สัญญาเลขที่ RDG5450086

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
<u>ความเห็นด้านการพิมพ์</u>	
1.ตรวจสอบข้อมูลในหน้า 12 ตัวเลขในภาคบรรยายและในตารางถูกต้องหรือไม่ เนื่องจากตัวเลขไม่ตรงกัน	1. ตรวจสอบและแก้ไขเรียบร้อยแล้ว
2. ตรวจสอบตัวสะกดให้ถูกต้อง	2. ตรวจสอบและแก้ไขเรียบร้อยแล้ว
3. ตรวจสอบการเขียนเอกสารอ้างอิงให้ถูกต้อง a. ตรวจสอบชื่อเรื่อง, ปี พ.ศ. ให้ตรงกัน b. อ้างอิงทุกชื่อในเอกสารอ้างอิง c. เรียงลำดับอักษร A-Z d. การพิมพ์ หรือ เขียนปี พ.ศ. ในรายชื่อเอกสารอ้างอิงให้สอดคล้องกัน เช่น ผู้แต่ง, ปี พ.ศ. ก็ให้เหมือนกัน ไม่ใช่ ผู้แต่ง (ปี พ.ศ.) จะใช้แบบใหนควรใช้หลักเดียวกัน	3. ตรวจสอบและแก้ไขเรียบร้อยแล้ว
<u>ความเห็นด้านวิชาการ</u>	
1. การทดลองในแต่ละขั้นตอน นักวิจัยควรแสดงรายละเอียดลักษณะกรรมวิธี วิธีการดำเนินการทดลอง รวมทั้งการวัดผลการทดลองให้มองเห็นภาพการทำงานว่าเป็นอย่างไร ควรเพิ่มรายละเอียดในวิธีการให้ชัดเจนกว่านี้ เช่น การฆ่าเชื้อ serum ทำอย่างไร ส่วนผสมของ serum ที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนใช้มากน้อยแค่ไหน	1. ได้เพิ่มเติมรายละเอียดต่างๆในวิธีการทดลอง หน้า 10-11 เรียบร้อยแล้ว
2. การทดลองการหมัก นักวิจัยควรเพิ่มเติมการอธิบายวัสดุที่ใช้ เช่น กล้วยน้ำว้า สุก หรือ ดิบ ปั่นหรือไม่อย่างไร แต่ละส่วนเป็นโดยน้ำหนักหรือโดยปริมาตร หัวเชื้อแบคทีเรียเติมอย่างไร	2. ในวิธีการทดลองข้อ 3 หน้า 11 ได้เพิ่มรายละเอียดไว้เรียบร้อยแล้ว
3. Serumที่เป็นวัสดุทดลองหลักนั้นผู้วิจัยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำยางซึ่งคาดว่ามี serum ปะปนอยู่ (แหล่งที่มา มาจากใหน) หรือทำการปั่นน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำยางเพื่อสกัดเอาซีรัมมาทดสอบโดยตรง แล้วชนิดของดินหรืออาหารหมักดองที่นำมาแยกเชื้อคืออะไร ชนิดของอาหารแข็งที่ใช้กี่ชนิด อะไรบ้าง เพราะชนิดของอาหารมีผลต่อการแยกเชื้อแต่ละชนิดต่างกัน	3. ในวิธีการทดลองข้อ 1 หน้า 10 ได้เพิ่มรายละเอียดเกี่ยวกับ - ที่มาของซีรัม ชนิดของอาหารหมักดองและดิน - สูตรของอาหารแข็งที่ใช้ในการแยกเชื้อใช้เพียงสูตรเดียวที่มีส่วนประกอบเป็น ซีรัมอย่างเดียว ทั้งนี้เพื่อต้องการคัดเลือกเอาเฉพาะเชื้อที่สามารถใช้ซีรัมในการเจริญได้

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
4. กรณีการทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อราก่อโรคในพืช วัตถุประสงค์ของผู้วิจัยคือการใช้ซีรัมเป็นวัสดุตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อจากขั้นตอนที่ 1 เพื่อให้สร้างสารต้านเชื้อราก่อโรคจากการใช้สารที่ผู้วิจัยอ้างว่ามีอยู่ในซีรัม ผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดลองเพื่อให้ดำเนินไปตามเป้าหมาย ซึ่งหากดูผลการทดลองแล้วเป็นการศึกษาในลักษณะความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของเชื้อที่แยกได้ ประสิทธิภาพที่ได้ จะทราบได้อย่างไรว่าเป็นเชื้อที่สามารถสร้างสารต้านเชื้อราที่ก่อโรคจากการใช้สารที่มีอยู่ในซีรัม ควรทำการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อที่แยกได้แต่ละชนิดในน้ำซีรัม เพื่อให้สร้างสารที่ผู้วิจัยคาดหวังก่อน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบการยับยั้ง ดังนั้นหัวข้อนี้ควรเปลี่ยนให้เหมาะสมเป็นความสามารถในการต้านเชื้อราก่อโรค	4. จุดประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้คือ เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัมที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา นั่นคือเพื่อทดสอบดูว่าเชื้อที่ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา เมื่อเอาไปเลี้ยงในซีรัมที่สภาวะการหมัก เชื้อนั้นจะสามารถใช้สารในซีรัมแล้วทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มมากขึ้นจากเดิมหรือไม่
5. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช หากแสดงเป็นเปอร์เซนต์การยับยั้งจะเห็นประสิทธิภาพของเชื้อชัดเจนกว่า	5. จากผลการทดลองที่ได้ไม่สามารถแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้เนื่องจากมีการทดสอบโดยใช้แบคทีเรียถึง 3 ชนิด ในจานอาหารเดียวกัน อย่างไรก็ตามจะนำข้อเสนอแนะไปปรับปรุงการทดลองในครั้งต่อไป
6. จากการทดลองนี้ ทราบได้อย่างไรว่าเชื้อที่คัดเลือกมาใช้ในการหมักสามารถใช้สาร L-Quebrachitol เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารต้านเชื้อราได้ เนื่องจากไม่มีการทดลองส่วนใดสนับสนุนผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช เชื้อที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus* และ *Fusarium* ได้ อาจเกิดกลไกอื่น เช่นการสกัดเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อรา หรือมีการสกัดสารปฏิชีวนะแบบอื่น และหากไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมีคุณสมบัติในการใช้สาร L-Quebrachitol ในการสังเคราะห์สารต้านเชื้อรา การทดลองจะไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้	6. จุดประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้คือ เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัมที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา การดำเนินงานวิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายที่จะนำซีรัมมาใช้ในการทำน้ำหมักชีวภาพเพื่อลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นโดยผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าเชื้อที่ทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราเมื่อใส่ลงในน้ำหมักถ้าเชื้อเจริญได้ เชื้อก็น่าจะสร้างสารต้านเชื้อราได้ ซึ่งจะทำให้น้ำหมักที่ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราไปด้วย ส่วนในเรื่องการใช้สาร L-Quebrachitol ในการสังเคราะห์สารต้านเชื้อรานั่นเป็นผลพลอย

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
	ได้ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นนั่นคือ ถ้าเชื้อใช้สารนี้เป็นสารเริ่มต้นอาจจะทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นั้นจะเห็นว่าน้ำหมักที่ได้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียน่าจะไม่สามารถเจริญได้ในน้ำหมัก นั่นคือ การทดลองครั้งนี้ยังไม่บรรลุวัตถุประสงค์ ซึ่งงานวิจัยครั้งต่อไปน่าจะมีการปรับสภาพน้ำหมักก่อนการหมักเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปเจริญได้
7. การทดสอบทุกการทดลองควรเปรียบเทียบกับชุดควบคุม	7. การทดลองมีชุดควบคุมแต่ไม่ได้ในระบุไว้ในรายงาน ในรายงานครั้งนี้จึงได้เพิ่มเติมรายละเอียดเกี่ยวกับชุดควบคุมไว้ในวิธีการทดลอง ข้อ 3และ4 หน้า 11
8. ผลการทดลอง	8.
a. รายละเอียดชนิดของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละตัวอย่าง แยกเป็นแบคทีเรีย หรือ แอคติโนมัยสิท กี่ชนิด มีชนิดเชื้อเหมือนหรือต่างกันอย่างไร	a. ได้เพิ่มเติมรายละเอียดต่างๆในผลทดลอง หน้า 12 เรียบร้อยแล้ว
b. การทดลองนี้สามารถสรุปได้หรือไม่ว่าเชื้อที่คัดเลือกสามารถสร้างสารต้านเชื้อราก่อโรคจากการใช้สารที่ผู้วิจัยอ้างว่ามีอยู่ในซีรัม และเชื้อที่ใช้เป็นหัวเชื้อหมักสามารถเจริญในสภาพการหมักได้หรือไม่	b. การทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อที่คัดเลือกสามารถสร้างสารต้านเชื้อราก่อโรคจากการใช้สาร L-Quebrachitol ซึ่งการจะสรุปได้ต้องดำเนินการทดลองตามข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิข้อที่ 4 การทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อที่ใช้เป็นหัวเชื้อหมักสามารถเจริญในสภาพการหมักเช่นเดียวกัน ซึ่งการจะสรุปได้จำเป็นต้องทำการแยกเชื้อที่เติมลงไปในน้ำหมักหลังจากหมักเสร็จ ซึ่งผู้วิจัยจะนำไปดำเนินการในการวิจัยครั้งต่อไป
c. คุณภาพน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลองที่ศึกษา (ตามข้อ 4	c. งานวิจัยครั้งนี้มีการศึกษาคุณภาพน้ำ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
หน้า 13) ต่างกันหรือไม่อย่างไร ควรวิจัยผลเพิ่มเติม ว่าผลวิเคราะห์ให้ประโยชน์อย่างไรต่องานวิจัย มีประโยชน์และเกี่ยวข้องกับการศึกษานี้อย่างไรหรือผู้วิจัยต้องการแสดงให้เห็นว่าน้ำหมักที่ได้ไม่ต่างจากน้ำหมักชนิดอื่นๆ	หมักที่ได้ควบคู่ด้วยเนื่องจากต้องการทราบว่าการเติมเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นลงไปมีผลต่อคุณภาพน้ำหมักที่เกิดขึ้นหรือไม่อย่างไร แต่จากผลการทดลองพบว่าคุณภาพน้ำหมักที่ได้จากการทดลองทั้ง 4 ชุด มีคุณภาพแตกต่างกันน้อยมาก นั่นคือ วัสดุที่ใช้ในการหมักที่มีความต่างกัน และการเติมเชื้อกับการไม่เติมเชื้อลงไปในการหมักไม่มีผลต่อคุณภาพของของน้ำหมัก
9.ผลการทดลองไม่สามารถตอบโจทย์ได้ รู้เพียงว่าในซีรัมมีจุลินทรีย์ยับยั้งได้ แต่เมื่อใส่ในการหมักซึ่งมีจุลินทรีย์อีกหลายชนิด จะรู้ได้อย่างไรว่าเป็น effect ของจุลินทรีย์ชนิดใหนที่มีผลต่อการยับยั้ง เพราะโดยทั่วไปผู้วิจัยได้ทบทวนเอกสาร เกี่ยวกับน้ำหมักชีวภาพแล้วว่ามีสารยับยั้งป้องกันกำจัดโรคพืชได้ และ pH ที่เป็นกรดของน้ำหมักจะมีส่วนช่วยในการยับยั้ง ดังนั้นแนวคิดใหม่ที่จะปรับ pH ให้เป็นกลางหรือเป็นด่างจึงไม่ถูกต้อง	9. การทดลองในส่วนของการหมักมีชุดควบคุมคือชุดการทดลองที่ 3และ4 ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราลงไป ซึ่งทำให้สามารถบอกได้ว่าการยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจากเชื้อที่เติมลงไปหรือไม่ การปรับ pH ให้เป็นกลาง หรือ ด่าง จะทำก่อนการหมัก เพื่อช่วยให้แบคทีเรียที่เติมลงไปเจริญได้ และสร้างสารต้านเชื้อราก่อน แต่ในท้ายที่สุดเมื่อกระบวนการหมักเสร็จสิ้นลง น้ำหมักก็จะมีความเป็นกรดเนื่องจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีการสร้างกรด
10. ผลการทดลองเกี่ยวกับการวิเคราะห์ธาตุอาหารในน้ำหมัก ก่อนและหลัง ยังบอกอะไรไม่ได้ และไม่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อรา เพียงแต่บอกว่ามีธาตุอาหารเท่าไหร่ ซึ่งตามผลการทดลองได้ค่าต่ำมาก จึงนำไปใช้เพื่อเพิ่มธาตุอาหารไม่ได้ หรือแม้แต่การปรับปรุงดิน เพราะค่าอินทรีย์วัตถุต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยอินทรีย์ทั่วไป	10. การวิเคราะห์ธาตุอาหารในน้ำหมักเป็นการทดสอบคุณภาพของน้ำหมักที่ได้ ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อรา แต่ทำควบคู่ไปด้วยเพื่อประเมินว่าน้ำหมักที่ได้สามารถนำไปใช้เพื่อเพิ่มธาตุอาหารได้หรือไม่
11. ในส่วนของข้อเสนอแนะ การปรับ pH ในกระบวนการหมักให้เป็นกลางหรือเบสสามารถทำได้หรือไม่ การทดลองที่ไม่ประสบผลสำเร็จ น่าจะเกิดจากเชื้อที่คัดเลือกไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพนี้ ซึ่งผู้วิจัยควรตรวจสอบก่อนแล้วนำมาวิจารณ์ผล	11. ปรับข้อเสนอแนะในหน้า 17 และวิจารณ์ผลการทดลองหน้า 16 เป็นควรมีการปรับ pH ก่อนการหมักให้เป็นกลางหรือ ด่าง เพื่อช่วยให้แบคทีเรียที่เติมลงไปเจริญได้ และสร้างสารต้านเชื้อราก่อน แต่

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
	ในท้ายที่สุดเมื่อกระบวนการหมักเสร็จสิ้นลง น้ำหมักก็จะมีความเป็นกรด เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีการสร้างกรด
12. การเสนอแนะจากผลงานวิจัย ในเมื่อการทดลองนี้ไม่ได้ผลในเชิงการต่อต้านเชื้อ ผู้วิจัยไม่ควรเสนอแนะในเชิงการคาดการณ์ว่าหากนำไปใช้แล้วจะได้ผล เพราะในสภาพธรรมชาติยังมีปัจจัยอีกมากมายไม่เหมือนในสภาพการทดลองซึ่งสามารถควบคุมได้ หากในสภาพการทดลองในห้องปฏิบัติการไม่ได้ผลแล้วไม่ควรให้ข้อเสนอแนะในทำนองนี้	12. ในข้อเสนอแนะหน้า 17ได้ปรับแก้ตามความเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิเรียบร้อยแล้ว

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพจากซีรัม ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

Screening of bacteria to used as inoculum for bio-organic liquid fertilizer from serum

ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว

(ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.))

เรื่องย่อ

○ สามารถแยกเชื้อได้ 81 ไอโซเลท พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา ได้ดี โดยให้บริเวณยับยั้งมากกว่า 14 มิลลิเมตรขึ้นไป

○ เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทดสอบการหมักเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าหลังการหมักทุกชุดการทดลองมี pH เป็นกรด(3.89-4.22) มีค่าอยู่ระหว่าง 9.77-11.09 mS/cm มีค่าอินทรียวัตถุอยู่ระหว่าง 4.46-5.01 %w/w ค่า N P และ K อยู่ระหว่าง 0.08-0.13, 0.02-0.06 และ 0.17-0.20 %w/w ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนของ N:P:K ประมาณ 30:10:60

○หลังการหมักน้ำหมักทุกชุดการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้เลย อาจเกิดจากสภาวะในการหมักไม่เหมาะสมกับการสร้างสารต้านเชื้อรา

คำนำ

ซีรัม (serum) เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการทำน้ำยางข้น มีรายงานว่าใน serum มีสารอินทรีย์ที่มีประโยชน์ปะปนอยู่มากมาย เช่น L-Quebrachitol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารต่างๆ เช่น สารต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial), สารต้านมะเร็ง (anticancer) และสารต้านเชื้อรา (antifungal) ดังนั้นถ้าได้มีการนำ serum มาใช้เลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้แบคทีเรียเปลี่ยนสารตั้งต้นที่มีอยู่ใน serum เป็นสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะนำกลับไปใช้ในการควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในพืชชนิดต่างๆ ก็จะเป็นการลดต้นทุนในการดำเนินงานในระบบบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากปริมาณน้ำเสียลดลง อีกทั้งเป็นการนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยางกลับมาให้เกิดประโยชน์

ผลการทดลอง

ผลคัดเลือกแบคทีเรียทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อราก่อโรคในพืช

แยกเชื้อได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลท มี 3 ไอโซเลทรา (SO 55, SO 35 และ FF 1) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีโดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งมากกว่า 17 มม.

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียและแอคติโนมัยสิทจากตัวอย่างดิน อาหารหมักดอง และ น้ำซีรัม

ตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ (ไอโซเลท)	ไอโซเลท
ดิน	56	SO 1-SO 56
อาหารหมักดอง	15	FF 1-FF 15
น้ำซีรัม	10	SE 1-SE 10
รวม	81	

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

ไอโซเลท	ขนาดของบริเวณการยับยั้ง (มม.)		
	Rigidoporus	*Fusarium*	*Rhizopus*
SO2, SO8, SO9, SO44, SO48, FF3, FF6, FF9, FF14	<5	<5	0
SO 10, FF 15	10-13	10-13	0
SO 55	18	15	0
SO 35	16	16	0
FF 1	14	15	0
SO 1,SE 2, SE 3,SE 7, SE 8	5-10	5-10	0

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus* ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

ผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักที่ได้จากซีรัมและกล้วยน้ำว้า

จากการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อรา (ไอโซเลท SO55, SO35 และ FF1) มาทดสอบการหมัก โดยการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 3 เดือน ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรของน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดยวิธี agar well diffusion พบว่าน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้เลย

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของน้ำหมักหลังทำการหมักเป็นเวลา 3 เดือน

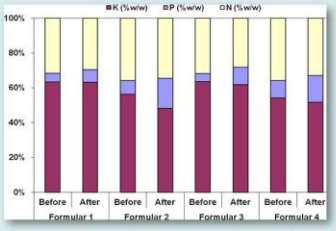
ผลเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลอง

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทดสอบการหมักเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าหลังการหมักทุกชุดการทดลองมี pH เป็นกรด(3.89-4.22) มีค่าอยู่ระหว่าง 9.77-11.09 mS/cm มีค่าอินทรียวัตถุอยู่ระหว่าง 4.46-5.01 %w/w ค่า N P และ K อยู่ระหว่าง 0.08-0.13, 0.02-0.06 และ 0.17-0.20 %w/w ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนของ N:P:K ประมาณ 30:10:60

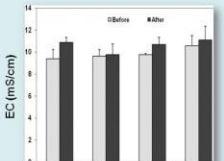
ผลการเปรียบคุณภาพของน้ำหมักทั้ง 4 ชุดการทดลอง ก่อนและหลังการหมักเป็นเวลา 90 วัน

ชุดการทดลองที่	1		2		3		4	
	ก่อนหมัก	หลังหมัก	ก่อนหมัก	หลังหมัก	ก่อนหมัก	หลังหมัก	ก่อนหมัก	หลังหมัก
pH	4.01	3.89	4.13	4.01	4.22	4.02	4.09	3.98
EC (mS/cm)	9.38	10.86	9.63	9.77	9.76	10.67	10.56	11.09
OM (%w/w)	6.72	5.01	6.20	4.71	6.49	4.82	5.72	4.46
N (%w/w)	0.12	0.09	0.18	0.13	0.13	0.08	0.17	0.13
P (%w/w)	0.02	0.02	0.04	0.06	0.02	0.03	0.04	0.06
K (%w/w)	0.25	0.20	0.28	0.17	0.26	0.18	0.25	0.20

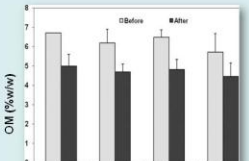
กราฟแสดงผลการวิเคราะห์อัตราส่วนค่า N, P และ K ของน้ำหมักก่อนและหลังการหมัก



กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำหมักก่อนและหลังการหมัก



กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ค่าอินทรียวัตถุของน้ำหมักก่อนและหลังการหมัก



เอกสารอ้างอิง

Barton, D.H. R., Bath, S., Billington, D. C., Gero, S. D., Béatrice, Q. and Samadi, M.1995. Total synthesis of (–)-ovalicin and analogues from L-quebrachitol *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1551-1558

Cui, TB, Chai, HY and Jiang, LX (2012). Isolation and Partial Characterization of an Antifungal Protein Produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. Molecules. 17:7336-7347.

Kumar, A, Saini, P and Shrivastava, JN. (2009) Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Indian Journal of Experiment Biology. 47: 57-62.

วิจารณ์ผลการทดลอง

หลังการหมักน้ำหมักทุกชุดการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้เลยนั่นคือเชื้อที่เติมลงไปอาจจะไม่สามารถเจริญได้ในน้ำหมัก หรือ เจริญได้แต่สภาวะของน้ำหมักไม่เหมาะสมจึงไม่สามารถกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปสร้างสารต้านเชื้อราได้ หรือแม้แต่เชื้อธรรมชาติที่อยู่ในกล้วยน้ำว้าหรือในน้ำซีรัมก็ไม่สามารถที่จะสร้างสารต้านเชื้อราได้ นั่นคือ ชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อลงไป มีเพียงเชื้อที่อยู่ในน้ำซีรัมและในกล้วยน้ำหว้าตามธรรมชาติเท่านั้น จากรายงานของ Cui และคณะ (2012) และ Kumar และคณะ (2009) พบว่า pH ที่เหมาะสมในการสร้างสารต้านเชื้อราของแบคทีเรียคือ 6-10 และ 7 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำหมักไปใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่มีอยู่ในน้ำอาจจะมีการเจริญหรือเพิ่มจำนวนได้ในสภาพที่อยู่ในดิน และอาจจะมีผลยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000 โทร: 055964622 E-mail: nnakaew@hotmail.com