โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนเศษพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าอ้อยในสภาวะแล้ง

Immobilization of mixed bacteria on bioplastic scrap for promoting sugarcane growth during drought conditions

ชื่อนิสิต นางสาวภาณุมาศ เมืองวุฒฑานันท์ **เลขประจำตัว** 5932343823

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนเศษพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าอ้อยในสภาวะแล้ง

โดย นางสาวภาณุมาศ เมืองวุฒฑานันท์ รหัสประจำตัวนิสิต 5932343823

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2315499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการ

(ดร.สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนเศษพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าอ้อยในสภาวะแล้ง

Immobilization of mixed bacteria on bioplastic scrap for promoting sugarcane growth during drought conditions

นิสิตในโครงการ

นางสาวภาณุมาศ เมืองวุฒฑานันท์

รหัสประจำตัวนิสิต 5932343823

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

ชื่อโครงการ การตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนเศษพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าอ้อยในสภาวะแล้ง

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวภาณุมาศ เมืองวุฒฑานันท์ รหัสประจำตัวนิสิต 5932343823

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย โทร 662 218 5081

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

อ้อย (Sugarcane, *Saccharum officinarum* L.) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย แต่พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่นอกเขตชลประทาน ทำให้เมื่อเกิดภัยแล้งขึ้นจึงส่งผลกระทบต่อผลผลิตของอ้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 และแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ *Weissella cibaria* PN3 มาช่วยส่งเสริมการเจริญของอ้อยภายใต้สภาวะแล้ง โดยจะเตรียมแบคทีเรียในรูปของหัวเชื้อผสมแบบตรึงกับวัสดุ เพื่อช่วยให้แบคทีเรียสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานขึ้น โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้พลาสติกชีวภาพชนิด Polylactic acid (PLA) มาตรึงแบคทีเรีย เนื่องจาก PLA เป็นบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ทั่วไป และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ โดยได้นำ PLA มาตัดให้เป็นชิ้นเล็กขนาด 6 มิลลิเมตร ก่อนจะนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงแบคทีเรีย เมื่อนำ PLA ที่มาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าแบคทีเรียเกาะบน PLA ได้ไม่ค่อยดี และเมื่อทำการทดลองย่อยสลาย PLA ในดินชนิดต่างๆ พบว่า PLA ที่ฝังในดิน 21 สัปดาห์ ย่อยสลายไปเพียงบางส่วนเท่านั้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำ PLA มาผสมกับวัสดุตรึงชนิดอื่น ได้แก่ ถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม เพื่อใช้เป็นวัสดุตรึงผสม 4 ชนิด เปรียบเทียบกับวัสดุตรึงผสมแบบ 3 ชนิด ที่ไม่เติม PLA พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึงผสมทั้ง 2 แบบมีค่าใกล้เคียงกัน คือ 10^{10}-10^{11} CFU ต่อกรัมของวัสดุตรึงแสดงให้เห็นว่า PLA สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุสำหรับตรึงเชื้อแบคทีเรียได้ และเมื่อนำวัสดุที่ตรึงแบคทีเรียผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด มาผสมลงในดินที่ใช้ปลูกอ้อย และให้น้ำเป็นเวลา 11 วัน พบว่าการเจริญของต้นอ้อยให้ผลไม่ต่างกัน ทั้งความยาวใบ และความยาวลำต้น เมื่อเทียบกับต้นอ้อยในวันที่เริ่มลงปลูก (วันที่ 0) แสดงว่า PLA ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของอ้อยและช่วยลดปริมาณของวัสดุตรึงอื่นๆ ได้ ดังนั้นจึงควรทดลองเพิ่มเติม โดยรดน้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และจำลองสภาวะแล้งด้วยการงดให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงเก็บผลการทดลองได้แก่ ความยาวใบ ความยาวลำต้น และความยาวรากของต้นอ้อย รวมถึงปริมาณของแบคทีเรียบริเวณรอบพื้นผิวราก เพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพของวัสดุตรึงที่ประกอบด้วย PLA ในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าอ้อยในสภาวะแล้งต่อไป

Project title Immobilization of mixed bacteria on bioplastic scrap for promoting sugarcane growth during drought conditions

Name of student Miss Panumas Muangwutthanant Student ID. 5932343823

Project Advisor Assoc. Prof. Ekawan Luepromchai, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic year 2019

Abstract

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is one of the important economic crops in Thailand. The sugarcane is mostly cultivated outside the irrigated area, thus the sugarcane yields can affect by drought condition. Therefore, this study interested to use plant growth promoting rhizobacteria (*Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19 and *Bacillus altitudinis* T17 and a biosurfactant producing bacterium *(Weissella cibaria* PN3) to enhance drought tolerance of sugarcane. The mixed bacterial inoculum was immobilized in solid materials to prolong its survival in the environment. In this study, polylactic acid (PLA) bioplastics was selected for immobilizing bacteria because PLA is a commonly used packaging products and can decompose naturally. To immobilize the bacteria, PLAs were cut into small pieces (6 mm) and immobilized with prepared bacterial culture. The immobilized PLAs were observed for bacterial attachment by scanning electron microscope (SEM). The result showed that the bacteria did not attach well on PLAs surface. In addition, the degradation of PLAs was evaluated in different types of soil. The results showed that the PLAs partially degraded in all soil samples after 21 weeks. The study therefore mixed PLAs with other 3 carriers (i.e. biochar, fly ash and palm kernel cake) before bacterial immobilization and compared with the treatment containing 3-mixed carriers without PLA. The results show that the survival rate of bacteria in both treatments were similar at 10^{10}-10^{11} CFU/g carrier, so PLA could be used as material for immobilized PGPR bacteria. When applying the immobilized bacteria in 3- and 4-mixed carriers in sugarcane soils and watering for 11 days, the result showed that the growth of sugarcane as seen from leaf and stem lengths was not different from sugarcane on day 0. Consequently, PLA did not impact to sugarcane growth and could reduce the amounts of other carriers. Therefore, additional experiments should be conducted by watering the sugarcane for 2 weeks and stop watering for 2 weeks to simulate the drought conditions. Then, the length of leaf, stem and root and the number of bacteria around the root surface should be measured to prove the efficiency of carrier containing PLA.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร . เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขโครงการฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตา และความเอาใจใส่ของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำและความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ร่วมห้องปฏิบัติการทุกคน ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และคำแนะนำเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณบริษัทเคทิส วิจัยและพัฒนา จำกัด ที่สนับสนุนท่อนพันธุ์อ้อยในงานวิจัย

ขอขอบคุณโรงงานเกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ชูการ์ คอร์ปอเรชั่นที่สนับสนุนเถ้าลอยสำหรับการทำวิจัย

ขอขอบคุณบริษัทโกลเด้นไทม์เอ็นเตอไพร์ส จำกัด ที่สนับสนุนกากเนื้อในเมล็ดปาล์มสำหรับการทำวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคน ที่ให้โอกาสให้การสนับสนุน คอยรับฟังปัญหา และช่วยเหลือผู้วิจัยในทุกๆด้าน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญแก่ผู้วิจัยเรื่อยมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

นางสาวภาณุมาศ เมืองวุฒฑานันท์

พฤษภาคม 2562

สารบัญ

บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1	1
1.1 อ้อย	1
1.2 แบคทีเรียในดินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria)	1
1.3 แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิว	5
1.4 วัสดุตรึงแบคทีเรีย	6
1.5 ภาพรวมของงานวิจัย	8
1.6 วัตถุประสงค์	8
1.7 วิธีการดำเนินงาน	9
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2	10
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินงาน	10
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	10
2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	11
2.3 วิธีดำเนินงาน	11
2.3.1 แบคทีเรีย วัสดุตรึง อ้อย และดินที่ใช้ในการทดลอง	11
2.3.2 ทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึงผสม	12
2.3.2.1 วัดค่า pH	12
2.3.2.2 วัดค่าความชื้นสัมพัทธ์	12
2.3.2.3 วัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ	13
2.3.2.4 วัดปริมาณแร่ธาตุภายในวัสดุตรึง	13
2.3.3 ศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นพลาสติกชนิด PLA	13
2.3.3.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม	13
2.3.3.2 เตรียมวัสดุตรึง	13

2.3.3.3 ตรึงเชื้อผสมบนวัสดุตรึง 14
2.3.3.4 วัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนวัสดุตรึง 14
2.3.4 การย่อยสลายของพลาสติก PLA ในดินชนิดต่างๆ 14
2.3.4.1 เตรียมดินที่ใช้ในการฝัง PLA 14
2.3.4.2 นำ PLA มาฝังดิน 15
2.3.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด ในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม 15
2.3.5.1 การตรึงเชื้อผสมในวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด 15
2.3.6 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง 16
2.3.6.1 เตรียมวัสดุตรึงที่ทำการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสม 17
2.3.6.2 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียในดินปลูกอ้อย 17
บทที่ 3 18
ผลการทดลอง 18
3.1 การเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นพลาสติกชนิด PLA 18
3.2 การย่อยสลายของพลาสติก PLA ในดินชนิดต่างๆ 20
3.3 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึง 22
3.1.1 ค่า pH, ค่าความชื้นสัมพันธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง 22
3.1.2 ปริมาณแร่ธาตุของวัสดุตรึง 23
3.4 อัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึง 24
3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง 25
แผนการดำเนินงานต่อไป 28
1. ทำการทดลองศึกษาเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นพลาสติกชนิด PLA เพิ่มเติม 28
2. ศึกษาการย่อยสลายของพลาสติก PLA ในดินชนิดต่างๆ 28
3. วัดค่า pH, ค่าความชื้นสัมพันธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง 28

4. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด ในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม 29

5. ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง 29

บทที่ 4 31

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 31

เอกสารอ้างอิง 33

ภาคผนวก 38

ภาคผนวก ก 38

ภาคผนวก ข 39

สารบัญภาพ

รูปที่ 1.1 แสดงการดูดซับธาตุเหล็กโดยไซเดอโรฟอร์ที่สร้างโดยแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 3

รูปที่ 1.2 แผนผังแสดงการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ที่ช่วยลดปริมาณของเอทิลีน และการผลิต IAA ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPB) 4

รูปที่ 1.3 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชกับพืช 5

รูปที่ 1.4 รูปร่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 6

รูปที่ 1.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืชที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* B2 (ก), *Bacillus stratosphericus* L19 (ข), *Bacillus altitudinis* T17 (ค) และ *Weissella cibaria* PN3 (ง) 8

รูปที่ 2.1 วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ถ่านชีวภาพ (ก), เถ้าลอย (ข), กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (ค) และพลาสติกชนิด PLA (ง) 12

รูปที่ 2.2 ดินที่ใช้ปลูกอ้อย 12

รูปที่ 2.3 พลาสติกชนิด PLA ที่มีเชื้อแบคทีเรียผสม บ่มด้วยเครื่องกวนสารชนิดให้ความร้อน 14

รูปที่ 2.4 วัสดุตรึงผสมที่มีเชื้อแบคทีเรียผสมในขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร (vial) 16

รูปที่ 2.5 อ้อยที่ลงปลูกในกระถาง และเปิดไฟ LED เพิ่มแสงให้อ้อย 16

รูปที่ 2.6 วัสดุตรึงผสมที่มีเชื้อแบคทีเรียผสมในถุงพลาสติก ก่อนนำไปผสมดินเพื่อใช้ปลูกอ้อย 17

รูปที่ 3.1 ภาพพื้นผิว และการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวของ PLA 19

รูปที่ 3.2 จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงบน PLA 20

รูปที่ 3.3 ภาพ PLA ปกติ ที่ไม่ได้มีการตรึงเชื้อแบคทีเรีย และไม่ได้ฝังดิน 21

รูปที่ 3.4 ภาพ PLA หลังจากฝังดินทั้งหมด 5 ชนิด เป็นเวลา 21 สัปดาห์ 21

รูปที่ 3.5 ภาพ PLA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X หลังจากฝังดินทั้งหมด 5 ชนิด เป็นเวลา 5 สัปดาห์ 22

รูปที่ 3.6 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด 25

รูปที่ 3.7 อ้อยในวันที่เริ่มลงปลูก (วันที่ 0) 26

รูปที่ 3.8 อ้อยหลังจากการรดน้ำ 11 วัน 27

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชมาให้ประโยชน์ 2

ตารางที่ 2 ค่า pH, ค่าความชื้นสัมพันธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง 23

ตารางที่ 3 ปริมาณแร่ธาตุของวัสดุตรึงแต่ละชนิด 24

ตารางที่ ข-1 จำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงบน PLA 39

ตารางที่ ข-2 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด 39

บทที่ 1

บทนำ

1.1 อ้อย

อ้อย (Sugarcane, *Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลและพลังงานทดแทนเพื่อใช้ภายในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ทำให้ในแต่ละปีประเทศไทยสามารถสร้างรายได้จากการส่งออกน้ำตาลนับหมื่นล้านบาท (ธัญชนก, 2557) ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 12.2 ล้านไร่ โดยแบ่งเป็นพื้นที่ภาคเหนือ 3 ล้านไร่ ภาคกลาง 3.2 ล้านไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5.3 ล้านไร่ และภาคตะวันออก 6.8 แสนไร่ และในปัจจุบันอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายของประเทศไทยมีแนวโน้มที่จะขยายตัวเพิ่มขึ้นอีก สืบเนื่องมาจากทางรัฐบาลได้มีนโยบายขยายพื้นที่ปลูกอ้อยทดแทนในพื้นที่นาข้าวที่ไม่เหมาะสม และประกอบกับมีโรงงานน้ำตาลตั้งใหม่เกิดขึ้นทุกภาค จึงทำให้มีการส่งเสริมพื้นที่ปลูกอ้อยเพิ่มขึ้น โดยการปลูกอ้อยนั้นน้ำถือเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย หากอ้อยได้รับน้ำอย่างเพียงพอตลอดช่วงการเจริญเติบโต ผลผลิตอ้อยจะเพิ่มปริมาณสูงขึ้น แต่ในปัจจุบันพบว่าพื้นที่เพาะปลูกอ้อยส่วนใหญ่อยู่นอกเขตชลประทาน ทำให้ต้องอาศัยน้ำฝนในการปลูกอ้อย เมื่อเกิดภัยแล้งขึ้นมาจึงส่งผลต่อผลผลิตของอ้อยที่ได้ รวมถึงส่งผลกระทบต่อเกษตรกรที่ปลูกอ้อยเช่นกัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม, 2562)

1.2 แบคทีเรียในดินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Bacteria)

จากการศึกษาจุลินทรีย์ในดินพบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้ยังสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้อีกด้วย เช่น สภาวะแล้ง โดยจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Ochrobactrum pseudogrignonense* RJ12 สามารถผลิต 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะไปลดปริมาณ ethylene ในพืชได้ และจากการศึกษาพบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมนั้นจะช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้ดีกว่าการใช้เชื้อเพียงชนิดเดียว (Juthika และคณะ, 2018) จุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชบางชนิด เช่น *Bacillus cereus* (EIV) สามารถทนต่อโลหะหนัก เช่น โลหะโครเมียมในดิน และปกป้องพืชจากความเครียดที่เกิดจากโลหะหนักได้ (Fatima and Ahmed, 2018) และการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชนั้นยังถือว่าเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ตัวอย่างการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในงานวิจัยต่างๆ ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชมาให้ประโยชน์

แบคทีเรีย	พืชที่ใช้ทดสอบ	อ้างอิง
Bacillus siamensis (PM13) *Bacillus* sp. (PM15) *Bacillus methylotrophicus* (PM19)	ข้าวสาลี (wheat)	Amna และคณะ, 2019
Agrobacterium fabrum Leclercia adecarboxylata	ข้าวโพด (*Zea mays)*	Danish และคณะ, 2019
Curtobacterium herbarum CAH5	ผักกาดหอม (*Lactuca sativa*)	Silambarasan และคณะ, 2019
Ochrobactrum pseudogrignonense RJ12 *Pseudomonas* sp. RJ15 *Bacillus subtilis* RJ46	ถั่วดำ (*Vigna mungo* L.) ถั่วลันเตา (*Pisum sativum* L.)	Juthika และคณะ, 2018
Bacillus cereus (3a) *Bacillus anthracis* (EII) *Bacillus cereus* (EIV)	ถั่วเลนทิล (*Lens culinaris*)	Fatima และคณะ, 2018
Azospirillum brasilence *Bradyrhizobium japonicum*	ข้าวโพด (*Zea mays)* ถั่วเหลือง (*Glycine max*)	Orlandini และคณะ, 2014
Bacillus megaterium var *phosphaticum*	แตงกวา (*Cucumis sativus*)	Stefanescu, 2015
Bacillus mucilaginosus	พริกไทย (*Piper nigrum*)แตงกวา (Cucumis sativus)	Liu และคณะ, 2012
Gluconacetobacter diazotrophicus *Herbaspirillum seropedicae* *Herbaspirillum rubrisubalbicans* *Azospirillum amazonense* *Burkholderia tropica*	อ้อย (*Saccharum officinarum*)	da Silva และคณะ ,2012

สำหรับกลไกที่แบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชช่วยให้พืชสามารถปรับตัวในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ได้แก่

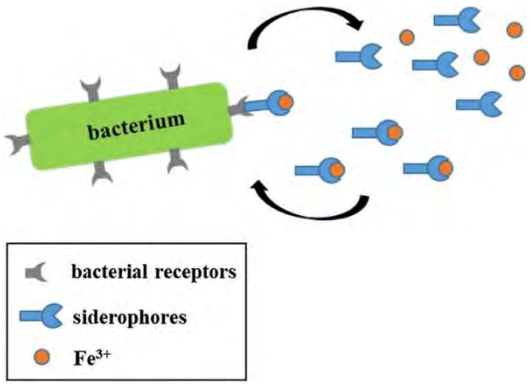
1. การผลิตเอนไซม์ ACC deaminase หรือ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase เพื่อย่อยสลาย ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของวิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอทิลีน ให้ระดับเอทิลีนในพืชลดน้อยลง เนื่องจากพืชเมื่อเผชิญกับสภาวะเครียด เช่น ความแล้ง ความเค็ม อุณหภูมิไม่เหมาะสม มักจะผลิต

ฮอร์โมนเอทิลีนออกมาเพื่อตอบสนองต่อความเครียดนั้น และถ้าเอทิลีนถูกผลิตออกมาในปริมาณสูงจะทำให้พืชเกิดความเครียด ส่งผลให้การเจริญของพืชลดลง (ธนากร แสงสง่า, 2557) (รูปที่ 1.2)

2. การผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide : EPS) และหลั่งออกนอกเซลล์ โดยเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จะไปจับกับแคตไอออน เช่น โซเดียม ซึ่งจะช่วยลดการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ ส่งผลให้พืชทนทานต่อความเครียดออสโมติกและความเค็มมากขึ้น (Upadhyay and Singh, 2015)

3. การผลิตออสโมไลท์ เช่น กรดอะมิโนโพรลีน, ไกลซีนบีเทน และทรีฮาโลส โดยสารออสโมไลท์จะช่วยปรับค่าแรงดันออสโมติก และปริมาณไอออน ช่วยให้พืชสามารถทนต่อสภาวะแล้งได้ดีขึ้น (Kaushal and Wani, 2015)

4. การผลิตไซเดอโรฟอร์ (Siderophore) เพื่อช่วยจุลินทรีย์ดูดซึมธาตุเหล็ก และช่วยให้พืชให้ได้รับธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะที่ปริมาณธาตุเหล็กมีจำกัด (ธนากร แสงสง่า และธารทิพย์ รัตนะ, 2561) (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 แสดงการดูดซับธาตุเหล็กโดยไซเดอโรฟอร์ที่สร้างโดยแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Ribeiro and Simões, 2019)

5. สร้างสารต้านอนุมูลอิสระ สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแล้ง ดินเค็ม ล้วนส่งผลให้พืชเกิดความเครียดขึ้น และความเครียดที่เกิดขึ้นนี้ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระ อนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive oxygen species; ROS) หลายชนิด เช่น superoxide radical (O_2^-) , hydroxyl radical ($^{\cdot}OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ การเจริญเติบโต พัฒนาการ และผลผลิตของพืชลดลง ความไม่สมดุลของฮอร์โมนและสารอาหาร ความผิดปกติทางสรีรวิทยาและความอ่อนแอต่อโรค ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม แต่พืชเองก็สามารถสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD), Peroxidase (POX) เพื่อต้านต่อ ROS ที่เกิดขึ้น ซึ่งแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชนั้นสามารถช่วยเพิ่มปริมาณของเอนไซม์เหล่านี้ได้ (ธนากร แสงสง่า, 2557, Silambarasan และคณะ, 2019)

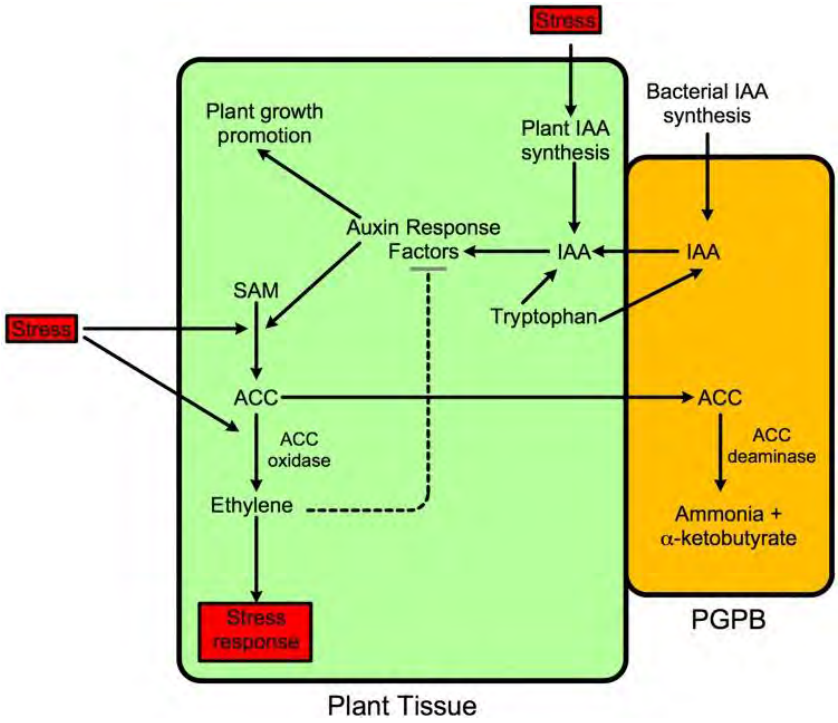
แบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชสามารถผลิตฮอร์โมนพืชที่สำคัญ ได้แก่

1. ไซโทไคนิน (Cytokinins) เป็นฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ในเนื้อเยื่อเจริญของพืช, การเจริญของราก, การงอกของเมล็ด, การข่มของตายอด, การเจริญของเซลล์, การเจริญของดอกและผล, การสร้างไซเลมและคลอโรพลาสต์ และความชราของใบ (Olanrewaju และคณะ, 2017)

2. จิบเบอเรลลิน (Gibberellin : GA) เป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช เช่น การยืดยาวของลำต้น, การงอกของเมล็ด, การมีดอก, การมีผล, ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงดีขึ้น และทำให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์มากขึ้น (Olanrewaju และคณะ, 2017)

3. กรดอินโดลอะซีติก (Indole-3-acetic acid : IAA) เป็นฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (Auxin) ช่วยในเรื่องการยืดยาว และการขยายขนาดของราก ทำให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้น สามารถดูดซึมน้ำและแร่ธาตุได้มากขึ้น (Olanrewaju และคณะ, 2017, Vessey, 2003) (รูปที่ 1.2)

4. กรดแอบไซซิก (Abscisic acid) เป็นฮอร์โมนพืชที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปิดปิดของปากใบ, เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช และการปรับของพืชในสภาวะเครียด เช่น ในสภาวะแล้ง (Cohen และคณะ, 2009)



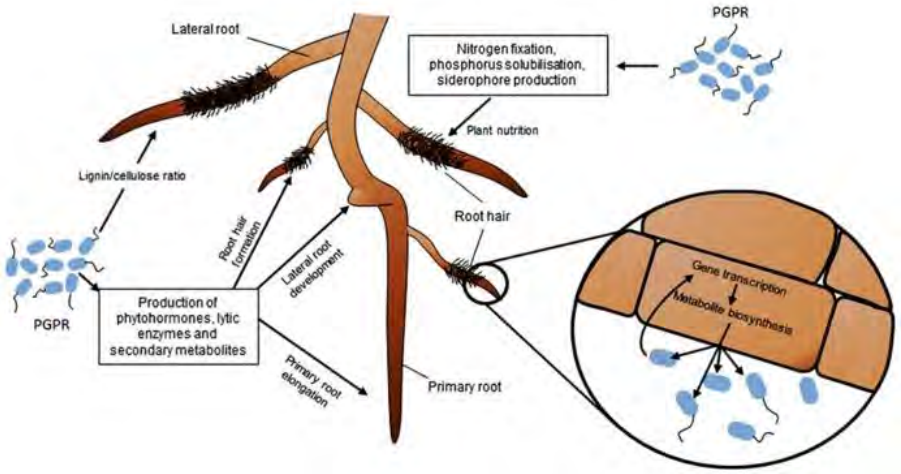
รูปที่ 1.2 แผนผังแสดงการผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ที่ช่วยลดปริมาณของเอทิลีน และการผลิต IAA ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จากแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPB) (Olanrewaju และคณะ, 2017)

นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติอื่นๆ ของแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นกัน

1. ช่วยตรึงไนโตรเจน ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยในชั้นบรรยากาศมีไนโตรเจนมากถึง 78% แต่พืชก็ไม่สามารถนำไปใช้ได้ แต่แบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชนั้นสามารถช่วยตรึงไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศ แล้วเปลี่ยนให้อยู่ในโครงสร้างที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่น แอมโมเนียม ไนไตรท์ ไนเตรท (Olanrewaju และคณะ, 2017)

2. ช่วยละลายฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของพืช แต่ฟอสฟอรัสส่วนใหญ่ในดินมักจะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำทำให้พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ แต่แบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชจะสร้างและหลั่งกรดอินทรีย์และเอนไซม์ฟอสฟาเทสเพื่อเปลี่ยนฟอสฟอรัสให้อยู่ในโครงสร้างที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (Vacheron และคณะ, 2013, Vessey, 2003)

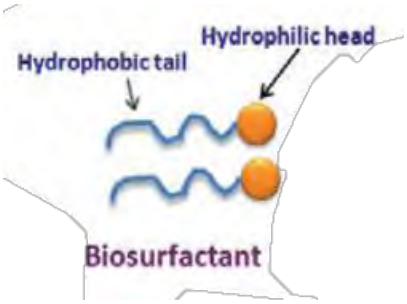
โดยความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชกับพืชจะแสดงดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชกับพืช (Vacheron และคณะ, 2013)

1.3 แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) เป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นแอมฟิฟาติก คือทั้งส่วนที่มีขั้วหรือชอบน้ำ และส่วนที่ไม่มีขั้วหรือไม่ชอบน้ำอยู่ในโครงสร้างเดียวกัน (รูปที่ 1.4) มีการใช้นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกใช้อย่างกว้างขวางในการบำบัดสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ และสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติจึงไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กลุ่มไกลโคลิพิด จัดอยู่ในกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโมเลกุลต่ำ หน้าที่หลักคือการลดแรงตึงผิวและลดแรงระหว่างผิว มีคุณสมบัติการตอบสนองต่อพื้นผิวที่หลากหลาย เช่น การละลาย, การกระจาย, การก่ออิมัลชัน, การส่งผ่านสาร เป็นต้น (เพ็ญนภา บุญจริง, 2015)



รูปที่ 1.4 รูปร่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Mohd-Setapar และคณะ, 2012)

จากงานการศึกษาประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านการเกษตรพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติในการต้านต่อเชื้อราที่ก่อโรคพืช เช่น *Colletotrichum gloeosporioides* , *Fusarium oxysporum* ช่วยปกป้องพืช (Clements และคณะ, 2018) และยังช่วยเพิ่มอัตราการงอกและการเจริญของเมล็ดพืช (Araújo และคณะ, 2019) นอกจากนี้แบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางสายพันธุ์ยังมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น ผลิต siderophore, IAA, ACC deaminase (Wu และคณะ , 2018)

การใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิต่างๆ โดยคาดหวังว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยจับโมเลกุลของน้ำ ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของดินเพิ่มมากขึ้น และสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจะมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชได้

1.4 วัสดุตรึงแบคทีเรีย

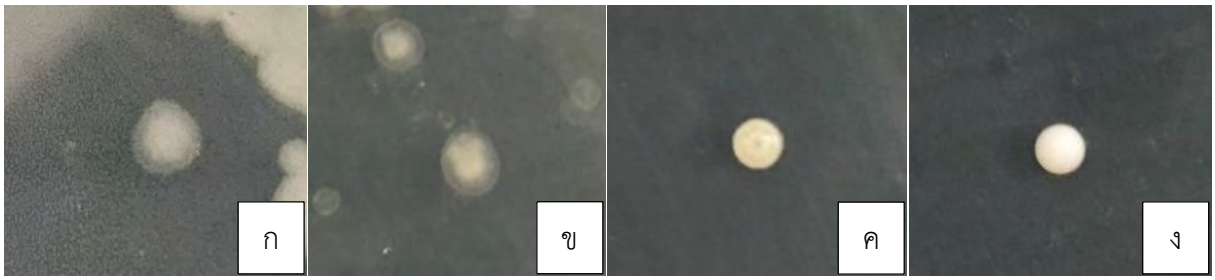
สำหรับการนำเอาจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชมาใช้ประโยชน์ พบว่ามีปัญหาในเรื่องของการเก็บรักษา และอัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์เมื่ออยู่ในดิน จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการใส่เชื้อที่ผสมกับวัสดุตรึงลงในดินจะช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้มากกว่าการใส่เชื้อลงไปในดินโดยตรง (Hale et al. 2015) ซึ่งวัสดุตรึงต่างชนิดกันก็มีผลต่อความสามารถในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน เช่น จากงานวิจัยที่เปรียบเทียบระหว่างถ่านชีวภาพและเถ้าลอย พบว่าถ่านชีวภาพสามารถส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเถ้าลอย (Tripti และคณะ, 2017) โดยวัสดุตรึงมีทั้งที่เป็นอินทรียวัตถุ เช่น ชานอ้อย, ถ่านหินและพีต และอนินทรียวัตถุ เช่น แร่เวอร์มิคูไลท์, อะลูมิเนียมซิลิเคต และแป้งทัลคัม (Saharan และคณะ, 2010) ดังนั้นการเลือกใช้วัสดุตรึงจะต้องคำนึงถึงองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น ความหาง่ายของวัสดุที่นำมาใช้ คุณสมบัติเฉพาะของวัสดุตรึง เช่น สมบัติความเป็นกรดด่าง ความสามารถในการอุ้มน้ำ ค่าความชื้นสัมพัทธ์ (Borowik and Wyszkowska, 2016)

โครงงานวิจัยนี้สนใจตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนเศษพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าอ้อยในสภาวะแล้ง โดยพลาสติกชนิด PLA เป็นพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ที่ผลิตได้จากพืชที่มีแป้งหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักมาผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ให้ได้เป็นกรดแลคติก แล้วจึงนำกรดแลคติกนั้นมาทำปฏิกิริยาสังเคราะห์โพลิเมอร์ PLA นั้นสามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ได้ (Lv และคณะ, 2018) ถึงแม้ว่า PLA จะสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติก็จริง แต่ว่าการย่อยสลายของ PLA ที่มากหรือน้อยในดินนั้นจำเป็นต้องอาศัยสภาวะแวดล้อมในดินที่เหมาะสมต่อการย่อยมาเสริม เช่น อุณหภูมิภายในดิน ค่าความเป็นกรดด่าง ความชื้น นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ เองก็มีผลต่อการย่อยสลาย เช่น ระยะเวลา ความหนาของ PLA รวมถึงชนิดและขนาดประชากรของจุลินทรีย์ที่มาช่วยย่อยสลายด้วย โดยมีการศึกษาการย่อยสลายของ PLA ในดินพบว่าต้องใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น และใช้เวลานานขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย (Emadian และคณะ, 2017, Madhavan Nampoothiri และคณะ, 2010, Rudnik and Briassoulis, 2011, Shi and Palfery, 2010)

จากคุณสมบัติเหล่านี้จึงมีการนำ PLA มาใช้เป็นวัสดุตรึงเชื้อแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ (Sarioglu และคณะ, 2017) และ PLA ยังเป็นของเสียที่เกิดขึ้นทุกวันจากการใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ เช่น แก้วสำหรับบรรจุเครื่องดื่ม เป็นต้น ทำให้สามารถหาได้ง่ายตามถังขยะที่อยู่ใกล้ร้านค้าที่ใช้บรรจุภัณฑ์เหล่านี้ อย่างไรก็ดีการใช้ PLA อย่างเดียว อาจจะทำให้แบคทีเรียเกาะไม่ดี เนื่องจาก PLA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเศษพลาสติกที่มีพื้นผิวเรียบ ดังนั้นผู้วิจัยจึงผสม PLA กับวัสดุตรึงอื่นๆ คือ ถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และ กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม โดยถ่านชีวภาพนั้นมีประสิทธิภาพที่ดีเป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นวัสดุตรึงแบคทีเรีย (Hale และคณะ, 2015, Tripti และคณะ, 2017, Sun และคณะ,. 2016, Hale และคณะ, 2014, Khan และคณะ, 2016) ส่วนเถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มนั้นเป็นวัสดุเหลือใช้ที่ได้จากโรงงาน เถ้าลอยนั้นเป็นวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและอุตสาหกรรมการเผาไหม้ถ่านหิน โดยในปัจจุบันมีการนำเถ้าลอยไปใช้เป็นสารผสมคอนกรีตสำหรับงานก่อสร้าง และเป็นวัสดุดิบเสริมปูนซีเมนต์ในการผลิตวัสดุก่อสร้าง เช่น กระเบื้องมุงหลังคา, เสาเข็ม, พื้นสำเร็จรูป เป็นต้น ส่วนกากเนื้อในเมล็ดปาล์มนั้นเป็นวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันจากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ซึ่งในปัจจุบันจะถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์

1.5 ภาพรวมของงานวิจัย

สำหรับแบคทีเรียผสมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย *Bacillus thuringiensis* B2 รหัส MSCU 0882 แยกจากดินบริเวณที่ปลูกอ้อย, *Bacillus stratosphericus* L19 รหัส MSCU 0873 แยกจากดินบริเวณที่ปลูกอ้อย, *Bacillus altitudinis* T17 รหัส MSCU 0867 แยกจากดินบริเวณที่ปลูกข้าว และ *Weissella cibaria* PN3 รหัส MSCU 0840 แยกได้จากแหนม โดยเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มีลักษณะโคโลนีดังรูปที่ 1.5 โดยงานวิจัยนี้จะนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มาทำเป็นเชื้อผสม เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการใช้เชื้อผสมจะช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้ดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว (Saikia และคณะ, 2018) สำหรับแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียทนต่อสภาวะแล้งที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ ความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA ซึ่งมีบทบาทต่อการยืดยาวและการแบ่งเซลล์ อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นการเจริญของรากพืช ส่งผลให้พืชสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการลำเลียงสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของพืช (เอกวัล ลือพร้อมชัย, 2560) ส่วน *Weissella cibaria* PN3 เป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว (เพ็ญนภา บุญจริง, 2015) ซึ่งจากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าเมื่อนำมารวมกับแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์สามารถส่งเสริมการเจริญของอ้อยได้ โดยผู้วิจัยจะศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นเศษพลาสติกชนิด PLA แล้วติดตามการย่อยสลายของเศษพลาสติกชนิด PLA ในดินชนิดต่างๆ เพื่อจำลองเหตุการณ์เมื่อนำ PLA ไปทำเป็นปุ๋ยสำหรับปลูกอ้อย และเพื่อให้แน่ใจว่า PLA จะย่อยสลายโดยไม่มีการตกค้างในสิ่งแวดล้อม หลังจากนั้นจะเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมที่ตรึงบนวัสดุตรึงผสมในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง โดยทำการทดลองในระดับกระถาง



รูปที่ 1.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืชที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* B2 (ก), *Bacillus stratosphericus* L19 (ข), *Bacillus altitudinis* T17 (ค) และ *Weissella cibaria* PN3 (ง)

1.6 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นเศษพลาสติกชนิด PLA
2. เพื่อติดตามการย่อยสลายของเศษพลาสติกชนิด PLA ในดินชนิดต่างๆ

3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

1.7 วิธีการดำเนินงาน

1. ทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึง

2. ศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นพลาสติกชนิด PLA

3. การย่อยสลายของพลาสติก PLA ในดินชนิดต่างๆ

4. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด ในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม

5. ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้คาดว่าจะสามารถนำถ่านชีวภาพ เถ้าลอย กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และพลาสติกชนิด PLA ซึ่งเป็นของเสียที่เกิดขึ้น มาใช้ให้เกิดประโยชน์ ด้วยการนำมาเป็นวัสดุตรึงสำหรับตรึงแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช ซึ่งในอนาคตจะนำแบคทีเรียตรึงบนวัสดุเหล่านี้มาเป็นองค์ประกอบของปุ๋ยชีวภาพ เพื่อนำไปใช้เพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีของเกษตรกรต่อไป

บทที่ 2

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินงาน

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge ware) ของบริษัท NALGENE, USA
2. กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX, USA
3. ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ของบริษัท Schott, Germany
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX, USA
5. ขวดใส่สารขนาดเล็ก (Vial) ของบริษัท PYREX, USA
6. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J., USA และ รุ่น GREEN SSeriker 2 ของบริษัท PanaPolytech Co., LTD., Thailand
7. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) รุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
8. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Refrigerated Centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท KUBOTA, Japan
10. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific industries, USA
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น MP125 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
13. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ของบริษัท PYREX, USA
14. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) แบบ ISSco รุ่น BV-124 ของบริษัท Internal Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
15. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
16. แท่งแก้วปาดเชื้อ (Spreader) ของบริษัท Suzhou Yunbo Glass Co., Ltd., Chinese
17. ปิเปตทิป (Tip) ขนาด 200, 1000, 5000 และ 10000 ไมโครลิตร ของบริษัท Hycon Plastics
18. บีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX, USA
19. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
20. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท HIRAYAMA, Japan

21. หลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf tube) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Axygen, INC., USA
22. ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P200, P1000, P5000 และ P10000 ของบริษัท Eppendorf, Thailand
23. แผ่นสไลด์ บริษัท Sail Brand, China
24. แผ่นปิดสไลด์ บริษัท Sail Brand, China

2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

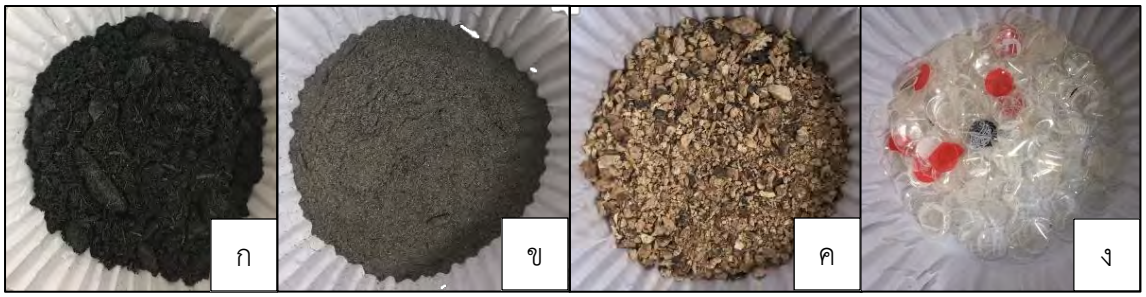
1. Tryptone Soya Broth ของบริษัท Sisco Research Laboratories, India
2. Lactobacillus MRS Agar (MRS Agar) ของบริษัท Hi Media Laboratories, India
3. Luria-Bertani Broth (LB Broth) ของบริษัท Difco BBL, USA
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
5. ผงวุ้น ตรานางเงือก ของบริษัท ห้างหุ้นส่วนจำกัด พัฒนาสินเอ็นเตอร์ไพรส์, Thailand
6. เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท Merck, Germany
7. คริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet)

2.3 วิธีดำเนินงาน

2.3.1 แบคทีเรีย วัสดุตรึง อ้อย และดินที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ B2 รหัส MSCU 0882 ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่ปลูกอ้อย อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี, *Bacillus stratosphericus* สายพันธุ์ L19 รหัส MSCU 0873 ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่ปลูกอ้อย อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี, *Bacillus altitudinis* สายพันธุ์ T17 รหัส MSCU 0867 ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่ปลูกข้าว อ.ท่าวุ้ง จ.ลพบุรี และ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 ที่แยกได้จากแหนม โดยเชื้อทั้ง 4 ชนิดถูกเก็บอยู่ในคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ เถ้าลอย จากโรงงานเกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ชูการ์ คอร์ปอเรชั่น, ถ่านชีวภาพ สั่งซื้อจากเพจบ้านไบโอชาร์ (https://www.biocharcoal.net/), กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม จากบริษัทโกลเด้นไทม์เอ็นเตอร์ไพร์ส จำกัด และพลาสติกชนิด PLA เก็บจากถังขยะในสำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยลักษณะของวัสดุตรึงแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 วัสดุตรึงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ถ่านชีวภาพ (ก), เถ้าลอย (ข), กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (ค) และพลาสติกชนิด PLA (ง)

ท่อนพันธุ์อ้อยจากแปลงทดลองที่จังหวัดนครสวรรค์ ของบริษัท เคทิส วิจัยและพัฒนา จำกัด

ดินที่ใช้ปลูกอ้อยซื้อจากตลาดองค์การตลาดเพื่อการเกษตร (ตลาดสด อ.ต.ก.) ถนนกำแพงเพชร แขวงจตุจักร เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร โดยมีลักษณะของดินดังรูปที่ 2.2

รูปที่ 2.2 ดินที่ใช้ปลูกอ้อย

2.3.2 ทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึงผสม

เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุตรึงผสมที่ประกอบด้วยถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย, กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และพลาสติกชนิด PLA และเพื่อนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ผลร่วมกับการทดลองอื่นๆ

2.3.2.1 วัดค่า pH

นำวัสดุตรึง 10 กรัม มาผสมกับน้ำ DI 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและทิ้งไว้ให้วัสดุตรึงตกตะกอน วัดค่าความเป็นกรดด่างด้วย pH meter

2.3.2.2 วัดค่าความชื้นสัมพัทธ์

อบวัสดุตรึง 5 กรัมใน oven แล้วนำมาชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่ นำน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งที่ได้มาคำนวนหาค่าความชื้นสัมพัทธ์โดยใช้สูตร

$$\text{Moisture Content} = \frac{\text{wet weight} - \text{dry weight}}{\text{wet weight}} \times 100$$

2.3.2.3 วัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ

วัดปริมาณน้ำที่ไหลผ่านวัสดุตรึงปริมาตร 10 กรัม จากน้ำทั้งหมด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวนหาปริมาตรของน้ำที่ถูกวัสดุตรึงกักเก็บไว้

2.3.2.4 วัดปริมาณแร่ธาตุภายในวัสดุตรึง

ส่งวัสดุตรึงไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยตรวจหาปริมาณ C และ N เนื่องจากเป็นธาตุสำคัญที่เชื้อเอาไว้ใช้ในการเจริญ หาปริมาณ Cd เพราะ Cd เป็นพิษต่อแบคทีเรียและพืช โดยปริมาณของ Cd เพียง 250 μM ก็มีผลต่อการเจริญเติบโตที่ลดลงของพืช ดังนั้นไม่ควรมีเยอะ (ปณญ์ธีรา แท่งหิน. 2559) และหาปริมาณ Cu และ Zn เนื่องจาก 2 ธาตุนี้ในปริมาณน้อยๆ จะช่วยในการเจริญของพืชก็จริง แต่ก็ไม่ควรมีเยอะเกิน 10 mmole kg^{-1} เพราะจะเป็นพิษกับพืชได้ (Blasco และคณะ, 2019, Gao และคณะ, 2018, Norman P.A. Huner and William Hopkins, 2009)

2.3.3 ศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นพลาสติกชนิด PLA

เพื่อดูปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่เกาะบนวัสดุตรึงที่เป็นพลาสติกชนิด PLA

2.3.3.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียผสม

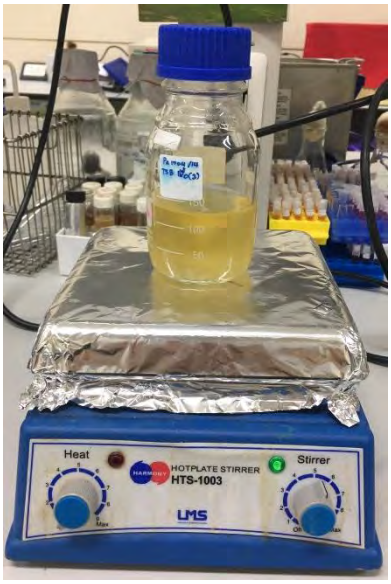
เลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus altitudinis* T17 และ *Weissella cibaria* PN3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) นำไปบ่ม จากนั้นนำเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) และเลี้ยง *Weissella cibaria* PN3 ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB broth) โดยบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerated Microcentrifuge ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วเตรียมหัวเชื้อโดยผสมเซลล์กับ 0.85%NaCl โดยปรับ OD ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus altitudinis* T17 และ *Weissella cibaria* PN3 ให้เท่ากับ 1.4, 1, 1 และ 1 ตามลำดับ เพื่อให้แต่ละเชื้อมีความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และผสมหัวเชื้อในอัตราส่วน 1:1:1:1 (ปฐมาวดี ตรีสอน, 2561)

2.3.3.2 เตรียมวัสดุตรึง

นำแก้วพลาสติกชนิด PLA มาตัดด้วยเครื่องเจาะกระดาษเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เพื่อให้มีขนาดเล็กพอที่จะย่อยสลายในดินต่อไป นำเศษพลาสติกใส่ลงในขวดดูแรนที่บรรจุอาหาร TSB และแท่งแม่เหล็กกวนสาร แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

2.3.3.3 ตรึงเชื้อผสมบนวัสดุตรึง

ใส่เชื้อผสม 10% ลงในอาหาร TSB ที่มีพลาสติกชนิด PLA นำไปบ่มด้วยเครื่องกวนสารชนิดให้ความร้อนเพื่อกวนให้พลาสติกมีการกระจายในอาหาร (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 พลาสติกชนิด PLA ที่มีเชื้อแบคทีเรียผสม บ่มด้วยเครื่องกวนสารชนิดให้ความร้อน

2.3.3.4 วัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนวัสดุตรึง

เก็บพลาสติก PLA ทุก 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน โดยนำ PLA ใส่ใน 0.85%NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปใส่อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (sonicator bath) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิว PLA ดูดสารละลายเซลล์มาทำการเจือจางโดยวิธีการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับส่วน (serial dilution techniques) และวิธีการกระจายเชื้อ (spread plate) ลงอาหาร TSA หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงอัตราการเกาะของเชื้อแบคทีเรีย และนำตัวอย่าง PLA บางส่วนไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อดูลักษณะการเกาะของแบคทีเรีย

2.3.4 การย่อยสลายของพลาสติก PLA ในดินชนิดต่างๆ

เพื่อจำลองเหตุการณ์เมื่อนำ PLA ไปทำเป็นปุ๋ยสำหรับปลูกอ้อย และเพื่อให้แน่ใจว่า PLA จะย่อยสลายโดยไม่มีการตกค้างในสิ่งแวดล้อม

2.3.4.1 เตรียมดินที่ใช้ในการฝัง PLA

ดินที่ใช้ ได้แก่ ดินสำหรับปลูกอ้อยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อดูว่าถ้านำ PLA ไปใช้ในไร่อ้อยจริงจะสามารถย่อยสลายได้หรือไม่ และสำหรับดินอีก 4 ชนิดที่นำมาใช้เพื่อดูว่าในกรณีที่นำ PLA ไปใช้กับดิน

ปลูกพืชชนิดอื่นจะสามารถย่อยได้หรือไม่ โดยดิน 4 ชนิด ได้แก่ ปุ๋ยจามจุรี, ดินปลูกอ้อยที่นำมาจากพื้นที่ปลูกอ้อยอื่นที่ไม่ใช่แปลงทดลองที่จังหวัดนครสวรรค์ ของบริษัท เคทิส วิจัยและพัฒนา จำกัด, ดินปลูกมันเทศ และดินปลูกข้าวโพด โดยดินปลูกอ้อย, มันเทศ และข้าวโพด เก็บมาจากแปลงปลูกพืชในจังหวัดนครสวรรค์ นำดินที่ได้มาวัดความสามารถในการอุ้มน้ำเพื่อใช้ในการปรับความชื้นสำหรับฝัง PLA

2.3.4.2 นำ PLA มาฝังดิน

นำ PLA ที่ตัดเรียบร้อยแล้วมาฝังดินที่บรรจุในขวดบรรจุสาร โดยจะแบ่งเป็นชุดการทดลองทั้งหมด 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุมที่จะใส่ PLA ที่ไม่ได้ตรึงเชื้อแบคทีเรียมาใส่ลงในดิน และชุดการทดลองที่จะใส่ PLA ที่มีการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสม ซึ่งเป็น PLA ที่จากการทดลองขั้นตอนที่ 2.3.3.3 เพื่อศึกษาระยะเวลาการย่อยสลายของพลาสติก PLA ระหว่างชุดการทดลองที่ตรึงและไม่ได้ตรึงเชื้อแบคทีเรียผสม โดยใส่ PLA ลงไปขวดละ 5 ชิ้น ทำการปรับค่าความชื้นให้ได้ 60% นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยนำ PLA มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการย่อยสลาย

2.3.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด ในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม

เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ของวัสดุตรึงแบบผสม 3 ชนิด ประกอบด้วยถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และวัสดุตรึงแบบผสม 4 ชนิด โดยนำวัสดุตรึงแบบผสม 3 ชนิด มาเพิ่ม PLA เพื่อศึกษาว่าการเพิ่ม PLA เข้ามานั้นมีผลต่อความสามารถในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์มากน้อยแค่ไหน

2.3.5.1 การตรึงเชื้อผสมในวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด

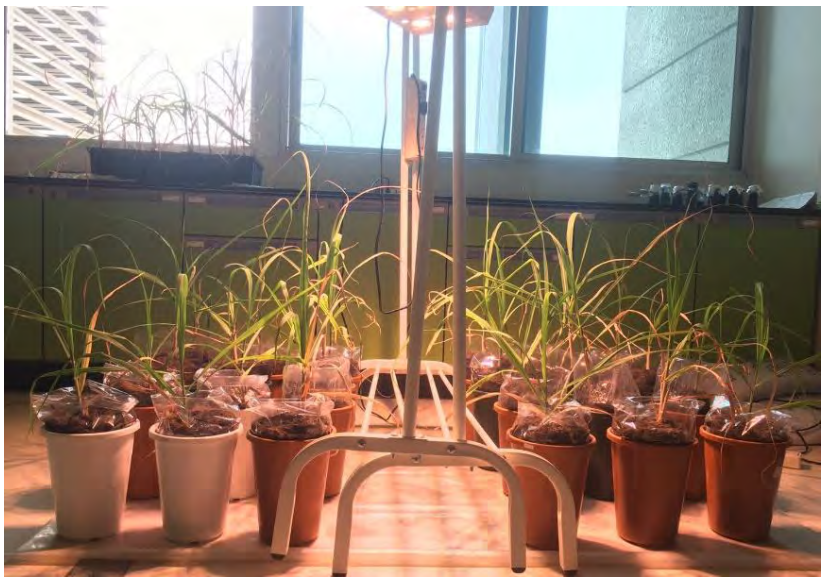
วัสดุตรึงผสมแบบ 3 ชนิด ได้แก่ ถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ในอัตราส่วน 1:1:1 และเพิ่มพลาสติกชนิด PLA ลงไปในวัสดุตรึงผสมแบบ 4 ชนิด ในอัตราส่วน 6:6:6:1 ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus altitudinis* T17 ในอาหาร TSB และเลี้ยง *Weissella cibaria* PN3 ในอาหาร LB บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerated Microcentrifuge เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วเตรียมหัวเชื้อโดยผสมเซลล์กับ 0.85%NaCl โดยปรับ OD ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19, *Bacillus altitudinis* T17 และ *Weissella cibaria* PN3 ให้เท่ากับ 1.4, 1, 1 และ 1 ตามลำดับ และผสมหัวเชื้อในอัตราส่วน 1:1:1:1 แล้วใส่หัวเชื้อผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในวัสดุตรึงปริมาตร 3 กรัม ที่ถูกบรรจุไว้ในขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร (vial) ขนาด 22 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท และมีอากาศอยู่ภายในขวด (รูปที่2.4) ปรับค่าความชื้นสัมพัทธ์ของวัสดุตรึงแต่ละชนิดให้เท่ากับ 40% (Tripti และคณะ, 2017) ด้วย 0.85%NaCl โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และเตรียมแบคทีเรียตรึงทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง เพื่อใช้เก็บผลในแต่ละสัปดาห์ บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด แล้วเก็บผลการทดลองที่ 0, 1, 3 สัปดาห์ โดยนำวัสดุตรึงมาเติม 0.85%NaCl 30 มิลลิลิตร นำไปใส่อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (sonicator

bath) 1 นาที จากนั้นนำมาเขย่าสารอีก 1 นาที ทำแบบนี้ 2 รอบ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวของวัสดุตรึง ดูดสารละลายเซลล์มาทำการเจือจางโดยวิธีการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับส่วน (serial dilution techniques) และวิธีการกระจายเชื้อ (spread plate) ลงอาหาร TSA หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียผสมในวัสดุตรึงผสม เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกันระหว่างการใช้วัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด ว่าการเพิ่ม PLA ลงไปมีผลช่วยเพิ่มความสามารถในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์มากน้อยแค่ไหน

รูปที่ 2.4 วัสดุตรึงผสมที่มีเชื้อแบคทีเรียผสมในขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร (vial)

2.3.6 ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

ในการทดลองนี้ใช้อ้อยอายุประมาณ 2 เดือนครึ่ง โดยปลูกในกระถางขนาด 4×5×12.5 เซนติเมตร ติดไฟ LED กำลังไฟฟ้า 15 วัตต์ เพื่อให้อ้อยได้รับแสงได้ดี (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 อ้อยที่ลงปลูกในกระถาง และเปิดไฟ LED เพิ่มแสงให้อ้อย

2.3.6.1 เตรียมวัสดุตรึงที่ทำการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสม

โดยจะเตรียมวัสดุตรึงผสมเหมือนขั้นตอนในข้อ 2.3.5.1 แต่จะเพิ่มปริมาตรของวัสดุตรึงผสมเป็นอย่างละ 95 กรัม สำหรับอัตราส่วน และน้ำหนักของวัสดุตรึงแต่ละชนิดที่ใช้ในวัสดุตรึงผสมเป็นดังนี้ ในวัสดุตรึงผสม 3 ชนิด ประกอบด้วยถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม ในอัตราส่วน 1:1:1 นั่นคือใช้วัสดุตรึงชนิดละ 31.7 กรัม และในวัสดุตรึงผสม 4 ชนิด ประกอบด้วยถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย, กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และพลาสติกชนิด PLA ในอัตราส่วน 6:6:6:1 คือใช้ถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มชนิดละ 30 กรัม และพลาสติกชนิด PLA 5 กรัม และนำมาใส่เชื้อผสมตามขั้นตอนในข้อ 2.3.5.1 แต่จะเพิ่มปริมาตรของเชื้อผสมที่ใส่ลงไปตามปริมาตรของวัสดุตรึงผสมที่เพิ่มขึ้น ปรับค่าความชื้นสัมพัทธ์ของวัสดุตรึงแต่ละชนิดให้เท่ากับ 40% (Tripti และคณะ, 2017) ด้วย 0.85%NaCl บ่มในถุงพลาสติก มัดปากถุงโดยให้มีอัตราส่วนของอากาศในถุงใกล้เคียงกับปริมาณอากาศในขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร นำไปบ่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 2.6)

รูปที่ 2.6 วัสดุตรึงผสมที่มีเชื้อแบคทีเรียผสมในถุงพลาสติก ก่อนนำไปผสมดินเพื่อใช้ปลูกอ้อย

2.3.6.2 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียในดินปลูกอ้อย

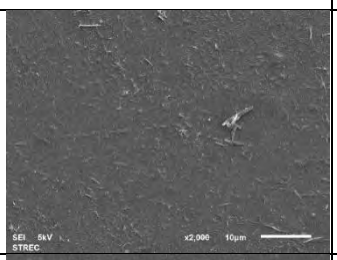
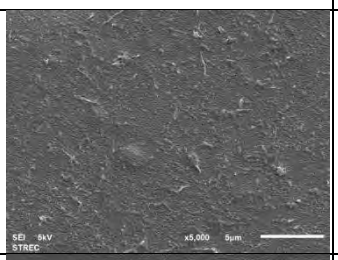
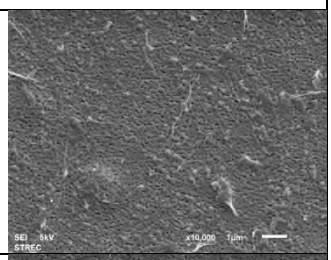
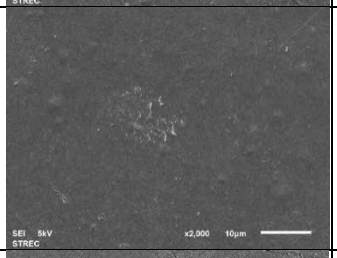
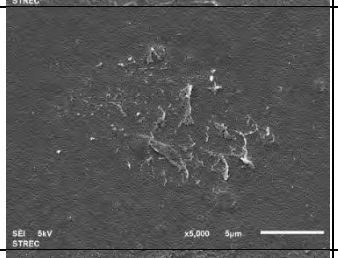
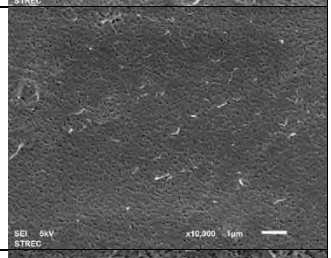
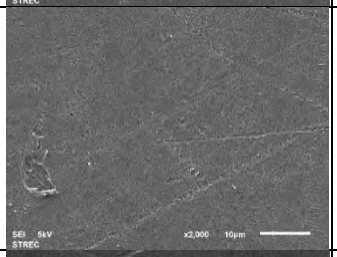
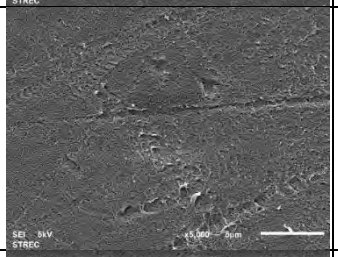
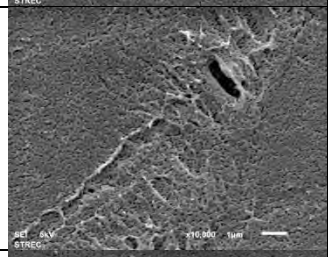
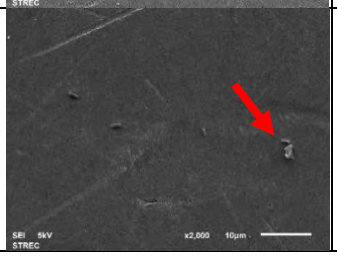
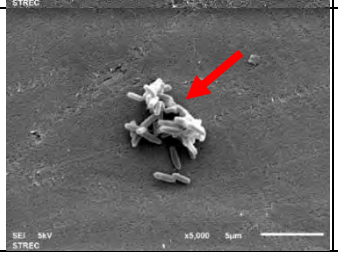
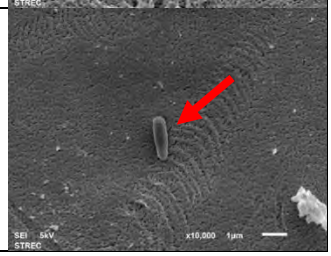
นำวัสดุตรึงที่ทำการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสมเรียบร้อยแล้ว 95 กรัม มาผสมกับดินสำหรับปลูกอ้อย 1.5 กิโลกรัม แล้วนำลงปลูกในกระถาง โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุมจะไม่มีการใส่แบคทีเรียผสมแบบตรึงในการปลูกอ้อย ชุดการทดลองที่ 1 จะใส่เชื้อแบคทีเรียผสมลงไป ชุดการทดลองที่ 2 จะใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 3 ชนิด และชุดการทดลองที่ 3 จะใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 4 ชนิด รดน้ำอ้อยเป็นเวลา 11 วัน วัดผลการเจริญของต้นอ้อยโดยวัดความยาวราก, ลำต้น และใบ

บทที่ 3

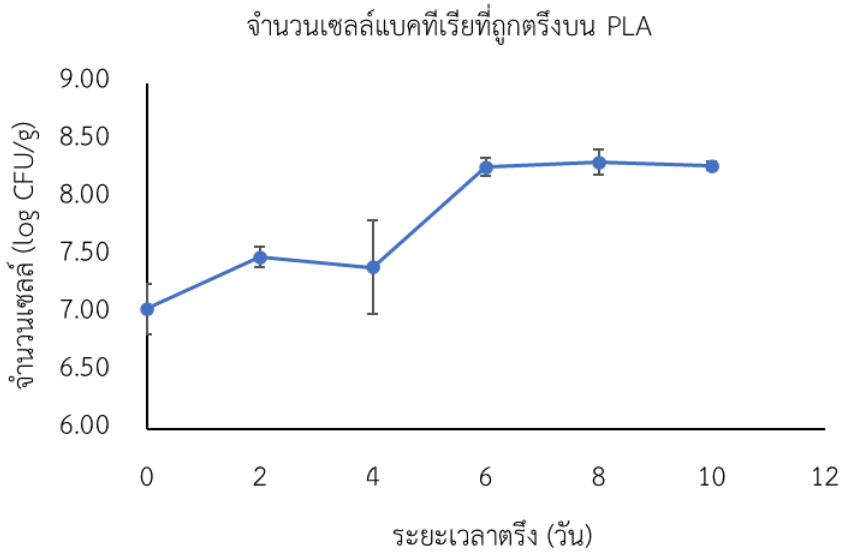
ผลการทดลอง

3.1 การเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นพลาสติกชนิด PLA

งานวิจัยนี้สนใจตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสมบนเศษพลาสติกชีวภาพชนิด PLA ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้ง เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์โดยการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับปลูกอ้อย ซึ่งขั้นแรกคือ การตรึงหัวเชื้อแบคทีเรียผสม โดยผลการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสมที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.1 ซึ่งเป็นภาพที่ได้จากการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเชื้อเริ่มเกาะบน PLA ในวันที่ 10 (ลูกศรสีแดง) และมีการเกาะน้อยมาก ถึงแม้ว่าจะมีการเกาะของเชื้อน้อยแต่จากกราฟในรูปที่ 3.2 จะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อมีการเพิ่มขึ้นจากวันแรกที่ใส่เชื้อลงไป (วันที่ 0) แสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตตลอดระยะเวลา 10 วัน ที่ทำการตรึง ซึ่งผลของปริมาณเชื้อที่เกาะบน PLA นั้นน้อยเกินกว่าที่จะนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ เพราะปริมาณเชื้อที่น้อยเกินไปอาจจะไม่สามารถแข่งขันกับแบคทีเรียประจำถิ่นในดินที่ใช้เพาะปลูกอ้อยได้ และสำหรับเหตุผลที่แบคทีเรียเกาะบน PLA ได้น้อยน่าจะเกิดจากการที่พื้นผิวของ PLA นั้นเรียบ และไม่มีรูพรุนเลยเมื่อเทียบกับวัสดุตรึงชนิดอื่น เช่น ถ่านชีวภาพที่มีรูพรุนมาก และการที่ผิวด้านนอกที่เรียบอาจจะทำให้แบคทีเรียเข้าไปยึดเกาะได้ยาก นอกจากนี้การนำไปบ่มบนเครื่องกวนสารเพื่อให้พลาสติกมีการกระจายในอาหาร อาจจะทำให้แบคทีเรียเข้ามายึดเกาะที่พื้นผิวของ PLA ได้ยากขึ้น ซึ่งควรจะปรับวิธีการบ่มให้แบบเป็นหยุดนิ่งแทน โดยการนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อธรรมดาเพื่อเพิ่มโอกาสที่แบคทีเรียจะเข้าไปเกาะบน PLA ได้มากขึ้น และอาจจะเพิ่มเวลาการทดลองเป็น 4 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เข้าไปเกาะบน PLA

กำลังขยาย / วัน	2,000X	5,000X	10,000X
วันที่ 0			
วันที่ 2			
วันที่ 6			
วันที่ 10			

รูปที่ 3.1 ภาพพื้นผิว และการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวของ PLA ได้จากการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 2,000X, 5,000X และ 10,000X



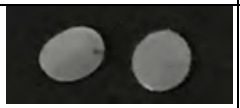
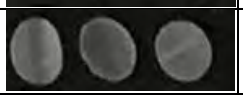
รูปที่ 3.2 จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงบน PLA

3.2 การย่อยสลายของพลาสติก PLA ในดินชนิดต่างๆ

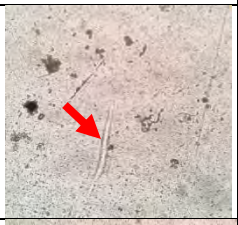
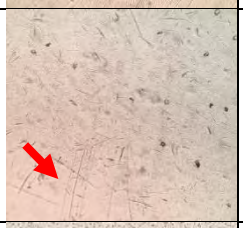
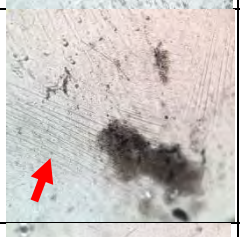
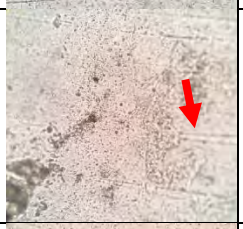
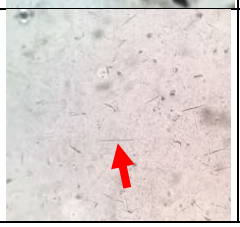
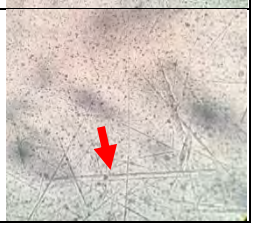
เนื่องจากการนำ PLA ไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในการปลูกอ้อยนั้น อาจจะทำให้เกิดความกังวลเรื่องการตกค้างของพลาสติก PLA ในสิ่งแวดล้อมขึ้นได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการย่อยสลายของ PLA ร่วมด้วย โดยผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.3 ซึ่งแสดงลักษณะภายนอกของ PLA ปกติที่ไม่ได้มีการตรึงเชื้อแบคทีเรีย และไม่ได้ฝังดิน โดยเปรียบเทียบระหว่าง PLA ที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ กับ PLA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะเห็นได้ว่าลักษณะภายนอกของ PLA หลังผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจะเปลี่ยนแปลงไป โดยลักษณะของพลาสติก PLA จะเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่น โดยการทดลองนี้จะนำ PLA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาฝังดิน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.4 และรูปที่ 3.5 โดยรูปที่ 3.4 ซึ่งเป็นภาพ PLA หลังจากฝังดินเป็นเวลา 21 สัปดาห์ แม้ว่าเวลาจะไป 21 สัปดาห์แล้วก็ตาม แต่ PLA ก็ยังย่อยสลายไม่หมด และสภาพของดินในขวดแก้วพบว่าดินหลายขวดนั้นแห้งมากจนจับตัวกันเป็นก้อน ซึ่งอาจจะเป็นผลให้ดินเกิดสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายของ PLA รวมถึงอุณหภูมิในดินอาจจะต่ำไป เนื่องจากทำการทดลองในที่ร่ม ทำให้ PLA ย่อยสลายได้ไม่ดี และสภาวะในดินอาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ช่วยในการย่อยสลายของ PLA ถึงแม้ว่า PLA จะย่อยสลายไม่หมดก็ตาม แต่ผลที่ได้พบว่า PLA มีความขุ่นน้อยลงเมื่อเทียบกับ PLA ก่อนนำไปฝังดิน และ PLA บางชิ้นมีความบางมากขึ้น และแตกหักง่าย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการย่อยสลายไปบางส่วน โดยการย่อยสลายบางส่วนนั้นสามารถดูได้จากรูปที่ 3.5 จะเห็นได้ว่าว่าที่พื้นผิวของ PLA นั้นมีการสึกกร่อนไป (ลูกศรสีแดง) ทั้งในชุดควบคุมที่ใช้ PLA ที่ไม่ได้ตรึงเชื้อแบคทีเรีย และชุดการทดลองที่ตรึงเชื้อแบคทีเรียผสมทั้งหมด 3 ซ้ำ แสดงว่า PLA เกิดการย่อย

สลายได้บ้างตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงไม่น่าเป็นห่วงการตกค้างของ PLA เมื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ เพราะยังไง PLA ก็น่าจะสามารถย่อยสลายไปได้จนหมดในสิ่งแวดล้อม เพียงแค่อาจจะต้องใช้เวลาสักหน่อย

รูปที่ 3.3 ภาพ PLA ปกติ ที่ไม่ได้มีการตรึงเชื้อแบคทีเรีย และไม่ได้ฝังดิน โดยรูป ก คือ PLA ที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และรูป ข คือ PLA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

ชนิดของดิน	ชุดควบคุม	PLA ที่มีการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสม		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
ดินสำหรับปลูกอ้อยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ				
ปุ๋ยจามจุรี				
ดินปลูกอ้อยที่นำมาจากพื้นที่ปลูกอ้อยอื่น				
ดินปลูกมันเทศ				
ดินปลูกข้าวโพด				

รูปที่ 3.4 ภาพ PLA หลังจากฝังดินทั้งหมด 5 ชนิด เป็นเวลา 21 สัปดาห์ โดยใช้ PLA 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุมซึ่งจะใช้ PLA ที่ไม่ได้ตรึงเชื้อแบคทีเรีย และชุดการทดลองที่ใช้ PLA ที่มีการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสม ทั้งหมด 3 ซ้ำ

ชนิดของดิน	ชุดควบคุม	PLA ที่มีการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสม		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
ดินสำหรับปลูกอ้อยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ				
ปุ๋ยจามจุรี				
ดินปลูกอ้อยที่นำมาจากพื้นที่ปลูกอ้อยอื่น				
ดินปลูกมันเทศ				
ดินปลูกข้าวโพด				

รูปที่ 3.5 ภาพ PLA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X หลังจากฝังดินทั้งหมด 5 ชนิด เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยใช้ PLA 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุมซึ่งจะใช้ PLA ที่ไม่ได้ตรึงเชื้อแบคทีเรีย และชุดการทดลองที่ใช้ PLA ที่มีการตรึงเชื้อแบคทีเรียผสมทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3 การทดสอบคุณสมบัติของวัสดุตรึง

3.1.1 ค่า pH, ค่าความชื้นสัมพันธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง

จากตารางที่ 2 ถ่านชีวภาพมีค่า pH สูงที่สุด รองลงมาคือเถ้าลอย และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มมีค่า pH ต่ำที่สุด ค่าความชื้นสัมพัทธ์ของถ่านชีวภาพมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และเถ้าลอยมีค่า

ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำที่สุด จากค่าความสามารถในการอุ้มน้ำจะเห็นได้ว่าถ่านชีวภาพและกากเนื้อในปาล์มมีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำที่ใกล้เคียงกัน โดยกากเนื้อในเมล็ดปาล์มสามารถอุ้มน้ำได้มากที่สุด และเถ้าลอยสามารถอุ้มน้ำได้น้อยที่สุด และสำหรับวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำที่ใกล้เคียงกัน โดยผลที่ได้อย่างค่า pH นั้นเพื่อดูว่าวัสดุตรึงมีความเป็นกรดหรือเบสมากเกินไปหรือไม่ เพราะค่า pH ของวัสดุตรึงอาจจะมีผลต่อการเจริญของอ้อยได้ ค่าความชื้นสัมพัทธ์ของวัสดุตรึงผสมที่ได้จะนำไปใช้ในการปรับค่าความชื้นสัมพัทธ์ก่อนจะนำไปตรึงเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำไปใช้ในการปลูกต้นอ้อยต่อไป และสำหรับค่าความสามารถในการอุ้มน้ำเพื่อดูว่าเมื่อนำวัสดุตรึงผสมไปใช้ในการปลูกอ้อย วัสดุตรึงผสมนั้นจะช่วยดินในอุ้มน้ำได้มากน้อยเพียงใด

ตารางที่ 2 ค่า pH, ค่าความชื้นสัมพันธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง

วัสดุตรึง	ค่า pH	ค่าความชื้นสัมพัทธ์ (%)	ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (มิลลิลิตรต่อกรัม)
วัสดุตรึงแบบเดี่ยว			
ถ่านชีวภาพ	10.3	51.3	2.0
เถ้าลอย	9.2	0.4	1.2
กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม	5.7	8.4	2.4
วัสดุตรึงผสม			
ถ่านชีวภาพ + เถ้าลอย + กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (วัสดุตรึงผสม 3 ชนิด)	ND	ND	1.3
ถ่านชีวภาพ + เถ้าลอย + กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม + พลาสติกชนิด PLA (วัสดุตรึงผสม 4 ชนิด)	9.93	13.97	1.9

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

3.1.2 ปริมาณแร่ธาตุของวัสดุตรึง

จากตารางที่ 3 กากเนื้อในเมล็ดปาล์มมีปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุด ส่วนถ่านชีวภาพมีปริมาณคาร์บอนสูงที่สุด ไม่สามารถตรวจพบปริมาณแคดเมียมในกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม แต่พบในถ่านชีวภาพและเถ้าลอยในปริมาณที่เท่ากันคือ 0.2 กรัมต่อกิโลกรัม และเถ้าลอยมีปริมาณทองแดงและสังกะสีสูงที่สุดในวัสดุตรึงทั้ง 3

ชนิด โดยในการทดลองจะใช้เป็นวัสดุตรึงผสมในปลูกอ้อย ซึ่งจะนำวัสดุตรึงทั้ง 3 ชนิดนี้มาผสมกับพลาสติกชนิด PLA ผลที่ได้คาดว่าปริมาณของไนโตรเจน คาร์บอน และสังกะสีในวัสดุตรึงผสมน่าจะเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้วัสดุตรึงแบบเดี่ยวเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น เถ้าลอยที่มีปริมาณคาร์บอนน้อยที่สุด และปริมาณของแคดเมียม และทองแดงในวัสดุตรึงผสมน่าจะมีค่าใกล้เคียงกับการใช้วัสดุตรึงแบบเดี่ยว

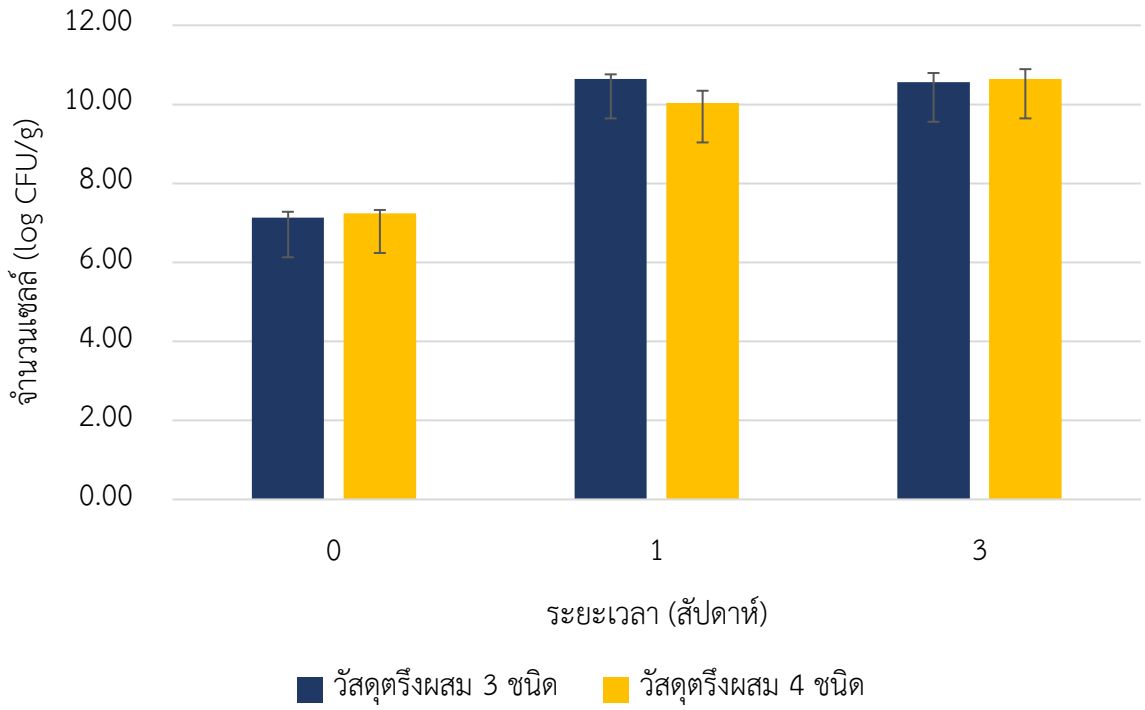
ตารางที่ 3 ปริมาณแร่ธาตุของวัสดุตรึงแต่ละชนิด

แร่ธาตุ	ถ่านชีวภาพ	เถ้าลอย	กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม
ไนโตรเจน (Total N) (%)	0.11	0.03	1.71
คาร์บอน (Total organic carbon) (กรัมต่อกิโลกรัม)	199.2	23.3	115.6
แคดเมียม (Cd) (กรัมต่อกิโลกรัม)	0.2	0.2	ND
ทองแดง (Cu) (กรัมต่อกิโลกรัม)	14.2	27.6	22.5
สังกะสี (Zn) (กรัมต่อกิโลกรัม)	20.5	137.0	36.2

หมายเหตุ ND หมายถึงไม่สามารถตรวจพบได้

3.4 อัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึงผสม

จากผลการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบน PLA ในข้อ 3.1 ที่พบว่าในระยะเวลา 10 วัน แบคทีเรียนั้นมีการยึดเกาะบน PLA ที่น้อยมาก ซึ่งน้อยเกินไปที่จะนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในการปลูกอ้อย และจากผลการย่อยสลายของพลาสติก PLA ในดินชนิดต่างๆ ในข้อ 3.2 ที่พบว่า PLA ย่อยสลายในดินได้ไม่ค่อยดี ดังนั้นจึงเตรียมเป็นวัสดุตรึงผสม เพื่อลดปริมาณการใช้ PLA ลง และเป็นการเพิ่มพื้นที่ยึดเกาะให้กับแบคทีเรียผ่านวัสดุตรึงชนิดอื่น โดยผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อมีการเพิ่มขึ้นจากวันแรกที่ได้ใส่เชื้อลงไป (สัปดาห์ที่ 0) และมีปริมาณเชื้อสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ของวัสดุตรึงผสม 4 ชนิด คือ 1.04×10^{11} CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง รองลงมาคือวัสดุตรึงผสม 3 ชนิด ในสัปดาห์เดียวกัน คือ 8.60×10^{10} CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง ซึ่งปริมาณเชื้อในของวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด ในสัปดาห์ที่ 1 และ 3 มีอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อในวัสดุตรึงใกล้เคียงกัน คือ มีปริมาณแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 10^{10}-10^{11} CFU ต่อกรัมวัสดุตรึง



รูปที่ 3.6 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

หลังจากที่ได้เชื้อแบคทีเรียผสมที่ตรึงบนวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด เรียบร้อยแล้วจะนำมาใช้ในการปลูกอ้อย โดยจะใส่เชื้อแบคทีเรียผสมที่ตรึงบนวัสดุตรึงผสมลงไปในดิน จากนั้นคลุกเคล้าให้เข้ากัน เสร็จแล้วเทดินลงในกระถางสำหรับปลูกอ้อย แล้วนำต้นอ้อยลงปลูก ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.8 คือต้นอ้อยหลังให้น้ำเป็นเวลา 11 วัน โดยเมื่อเทียบกับต้นอ้อยที่เริ่มลงปลูกในวันแรก (วันที่ 0) ในรูปที่ 3.7 พบว่าการเจริญของต้นอ้อยให้ผลไม่ต่างกัน ทั้งความยาวของใบ และความยาวของลำต้น เนื่องจากเป็นผลการทดลองในระยะสั้นทำให้ผลการทดลองที่ได้ยังไม่เห็นถึงความแตกต่างในระหว่างชุดการทดลอง

รูปที่ 3.7 อ้อยในวันที่เริ่มลงปลูก (วันที่ 0) โดยรูปแถว ก คือชุดควบคุมจะใช้ดินในการปลูกอ้อยโดยไม่มีการใส่แบคทีเรียผสมแบบตรึงในการปลูกอ้อย, รูปแถว ข คือชุดการทดลองที่ใส่เชื้อแบคทีเรียผสม, รูปแถว ค คือชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 3 ชนิด และรูปแถว ง คือชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 4 ชนิด

ก

ข

ค

ง

รูปที่ 3.8 อ้อยหลังจากการรดน้ำ 11 วัน โดยรูป ก คือชุดควบคุมจะใช้ดินในการปลูกอ้อยโดยไม่มีการใส่แบคทีเรียผสมแบบตรึงในการปลูกอ้อย, รูปแถว ข คือชุดการทดลองที่ใส่เชื้อแบคทีเรียผสม, รูปแถว ค คือชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 3 ชนิด และรูปแถว ง คือชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 4 ชนิด

แผนการดำเนินงานต่อไป

1. ทำการทดลองศึกษาการเกาะของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุตรึงที่เป็นพลาสติกชนิด PLA เพิ่มเติม

โดยจะเปรียบเทียบวิธีการเตรียมพลาสติกระหว่างการใช้พลาสติก PLA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาตรึงแบคทีเรีย (แบบที่ได้ทำการทดลองในงานวิจัยนี้) กับพลาสติก PLA ที่จะนำไปทำให้เกิดรูพรุนเสียก่อน เช่น อาจจะใช้กรดในการทำการทำให้เกิดรูพรุนบน PLA และยืดระยะเวลาการเก็บผลการทดลองออกเป็น 1 เดือน ซึ่งจะเก็บผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่ได้น่าจะพบว่ามีแบคทีเรียไปเกาะบนพลาสติกชนิด PLA ที่ได้ทำให้เกิดรูพรุนเสียก่อนเพิ่มขึ้นมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และมีปริมาณแบคทีเรียที่เกาะมากกว่าการใช้ PLA ไม่ได้ผ่านการทำให้เกิดรูพรุน

2. ศึกษาการย่อยสลายของพลาสติก PLA ในดินชนิดต่างๆ

โดยจะเก็บผลการย่อยสลายของพลาสติก PLA ในสัปดาห์ที่ 21 เพิ่มเติม ด้วยการนำ PLA มาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X เพื่อดูการสึกกร่อนของพลาสติก รวมถึงจะลองปรับสภาวะดินให้เหมาะสมต่อการย่อยสลายพลาสติกมากขึ้น เช่น การนำดินไปตั้งกลางแดดเพื่อให้อุณหภูมิในดินเพิ่มขึ้นซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายได้

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่ได้น่าจะพบว่าพลาสติก PLA มีการสึกกร่อนมากขึ้นเมื่อเทียบกับผลการทดลองที่ได้ในสัปดาห์ที่ 5 และผลจากการปรับสภาวะในดินจะช่วยให้พลาสติก PLA มีการย่อยสลายที่เร็วขึ้น

3. วัดค่า pH, ค่าความชื้นสัมพันธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุตรึง

โดยจะวัดค่า pH, ค่าความชื้นสัมพันธ์ และความสามารถในการอุ้มน้ำของพลาสติกชนิด PLA และวัดค่า pH และค่าความชื้นสัมพันธ์ของวัสดุตรึงผสม 3 ชนิดเพิ่มเติม

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ

ผลของค่า pH และค่าความชื้นสัมพันธ์ของวัสดุตรึงผสม 3 ชนิด น่าจะมีค่าใกล้เคียงกับวัดสุตรึงผสม 4 ชนิด

4. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด ในการส่งเสริมการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียผสม

เก็บผลการทดลองเพิ่มเติม จากเดิมที่เก็บผลเพียงแค่ 0, 1 และ 3 สัปดาห์ โดยจะเก็บผลการทดลองเพิ่มในสัปดาห์ที่ 4, 6, 8 และ 10

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่ได้น่าจะพบว่าแบคทีเรียมีอัตราการอยู่รอดหลังจากสัปดาห์ที่ 3 ที่เริ่มคงที่ และคาดว่าน่าจะคงที่ไปได้เรื่อยๆ จนถึงสัปดาห์ที่ 10

5. ทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงในการส่งเสริมการเจริญของต้นอ้อยในสภาวะแล้ง

โดยจะรดน้ำอ้อยให้ครบเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะหยุดให้น้ำเพื่อจำลองสภาวะแล้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วัดผลการเจริญของต้นอ้อยจากการวัดความยาวราก, ลำต้น และใบ ดูลักษณะของแบคทีเรียบริเวณพื้นผิวรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด วัดปริมาณของเชื้อที่เจริญบริเวณพื้นผิวราก โดยนำราก 1 กรัมใส่ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทำให้เซลล์แบคทีเรียหลุดออกจากผิวรากโดยนำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที และนำไปใส่อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (sonicator bath) เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนเซลล์มาละลายใน 0.85%NaCl และดูปริมาณเชื้อโดยวิธี MPN ในอาหาร 2 ชนิด คือ อาหาร TSB เพื่อใช้ดูปริมาณเชื้อทั้งหมด และอาหาร TSB ที่ใส่ PEG 20% เพื่อใช้ดูปริมาณเชื้อทนแล้ง และติดตามการย่อยสลายของ PLA ในดินระหว่างการปลูกอ้อย

ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ

คาดว่าหลังจากที่มีการให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ต้นอ้อยน่าจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และเมื่อหยุดให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ต้นอ้อยจะเริ่มมีการเหี่ยวแห้ง โดยต้นอ้อยในชุดควบคุมจะมีการเหี่ยวแห้งมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ และอาจจะมีต้นอ้อยตายในชุดควบคุมเนื่องจากทนสภาวะแล้งไม่ไหว สำหรับการเหี่ยวแห้งที่เกิดขึ้นรองลงมาจากชุดควบคุมน่าจะเป็นชุดการทดลองที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียผสมที่ไม่ได้ตรึงบนวัสดุตรึง และชุดการทดลองที่มีการเหี่ยวแห้งน้อยที่สุด คือ ชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 3 ชนิด และชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 4 ชนิด ซึ่งทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้น่าจะให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน

ผลจากการทดลองหลังจากที่มีการให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ต้นอ้อยจะมีความยาวลำต้น และความยาวใบเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนทำการทดลอง และเมื่อหยุดให้น้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ต้นอ้อยจะมีความยาวรากเพิ่มมากขึ้นทั้ง 4 ชุดการทดลอง สำหรับความยาวลำต้น และความยาวใบนั้น ในชุดควบคุมน่าจะมีค่าคงที่หรือลดลง และความยาวลำต้น และความยาวใบน่าจะเพิ่มขึ้นมากที่สุดในชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 3 ชนิด และชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 4 ชนิด โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้ น่าจะให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน รองลงมาคือชุดการทดลองที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียผสมที่ไม่ได้ตรึงบนวัสดุตรึง

ผลการทดลองเพื่อวัดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดบริเวณพื้นผิวรากโดยวิธี MPN ในอาหาร 2 ชนิด คือ อาหาร TSB เพื่อใช้ดูปริมาณเชื้อทั้งหมด และอาหาร TSB ที่ใส่ PEG 20% ผลการทดลองที่ได้น่าจะพบว่าในชุดควบคุมมีจำนวนแบคทีเรียน้อยที่สุด และมีจำนวนมากที่สุดในชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 3 ชนิด และชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมแบบตรึงบนวัสดุตรึง 4 ชนิด โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้น่าจะให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน และรองลงมาคือชุดการทดลองที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียผสมที่ไม่ได้ตรึงบนวัสดุตรึง

ผลการติดตามการย่อยสลายของ PLA ในดินระหว่างการปลูกอ้อย ผลการทดลองที่ได้คาดว่าที่พื้นผิวของ PLA น่าจะมีการย่อยสลายไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เลือกใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมระหว่างแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช และเป็นแบคทีเรียทนแล้ง ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* B2, *Bacillus stratosphericus* L19 และ *Bacillus altitudinis* T17 ร่วมกับแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ *Weissella cibaria* PN3 และใช้วัสดุตรึงผสม ได้แก่ ถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย, กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม และพลาสติกชนิด PLA โดยถ่านชีวภาพมีค่าความชื้นสัมพัทธ์สูง และมีรูพรุนจำนวนมาก จึงง่ายต่อการที่แบคทีเรียจะเข้าไปอาศัยและเจริญอยู่ภายในรูพรุน แต่ถ่านชีวภาพมีข้อเสียตรงที่มีราคาสูง จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในพื้นที่ทางการเกษตรขนาดใหญ่ เถ้าลอยเป็นของเสียจากโรงงานที่มีการเผาไหม้เชื้อเพลิง เช่น โรงงานน้ำตาล โดยลักษณะพื้นผิวของเถ้าลอยนั้นมีรูพรุนที่แบคทีเรียสามารถเข้าไปอยู่อาศัยได้ กากเนื้อในเมล็ดปาล์มเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำมันเมล็ดในปาล์ม มีธาตุไนโตรเจนสูง ซึ่งไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่สำคัญต่อการเจริญของอ้อย และพลาสติกชีวภาพชนิด PLA เป็นของเสียที่เกิดขึ้นจากการใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ เช่น แก้วสำหรับบรรจุเครื่องดื่ม ทำให้สามารถหาได้ง่ายตามถังขยะที่อยู่ใกล้ร้านค้าที่ใช้บรรจุภัณฑ์เหล่านี้ ดังนั้น PLA ที่ได้มาจึงไม่เสียเงินเพื่อซื้อมาใช้ซึ่งเป็นการช่วยลดต้นทุนในการนำมาใช้เป็นวัสดุตรึง แต่ PLA ให้ผลการเกาะของแบคทีเรียที่ไม่ดี เนื่องจาก PLA มีพื้นผิวเรียบและไม่มีรูพรุน ทำให้แบคทีเรียเข้าไปเกาะ และอยู่อาศัยได้ยาก นอกจากนี้ PLA ยังย่อยสลายในดินได้ไม่ค่อยดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rudnik และ Briassoulis (2011) ที่ศึกษาการย่อยสลายของ PLA ที่ฝังในดินแถบทะเลเมดิเตอเรเนียนซึ่งมีอุณหภูมิที่ไม่สูงมากเป็นระยะเวลา 11 เดือน พบว่า PLA มีการย่อยสลายไปบ้างเท่านั้น โดยงานวิจัยนี้เสนอว่าการเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายของ PLA ได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Yagi และคณะ (2009) ที่ทดสอบการย่อยสลายของ PLA ที่อุณหภูมิ 35 และ 55 องศาเซลเซียส โดยทดลองในถังหมักเพื่อควบคุมอุณหภูมิ ผลที่ได้พบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส PLA ย่อยสลายได้เร็วกว่าการใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จึงคาดว่าการใช้ PLA ที่ตรึงแบคทีเรียแล้วฝังในดินปลูกอ้อยที่อยู่กลางแจ้งและโดนแดดตลอดทั้งวัน จะทำให้ PLA เกิดการย่อยสลายได้เร็วกว่าที่พบในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากผลการเกาะของแบคทีเรียบน PLA และผลการย่อยสลายของ PLA ในดินนั้นไม่ค่อยดี ดังนั้นผู้วิจัยจึงผสม PLA กับวัสดุตรึงอื่นๆ คือ ถ่านชีวภาพ, เถ้าลอย และ กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม เพื่อลดปริมาณของ PLA ลง และยังช่วยเพิ่มพื้นที่ยึดเกาะให้กับแบคทีเรียผ่านวัสดุตรึงชนิดอื่น

จากอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียมีค่าใกล้เคียงกัน โดยเชื้อจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และในสัปดาห์ที่ 3 จะมีปริมาณแบคทีเรียสูงถึง 10^{10}-10^{11} CFU ต่อกรัมของวัสดุตรึง โดยปริมาณแบคทีเรียระหว่างวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saharan และคณะ (2010) ที่ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอด

ของแบคทีเรียในแป้งทัลคัมและอะลูมิเนียมซิลิเคต พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียที่ถูกตรึงในบนวัสดุตรึงทั้ง 2 ชนิด ในระยะเวลา 100 วันแรกของการตรึงมีค่าใกล้เคียงกันนั่นคือ 10^9-10^{10} CFU ต่อกรัมของวัสดุตรึง และจากปริมาณแบคทีเรียที่ได้จากงานวิจัยเล่มนี้มีค่า 10^{10}-10^{11} CFU ต่อกรัมของวัสดุตรึง ซึ่งมีค่ามากกว่างานวิจัยของ Saharan และคณะ (2010) ที่มีปริมาณ 10^9-10^{10} CFU ต่อกรัมของวัสดุตรึง ดังนั้นการเตรียมวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด เพื่อใช้ในการปลูกอ้อยนั้นจะทำการบ่มเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเพิ่มมากที่สุด ก่อนจะนำไปใช้ผสมดินปลูกอ้อย แต่เนื่องจากถ้าใช้เวลาบ่มถึง 3 สัปดาห์ จะเป็นการใช้เวลาในการบ่มที่นานเกินไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วัสดุตรึงที่ผสมกับแบคทีเรียไว้นาน 2 สัปดาห์ ซึ่งน่าจะมีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่เพียงพอแล้ว ก่อนจะนำมาผสมกับดินเพื่อใช้ปลูกอ้อย และจากผลของอัตราการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด ที่มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้ทดแทนกันได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถนำ PLA มาใช้เป็นวัสดุตรึงเชื้อแบคทีเรียเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นองค์ประกอบในปุ๋ยชีวภาพต่อไปได้ และการใช้วัดสุตรึงผสม 4 ชนิด ยังช่วยลดปริมาณและต้นทุนของวัสดุตรึงที่นำมาใช้ได้ เนื่องจาก PLA ที่นำมาใช้เป็นวัสดุตรึงนั้นเป็นขยะที่ไม่มีมูลค่า ในขณะที่ถ่านชีวภาพ และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มเป็นวัสดุตรึงที่มีมูลค่าจำเป็นต้องมีการจัดซื้อมาใช้

ผลของการปลูกอ้อยที่ได้หลังจากรดน้ำเป็นเวลา 11 วัน พบว่าต้นอ้อยมีการเจริญไม่ต่างจากวันแรกที่ลงปลูก ทั้งความยาวใบ และความยาวลำต้น เนื่องจากผลการทดลองที่ได้นี้เป็นเพียงผลการทดลองในระยะสั้นเท่านั้น จึงทำให้ยังไม่เห็นถึงความแตกต่างในระหว่างชุดการทดลอง ดังนั้นถ้าต้องการเห็นความแตกต่างในระหว่างชุดการทดลองที่ชัดเจนควรจะรดน้ำอ้อยให้ครบเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะหยุดให้น้ำเพื่อจำลองสภาวะแล้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงเก็บผลการเจริญของต้นอ้อย, ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดบริเวณพื้นผิวราก และติดตามการย่อยสลายของ PLA ในดินในระหว่างการปลูกอ้อย

เอกสารอ้างอิง

Amna., Ud, Din, B., Sarfraz, S., Xia, Y., Kamran, M.A., Javed, M.T., Sultan, T., Hussain, Munis, M.F., Chaudhary, H.J., 2019. Mechanistic elucidation of germination potential and growth of wheat inoculated with exopolysaccharide and ACC- deaminase producing Bacillus strains under induced salinity stress. Ecotoxicol Environ Saf. 183, 109466.

Araújo, H.W.C., Andrade, R.F.S., Montero-Rodríguez, D., Rubio-Ribeaux, D., Alves da Silva, C.A., Campos-Takaki, G.M., 2019. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. Microb Cell Fact. 18, 2.

Blasco, B., Navarro-León, E., Ruiz, J.M., 2019. Study of Zn accumulation and tolerance of HMA4 TILLING mutants of Brassica rapa grown under Zn deficiency and Zn toxicity. Plant Sci. 287, 110201.

Borowik, A., Wyszkowska, J., 2016. Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil. Plant Soil Environ. 62, 250-5.

Clements, T., Ndlovu, T., Khan, S., Khan, W., 2019. Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. Appl Microbiol Biotechnol. 103, 589-602.

Cohen, A.C., Travaglia, C.N., Bottini, R., Piccoli, P.N., 2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic Azospirillum in the alleviation of drought effects in maize. Botany. 87, 455-462.

Danish, S., Kiran, S., Fahad, S., Ahmad, N., Ali, M.A., Tahir, F.A., Rasheed, M.K., Shahzad, K., Li, X., Wang, D., Mubeen, M., Abbas, S., Munir, T.M., Hashmi, M.Z., Adnan, M., Saeed, B., Saud, S., Khan, M.N., Ullah, A., Nasim, W., 2019. Alleviation of chromium toxicity in maize by Fe fortification and chromium tolerant ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria. Ecotoxicol Environ Saf. 185, 109706.

da Silva, M. F, de Souza Antônio, C., de Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., de Barros Soares, L. H., Reis, V. M., 2012. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. Plant and soil. 356, 231-243.

Emadian, S.M., Onay, T.T., Demirel, B., 2017. Biodegradation of bioplastics in natural environments. Waste Manag. 59, 526-536.

Fatima, H.E., Ahmed, A., 2018. Micro-remediation of chromium contaminated soils. PeerJ. 6, 6076.

Gao, X., Avellan, A., Laughton, S., Vaidya, R., Rodrigues, S.M., Casman, E.A., Lowry, G.V., 2018. CuO Nanoparticle Dissolution and Toxicity to Wheat (*Triticum aestivum*) in Rhizosphere Soil. Environ Sci Technol. 6;52(5), 2888-2897.

Hale, L., Luth, M., Crowley, D., 2015. Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. Soil Biology & Biochemistry. 81, 228-35.

Hale, L., Luth, M., Kenney, R., Crowley, D., 2014. Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. Applied Soil Ecology. 84, 192-9.

Juthika, S., Rupak, K.S., Rajashree, D., Archana, Y., Rupjyoti, B., Vijai, K.G., Ratul, S., 2018. Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. Sci. Rep. 8, 3560.

Kaushal, Manoj., Wani, S.P., 2015. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. Annals of Microbiology. 66, 35-42.

Khan, N., Clark, I., Sánchez-Monedero, M.A., Shea, S., Meier, S., Qi, F., Kookana, R.S., Bolan, N., 2016. Physical and chemical properties of biochars co-composted with biowastes and incubated with a chicken litter compost. Chemosphere. 142, 14-23.

Liu, D., Lian, B., Dong, H., 2011. Isolation of *Paenibacillus* sp. and Assessment of its Potential for Enhancing Mineral Weathering. Geomicrobiology Journal. 29, 413-421.

Lv, S., Zhang, Y., Gu, J., Tan, H., 2018. Physicochemical evolutions of starch/poly (lactic acid) composite biodegraded in real soil. J Environ Manage. 228, 223-231.

Madhavan, Nampoothiri, K., Nair, N.R., John, R.P., 2010. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. Bioresour Technol. 101, 8493-501.

Norman P.A. Huner and William Hopkins, Introduction to Plant Physiology 4th Edition, John Wiley & Sons, Inc.,2009, isbn=978-0-470-24766-2, Chapters 3 & 4

Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World J Microbiol Biotechnol. 33, 197.

Orlandini, V., Emiliani, G., Fondi, M., Maida, I., Perrin, E., Fani, R., 2014. Network Analysis of Plasmidomes: The *Azospirillum brasilense* Sp245 Case. Int J Evol Biol. 2014, 951035.

Ribeiro, M., Simões, M., 2019. Advances in the antimicrobial and therapeutic potential of siderophores. ENVIRON CHEM LETT. 17, 1485–1494.

Rudnik, E., Briassoulis, D., 2011. Degradation behaviour of poly(lactic acid) films and fibres in soil under Mediterranean field conditions and laboratory simulations testing. Industrial Crops and Products. 33, 648-658.

Saharan, K., Sarma, M.V.R.K., Srivastava, R., Sharma, A.K., Johri, B.N., Prakash, A., 2010. Development of non-sterile inorganic carrier-based formulations of fluorescent pseudomonad R62 and R81 and evaluation of their efficacy on agricultural crops. Applied soil ecology. 46, 251-8.

Saikia, J., Sarma, R.K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V.K., Saikia R., 2018. Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. Sci. Rep. 8, 3560.

Sarioglu, O.F., San, Keskin, N.O., Celebioglu, A., Tekinay, T., Uyar, T., 2017. Bacteria immobilized electrospun polycaprolactone and polylactic acid fibrous webs for remediation of textile dyes in water. Chemosphere. 184, 393-399.

Shi, B., Palfery, D., 2010. Enhanced Mineralization of PLA Meltblown Materials Due to Plasticization. J Polymer Environ. 18, 122–127.

Silambarasan, S., Logeswari, P., Valentine, A., Cornejo, P., 2019. Role of *Curtobacterium herbarum* strain CAH5 on aluminum bioaccumulation and enhancement of *Lactuca sativa* growth under aluminum and drought stresses. Ecotoxicol Environ Saf. 183, 109573.

Stefanescu, I.A., 2015. Bioaccumulation of heavy metals by *Bacillus megaterium* from phosphogypsum waste. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry. 16, 093–097.

Sun, D., Hale, L., Crowley, D., 2016. Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. Biol Fertil Soils. 52, 515-22.

Tripti., Kumar, A., Usmani, Z., Kumar, V., Anshumali., 2017. Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. J Environ Manage. 190, 20-7.

Upadhyay, S.K., Singh, D.P., 2015. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. Plant Biol (Stuttg). 17, 288-93.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Front Plant Sci. 4, 356.

Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil. 297, 139-145.

Wu, T., Xu, J., Xie, W., Yao, Z., Yang, H., Sun, C., Li, X., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* L10: A Hydrocarbon-Degrading, Biosurfactant-Producing, and Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated From a Reed (*Phragmites australis*). Front Microbiol. 9, 1087.

Yagi, H., Ninomiya, F., Funabashi, M., Kunioka, M., 2009. Anaerobic biodegradation tests of poly(lactic acid) and polycaprolactone using new evaluation system for methane fermentation in anaerobic sludge. Polymer Degradation and Stability. 94, 1397-1404.

ธนากร แสงสง่า. 2557. พีจีพีอาร์ : บทบาทในการส่งเสริมและป้องกันพืชภายใต้สภาวะเครียด. โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

ธนากร แสงสง่า และ ธารทิพย รัตนะ. 2561. บทบาทของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในการเพิ่มประสิทธิภาพการฟนฟูดินปนเปอนโลหะหนักดวยพืช. คณะวิทยาศาสตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

ธัญชนก ขันศิลา, วิรงรอง มงคลธรรม และ ดร.เพ็ญประภา เพชระบูรณิน. 2557. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเลือกปลูกอ้อยของเกษตรกรในอำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปฐมาวดี ตรีสอน. 2561. การผลิตและประยุกต์ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียผสมแบบตรึงสำหรับส่งเสริมการเจริญของอ้อยในสภาวะแล้ง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปณญ์ธีรา แท่งหิน. 2559. ผลของแคดเมียมต่อปริมาณซิลิกอน รงควัตถุ ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และการสร้างโปรตีนไฟโตคีเรตินในข้าวไรซ์เบอร์รี่. สาขาวิชาเคมีศึกษา ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

เพ็ญนภา บุญจริง. 2015. การคัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาการหมักดองพื้นบ้านเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม. 2562. เข้าถึงจาก http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-9040.pdf เข้าถึงเมื่อ 1 พฤษภาคม 2563.

เอกวัล ลือพร้อมชัย และคณะ. 2560. การพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียผสมเพื่อส่งเสริมการเจริญและการฟื้นตัวของพืชเศรษฐกิจในสภาวะแห้งแล้ง. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth

อาหารสำเร็จรูป Tryptone Soya Broth 30.0 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 30.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

อาหารสำเร็จรูป MRS 55.0 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 55.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth

อาหารสำเร็จรูป LB Broth 25.0 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 25.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.5 กรัม

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ ข-1 จำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงบน PLA

วันที่	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัมของ PLA)
0	1.18×10^{7}
2	3.14×10^{7}
4	3.13×10^{7}
6	1.89×10^{8}
8	2.09×10^{8}
10	1.91×10^{8}

ตารางที่ ข-2 อัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อผสม 4 ชนิดในวัสดุตรึงผสมแบบ 3 และ 4 ชนิด

สัปดาห์ที่	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัมของวัสดุตรึง)	
	วัสดุตรึงผสม 3 ชนิด	วัสดุตรึงผสม 4 ชนิด
0	1.40×10^{7}	1.75×10^{7}
1	5.10×10^{10}	1.82×10^{10}
3	8.60×10^{10}	1.04×10^{11}