รายงานการวิจัย ฉบับสมบูรณ์

เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ปีงบประมาณ 2561

ชื่อโครงการวิจัย

การคัดสรรและพัฒนาปุ๋ยชีวภาพและการเกษตรแบบอินทรีย์ จากฐานข้อมูลจุลินทรีย์

Selection and development of organic fertilizer and agriculture using microbiome

รองศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญาเลขที่ GB-A_61_024_23_05

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม พืชที่ปลูกส่วนใหญ่ได้แก่ ข้าว ตามด้วยผักและผลไม้ชนิดต่างๆ ปัจจุบันมีแนวโน้มการส่งออกสินค้าเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตรเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่กลับพบว่าพื้นที่ๆ ใช้สำหรับเพาะปลูกเกือบทั้งหมดนั้นเป็นดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์และเสื่อมสภาพทั้งทางเคมีและทางกายภาพ อันเนื่องมาจากการใช้สารเคมี ยาฆ่าแมลง ปัญหาดินเปรี้ยวหรือดินเค็ม ทำให้ดินมีคุณภาพเสื่อมลงและสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งปัญหาเหล่านี้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้พืชโตช้า และได้ผลผลิตทางการเกษตรน้อย มีงานวิจัยจำนวนมากชี้ให้เห็นว่าการทำเกษตรอินทรีย์ หรือการปลูกพืชโดยใช้ปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยชีวภาพนั้นสามารถคงความหลากหลายทางชีวภาพและความอุดมสมบูรณ์ของดินได้มากกว่าการทำเกษตรที่ใช้สารเคมี ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพเป็นจำนวนมาก ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งหวังเพื่อที่จะศึกษาจุลินทรีย์ในมูลสัตว์แต่ละชนิด เพื่อที่จะคัดเลือกมูลสัตว์ที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดและนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นปุ๋ยคอก และใช้เพื่อปรับปรุงฟื้นฟูดินที่เสื่อมสภาพจากการทำการเกษตร ด้วยการเปรียบเทียบฐานข้อมูลประชากรจุลินทรีย์แบคทีเรีย อาร์เคีย และราในมูลสัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ มูลโคนม มูลไส้เดือน มูลแพะ มูลกวางลูซี่ มูลกระต่าย และมูลโคเนื้อภูพาน ด้วยวิธีการสร้างห้องสมุดยีน 16s ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอและ sequencing หรือไมโครไบโอม ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีที่เหมาะในการใช้เพื่อสร้างฐานข้อมูลและเพื่อใช้วิเคราะห์ระบบนิเวศอย่างถูกต้อง เนื่องจากมีแบคทีเรียจำนวนมากที่ไม่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงและยังให้ข้อมูลที่ครบถ้วนอีกด้วย จากผลของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของมูลสัตว์แต่ละชนิดทั้งในด้านคุณสมบัติลักษณะทางกายภาพ เคมี และความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ที่พบในมูลสัตว์ โดยพบว่าไฟลัม Fibrobacteres, Actinobacteria และ Planctomycetes เป็นไฟลัมที่พบได้มากที่สุดในมูลสัตว์ทุกชนิด ซึ่งมูลไส้เดือนนั้นมีความหลากหลายแบคทีเรียรวมมากที่สุด และยังมีโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับมูลสัตว์ชนิดอื่นๆ ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม Rhizobiales, Actinomycetales และ Flavobacteriales พบได้มากในมูลของไส้เดือนอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุอาหารที่สำคัญที่ต่อพืชอย่างครบถ้วน ได้แก่ ไนโตรเจน โพแทสเซียม และฟอสฟอรัส ซึ่งเหมาะสมต่อการนำมาพัฒนาเป็นปุ๋ยคอกต่อไป

Abstract

Thailand is an agricultural country, particularly in the Northeastern that covers one-third of the region. Main cultivars include rice (>50%) followed by local vegetables and fruits. Yet, the soil quality of the Northeastern is sandy and inappropriate for agriculture. In addition, water amount from ponds and annual rain is limited, and the soil is also salty because of the recently heavy use of chemicals, such as pesticide. Instead of synthetic fertilizer that yields only individual minerals for soil, the present study analyzed animal feces from various species that farmers use in farming (feces of earthworm, cow, dairy cow, buffalo, goat, pig, Lucy deer, chicken and rabbit), for physiochemical properties and microbiota compositions via culture-independent 16S rRNA gene sequencing methods. Inclusion of proper microbial population in animal feces is expected to supportively function to recover the soil nutrition and condition for fertile land. Results indicated that phylum Fibrobacteres, Actinobacteria, and Planctomycetes were found more abundance in all fecal samples. Earthworm feces yielded the most variety of minerals (nitrogen, potassium, and Phosphorus). It also showed appropriate levels of pH, salt, moisture, and the most diversity of bacterial phyla. Compared with other animals, earthworm yielded significantly more proportion of Rhizobiales, Actinomycetales and Flavobacteriales. Many species of these phyla are important for soil quality. Examples are nitrogen-fixer *Rhizobium* and organic-digested Actinomycetales.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณที่ปรึกษาและผู้ร่วมวิจัยได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัตน์มณี ชนะบุญ นางสาวนฤมล ตันสกุล และ นางสาวล้ำเพชร วงศาโรจน์

สารบัญ

บทที่	เลขหน้า
1. บทนำ	4 - 6
2. วิธีทำ	7 - 9
3. ผลการทดลองและอภิปรายผล	
3.1 องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมี	10 - 17
3.2 ความหลากหลายของประชากรแบคทีเรีย	17 - 22
4. สรุปผล	23
5. เอกสารอ้างอิง	24

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาเทคนิคทางเมตาจีโนมิกส์อย่างแพร่หลายเพื่อศึกษาและทำฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพที่แท้จริง ครอบคลุม ไม่ขึ้นกับความสามารถในการเพาะเลี้ยง และใช้เวลาไม่นาน ซึ่งในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์โดยวิธีเมตาจีโนมิกส์หรือวิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงนี้ทำให้พบจุลินทรีย์อีกมากกว่า 1,000 เท่าของที่รายงานโดยอาศัยวิธีเพาะเลี้ยง ช่วยให้ทราบสังคมจุลินทรีย์ที่แท้จริง หรือที่เรียกว่า ไมโครไบโอม (microbiome) และก่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นในความหลากหลายและบทบาทของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศ อาทิเช่น นักวิทยาศาสตร์พบจุลินทรีย์ที่คาดว่าเป็นประโยชน์ในการปรับสภาพพื้นดิน จากดินในเขตทะเลทราย ว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปรับสมดุลของน้ำ และพบไมโครไบโอมมีส่วนสัมพันธ์กับความอุดมสมบูรณ์และความทนต่อโรคของดินและต้นพืช ผลของงานวิจัยดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนาเพื่อการเกษตร ซึ่งการประยุกต์ใช้ความรู้ทางไมโครไบโอมเพื่อสร้างจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่เหมาะสมดังกล่าวนับเป็นวิธีบำบัดทางธรรมชาติที่ไม่ก่อผลกระทบใดๆ และยั่งยืน เพราะก่อให้เกิดระบบนิเวศที่เหมาะสมตามความสัมพันธ์ของห่วงโซ่อาหารและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ

1.1 การเกษตรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ พืชที่ปลูกกันส่วนใหญ่ในประเทศได้แก่ ข้าว (มากกว่าร้อยละ 50) ตามด้วยผักและผลไม้ต่าง ๆ (เช่น ชา ข้าวโพด และกล้วย) (NESDB, 2005)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ขนาดใหญ่ โดยคิดเป็นหนึ่งในสามของพื้นที่ทั้งหมดของประเทศ (168,854 ตารางกิโลเมตร) และประชากรส่วนใหญ่ของประเทศอาศัยอยู่ในพื้นที่นี้ ประชากรของภาคตะวันออกเฉียงเหนือส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม แต่กระนั้น คุณภาพของดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้นต่ำสำหรับการทำเกษตรกรรมเมื่อเทียบกับภูมิภาคอื่น ๆ ของประเทศ (Fukai, Sittisuang and Chanphengsay, 1998) เนื่องจากดินมีลักษณะเป็นทรายเนื้อละเอียด นอกจากนี้ ลักษณะภูมิประเทศยังมีแหล่งน้ำอยู่จำกัด ปริมาณน้ำฝนก็ไม่แน่นอน กล่าวคือ บางครั้งมีฤดูแล้งที่ยาวนาน ตามด้วยฤดูฝนที่มีน้ำท่วม แม้ปัญหาจะทุเลาลงบ้างเพราะมีโครงการชลประทาน แต่การแก้ปัญหาดังกล่าวยังก่อให้เกิดปัญหาใหม่ นั่นคือ ปัญหาดินเค็ม นอกจากนี้ พื้นที่เกษตรกรรมหลายแห่งกลายสภาพมาจากการตัดไม้ทำลายป่า ปัญหาอีกอย่างหนึ่งคือ ผลผลิตต่อพื้นที่เฉลี่ยค่อนข้างต่ำ ทำให้เกษตรกรต้องพึ่งพาการทำเกษตรแบบอุตสาหกรรม (industrial agriculture) ซึ่งเป็นการเร่งให้คุณภาพดินเสื่อมเสียเร็วขึ้นไปอีก (Fedra, Winkelbauer and Pantulu, 1991; NESDB, 2005)

เมื่อสังคมสมัยใหม่กลายเป็นสังคมอุตสาหกรรม การเกษตรจึงเปลี่ยนเป็นการเกษตรอุตสาหกรรมไปด้วย เกษตรอุตสาหกรรม หมายถึง ระบบการทำการเกษตรโดยใช้ปุ๋ยเคมี ยาฆ่าแมลง ยากำจัดวัชพืช และสารเคมีสังเคราะห์ และสิ่งมีชีวิตตัดต่อพันธุกรรม มีการทำชลประทานและไถพรวนกันอย่างแพร่หลาย วิธีการนี้ทำให้สามารถได้ผลผลิตจำนวนมากในพื้นที่น้อยและใช้แรงงานมนุษย์น้อยลง (Seufert, Ramankutty, and

Foley, 2012) แต่กิจกรรมต่าง ๆ ที่ใช้ทรัพยากรและพลังงานมาก ๆ แบบเกษตรอุตสาหกรรมส่งผลร้ายต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การชะละลายของสารเคมี ความเสื่อมโทรมของดิน และการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพ งานวิจัยมากมายที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเกษตรอุตสาหกรรมและเกษตรอินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ตรงข้ามกันแสดงให้เห็นว่าเกษตรอินทรีย์ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตและความอุดมสมบูรณ์ของดินมากกว่าเกษตรอุตสาหกรรม (Bengtsson, Ahnström, and Weibull, 2005) นอกจากนี้ การใช้สารเคมี เช่น ยาฆ่าแมลง ยังทำให้มนุษย์เผชิญกับความเสี่ยงด้านสุขภาพ แต่กระนั้น เนื่องจากเกษตรอุตสาหกรรมให้ผลผลิตที่รวดเร็วกว่า เกษตรกรในประเทศไทยจึงยังเป็นที่นิยม ทำให้เกิดปัญหาดินคุณภาพต่ำอย่างต่อเนื่อง (Fukai, Sittisuang and Chanphengsay, 1998)

1.2 เกษตรอินทรีย์และความสำคัญของไมโครไมโอมในดิน

เกษตรอินทรีย์ (Organic agriculture) หรือเรียกว่า เกษตรยั่งยืน (sustainable farming) มีหลักการว่าห้ามใช้สารเคมีและสิ่งแปลกปลอม สิ่งมีชีวิตตัดต่อพันธุกรรม แต่ยังให้ใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรเพื่อลดการใช้พลังงานและแรงงานมนุษย์ (Hole et al., 2005; Paull, 2011) เช่น เกษตรอินทรีย์มีการใช้ปุ๋ยที่ได้จากสัตว์หรือพืช มีการกำจัดวัชพืชด้วยมือ ควบคุมศัตรูพืชด้วยวิธีการทางชีวภาพ เพื่อแทนการใช้ปุ๋ยเคมี สารกำจัดศัตรูพืช และยาฆ่าแมลง นอกจากนี้ เกษตรอินทรีย์ยังใช้วิธีการปลูกแบบสวนผสม (คือการปลูกพืชหลายชนิดรวมกัน) และปลูกพืชหมุนเวียนเพื่อให้ดินมีแร่ธาตุที่หลากหลาย เป้าหมายของเกษตรอินทรีย์ คือ คงสภาพความเป็นธรรมชาติที่ดี รวมถึง ดิน น้ำ สัตว์ มนุษย์ และอื่น ๆ กระบวนการของเกษตรอินทรีย์จะเป็นการพึ่งพาความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศและสายใยอาหารที่เหมาะสมกับสภาพภูมิประเทศในท้องถิ่นนั้น ๆ (Rigby and Cáceres, 2001) สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานว่า ฟาร์มเกษตรอินทรีย์ในประเทศไทยประกอบด้วย ทำนาข้าว (ร้อยละ 68) สวนผักต่าง ๆ (ร้อยละ 12) ผลไม้ (ร้อยละ 8) ไร่ชา (ร้อยละ 8) สมุนไพร และอื่น ๆ นอกจากนี้ ผลผลิตจากฟาร์มเกษตรอินทรีย์มักจะมีราคาตลาดที่สูงกว่าสินค้าเกษตรประเภทอื่น เนื่องจากมีคุณค่าด้านการทำเกษตรแบบห่วงใยสิ่งแวดล้อม

จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในทุกวัฏจักรของห่วงโซ่อาหาร รวมทั้งในดินด้วย โดยทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรียวัตถุ ซากพืชซากสัตว์ ให้เป็นสารอาหารที่พืชสามารถดูดซึมไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นปัญหาดินขาดธาตุอาหารและกลายเป็นดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์จึงสามารถแก้ไขได้ด้วยการเติมสารอาหารให้แก่ดิน โดยการคงความสมดุลของความหลากหลายของจุลินทรีย์ทั้งประเภทโปรคาริโอตและยูคาริโอต (รา สัตว์จำพวกหนอนตัวกลม และสัตว์จำพวกหนอนปล้อง) เมื่อเกษตรกรปลูกและเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้ว ดินก็จะสูญเสียสารอาหารบางอย่างออกไป เพื่อให้วัฏจักรการย่อยสลายนั้นกลับมาสมบูรณ์อีกครั้ง โดยทั่วไปเกษตรกรมักมีการใส่ปุ๋ยเพื่อเป็นการเพิ่มธาตุอาหารให้แก่พืช โดยเฉพาะธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมากเมื่อเทียบกับธาตุอื่นๆ ซึ่งมีไม่เพียงพอในดินสำหรับการเพาะปลูก จึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มเติมธาตุเหล่านี้โดยการให้ปุ๋ย

ปุ๋ยคอกเป็นปุ๋ยที่ได้จากมูลสัตว์ เช่น หมู แพะ วัว ไส้เดือน ฯลฯ จะให้อินทรียวัตถุ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่จำเป็นต่อพืช เพิ่มธาตุอาหารให้แก่ดิน มีประโยชน์ในการปรับปรุงสภาพทางกายภาพของดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ช่วยลดอัตราการพังทลายของหน้าดิน ช่วยปรับปรุงดินให้โปร่งและร่วน

ซุย นอกจากนี้ปุ๋ยคอกยังเป็นแหล่งธาตุอาหารและที่อยู่ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการย่อยสลายอินทรียวัตถุ พื้นที่การทำนาส่วนใหญ่ของประเทศอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นดินทรายที่มีอินทรียวัตถุต่ำมาก การใส่ปุ๋ยที่ได้จากมูลสัตว์จะช่วยทำให้ดินอุ้มน้ำและปุ๋ยได้ดีขึ้น ช่วยให้การดำนาง่ายขึ้น ข้าวตั้งตัวได้ดีและมีโอกาสรอดได้มากขึ้น และเจริญเติบโตงอกงามอย่างรวดเร็ว

งานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าเทคนิคในการทำเกษตรกรรมส่งผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพ ระบุว่าการเกษตรอุตสาหกรรมในระยะยาวเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจุลินทรีย์ในดิน โดยมีแนวโน้มที่จะไปลดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตและกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตเมื่อเทียบกับเกษตรอินทรีย์ (Bossio et al., 1998; Letourneau and Goldstein, 2001; Berkelmans et al., 2003) นอกจากนี้ ดินจากเกษตรอินทรีย์ยังมีเชื้อก่อโรคพืชลดลงเนื่องจากมีการแข่งขันการเจริญเติบโตจากจุลชีพที่มีประโยชน์ (Griffiths et al., 1994) และขณะที่การใช้จุลินทรีย์ชนิดเดียวจะให้ผลลัพธ์ที่ไม่นิ่ง แต่ข้อมูลจากการใช้ไมโครไบโอมหมายถึงสังคมจุลินทรีย์ พบว่าช่วยแก้ปัญหาพืชเกษตรและปัญหาเกี่ยวกับดินเรื้อรังได้หลายอย่าง เช่น พืชที่ทนความเค็มได้และคุณภาพดินที่ดีขึ้น (Vandenkoornhuyse et al., 2015; Qin et al., 2016; Schmidt, Bowles and Gaudin, 2016) อย่างไรก็ตาม ไมโครไบโอมในดินแตกต่างกันไปตามพื้นที่ทางภูมิศาสตร์และประเภทของพืช (Bulgarelli et al., 2012; Lakshmanan, 2015; Agler et al., 2016)

ดังนั้น จากงานวิจัยในปีพ.ศ. 2560 ที่ศึกษาไมโครไบโอมในดินพื้นที่เพาะปลูกแบบต่างๆ (ดินจากแปลงนาเกษตรอินทรีย์ ดินจากแปลงนาเกษตรอุตสาหกรรม และดินนาเกลือ) ในโครงการวิจัยปีที่ 2 (พ.ศ. 2562) นี้จึงมุ่งหวังที่จะต่อยอดศึกษาไมโครไบโอมในมูลสัตว์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โคนม วัว ควาย ไส้เดือน แพะ กวางลูซี่ กระต่าย ไก่ภูพาน สุกร และโคเนื้อภูพาน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสัตว์พื้นเมืองของประเทศไทย และมีการเลี้ยงและขยายพันธุ์กันอย่างแพร่หลาย เกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจึงนิยมเลี้ยงเพื่อใช้งานในการเกษตรและการปศุสัตว์ ในปัจจุบันมูลสัตว์หลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นปุ๋ยบำรุงดิน เนื่องจากหาได้ง่าย ไม่เสียค่าใช้จ่าย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้มูลจากสัตว์เหล่านี้เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครไบโอม โดยทำการคัดเลือกมูลสัตว์ที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดและนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นปุ๋ยคอกที่เหมาะสม และใช้เพื่อปรับปรุงฟื้นฟูดินที่เสื่อมสภาพจากการทำการเกษตร ด้วยการเปรียบเทียบฐานข้อมูลประชากรจุลินทรีย์แบคทีเรียในตัวอย่างมูลสัตว์

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- ศึกษาและเปรียบเทียบสมบัติทางเคมีและทางกายภาพในมูลสัตว์แต่ละชนิด
- ได้แหล่งอ้างอิงข้อมูลประชากรจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและอาร์เคีย) ในมูลสัตว์แต่ละชนิด
- ระบุความแตกต่างของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ ระหว่างมูลสัตว์แต่ละชนิด
- ใช้ข้อมูลดังกล่าวเป็นตัวประกอบการพิจารณาพัฒนาปุ๋ยคอกและใช้ในการปรับปรุงพื้นที่การเกษตรอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

บทที่ 2
วิธีทำ

1. เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างมูลสัตว์ในช่วงเวลา ฤดูกาล และพื้นที่เดียวกัน (ช่วงเวลาระหว่างวัน เดือนสิงหาคม และจ. มหาสารคาม) โดยเก็บตัวอย่างละสามซ้ำอิสระ

ไก่ดำภูพาน (Phuphan Chicken) สายพันธุ์ 1, 2, 3

วัวดำภูพาน (Phuphan Cow)

สุกร (Pig)

กระต่าย (Rabbit)

ควายนม (Murrah Buffalo)

วัวชาโลเล่ส์ (Charole Cow)

แพะ (Goat) เลี้ยงหญ้าสายพันธุ์ 1, 2

โคนม (Dairy Cattle)

กวางลูซี่ (Lucy Deer)

ไส้เดือน (Earthworm)

2. วิเคราะห์ปริมาณน้ำในมูลสัตว์

นำตัวอย่างมูลสัตว์ 1 ช้อนตวงใส่บนเพลทที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนตากแห้ง จากนั้นนำเพลทไปตากแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Gardner WH., 1986) แล้วทำการชั่งน้ำหนักหลังตากแห้ง เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำในตัวอย่าง จากสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตัวอย่าง (\%)} = \frac{W2-W3}{W2-W1} \times 100$$

โดยกำหนดให้ W1 คือ น้ำหนักเพลท

W2 คือ น้ำหนักเพลทที่บรรจุตัวอย่างก่อนตากแห้ง และ

W3 คือ น้ำหนักเพลทที่บรรจุตัวอย่างหลังตากแห้ง

3. วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ความเค็ม และความสามารถในการนำไฟฟ้า

ผสมตัวอย่างมูลสัตว์กับน้ำที่ปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:5 เช่น มูลสัตว์ 5 กรัมและน้ำ 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่า pH ความเค็มของมูลสัตว์ (Salinity) และความสามารถในการนำไฟฟ้า (Conductivity) ด้วยเครื่อง Oakton PCD 650 pH/Conductivity/Dissolved Oxygen Multiparameter

4. วิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุสำคัญและอินทรียวัตถุ

วิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุที่สำคัญได้แก่ ไนโตรเจน (Nitrogen) ฟอสฟอรัส (Phosphorus) และโพแทสเซียม (Potassium) ด้วยชุดทดสอบของ Rapitest Soil test kit (Luster leaf) โดยนำตัวอย่างมูลสัตว์ผสมกับน้ำปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:5 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะตกตะกอน จากนั้นปิเปตน้ำส่วนใสลงในอุปกรณ์ชุดตรวจและใส่แคปซูลทดสอบลงไป ทำการเทียบสีและแปลผลปริมาณแร่ธาตุจากตารางที่กำหนดจากชุดทดสอบ

การวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุ ใช้มูลสัตว์ 1 ช้อนตวง และดำเนินการตามขั้นตอนของ Soil Organic Matter Test Kit (ปรับปรุงขั้นตอนจาก Walkley และ Black) เทใส่ขวดทำปฏิกิริยา จากนั้นใส่น้ำยาเบอร์1 5 มิลลิลิตร และตามด้วยกรด 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำกรองใส่ลงในขวดทำปฏิกิริยา 10 มิลลิลิตรและทิ้งไว้ 30 นาที หรือจนกว่าสารละลายเย็น จากนั้นเปรียบเทียบสีของสารละลายกับแผ่นเทียบสีมาตรฐาน ค่าที่ได้จะออกมาเป็นช่วง โดยมีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ ซึ่งบ่งบอกถึงระดับอินทรียวัตถุในดินที่ต่างกันแปดระดับ ตั้งแต่ต่ำมาก ถึงระดับสูง

5. สกัดเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพ

นำตัวอย่างมูลสัตว์จำนวน 0.25 กรัม มาสกัดเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (หรือจีโนมทั้งหมดในตัวอย่าง) โดยใช้ DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Inc.) ตามวิธีในคู่มือชุดสกัด ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างที่สกัดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และ nanodrop spectrophotometry และเก็บเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. สร้างห้องสมุดยีน 16s *ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ* (*16S rRNA)*

สร้างห้องสมุดยีนสากล 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่เชื่อมกับ 5’ Illumina adapter และ Golay barcode เพื่อใช้ในการเชื่อมกับดีเอ็นเอบนเครื่อง next-generation sequencing (NGS) และในการระบุตัวอย่าง ตามลำดับ และสภาวะ PCR ตามวิธีของ Caporaso และคณะ (2012) โดยใช้สภาวะเริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจำนวน 25 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที 50 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของห้องสมุด โดยนำไปแยกในเจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 1.75% ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) พร้อมรันเทียบกับ OneMARK 100 (GeneDireX, Inc.) หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน มีการทำสำเนาอย่างน้อยสามชุดอิสระ กระจายกันไปเท่าเทียมกันเพื่อลด stochastic PCR bias จากนั้นตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยใบมีดปลอดเชื้อ และทำความสะอาดผลิตภัณฑ์ด้วย PCR Clean-Up & Gel Extraction Kit (PureDireX, Inc.) วิเคราะห์คุณภาพและวัดความเข้มข้นโดยใช้ Picogreen *(*Invitrogen, Eugene, Oregon, USA*)* ด้วย qubit fluorometer จากนั้นทำการผสมแต่ละตัวอย่างของดีเอ็นเอในปริมาณที่เท่ากัน และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. ซีเควนซิ่งด้วยเทคนิค next generation sequencing

ผสมทุกตัวอย่างๆ ละ 200 นาโนกรัม และใช้ลำดับ sequencing primers และ index sequence ตามของ Caporaso และคณะ (2012) เพื่อลงเครื่อง MiSeq next generation sequencing platform จำนวน 300 รอบ platform (Illumina, San Diego, CA, USA) ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. วิเคราะห์ชีวสารสนเทศ และเปรียบเทียบข้อมูล

คัดกรองผลดิบและระบุ operational taxonomic unit (OTU) ตามมาตรฐานขั้นตอนของ Mothur (Schloss et al., 2009) ซึ่งรวมการวิเคราะห์ rarefaction curve, Good's coverage index, alpha diversity (เช่น inverse simpson) และ beta diversity (เช่น morisita horn, NMDS) ซึ่งสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ใน beta diversity ใช้เพื่อประเมินความเชื่อมโยงระหว่างโครงสร้างของกลุ่มสิ่งมีชีวิต OTU กลุ่มเด่น และความสัมพันธ์กับลักษณะหรือคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างได้ โดยใช้สหสัมพันธ์ของ Spearman หรือ Pearson เข้ามาช่วยโดยใช้คำสั่งใน Mothur (Schloss et al., 2009)

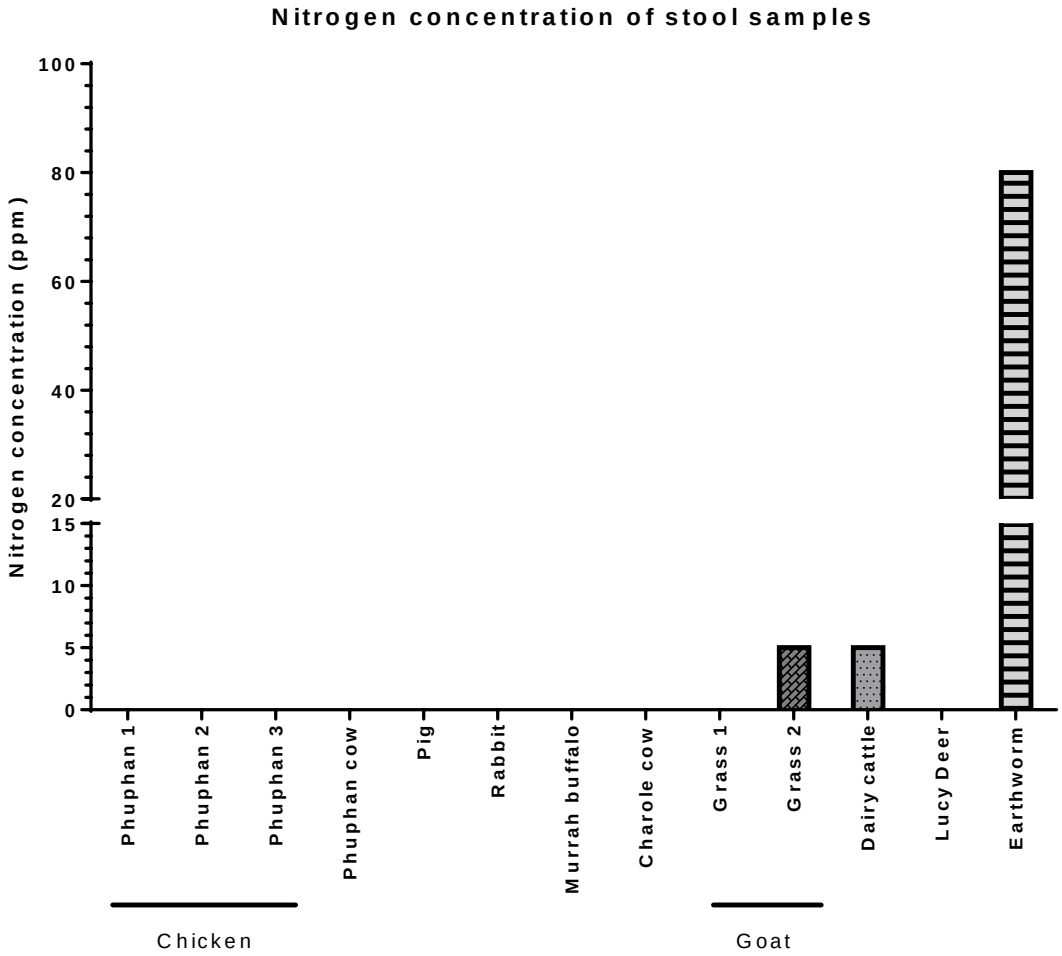
สำหรับเรื่องการวิเคราะห์ด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ ปฏิบัติตาม มาตรฐานการปฏิบัติงานของ Mothur หากไม่ได้บันทึกไว้ ใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียรสันเพื่อ ประเมินความเชื่อมโยงระหว่างโครงสร้างของกลุ่มสิ่งมีชีวิต และลักษณะของดิน สำหรับด้านสิ่งมีชีวิตที่เป็นโครงสร้างของ กลุ่มสิ่งมีชีวิต ใช้สหสัมพันธ์ของ Spearman เข้ามาช่วย

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผล

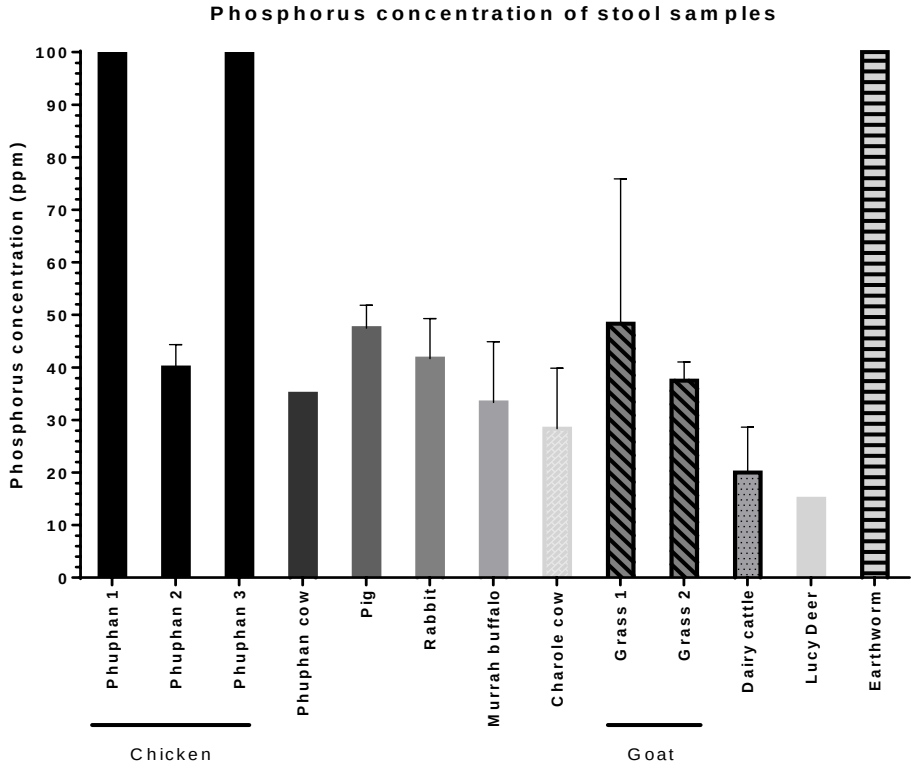
ปัจจุบันเกษตรกรมีการนำมูลสัตว์มาใช้สำหรับทำเป็นปุ๋ยคอกกันอย่างแพร่หลาย เพื่อทนแทนการใช้สารเคมีและปุ๋ยเคมีที่ก่อให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้าง และมลภาวะในดิน เนื่องจากมูลสัตว์นั้นสามารถหาได้ง่าย เป็นการลดต้นทุนการผลิตและยังมีแร่ธาตุอาหารที่สำคัญต่อพืชอย่างครบถ้วน ปุ๋ยจากมูลสัตว์นั้นมีหลายชนิด ซึ่งนำมาจากสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น สุกร วัว ควาย ฯลฯ ซึ่งแต่ละชนิดของสัตว์พบว่าสนับสนุนการเจริญของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน และมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันไป งานวิจัยนี้จะทำการวิเคราะห์มูลสัตว์ทั้งทางเคมี และทางจุลชีววิทยาได้แก่ โครงสร้างของประชากรแบคทีเรีย เพื่องานวิจัยต่อยอดคือการร่วมกับเกษตรกรและการทดลองเพาะปลูก เพื่อระบุว่ามูลสัตว์ชนิดใดคาดว่ามีคุณสมบัติที่ดีและนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นปุ๋ยคอก และใช้เพื่อปรับปรุงฟื้นฟูดินที่เสื่อมสภาพจากการทำการเกษตร

3.1 องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมี

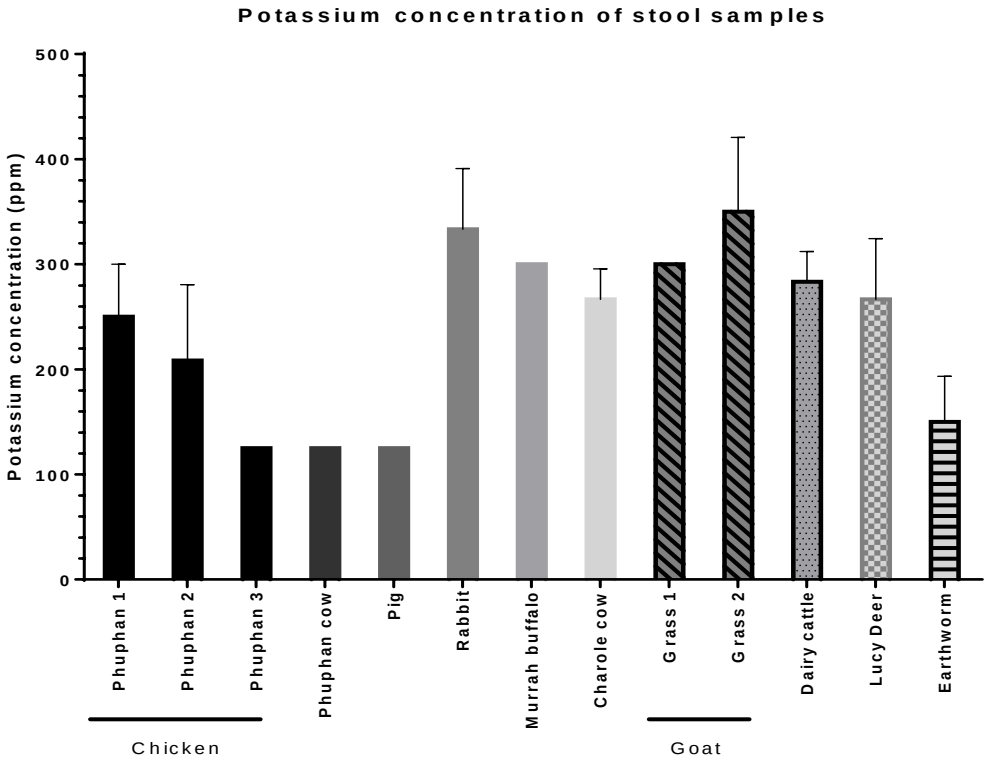
จากการศึกษาปริมาณแร่ธาตุสำคัญและอินทรียวัตถุในมูลสัตว์ทั้ง 13 ชนิด ได้แก่ มูลไก่ภูพานตัวที่ 1 มูลไก่ภูพานตัวที่ 2 มูลไก่ภูพานตัวที่ 3 มูลโคเนื้อภูพาน มูลสุกร มูลกระต่าย มูลควายมูร่าห์ มูลวัวชาโลเล่ห์ มูลแพะที่ได้รับหญ้าชนิดที่ 1 มูลแพะที่ได้รับหญ้าชนิดที่ 2 มูลโคนม มูลกวางลูซี่ และมูลไส้เดือน พบว่าปริมาณแร่ธาตุไนโตรเจนจากมูลของไส้เดือนมีปริมาณสูงสุดที่ 80 ppm ตามมาด้วยมูลของโคนม และมูลของแพะที่ได้รับหญ้าชนิดที่ 2 แต่ปริมาณแร่ธาตุไนโตรเจนกลับไม่สามารถตรวจพบได้ในมูลสัตว์ชนิดอื่นๆ ดังรูปที่ 1 ในขณะที่ปริมาณแร่ธาตุฟอสฟอรัส โพแทสเซียมและอินทรีย์วัตถุสามารถพบได้ในมูลสัตว์ทั้ง 13 ชนิด โดยมีปริมาณฟอสฟอรัสพบได้สูงมากในมูลไก่และไส้เดือนในระดับ 80-100 ppm ปริมาณฟอสฟอรัสที่พบในมูลสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสปานกลางถึงสูง (ประมาณ 20-40 ppm) ดังรูปที่ 2 ส่วนปริมาณธาตุโพแทสเซียมที่พบในมูลสัตว์ทั้ง 13 ชนิด จัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณแร่ธาตุต่ำ (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 400 ppm) ดังรูปที่ 3 โดยที่ตารางที่ 1 เป็นการรวบรวมค่าเฉลี่ยของแร่ธาตุทั้งสามชนิดที่พบในมูลสัตว์ และปริมาณอินทรียวัตถุที่พบในมูลสัตว์จัดอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งมีปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในช่วงระหว่าง 0.6-1.5% แต่อย่างไรก็ตามความผันแปรคุณภาพของมูลสัตว์ในการปลดปล่อยธาตุอาหารได้ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่สัตว์ชนิดนั้น ๆ กินเข้าไป และประเภทของสัตว์ เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงสัตว์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ โดยย่อถือว่า ไส้เดือนมีแร่ธาตุที่จำเป็นครบทั้งสามแร่ธาตุ สนับสนุนเหตุผลปุ๋ยมูลไส้เดือนเป็นที่นิยมในเกษตรกร



รูปที่ 1 ปริมาณแร่ธาตุไนโตเจนในมูลสัตว์ในแต่ละชนิด (แสดงค่าเฉลี่ยจากสามซ้ำอิสระ)



รูปที่ 2 ปริมาณแร่ธาตุฟอสโฟรัสในมูลสัตว์ในแต่ละชนิด (แสดงค่าเฉลี่ยจากสามซ้ำอิสระ)



รูปที่ 3 ปริมาณแร่ธาตุโพแทสเซียมในมูลสัตว์ในแต่ละชนิด (แสดงค่าเฉลี่ยจากสามซ้ำอิสระ)

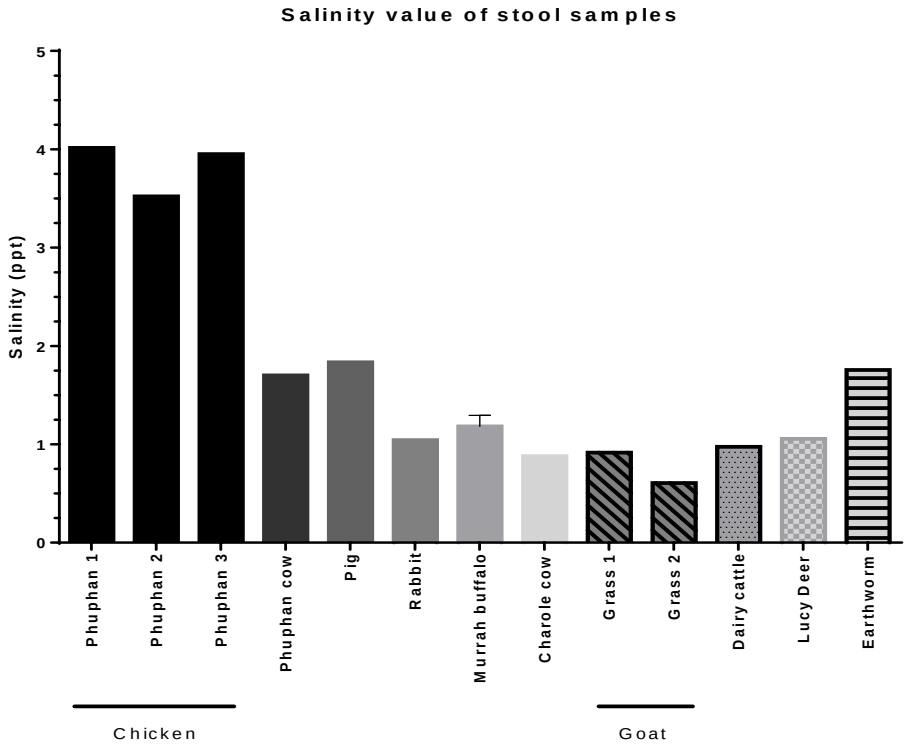
ตารางที่ 1 สรุปปริมาณแร่ธาตุไนโตเจน ฟอสโฟรัส และโพแทสเซียมในมูลสัตว์ในแต่ละชนิด

Fecal samples	Nutrient composition (mg/l)[a]		
	Nitrogen	Phosphorus	Potassium
Phuphan chicken 1	ND[b]	100.00 ± 0.00	250.00 ± 50.00
Phuphan chicken 2	ND	40.00 ± 4.33	208.33 ± 72.17
Phuphan chicken 3	ND	100.00 ± 0.00	125.00 ± 0.00
Phuphan cow	ND	35.00 ± 0.00	125.00 ± 0.00
Pig	ND	47.50 ± 4.33	125.00 ± 0.00
Rabbit	ND	41.67 ± 7.64	333.33 ± 57.74
Murrah buffalo	ND	33.33 ± 11.55	300.00 ± 0.00
Charole cow	ND	28.33 ± 11.55	266.67 ± 28.87
Goat grass 1	ND	48.33 ± 15.90	300.00 ± 0.00
Goat grass 2	5.00 ± 0.00	37.5 ± 3.53	350.00 ± 70.71
Dairy cow	5.00 ± 0.00	20.00 ± 8.66	283.33 ± 28.87
Lucy Deer	ND	15.00 ± 0.00	266.67 ± 57.74
Earthworm	80.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	150.00 ± 43.30

[a] แสดงค่าเฉลี่ยจากสามซ้ำอิสระและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

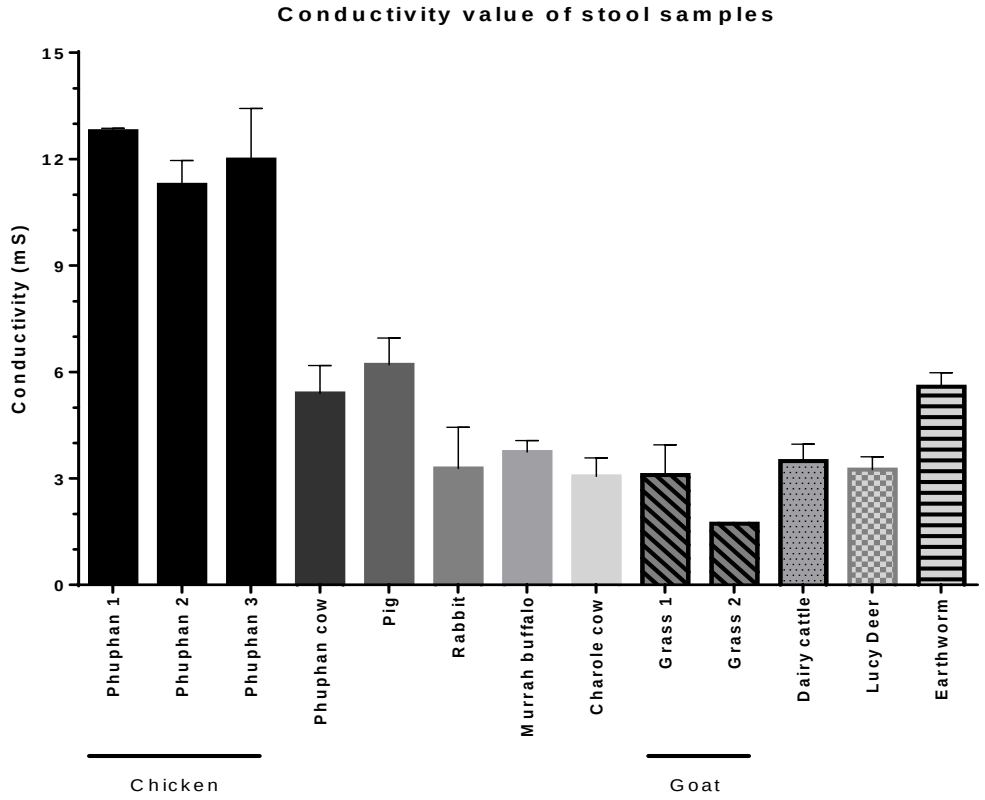
[b] ND คือ มีปริมาณแร่ธาตุต่ำกว่า 5.00 mg/l

ความเค็มของดินถือเป็นอีกปัญหาสำคัญในการเพาะปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นอย่างมาก และมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช รูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่า มูลไก่ภูพานมีปริมาณเกลือมากที่สุดถึงเกือบ 4 ppt ขณะที่มูลสัตว์ที่เหลือมีค่าความเค็มอยู่ที่ระดับไม่ถึง 2 ppt ซึ่งเกลือที่ละลายในมูลสัตว์นั้นอาจอยู่ในรูป NaCl, $CaCl_2$, Na_2SO_4 หรือ $CaSO_4$ เป็นต้น และในการเลือกมูลสัตว์ที่จะนำมาใช้ทำเป็นปุ๋ยคอกนั้น จึงไม่ควรเลือกมูลสัตว์ที่มีค่าความเค็มมากเกินไป และยังเป็นการทำให้ดินเค็มมากขึ้นไปอีก ความเค็มทำให้พืชขาดน้ำ เนื่องจากรบกวนระบบออสโมซิสทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำไปใช้ได้ จึงเกิดความเป็นพิษ การมีเกลือมากเกินไปยังลดอัตราการสังเคราะห์แสง ยับยั้งการดูดใช้โพแทสเซียมและแคลเซียม เนื่องจากโซเดียมจะไปแทนที่การดูดซึมของโพแทสเซียมและแคลเซียม ในขณะเดียวกันกลับไปเพิ่มอัตราการหายใจของพืช ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อการเจริญเติบโต



รูปที่ 4 ค่าความเค็มในมูลสัตว์ในแต่ละชนิด (แสดงค่าเฉลี่ยจากสามซ้ำอิสระ)

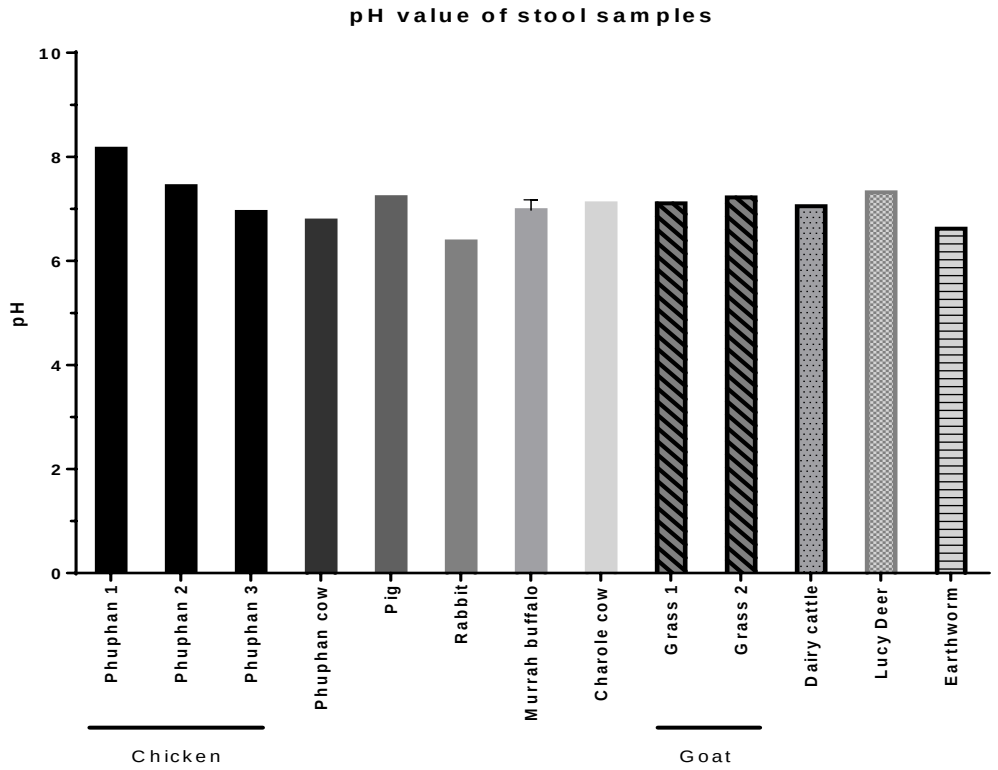
ค่าการนำไฟฟ้ามีความสัมพันธ์กับความเค็ม หรือความเข้มข้นของเกลือ เนื่องจากอิออนที่สามารถนำไฟฟ้าได้คือ โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ และซัลเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเกลือนั่นเอง ซึ่งหากค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้มีค่าประมาณ 4 mS ถือว่าในตัวอย่างนั้นมีความเค็มระดับปานกลาง จากการวิเคราะห์การนำไฟฟ้าดังแสดงในรูปที่ 5 พบ มูลไก่ภูพานมีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุด และอยู่ที่ประมาณ 12 mS ซึ่งถือว่ามีความเค็มระดับมาก ตามมาด้วยมูลของโคภูพาน หมูและไส้เดือนที่ประมาณ 6 mS ทั้งนี้พบค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้ทั้งหมดสอดคล้องกับค่าความเค็มข้างต้น โดยสรุปว่ามูลไก่มีความเค็มมากจนไม่เหมาะกับการนำมาใช้เป็นปุ๋ยปลูกพืชทั่วไป ยกเว้นพืชทนเค็ม ส่วนมูลโคภูพาน หมูและไส้เดือนนั้นมีค่าความเค็มในระดับปานกลาง อาจจะมีผลกระทบต่อพืชบางชนิด



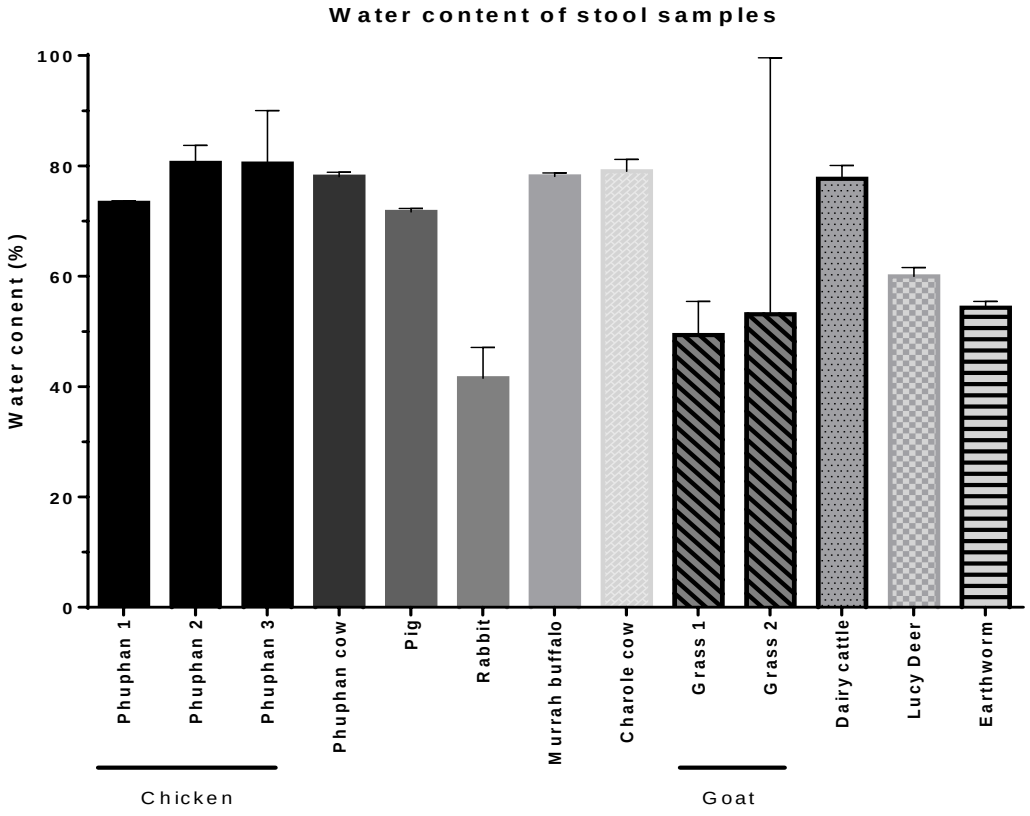
รูปที่ 5 ค่าการนำไฟฟ้าในมูลสัตว์ในแต่ละชนิด (แสดงค่าเฉลี่ยจากสามซ้ำอิสระ)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของมูลสัตว์แต่ละชนิดในรูปที่ 6 พบว่า ไม่แตกต่างกัน (pH 7.4-8.3) pH ในมูลสัตว์บ่งบอกถึงความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน (H^+) ซึ่งถ้ามีความเป็นกรดมากแสดงว่ามีปริมาณไฮโดรเจนอิออนมาก ซึ่งมักจะมีผลต่อระดับของแร่ธาตุในดิน โดยจะทำให้ธาตุแคลเซียม แมกนีเซียม และโพแทสเซียมมีปริมาณค่อนข้างต่ำ จะทำให้พืชไม่เจริญเติบโตเท่าที่ควร ซึ่งธาตุดังกล่าวจะมีอย่างเพียงพอเมื่อดินมี pH ช่วง 5.5-8.5 และสำหรับธาตุฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชจะพบได้ในช่วง pH 6–7 ซึ่งหากพิจารณาจากข้อมูลนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่ามูลของสัตว์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบนั้นมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงที่เหมาะสม

สำหรับปริมาณน้ำในมูลสัตว์แต่ละชนิด (รูปที่ 7) พบว่ามูลกระต่ายมีปริมาณน้ำน้อยที่สุดเพียง 41.5% ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพที่มองเห็นคือมูลมีลักษณะเป็นก้อนแห้งและแข็ง ส่วนมูลแพะที่กินอาหารที่ต่างกันทั้ง 2 ชนิด กวางลูซี่ และมูลไส้เดือนมีปริมาณน้ำประมาณ 50% ซึ่งมูลของแพะและกวางนั้นมีลักษณะเป็นก้อนแห้งคล้ายมูลกระต่าย จากรูปภาพที่ 7 จะเห็นว่ามูลแพะที่กินหญ้าชนิดที่ 2 นั้นมีปริมาณน้ำในตัวอย่างที่ไม่คงที่ ซึ่งอาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ได้ผสมตัวอย่างมูลสัตว์ให้เข้ากันดีก่อนนำมาทดลอง จึงอาจทำให้ค่าที่ได้มีปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน ส่วนมูลไส้เดือนนั้นมีลักษณะเป็นเม็ดร่วนละเอียด ส่วนมูลสัตว์ที่เหลือเช่น ไก่ วัว และควายมีปริมาณน้ำเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 70% โดยพบมูลมีลักษณะเป็นก้อนกึ่งแข็งกึ่งเหลว ทั้งนี้มูลสัตว์ที่มีลักษณะแข็งจนเกินไปอาจไม่เหมาะในการนำมาทำเป็นปุ๋ย เนื่องจากมีความสามารถในการจุน้ำและความชื้นได้น้อย ทำให้ดินไม่ชุ่มชื้น



รูปที่ 6 ความเป็นกรด-ด่างในมูลสัตว์ในแต่ละชนิด (แสดงค่าเฉลี่ยจากสามซ้ำอิสระ)



รูปที่ 7 ปริมาณน้ำในมูลสัตว์ในแต่ละชนิด (แสดงค่าเฉลี่ยจากสามซ้ำอิสระ)

ตารางที่ 2 ปริมาณลักษณะทางกายภาพ

Fecal Samples	Salinity (ppt)*	Conductivity (mS/cm)	pH	Water content (%)
Phuphan chicken 1	4.01 ± 0.64	12.79 ± 0.08	8.16 ± 0.20	73.29 ± 0.40
Phuphan chicken 2	3.52 ± 0.28	11.27 ± 0.69	7.43 ± 0.38	80.56 ± 3.17
Phuphan chicken 3	3.95 ± 0.30	11.99 ± 1.44	6.94 ± 0.29	80.43 ± 9.61
Phuphan cow	1.70 ± 0.22	5.40 ± 0.78	6.78 ± 0.38	78.05 ± 0.81
Pig	1.83 ± 0.17	6.20 ± 0.76	7.22 ± 0.09	71.66 ± 0.66
Rabbit	1.04 ± 0.12	3.28 ± 1.16	6.37 ± 0.18	41.53 ± 5.57
Murrah buffalo	1.18 ± 0.11	3.74 ± 0.32	6.98 ± 0.20	78.09 ± 0.61
Charole cow	0.88 ± 0.19	3.06 ± 0.52	7.11 ± 0.09	79.00 ± 2.16
Goat grass 1	0.92 ± 0.28	3.10 ± 0.85	7.11 ± 0.28	49.35 ± 6.08
Goat grass 2	0.61 ± 0.05	1.72 ± 0.01	7.22 ± 0.08	53.10 ± 46.50
Dairy cow	0.98 ± 0.31	3.49 ± 0.47	7.05 ± 0.13	77.69 ± 2.38
Lucy Deer	1.06 ± 0.12	3.25 ± 0.36	7.32 ± 0.05	59.97 ± 1.60
Earthworm	1.76 ± 0.13	5.59 ± 0.39	6.62 ± 0.10	54.28 ± 1.17

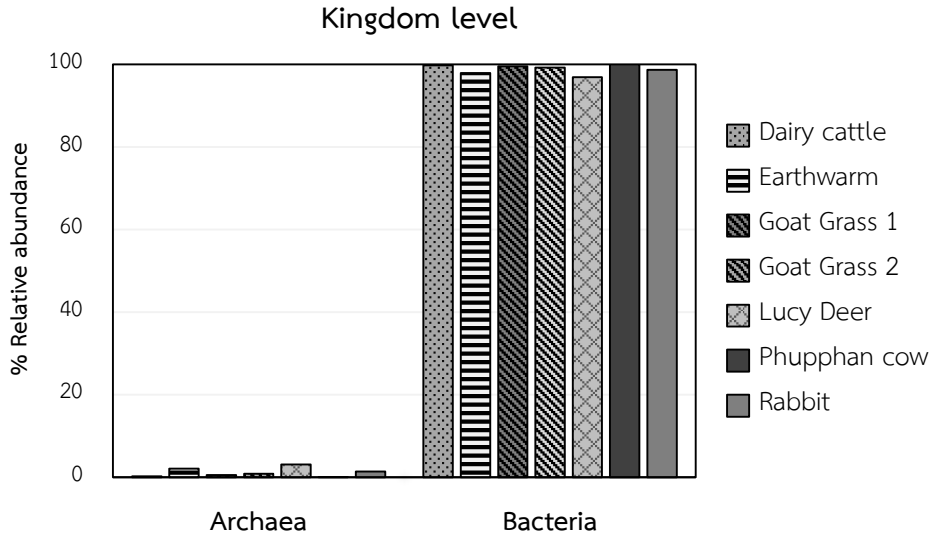
* ppt คือ หนึ่งส่วนในหนึ่งพันส่วน

จากข้อมูลทางกายภาพและทางเคมีวัดได้จากมูลสัตว์แต่ละชนิด (ตารางที่ 2) แสดงว่า มูลไก่นั้นอาจไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นปุ๋ยคอก เนื่องจากมีความเค็มมากเกินอาจส่งผลให้ดินเค็มเพิ่มขึ้นได้เมื่อนำมาใช้ ส่วนมูลกระต่ายมีความแห้ง แข็งและมีปริมาณน้ำน้อยจึงไม่เหมาะที่จะนำมาทำเป็นปุ๋ยคอกเช่นเดียวกัน มูลของวัว ควาย หรือไส้เดือนจัดว่าคุณสมบัติที่จะนำมาใช้เป็นปุ๋ยสำหรับพืชได้ เนื่องจากมีค่าความเป็นกลางหรือด่างอ่อน มีธาตุอาหารพืชเป็นส่วนประกอบอยู่ มีความเค็มไม่มากจนเกินไป และยังมีน้ำอยู่ในส่วนประกอบซึ่งทำให้ไม่แห้งแข็ง สามารถดูดความชื้นและน้ำได้

3.2 ความหลากหลายของประชากรแบคทีเรีย

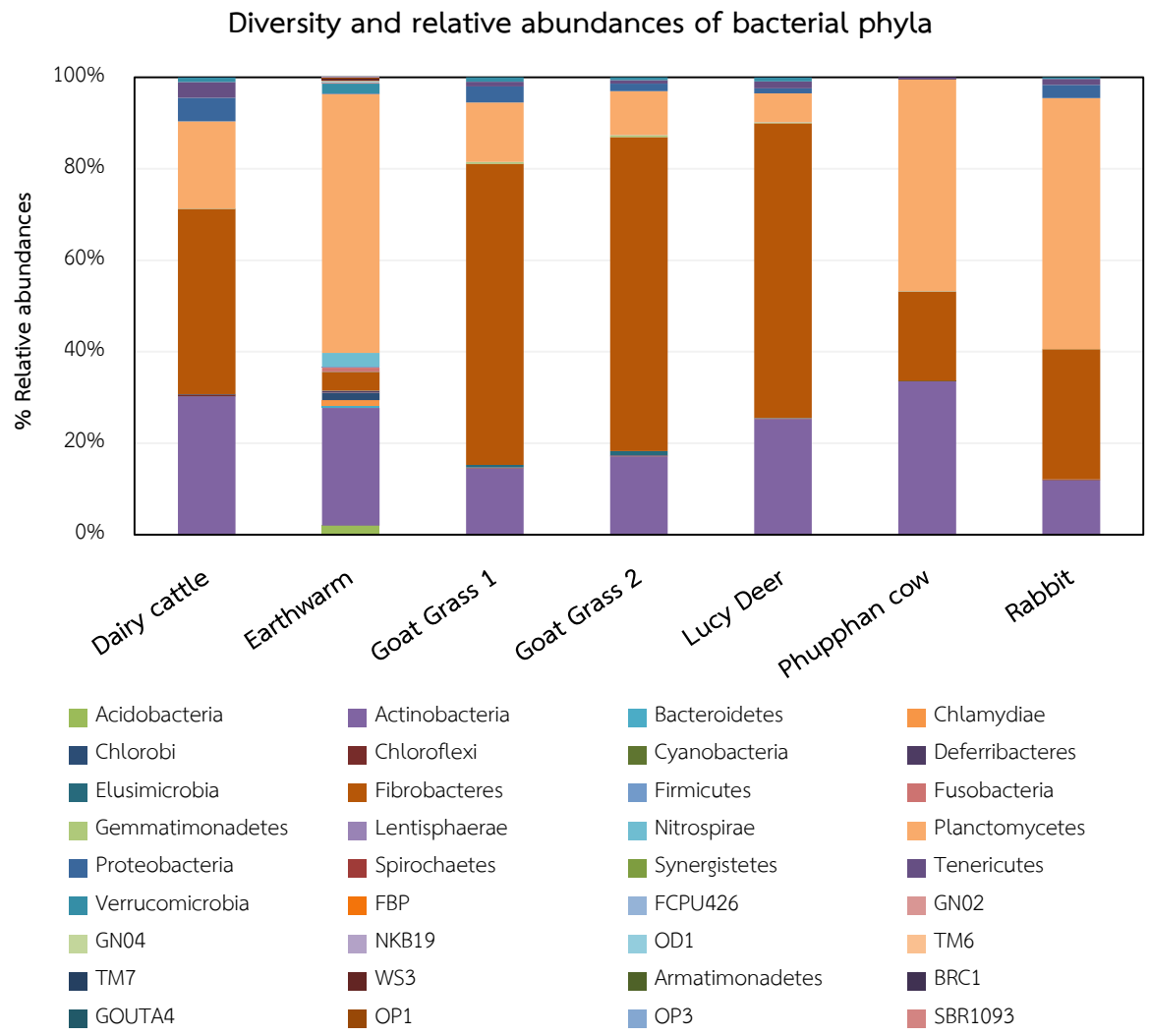
เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างของมูลสัตว์ชนิดต่างๆ จึงได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างมูลสัตว์มา 6 ชนิดที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันจากข้อมูลข้างต้น ประกอบด้วยมูลของโคนม ไส้เดือน แพะที่กินหญ้าต่างชนิดกัน กวางลูซี่ โคเนื้อภูพาน และกระต่าย เพื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของระบบนิเวศจุลชีพในมูลสัตว์ชนิดต่างๆ เนื่องจากจุลินทรีย์ในปุ๋ยมูลสัตว์มีส่วนช่วยระบบนิเวศในดิน

ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายอินทรียวัตถุต่างๆ ในดิน มีบทบาทในการช่วยหมุนเวียนแร่ธาตุและสารอาหารในดิน ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตในดิน พืช และสัตว์ ยกตัวอย่างจุลินทรีย์บางพวกที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ บางชนิดทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อย่อยสลายอินทรียวัตถุ แต่ก็อาจมีบางชนิดที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 16S rRNA gene sequencing reads พบว่าในมูลสัตว์ของทุกๆ ตัวอย่าง ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวจำพวกแบคทีเรียมากกว่า 97% ในขณะที่อาร์เคียนั้นพบในปริมาณน้อยมาก ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในตัวอย่างมูลสัตว์ โดยแบ่งเป็นอาร์เคียและแบคทีเรีย

จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในมูลสัตว์ พบว่ามูลโคนม มูลแพะทั้ง 2 ชนิด และมูลกวางลูซี่ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยแบคทีเรียในไฟลัม Fibrobacteres มากที่สุด ตามมาด้วยไฟลัม Actinobacteria, Planctomycetes, Proteobacteria และ Tenericutes ตามลำดับ ในขณะที่มูลไส้เดือนและมูลโคเนื้อภูพานประกอบด้วยแบคทีเรียในไฟลัม Planctomycetes มากที่สุด ตามมาด้วยไฟลัม Actinobacteria และ Fibrobacteres ตามลำดับ ส่วนมูลของกระต่ายนั้นประกอบด้วยแบคทีเรียในไฟลัม Planctomycetes มากที่สุดเช่นเดียวกันกับมูลไส้เดือนและโคเนื้อภูพาน แต่ระดับความชุกชุมของไฟลัมนั้นตามมาด้วย Fibrobacteres และ Actinobacteria ตามลำดับ (รูปที่ 9) และยังพบว่าในมูลของไส้เดือนนั้นมีแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุดเมื่อเทียบกับมูลของสัตว์ชนิดอื่นๆ โดยประกอบด้วยแบคทีเรียในไฟลัม Acidobacteria, Bacteroidetes, Chlamydiae, Lentisphaerae และยังประกอบด้วยแบคทีเรียที่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้อีกเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 9) จากงานวิจัยโดย Loredana Canfora และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 ระบุว่าไฟลัม Proteobacteria และ Actinobacteria สามารถพบได้ทั้งในดินที่มีความเค็มน้อยไปจนถึงเค็มมาก โดยไฟลัม Proteobacteria พบได้มากถึง 95.95% และ Actinobacteria พบได้ 83.39% ในดินเค็ม



รูปที่ 9 สัดส่วนความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในตัวอย่างมูลสัตว์ในระดับไฟลัม

เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในมูลสัตว์ทั้ง 6 ตัวอย่างในขั้น order (อันดับ) ดังรูปที่ 10 พบว่า Rhizobiales พบได้มากในมูลไส้เดือน (89.5%) โดยแบคทีเรียที่เป็นที่รู้จักกันดีใน order นี้คือ genus *Rhizobium* เพราะมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในรากพืชตระกูลถั่ว ซึ่งถือเป็นแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช สนับสนุนผลที่รายงานในแปลงเพาะปลูก จากรูปที่ 1 จะเห็นว่าในมูลไส้เดือนนั้นมีปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่นๆ โดยมีมากถึง 80 mg/l ซึ่งสัมพันธ์กับชนิดของแบคทีเรียที่พบ คือ genus *Rhizobium* ในขณะที่มูลสัตว์ชนิดอื่นๆ มีปริมาณธาตุไนโตรเจนน้อยกว่า 5.00 mg/l สัมพันธ์กับ genus *Rhizobium* ที่พบเพียงแค่ 5% Actinomycetales เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ ทำหน้าที่ช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุในธรรมชาติ ช่วยย่อยซากพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลายให้เป็นสารใหม่กลับคืนสู่สิ่งแวดล้อม แบคทีเรียในกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปในตัวอย่างของมูลสัตว์ โดยเฉพาะในมูลไส้เดือนพบมากที่สุด (42.3%) order flavobacteriales เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยจากตัวอย่างมูลสัตว์ทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียชนิดนี้ในมูลของไส้เดือน (41.3%) โคเนื้อภู

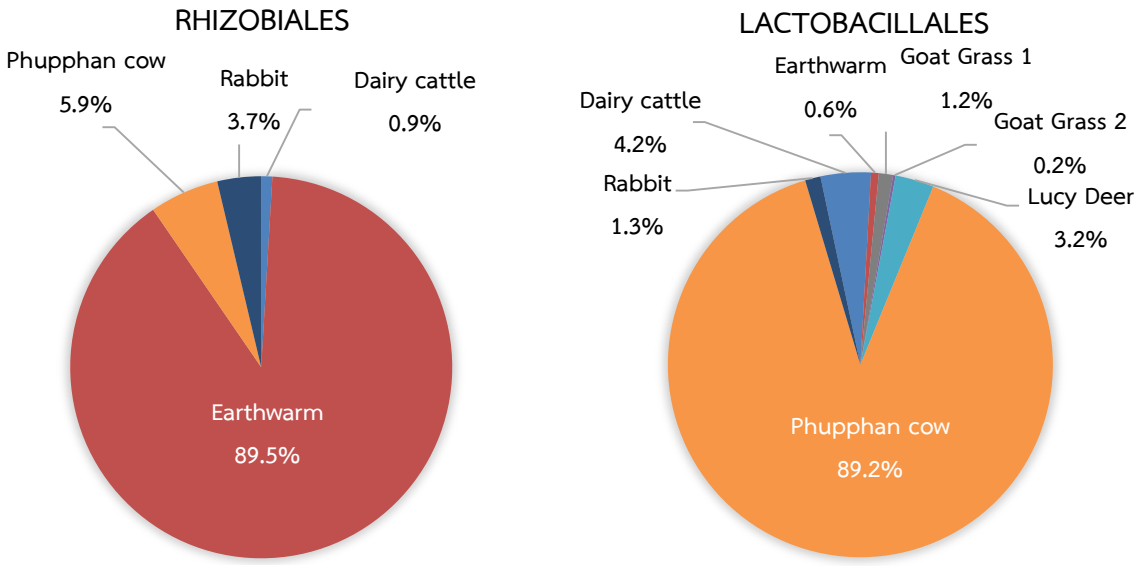
พาน (22%) กระต่าย (20.7%) และโคนม (15.5%) ส่วน Lactobacillales เป็นแบคทีเรียที่พบได้มากในมูลโคภูพาน (89.2%) แบคทีเรียใน order นี้มักพบได้ในลำไส้ใหญ่ โดยจะผลิตกรดแลคติกจากกระบวนการหมักน้ำตาลหรือน้ำนม ซึ่งทำให้เป็นที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์นมและอาหารหมักดอง โดยในงานวิจัยนี้มีการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้มากที่สุดในมูลของโคนมเมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น

แบคทีเรียใน order Bacillales พบได้มากในมูลของแพะ (57.9% และ 24.9%) รองลงมาคือกวางลูซี่และไส้เดือน (7.6% และ 6.4% ตามลำดับ) แบคทีเรียกลุ่มนี้ใน genus *Bacillus* และ *Staphylococcus* ถึงแม้ว่าใน *Bacillus* อาจมีแบคทีเรียที่มีประโยชน์และทนแล้งได้เนื่องจากมีการผลิตเอนโดสปอร์ แต่ทั้งสองจีนัสนี้อาจพบสปีชีส์ที่เป็นเชื้อก่อโรคได้โดยแบคทีเรียจะมีการสร้างสารพิษออกมา เมื่อคนรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหรือสารพิษชนิดนี้เข้าไปจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ Spirochaetales เป็นกลุ่มแบคทีเรียรูปเกลียวพบได้ในมูลของโคนม (40.4%) แพะ (32.8%) และกระต่าย (11.1%) เป็นหลัก แบคทีเรียใน genus Treponema ที่พบในแบคทีเรีย order นี้นั้นสามารถทำให้เกิดโรคซิฟิลิสซึ่งเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ได้ ผู้ป่วยจะได้รับเชื้อเมื่อมีการสัมผัสกับเชื้อโดยตรงและสามารถติดต่อจากคนสู่คนได้โดยผ่านการสัมผัสกับแผลหรือผ่านการมีเพศสัมพันธ์ Pseudomonadales พบได้มากในมูลกระต่าย (43.5%) และมูลโคนม (33.5%) แบคทีเรียใน genus *Pseudomonas*, *Moraxella* และ *Acinetobacter* ของ order นี้ถือเป็นเชื้อก่อโรคในคน และยังเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบได้มากในโรงพยาบาลอีกด้วย โดยทำให้เกิดโรคปอดอักเสบจากการติดเชื้อ (pneumonia) สำหรับ order Clostridiales ที่พบได้ทั่วไปทั้งในมูลของแพะที่กินหญ้า 2 ชนิด กวางลูซี่ โคนม และกระต่าย (26.3%, 17.4%, 23.3%, 20.3% และ 9.7% ตามลำดับ) ซึ่งแบคทีเรียใน genus *Clostridium* นั้นถือเป็นเชื้อก่อโรคอีกชนิดหนึ่งในคน เนื่องจากสามารถผลิตสารพิษที่เป็นอันตรายต่อระบบประสาท ได้แก่ tetanus toxin (tetanospasmin หรือบาดทะยัก) โดยมีฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ จึงทำให้กล้ามเนื้อมีการแข็งเกร็งและหดตัวมากเกินไป และ botulinum toxin มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของสารสื่อประสาท ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง หรืออยู่ในภาวะอัมพาตชั่วคราว และสุดท้ายแบคทีเรียใน order Xanthomonadales เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ก่อโรคในพืช โดยทำให้เกิดโรคใบไหม้ แบคที่เรียในกลุ่มนี้พบได้ทั้งในมูลของโคเนื้อภูพาน (52.2%) กระต่าย (19.5%) ไส้เดือน (17.5%) และโคนม (11.8%)

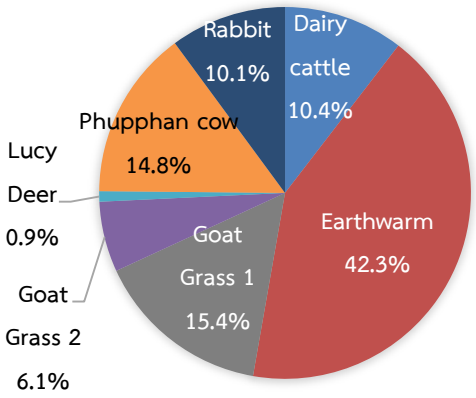
จากงานวิจัยของ Jung Eun Lee ในปีค.ศ. 2011 ได้ทำการศึกษาไมโครไบโอมในมูลสัตว์ ได้แก่ ไก่ สุกร ห่าน และวัว พบว่า ไฟลัม Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes และ Bacteroidetes พบได้มากที่สุดในมูลสัตว์ทุกชนิด โดย *Lactobacillus* sp., *Clostridium* sp. และ *Prevotella*sp. มีปริมาณมากที่สุดในมูลสัตว์ทุก ๆ ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า *Yania* sp. พบได้อย่างมีนัยสำคัญมากที่สุดในมูลไก่ หากทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ จะพบว่าแบคทีเรียที่พบในมูลสัตว์นั้นมีไฟลัมที่คล้ายคลึงกัน โดยประกอบไปด้วย ไฟลัม Actinobacteria, Planctomycetes, Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes และ Chlamydiae เป็นหลัก

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า ในมูลสัตว์แต่ละชนิดจะประกอบด้วยแบคทีเรียที่แตกต่างกันไปทั้งในแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์และแบคทีเรียกลุ่มที่คาดว่ามีโทษ ความแตกต่างของชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในนิเวศจุลชีพนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ อาหารที่สัตว์กินเข้าไป แบคทีเรียและกลไกภายในลำไส้ของสัตว์ ปริมาณของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ในมูลสัตว์ซึ่งเป็นสารอาหารและพลังงานสำหรับแบคทีเรีย หรือปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม เช่น ความชื้น pH อุณหภูมิ การแลกเปลี่ยนประจุอิออน ปริมาณออกซิเจน แร่ธาตุ กรด-ด่าง เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดล้วนมีผลต่อชนิดของแบคทีเรีย เช่น ปริมาณน้ำในมูลสัตว์ส่งผลต่อกระบวนการหายใจของแบคทีเรีย เพราะน้ำเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการนี้ ดังนั้นถ้ามีความชื้นน้อยอาจส่งผลต่อชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่หายใจแบบใช้ออกซิเจนได้ ทำให้มี aerobic หรือ anaerobic แบคทีเรียที่แตกต่างกัน

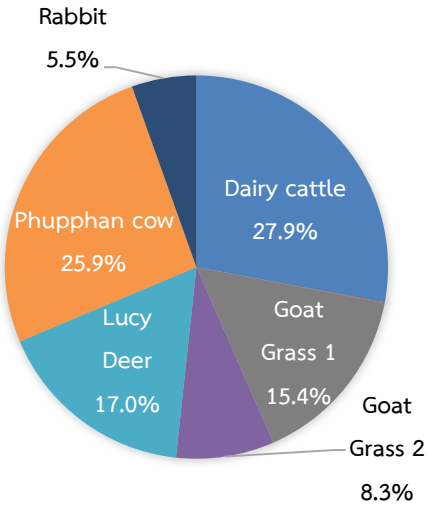
ตัวอย่างมูลสัตว์แต่ละชนิดจากงานวิจัยนี้ อาจจะสามารถใช้เป็นตัวแทนของปุ๋ยจากมูลสัตว์แต่ละชนิดได้ในอนาคต แต่ต้องทำการวิเคราะห์จากจำนวนตัวอย่างเพิ่มให้มากขึ้น เพื่อศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อความหลากหลายของแบคทีเรียในมูลสัตว์แต่ละชนิด ซึ่งเก็บจากสถานที่ต่าง ๆ ว่ามีผลต่อโครงสร้างของประชากรแบคทีเรียหรือไม่ นอกจากนี้ยังต้องศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ของสัตว์ หรืออาหาร ซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณแบคทีเรีย



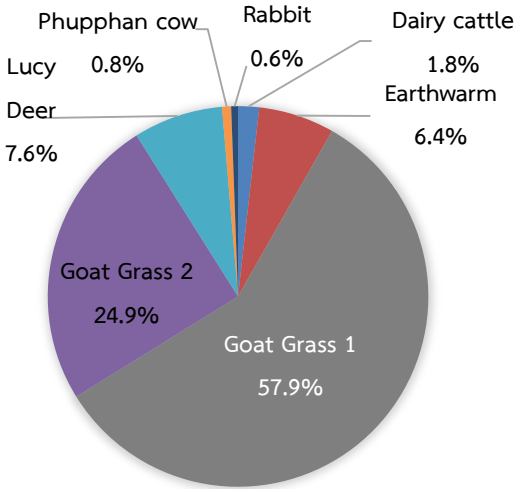
ACTINOMYCETALES



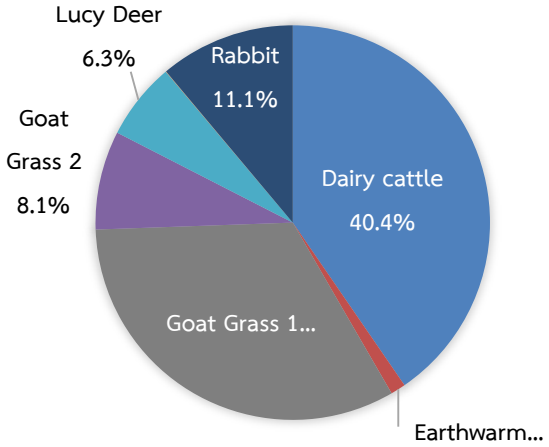
BACTEROIDALES



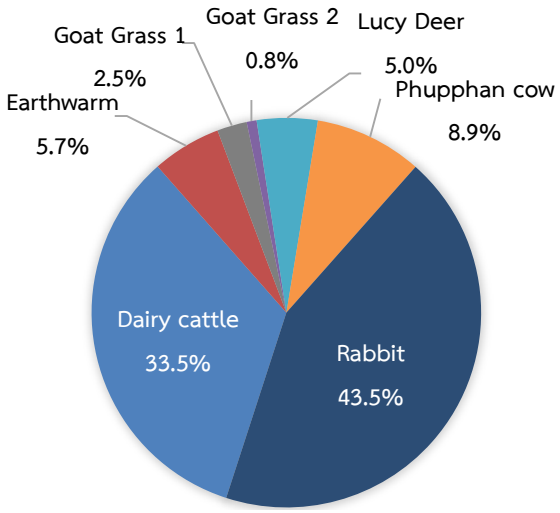
BACILLALES



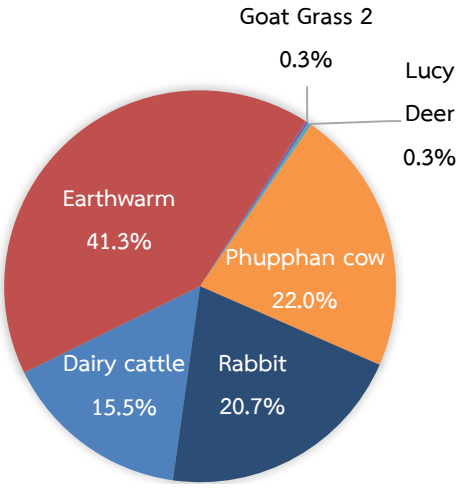
SPIROCHAETALES

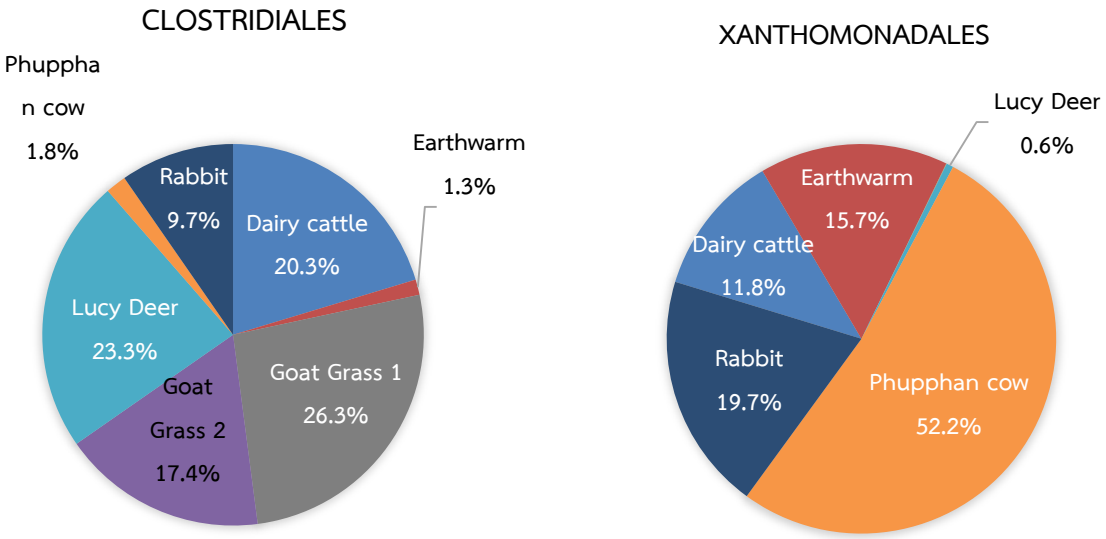


PSEUDOMONADALES



FLAVOBACTERIALES





รูปที่ 10 เปรียบเทียบความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในระดับ order ของตัวอย่างมูลสัตว์ ใน order Rhizobiales, Lactobacillales, Actinomycetales, Bacteroidales, Bacillales, Spirochaetales, Pseudomonadales, Flavobacteriales, Clostridiales และ Xanthomonadales

บทที่ 4
สรุปผล

จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า มูลของไส้เดือนนั้นมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำมาใช้เป็นปุ๋ยธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีธาตุอาหารหลักของพืชเป็นส่วนประกอบอยู่ มีค่าความเป็นกลาง ไม่ทำให้ดินเป็นกรดหรือด่างเมื่อนำมาใช้ มีความเค็มไม่มากจนเกินไป และยังมีน้ำอยู่ในส่วนประกอบซึ่งทำให้ไม่แห้งแข็ง สามารถดูดความชื้นและน้ำได้ อีกทั้งยังประกอบด้วยแบคทีเรียหลากหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดก็ล้วนมีหน้าที่ในดินที่แตกต่างกัน เช่น *Rhizobium* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนที่เป็นธาตุอาหารหลักของพืช ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนที่ตรวจพบได้ในมูลไส้เดือนที่มีปริมาณสูงสุด Actinomycetales ทำหน้าที่ช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุในดินให้กลายเป็นสารอาหารที่เหมะสมสำหรับการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งทำให้เกิดการหมุนเวียนของสารอาหารพืชในดินและเป็นการรักษาสมดุลของระบบห่วงโซ่อาหาร เหล่านี้สนับสนุนให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีผลผลิตที่มีคุณภาพ และสอดคล้องว่าในปัจจุบันพบเกษตรกรหลายพื้นที่มีการนิยมใช้มูลไส้เดือนมาทำเป็นปุ๋ย และนอกจากที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีรายงานว่ามูลไส้เดือนสามารถช่วยเก็บความชื้นและปลดปล่อยออกมาให้พืชอย่างช้า ๆ เป็นการยืดระยะเวลาการให้น้ำแก่พืช ช่วยให้ดินร่วนซุย ถ่ายเทน้ำและอากาศได้สะดวก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับในเชิงความรู้พื้นฐานและการใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ

ความสัมพันธ์ของแหล่งอ้างอิงไมโครไบโอมในมูลสัตว์แต่ละชนิดจะเป็นประโยชน์สำหรับการคัดเลือกและพัฒนามูลสัตว์เพื่อในไปใช้เป็นปุ๋ยคอก โดยอาจมีการเติมจุลินทรีย์บางชนิดที่มีประโยชน์เพื่อเพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์และปรับโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ในมูลสัตว์ สำหรับการปรับปรุงดินให้มีคุณภาพเหมาะแก่การเพาะปลูก และปรับปรุงโครงสร้างระบบนิเวศจุลินทรีย์ในดินที่เสื่อมสภาพของพื้นที่ดังกล่าว

นอกจากนี้ข้อมูลของแหล่งอ้างอิงไมโครไบโอมในมูลสัตว์แต่ละชนิดยังเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร เพื่อให้เกษตรกรได้เรียนรู้ รู้จักคัดเลือกปุ๋ยเพื่อนำไปใช้ปรับปรุงดินในพื้นที่เพาะปลูกของตน ให้เป็นดินที่มีคุณภาพและให้ปริมาณผลผลิตทางการเกษตรที่เพิ่มขึ้น

บทที่ 5
เอกสารอ้างอิง

Cai, F., Pang, G., Li, R.X., Li, R., Gu, X.L., Shen, Q.R., et al. (2017) Bioorganic fertilizer maintains a more stable soil microbiome than chemical fertilizer for monocropping. Biol Fertil Soils 53: 861–872.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. ISME J 6: 1621–1624.

Fonte, S.J., Winsome, T., Six, J. (2009) Earthworm populations in relation to soil organic matter dynamics and management in California tomato cropping systems. Appl Soil Ecol 41: 206-214.

Gardner, W.H. (1986) Water content. In: Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods (Klute, A., ed). Agronomy Series No. 9. Am. Soc. Agronomy, 2nd edition: 493-544.

McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., et al. (2011) An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. ISME J 6: 610–618.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., et al. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Res 35: 7188–7196.

Romaniuk, R., Giuffré, L., Costantini, A., Nannipieri, P. (2011) Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems. Ecol Indic 11: 1345–1353.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., et al. (2009) Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 75: 7537–7541.

Shrivastava, P., Kumar, R. (2015) Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. Saudi J Biol Sci 22: 123–131.

Lee, J.E., Lee, S., Sung, J., Ko, G. (2011) Analysis of human and animal fecal microbiota for microbial source tracking. The ISME Journal 5: 362–365.