การคัดเลือกแบคทีเรียสำหรับการผลิตน้ำปุ๋ยชีวภาพจากขยะ

นางสาว รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1973-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SELECTION OF BACTERIA FOR LIQUID BIOFERTILIZER PRODUCTION FROM SOLID WASTE

Miss Rungtiwa Piamtongkam

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-53-1973-2

Thesis Title	Selection of bacteria for liquid biofertilizer production from solid waste
By	Miss Rungtiwa Piamtongkam
Field of study	Biotechnology
Thesis Adviser	Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.
Thesis Co-adviser	Associate Professor Tikamporn Yongvanich

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Pongtharin Lotrakul, Ph.D.)

.....Thesis Adviser

(Associate Professor Warawut Chulalaksanukul, Ph.D.)

.....Thesis Co-adviser

(Associate Professor Tikamporn Yongvanich)

.....Member

(Assistant Professor Krabuan Wattanapreechanon, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Supat Chareonpornwattana, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ : การคัดเลือกแบคทีเรียสำหรับการผลิตน้ำปุ๋ยชีวภาพจากขยะ. (SELECTION OF BACTERIA FOR LIQUID BIOFERTILIZER PRODUCTION FROM SOLID WASTE) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวณิชย์. 61 หน้า. ISBN 974-53-1973-2.

จากผลการศึกษา ทำการเลือกแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส โปรตีเอส และไลเพส จากแบคทีเรียที่มีผู้ศึกษาไว้ และจากแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินบริเวณที่ทิ้งเศษอาหาร, ดินบริเวณน้ำพุร้อน อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่, ผักที่กำลังย่อยสลาย และ ปุ๋ยหมักจากโครงการสวนพระองค์ สวนจิตรลดา และจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ได้แก่ *Bacillus cereus* 5 ไอโซเลต, *Bacillus subtilis* 1 ไอโซเลต, *Bacillus coagulans* 4 ไอโซเลต, *Serratia marcescens* 1 ไอโซเลต, และ *Pseudomonas aeruginosa* 1 ไอโซเลต นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทดสอบการอยู่ร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลต สามารถเจริญเติบโตร่วมกันและสามารถนำมาใช้ในการผลิตน้ำปุ๋ยชีวภาพได้ จากนั้นนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาใช้ในการผลิตน้ำปุ๋ยชีวภาพจากขยะ โดยใช้เศษอาหารจากครัวเรือน และขยะที่กำหนดขึ้น ประกอบด้วย เศษผัก เนื้อสัตว์ และน้ำมันที่ใช้แล้ว ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) เป็นตัวแทนของขยะที่ใช้ในการผลิตน้ำปุ๋ย โดยแบ่งการผลิตน้ำปุ๋ยเป็น 6 ถัง ดังนี้คือ ถังที่ 1 เศษอาหารจากครัวเรือน ถังที่ 2 เศษอาหารจากครัวเรือนผสมกับแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลต ถังที่ 3 ขยะที่กำหนด ถังที่ 4 ขยะที่กำหนดผสมแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลต ถังที่ 5 ขยะที่กำหนดผ่านการอบฆ่าเชื้อ และถังที่ 6 ขยะที่กำหนดผ่านการฆ่าเชื้อผสมกับแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลต ทำการหมักปุ๋ยเป็นเวลา 30 วัน เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำปุ๋ยที่ผลิตได้ พบว่า อุณหภูมิของน้ำปุ๋ยเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 7.5-8.5 ปริมาณความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนได้ค่าอยู่ระหว่าง 7.53 ถึง 16.80 และปริมาณธาตุอาหาร ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ได้ค่าเท่ากับ 1.42, 1.20 และ 1.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นนำน้ำปุ๋ยที่ผลิตได้มาศึกษาผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นผักตัวอย่าง ได้แก่ ผักโขม (*Amaranthus viridis* L.) ปลูกต้นผักโขมเป็นเวลา 30 วัน โดยวัดส่วนสูงของลำต้น และชั่งน้ำหนักสด จากผลการทดลองพบว่า ต้นผักโขมที่ได้รับปุ๋ยจากขยะที่กำหนดผ่านการฆ่าเชื้อผสมกับแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลต ให้ผลความสูงของต้นพืช และน้ำหนักสด เท่ากับ 21.00 เซนติเมตร และ 42.3 กรัมตามลำดับ แต่ไม่สามารถพบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของผักโขมที่ได้รับน้ำปุ๋ยชนิดต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา .....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ.....

ปีการศึกษา ..... 2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

447 23843 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : SOLID WASTE /LIQUID BIOFERTILIZER / CELLULASE PRODUNING BACTERIA / PROTEASE PRODUNING BACTERIA / LIPASE PRODUNING BACTERIA.

RUNGTIWA PIAMTONGKAM : SELECTION OF BACTERIA FOR LIQUID BIOFERTILIZER PRODUCTION FROM SOLID WASTE. THESIS ADVISER : ASSOC. PROF. DR. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, THESIS CO-ADVISER : ASSOC. PROF. TIKAMPORN YONGVANICH, 61 pp. ISBN 974-53-1973-2.

Twelve isolates of bacteria which could produce cellulase, protease and lipase, were screened from already identified bacteria, soil around food waste dumping area, soil around hot spring area from Sankampang, Chiang Mai, Thailand, decomposed vegetables and compost from The Royal Project, Chitralada Palace. The selected bacteria were identified as 5 isolates of *Bacillus cereus*, 1 isolate of *Bacillus subtilis*, 4 isolates of *Bacillus coagulans*, 1 isolate of *Serratia marcescens* and 1 isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. When the enzyme activities were detected, the bacterial isolates with the highest activities of each enzyme were selected for the experimental production of liquid biofertilizer from the solid waste. The result from the antagonistic test revealed that these bacteria could use together without inhibiting each other and ready for the biofertilizer production. The solid wastes were sampled from home food waste and the synthetic waste composed of the leftover from vegetables, animals and used oil in the ratio of 1:1:1 by weight. The biofertilizer consisted of 6 pots as follows: pot 1; home food waste, pot 2; home food waste with bacteria 12 isolates, pot 3; synthetic waste, pot 4; synthetic waste with bacteria 12 isolates, pot 5; autoclaved synthetic waste, pot 6; autoclaved synthetic waste with bacteria 12 isolates. After 30 days of composting, the properties of the product were examined and the followings were obtained: temperature = 28 ^{o}C, pH = 7.5-8.5, moisture content = 80%, C/N ratio = 8.00-16.80 and nutritional values N, P, K; 1.40, 1.20, 1.23 gm% respectively. The liquid biofertilizer was later provided to the plants (*Amaranthus viridis* L.) for 30 days, after plantation. Then, plants were harvested and studied for the effect of growth by measuring the height and fresh weight. The tallest plant was 21.00 cm and fresh weight was 42.3 g in the group of plant receiving the liquid biofertilizer from autoclaved synthetic waste with isolated bacteria. From overall results, it was found that there were no differences among all groups of treated plants.

Field of study .....Biotechnology..... Student's signature Rungtiwa Piamtongkam

Academic year .....2004..... Adviser's signature Warawut Chulalaksananukul

Co-adviser's signature T. Yongvanich

ACKNOWLEDGEMENTS

For this research, I would like to express my sincere gratitude to my committee, Assistant Professor Pongtharin Lotrakul, Ph.D., Assistant Professor Krabuan Wattanapreechanon, Ph.D. and Assistant Professor Supat Chareonpornwattana, Ph.D. for valuable comments and his/her time to guidance my work.

I would like to express my deep appreciation and gratitude to my adviser, Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D. for his invaluable guidance, encouragement, mental support and mercy throughout all my period of study.

I would like to express my sincere gratitude to my co-adviser, Associate Professor Tikamporn Yongvanich, for her invaluable suggestion, guidance on my work and give me morale and motherlike, love, care and work with me all the time.

I am also very thankful to Dr. Jittra Piapukiew for her valuable suggestion and guidance.

Special thanks are also extending to Ms. Ploenpit Chokchaichamnankit, Mr. Anusorn Pansuk, Ms. Nattaya Somchit, Mr. Khanchai Danmek, all members of Department of Botany and members in Dr.Warawut's laboratory for their help and encouragement throughout the period of my work.

Finally, I feel very indebted and heart thanks to my dad and mom, aunt, my brother and my loved ones, including my adviser and co-adviser, for their love, care, morale, financial support and never leave me alone.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	ix
ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER I : INTRODUCTION	1
CHAPTER II : LITERATURE REVIEW	2
2.1 Solid waste information	2
2.2 Composting and enzyme involved in the compost process	4
CHAPTER III : MATERIALS AND METHODS	12
3.1 Sources of microorganisms	12
3.2 Culture and selective media	12
3.3 Chemicals and instruments	13
3.4 Screening of bacteria	15
3.5 Assay of enzyme activity	16
3.6 Identification of selected colonies	17
3.7 Antaginistic test of the selected bacteria	19
3.8 Solid waste composting with selected bacteria	19
3.9 Test of biofertilizer quality	20
CHAPTER IV : RESULTS	21
4.1 Isolation of bacteria	21
4.2 Assay of enzyme activity	30
4.3 Identification of bacteria	32
4.4 Antaginistic test of the selected bacteria	40
4.5 Biofertilizer production	41
4.6 Efficiency of the liquid biofertilizer	46
CHAPTER V : DISCUSSIONS	49
CHAPTER VI : CONCLUSIONS	56
REFERENCES	57
BIOGRAPHY	61

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Waste generation in Thailand in 2003.....	2
2.2	Waste composition in Thailand.....	3
2.3	Maturing period and composition of compost from different materials, using rapid composting technology.....	11
4.1	The fluoresced colonies of bacteria isolated from various sources: bacteria from Maneechote, 2001, soil around the food waste dumping area and denitrifying bacteria (Smartivutikoon, 2003).....	28
4.2	Cellulase activities of selected bacteria.....	30
4.3	Protease activities of bacteria.....	31
4.4	Lipase activities of selected bacteria.....	32
4.5	Morphology of the colonies, Gram's stain, Oxidase test, Catalase test and name of selected bacteria.....	37
4.6	Biochemical test of six isolates of the selected bacteria	38
4.7	Biochemical test of six isolates of the selected bacteria.....	39
4.8	Moisture content of the biofertilizer.....	44
4.9	Carbon and nitrogen ratio of the biofertilizer	45
4.10	Nutritional values of the biofertilizer	45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Phase of temperature between composting.....	6
4.1	The clear zones produced around the selected bacterial colonies growing on CMC agar stained with congo red: A) serial dilution of sample spread on CMC agar plate; B) 4 strains of *B. subtilis*; C-D) bacterial isolates from decomposed vegetable; E- F) bacterial isolates from The Royal Project compost.....	22
4.2	The ratio of clear zones of bacteria isolated from various sources after growing on CMC agar plates for 1 day and stained with congo red: bacterial from N. Maneechote (N1-N27), decomposed vegetables (A1-A4, B1-B3) and The Royal Project compost (P1-P3, Y1-Y2).....	23
4.3	The clear zones around the selected bacterial colonies on skim milk agar plates: A) serial dilution of sample from decomposed vegetable; B) *B. subtilis* isolates; C-D) bacteria from decomposed vegetables; E) bacteria from hot spring area; F) bacteria from food waste dumping area.....	25
4.4	The ratio of clear zones of bacteria isolated from various sources after growing on skim milk agar plates for 1 day : bacteria from N. Maneechote (N1-N27), decomposed vegetables (A1-A4, B1-B3), soil around the food waste dumping area (G1-G3) and soil from the hot spring area (D1 – D7).....	26
4.5	The fluorescence production on Rhodamine B agar plates from bacteria: A) serial dilution of sample from soil around food waste dumping area; B) *B. subtilis* N26; C) bacteria from food waste dumping area; D) denitrifying bacteria (J10).....	29
4.6	Morphology of the colonies and gram's stain of selected cellulase-producing bacteria growing on nutrient agar plates at room temperature (28°C) for 1 day: The right row illustrates the 500 times magnification of the colonies.....	33

Figure **Page**

4.7 Morphology of the colonies and gram's stain of selected protease-producing bacteria growing on nutrient agar plates at room temperature (28°C) for 1 day: The right row illustrates the 500 times magnification of the colonies..... 34

4.8 Morphology of the colonies and gram's stain of selected lipase-producing bacteria growing on nutrient agar plates at room temperature (28°C) for 1 day: The right row illustrates the 500 times magnification of the colonies..... 35

4.9 Antagonistic test of the selected bacteria: A and B) 10 isolates of bacteria grown together on nutrient agar plate; C and D) 5 isolates of bacteria grown together on nutrient agar plate..... 40

4.10 The 30 day old biofertilizer: Pot 1) home food waste; Pot 2) home food waste inoculated with mixed bacteria; Pot 3) synthetic waste, Pot 4) synthetic waste inoculated with mixed bacteria; Pot 5) autoclaved synthetic waste; Pot 6) autoclaved synthetic waste inoculated with mixed bacteria..... 41

4.11 Temperature of the biofertilizer was measured every 3 days of composting: Pot 1) home food waste; Pot 2) home food waste inoculated with mixed bacteria; Pot 3) synthetic waste, Pot 4) synthetic waste inoculated with mixed bacteria; Pot 5) autoclaved synthetic waste; Pot 6) autoclaved synthetic waste inoculated with mixed bacteria..... 42

4.12 The pH of the biofertilizer in the pot was measured every 5 days of composting: Pot 1) home food waste; Pot 2) home food waste inoculated with mixed bacteria; Pot 3) synthetic waste, Pot 4) synthetic waste inoculated with mixed bacteria; Pot 5) autoclaved synthetic waste; Pot 6) autoclaved synthetic waste inoculated with mixed bacteria..... 43

Figure **Page**

4.13 Growth of 30 day old Chinese spinach (*Amaranthus viridis* L.). Plants were grown in 6-inch diameter pots containing 500 grams of soil and the tested plants were provided with: A) biofertilizer from home food waste; B) biofertilizer from home food waste inoculated with mixed bacteria; C) biofertilizer from synthetic waste, D) biofertilizer from synthetic waste inoculated with mixed bacteria; E) biofertilizer from autoclaved synthetic waste; F) biofertilizer from autoclaved synthetic waste inoculated with mixed bacteria; G) water in control group..... 46

4.14 Height of Chinese spinach (*Amaranthus viridis* L.). Plants were grown in 6-inch diameter pots containing 500 grams of soil and the tested plants were provided with: A) biofertilizer from home food waste; B) biofertilizer from home food waste inoculated with mixed bacteria; C) biofertilizer from synthetic waste, D biofertilizer from synthetic waste inoculated with mixed bacteria; E) biofertilizer from autoclaved synthetic waste; F) biofertilizer from autoclaved synthetic waste inoculated with mixed bacteria; G) water in control group..... 47

4.15 Plant fresh weight after 30 days of planting: A) received the biofertilizer from home food waste; B) received the biofertilizer from home food waste inoculated with mixed bacteria; C) received the biofertilizer from synthetic waste, D) received the biofertilizer from synthetic waste inoculated with mixed bacteria; E) received the biofertilizer from autoclaved synthetic waste; F) received the biofertilizer from autoclaved synthetic waste inoculated with mixed bacteria; G) control group..... 48

ABBREVIATIONS

Abbreviation or symbol	Term
cm	centimeter
g	gram
kg	kilogram
µl	microlitre
mg	milligram
mg/ml	milligram per microlitre
ml	millilitre
mm	millimeter
min	minute
mM	millimole
M	molar or mole per litre
rpm	round per minute
v/v	volume by vlume
w/v	weight by volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย