# อัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตรในถ่านชีวภาพ
# The survival of agricultural microorganisms in biochar

10

สุวรรณี แทนธานี[1*] และสายจิต ดาวสุโข[1]
Suwannee Thaenthanee[1*] and Saijit Daosukho[1]

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรที่เหมาะสมในการนำไปใช้งานร่วมกับถ่านชีวภาพ โดยได้ศึกษาอัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Azotobacter vinelandii* TISTR 1096, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 และ *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 ที่ผสมในวัสดุรองรับที่มีส่วนผสมของถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียน และโปรตีนเกษตร (ผลิตจากถั่วเหลือง) ในอัตราส่วนต่างๆ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยติดตามการคงอยู่ของจุลินทรีย์ในวัสดุแต่ละสูตรทุกวัน พบว่าวัสดุรองรับที่มีส่วนผสมของถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียน มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญบนวัสดุรองรับสูตรนี้ได้ทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* TISTR 008 และ *T. harzianum* TISTR 3553 ซึ่งสามารถเจริญและมีชีวิตอยู่รอดได้มากกว่า $10^4$ CFU/ml และยังมีแนวโน้มของอัตราการอยู่รอดของเชื้อต่อไปได้ภายหลังจากครบกำหนดการทดลอง 14 วัน

## Abstract

This research aims the identity the agricultural microbes that could be survived in the biochar. Four species, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Azotobacter vinelandii* TISTR 1096, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, and *Trichoderma harzianum* TISTR 3553, were studied. The microbes were grown and mixed with the support materials made from soybean protein and biochar at different ratios. The inoculated support materials were kept at 30 °C for 14 days, and were investigated for the survival of microbes every day. The result showed that the support material made from biochar is suitable for 2 types of microbes, *B. subtilis* TISTR 008 and *T. harzianum* TISTR 3553, which tended to survive after day 14 of the experiment.

**คำสำคัญ**: เชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตร ถ่านชีวภาพ การอยู่รอด บาซิลลัส ซับทีลิส ไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม

**Keywords**: Agricultural microbes, Biochar, Survival, Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum

[1] กรมวิทยาศาสตร์บริการ

*Corresponding author E-mail address : suwannee@dss.go.th

## 1. บทนำ (Introduction)

การค้นพบดินเทอรา เปรตา (Terra preta) เป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงการใช้ถ่านชีวภาพในการปรับปรุงดินมาอย่างยาวนาน ในบริเวณที่ราบลุ่มอะเมซอน โดยคนพื้นเมืองชาวอินเดียยุคก่อน ได้ผลิตถ่านแล้วใส่ลงในแปลงดินขนาด 1-80 เฮกตาร์ ดินดังกล่าวมีลักษณะเด่นคือเป็นดินสีดำและเมื่อนำมาวิเคราะห์พบว่ามีส่วนที่เป็นคาร์บอนสีดำอยู่มากกว่าร้อยละ 30 รวมทั้งมีธาตุอาหารพืชอยู่สูง มีการอุ้มน้ำที่ดี มีค่า pH สูงและมีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกสูง (cation exchange capacity : CEC) จึงทำให้ดินบริเวณดังกล่าวมีความสมบูรณ์สูงกว่าดินที่อยู่บริเวณข้างเคียง จากการศึกษาในลำดับต่อมาทราบว่าลักษะดังกล่าวเกิดจากการทำปฏิกิริยาจนได้เม็ดดินจุลภาค (microaggregates) ซึ่งมีส่วนประกอบของอินทรียสารอนุภาคดิน ทราย อาหารปรุงสุกที่ย่อยสลายแล้ว และกลุ่มจุลินทรีย์ [1]

ถ่านชีวภาพ หรือไบโอชาร์ (biochar) เป็นวัสดุที่ได้จากการให้ความร้อนแก่วัสดุชีวภาพ ในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิสูง หรือที่เรียกว่ากระบวนการไพโรไลซิส (pyrolysis) ทำให้ได้สารที่มีคาร์บอนสูง มีรูพรุน และมีความเสถียรเมื่ออยู่ในดินเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากถ่านชีวภาพเป็นคาร์บอนที่มีความทนทานต่อการย่อยสลายและสูญหายไปจากดินได้ยาก มีความหมายต่างจากถ่านทั่วไป (charcoal) ตรงจุดมุ่งหมายการใช้ประโยชน์ ถ่านทั่วไปจะหมายถึงถ่านที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง ขณะที่ถ่านชีวภาพคือถ่านที่ใช้ประโยชน์เพื่อกักเก็บคาร์บอนไว้ในดิน ช่วยปรับปรุงสภาพทางกายภาพของดิน และยังช่วยลดภาวะโลกร้อนด้วยการสะสมคาร์บอนให้อยู่ในดินแทนที่จะถูกเผาเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สู่ชั้นบรรยากาศ ถ่านชีวภาพมีสมบัติในการเป็นวัสดุปรับปรุงดิน (soil amendment) ช่วยให้เกิดความพรุนของเนื้อดิน ทำให้เกิดการไหลเวียนของน้ำและอากาศได้ดี ทำให้ดินเหนียวเมื่อแห้งไม่แตกระแหง และลดความเป็นกรดของดิน อีกทั้งยังช่วยดูดซับธาตุอาหารและแร่ธาตุให้แก่พืช กระตุ้นการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ในดิน รูพรุนของถ่านชีวภาพสามารถเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดินได้ ส่งผลให้พืชที่ปลูกด้วยดินผสมถ่านชีวภาพมีอัตราการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตที่สูงกว่าพืชที่ปลูกในดินปกติหรือปลูกในดินที่ให้ปุ๋ยเคมี [2 , 3, 4]

ในสภาพธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์จะมีอินทรียสารซึ่งอยู่ในรูปของใบไม้หรือซากพืชซากสัตว์อยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ให้แปรสภาพเป็นธาตุอาหารเป็นประโยชน์ต่อพืช จุลินทรีย์มีทั้งประเภทที่เป็นประโยชน์และประเภทที่ก่อโรค จึงได้มีผู้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับใช้ในทางการเกษตรเพื่อส่งเสริมให้มีจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์เป็นจำนวนมากกว่าจุลินทรีย์ก่อโรค จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการทำเกษตรกรรมมีอยู่หลายชนิด เช่น กลุ่มของไรโซแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญ เติบโตของพืชหรือพีจีพีอาร์ สายพันธุ์ที่พบ ได้แก่ Pseudomonas, Enterobacter, Bacillus, Variovorax, Klebsiella, Burkholderia, Azospirillum, Serratia และ Azotobacter เชื้อกลุ่มดังกล่าวจะอยู่รอบรากพืชและมีสมบัติที่ดีต่อพืชคือ เป็นปุ๋ยชีวภาพโดยการตรึงไนโตรเจน สร้างฮอร์โมนพืช และควบคุมศัตรูพืช นอกจากนี้การครอบครองรากพืชของจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Trichoderma และ Pseudomonas ทำให้เกิดการกระตุ้นให้พืชมีภูมิต้านทาน (Induced Systemic Resistance; ISR) [5] หลักการสำคัญในการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์คือ ควรมีการใช้ซ้ำในพื้นที่เดิมจนกระทั่งเชื้อก่อโรคลดจำนวนลง จึงหยุดใช้ อย่างไรก็ตามการใส่จุลินทรีย์ลงดินโดยตรงต้องใช้ในปริมาณมาก จึงทำให้สิ้นเปลืองและอาจไม่ได้ผล เนื่องจากจุลินทรีย์ตายหรือถูกชะออกไปจากบริเวณที่ใส่ การใช้จุลินทรีย์ร่วมกับถ่านชีวภาพ จึงนับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงสภาพของดินทั้งในแง่ของสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพไปพร้อมกัน อีกทั้งถ่านชีวภาพซึ่งมีรูพรุนสูง จึงน่าจะเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ได้ จุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกัน ย่อมมีสมบัติและความสามารถในการปรับตัวที่แตกต่างกัน ในการทดลองนี้ เป็นการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร จำนวน 4 ชนิด ในวัสดุรองรับที่มีส่วนผสมของถ่านชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับ การพัฒนาวัสดุปรับปรุงบำรุง ดินเพื่อการใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อการระบุสายพันธุ์ที่เหมาะสมอันเป็นแนวทางในการพัฒนาวัสดุปรับปรุง

## 2. วิธีการวิจัย (Experimental)

**2.1 ผลิตถ่านจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นวัสดุรองรับ**

ผลิตถ่านจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ทุเรียน และกล้วย โดยนำเปลือกผลไม้สดมาตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กๆ นำไปตากเป็นเวลา 4 ถึง 5 วัน จนแห้งสนิท ชั่งน้ำหนักเปลือกแห้ง เผาเปลือกผลไม้โดยใช้เตาเผาถ่านขนาด 50 ลิตร เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ในเตาเผาจนกว่าจะเย็น ชั่งน้ำหนักถ่านชีวภาพที่ได้และคำนวณร้อยละของผลผลิตที่ได้ (%Yield) โดยใช้สูตร

% Yield = [(มวลของชีวมวลหลังเผา) / (มวลของชีวมวลก่อนเผา)] × 100

**2.2 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และเคมีของถ่านชีวภาพ**

2.2.1 การบดและคัดแยกขนาดถ่านชีวภาพ

นำถ่านชีวภาพที่ได้มาบดด้วยเครื่องบดแบบ Hammer Mill และคัดแยกขนาดด้วยการร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 2, 8, 12, 16, 50, และ 80 เพื่อแยกขนาดและจัดเก็บ

2.2.2 วิเคราะห์หาปริมาณธาตุโพแทสเซียมของถ่านชีวภาพ

วิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายน้ำของถ่านชีวภาพ โดยการชั่งน้ำหนักถ่านชีวภาพที่บดแล้ว จำนวน 5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง เจือจางโดยการดูดของเหลวที่กรองได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น และเจือจางต่อโดยใช้ดูดของเหลวที่เจือจางมาแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวด Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น วิเคราะห์หา

ปริมาณโพแทสเซียมโดยใช้ Atomic absorption spectrophotometer เทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมที่ความเข้มข้น 1, 3 ,5 และ 7 ppm ถ่านแต่ละชนิดทำซ้ำ 3 ครั้ง

2.2.3 การทดสอบหาค่า pH ของถ่านชีวภาพ

การทดสอบค่า pH ของถ่านชีวภาพโดยการชั่งถ่านชีวภาพที่บดแล้วจำนวน 5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเป็นครั้งคราวเพื่อให้ถ่านชีวภาพกระจายทั่ว ตั้งให้นิ่งเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนใสไปวัดค่า pH ถ่านแต่ละชนิดทำซ้ำ 3 ครั้ง

**2.3 ศึกษาอัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุรองรับ**

2.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

จัดหาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยคัดเลือกเชื้อในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Azotobacter vinelandii* TISTR 1096, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 และ *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีที่ระบุไว้บนฉลาก เพื่อตรวจดูลักษณะโคโลนี การปนเปื้อน และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลวเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมแก่การนำไปทดสอบกับวัสดุรองรับผสมถ่านชีวภาพ

2.3.2 ศึกษาอัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุรองรับ

จัดเตรียมวัสดุรองรับที่ประกอบด้วย โปรตีนเกษตร และถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ อบ และบดละเอียด โดยผสมในอัตราส่วนต่างๆ จำนวน 6 สูตร ดังนี้

- สูตรที่ 1 : ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนผสมโปรตีนเกษตรในอัตราส่วน 1 : 0
- สูตรที่ 2 : ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนผสมโปรตีนเกษตรในอัตราส่วน 1 : 1
- สูตรที่ 3 : ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนผสมโปรตีนเกษตรในอัตราส่วน 1 : 3
- สูตรที่ 4 : ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนผสมโปรตีนเกษตรในอัตราส่วน 1 : 5
- สูตรที่ 5 : ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนผสมโปรตีนเกษตรในอัตราส่วน 0 : 1

แบ่งวัสดุรองรับใส่ในขวดเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 100 กรัม จากนั้นดำเนินการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์โดยใช้อาหารเหลวในสภาวะที่เหมาะสม ดังนี้ *A. vinelandii* TISTR 1096 เพาะเลี้ยงในอาหารJensen's broth (JSB) *B. subtilis* TISTR 008 และ *P. fluorescens* TISTR 358 เพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) และ *T. harzianum* TISTR 3553 เพาะเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) ทุกสายพันธุ์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ยกเว้น *B. subtilis* TISTR 008 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที (ตารางที่ 5) เมื่อครบเวลา เจือจางเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลาย Butterfield's phosphate buffer pH 7.2 ให้มีปริมาณเชื้อ $10^3$-$10^4$ CFU/ml ผสมเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 60 มิลลิลิตร ลงในวัสดุรองรับ 5 สูตร ใส่เชื้อแต่ละชนิดแยกกัน เชื้อแต่ละชนิดทำ 2 ซ้ำ คลุกผสมเชื้อกับวัสดุรองรับให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และสุ่มเก็บตัวอย่างจากวัสดุรองรับสูตรต่างๆ ทุก 2 วัน มาตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี standard plate count เพื่อติดตามแนวโน้มของอัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุรองรับ

## 3. ผลและวิจารณ์ (Results and Discussion)

**3.1 ผลิตถ่านจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นวัสดุรองรับ**

ถ่านชีวภาพที่ได้จากเปลือกทุเรียนและจากเปลือกกล้วยตากแห้ง ให้ร้อยละของผลผลิตที่ได้ (% yield) 33.60±0.24 และ 23.2±0.45 ตามลำดับ (ตารางที่1)

**3.2 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และเคมีของถ่านชีวภาพ**

3.2.1 การบดและคัดแยกขนาดถ่านชีวภาพ

การคัดแยกขนาดถ่านหลังการบดและการร่อนผ่านตะแกรง พบว่าถ่านชีวภาพส่วนใหญ่ จะมีขนาดอนุภาคประมาณ 0.3-1.7 มิลลิเมตร คือ ผ่านตะแกรงเบอร์ 16 ค้างบนตะแกรงเบอร์ 50 คิดเป็นร้อยละ 34 และได้เลือกขนาดอนุภาคดังกล่าวในการทดลอง (ตารางที่ 2)

3.2.2 วิเคราะห์หาปริมาณธาตุโพแทสเซียมของถ่านชีวภาพ

วิเคราะห์หาปริมาณธาตุโพแทสเซียมที่ละลายน้ำด้วยเครื่อง Atomic absorption spectroscopy จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนและจากเปลือกกล้วยมีปริมาณธาตุโพแทสเซียม คิดเป็นร้อยละ 32.94±1.54, และ 22.53±1.76 ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของสายจิตและคณะ ซึ่งรายงานว่าถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนมีปริมาณโพแทสเซียมสูง อยู่ที่ประมาณร้อยละ 47 หากเป็นทุเรียนในฤดู และจะมีค่าประมาณร้อยละ 24 หากเป็นทุเรียนนอกฤดู [6] จึงเลือกใช้ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียน ในการศึกษาสมบัติการเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.3 การทดสอบหาค่า pH ของถ่านชีวภาพ

ค่า pH ของถ่านชีวภาพมีค่า pH อยู่ในช่วงเบส จากผลการทดลองพบว่าถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนและเปลือกกล้วย พบว่ามีค่า pH 9.22±0.21 และ 8.60±0.07 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

**3.3 ศึกษาอัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุรองรับ**

3.3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ผลการทดลองพบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยง และไม่พบการปนเปื้อน สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในอาหารแข็ง และอาหารเหลว ดังแสดงในตารางที่ 4 และตารางที่ 5 ตามลำดับ

**ตารางที่ 1 ร้อยละของผลผลิตที่ได้ของการเผาถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนและเปลือกกล้วย**

| ชื่อ | Lot | ครั้งที่ | เปลือกแห้ง (กิโลกรัม) | ถ่านที่ได้ (กิโลกรัม) | % yield | ค่าเฉลี่ย | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียน | 1 | 1 | 4.5 | 1.5 | 33.3 | 33.60 | 0.24 |
| | | 2 | 4.4 | 1.5 | 34.1 | | |
| | | 3 | 4.4 | 1.5 | 34.1 | | |
| | 2 | 1 | 4.5 | 1.5 | 33.3 | | |
| | | 2 | 3.9 | 1.3 | 33.3 | | |
| ถ่านชีวภาพจากเปลือกกล้วย | | 1 | 3.5 | 0.8 | 22.9 | 23.20 | 0.45 |
| | | 2 | 3.4 | 0.8 | 23.5 | | |
| | | 3 | 3.5 | 0.8 | 22.9 | | |
| | | 4 | 3.5 | 0.8 | 22.9 | | |
| | | 1 | 3.5 | 0.8 | 22.9 | | |

**ตารางที่ 2 ช่วงขนาดอนุภาคและปริมาณของถ่านชีวภาพหลังจากบดและคัดแยกขนาด**

| ขนาดตะแกรง | วิธีการเก็บตัวอย่าง | ช่วงขนาดอนุภาค | ร้อยละของถ่านที่ได้ |
|---|---|---|---|
| -8 | ค้างบนตะแกรงเบอร์ 8 | > 2.4 mm | 19 |
| 8x12 | ผ่านตะแกรงเบอร์ 8<br>ค้างบนตะแกรงเบอร์ 12 | 1.7-2.4 mm | 6 |
| 12x16 | ผ่านตะแกรงเบอร์ 12<br>ค้างบนตะแกรงเบอร์ 16 | 1.2-1.7 mm | 11 |
| 16x50 | ผ่านตะแกรงเบอร์ 16<br>ค้างบนตะแกรงเบอร์ 50 | 0.3-1.7 mm | 34 |
| 50x80 | ผ่านตะแกรงเบอร์ 50<br>ค้างบนตะแกรงเบอร์ 60 | 0.18-0.3mm | 10 |
| 80+ | ผ่านตะแกรงเบอร์ 80 (pan) | <0.18 mm | 20 |

**ตารางที่ 3 แสดงค่า pH ของถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนและเปลือกกล้วย**

| ชนิดของถ่านชีวภาพ | ค่า pH | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | วัดครั้งที่ 1 | วัดครั้งที่ 2 | วัดครั้งที่ 3 | ค่าเฉลี่ย | SD |
| ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียน | 9.03 | 9.18 | 9.45 | 9.22 | 0.21 |
| ถ่านชีวภาพจากเปลือกกล้วย | 8.54 | 8.67 | 8.59 | 8.60 | 0.07 |

**ตารางที่ 4 สภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง**

| เชื้อจุลินทรีย์ | อาหาร | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง |
|---|---|---|---|
| *A. vinelandii* TISTR 1096 | Jensen's agar (JSA) | 30 | โคโลนีกลม มีสีเหลือง นูน |
| *B. subtilis* TISTR 008 | Nutrient agar (NA) | 37 | โคโลนีกลม สีขาว แบนราบ |
| *P. fluorescens* TISTR 358 | Nutrient agar (NA) | 30 | โคโลนีกลม สีเขียว แบนราบ |
| *T. harzianum* TISTR 3553 | Potato dextrose agar (PDA) | 30 | เส้นใยสีขาว และมีสปอร์สีเขียว |

**ตารางที่ 5 สภาวะและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว**

| ชนิดเชื้อจุลินทรีย์ | อาหาร | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)/ อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที) | ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณจุลินทรีย์ที่นับได้ (CFU/ml) |
|---|---|---|---|---|
| *A. vinelandii* TISTR 1096 | Jensen's broth (JSB) | 30 / 150 | 72 | $3.2 \times 10^8$ |
| *B. subtilis* TISTR 008 | Nutrient Broth (NB) | 37 / 150 | 24 | $1.3 \times 10^7$ |
| *P. fluorescens* TISTR 358 | Nutrient Broth (NB) | 30 / 150 | 24 | $2.0 \times 10^9$ |
| *T. harzianum* TISTR 3553 | Potato dextrose broth (PDB) | 30 / 150 | 120 | $6.8 \times 10^6$ |

**ตารางที่ 6 แสดงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาใน วัสดุรองรับทั้ง 5 สูตร เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน**

| สูตรที่ | อัตราส่วนของถ่านชีวภาพต่อโปรตีนเกษตร | ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุรองรับ (CFU/ml) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *A. vinelandii* TISTR 1096 | | *B. subtilis* TISTR 008 | | *P. fluorescens* TISTR 358 | | *T. harzianum* TISTR 3553 | |
| | | วันที่ 0 | วันที่ 14 | วันที่ 0 | วันที่ 14 | วันที่ 0 | วันที่ 14 | วันที่ 0 | วันที่ 14 |
| 1 | 1:0 | ไม่พบ | ND | $2.5 \times 10^3$ | $2.5 \times 10^4$ | $2.4 \times 10^4$ | 0 | $4.4 \times 10^5$ | $5.0 \times 10^4$ |
| 2 | 1:1 | ไม่พบ | ND | $2.5 \times 10^3$ | $6.0 \times 10^8$ | $2.5 \times 10^3$ | 0 | $4.4 \times 10^5$ | 0 |
| 3 | 1:3 | ไม่พบ | ND | $2.5 \times 10^3$ | $1.6 \times 10^8$ | $2.5 \times 10^3$ | 0 | $4.4 \times 10^5$ | $1.3 \times 10^5$ |
| 4 | 1:5 | ไม่พบ | ND | $2.5 \times 10^3$ | $5.0 \times 10^7$ | $2.5 \times 10^3$ | 0 | $4.4 \times 10^5$ | 0 |
| 5 | 0:1 | ไม่พบ | ND | $2.5 \times 10^3$ | $9.0 \times 10^7$ | $2.5 \times 10^3$ | 0 | $4.4 \times 10^5$ | $7.0 \times 10^5$ |

ND : ไม่ได้ทำการทดลอง

**3.4 ศึกษาอัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุรองรับ**

ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนมีธาตุโพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้อยู่ในปริมาณสูง แต่มีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสไม่สูงนัก [6] ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้โปรตีนเกษตรที่ผลิตจากถั่วเหลืองมาเป็นส่วนผสมในสูตร โปรตีนเกษตร 100 กรัมมีคาร์โบไฮเดรต 40.89 กรัม และ โปรตีน 49.76 กรัม จึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนให้แก่เชื้อจุลินทรีย์ ในการศึกษาอัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุรองรับ ที่มีส่วนผสมของโปรตีนเกษตรและถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียน จำนวน 5 สูตร ผลการทดลองพบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญบนวัสดุรองรับสูตรนี้ได้ทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* TISTR 008 และ *T. harzianum* TISTR 3553 ซึ่งสามารถเจริญและมีชีวิตอยู่รอดได้มากกว่า $10^4$ CFU/ml และยังมีแนวโน้มของอัตราการอยู่รอดของเชื้อต่อไปได้ภายหลังจากครบกำหนดการทดลอง 14 วัน (ตารางที่ 6)

**เชื้อ *Azotobacter vinelandii* TISTR 1096**

ไม่พบการเจริญของเชื้อ A. vinelandii TISTR 1096 ในวัสดุรองรับทุกสูตร เนื่องจากอาจเกิดจากสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม เช่น ค่า pH หรือ องค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ของวัสดุรองรับที่นำมาใช้

**เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 008**

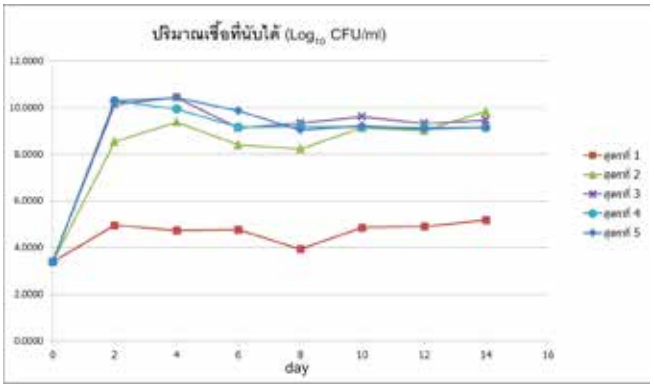
สามารถเจริญได้ในวัสดุรองรับทั้ง 5 สูตร พบการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และจากนั้นเจริญอย่างช้าๆ ในช่วงวันที่ 4 และเริ่มลดลงจนคงที่ในวันที่ 8 ปริมาณเชื้อที่พบในวันที่ 14 ในวัสดุรองรับสูตรที่ 2, 3, 4, 5 และ 1 เท่ากับ 9.84, 9.46, 9.14, 9.15 และ 5.18 ($Log_{10}$ CFU/g) ตามลำดับ จึงอาจกล่าวได้ว่า วัสดุรองรับที่มีส่วนผสมของโปรตีนเกษตรและถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 008 แม้แต่วัสดุรองรับที่มีถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนเพียงอย่างเดียว (สูตรที่ 1) เชื้อก็ยังสามารถเจริญเติบโตและอยู่ในรอดได้ แสดงว่าในถ่านทุเรียนยังคงมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อเหลืออยู่หลังจากการเผา เชื้อดังกล่าวสามารถสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อสภาวะรุนแรง จึงทำให้อยู่รอดในวัสดุรองรับทุกสูตรจนครบระยะเวลา 14 วัน ดังแสดงในรูปที่ 1

**เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358**

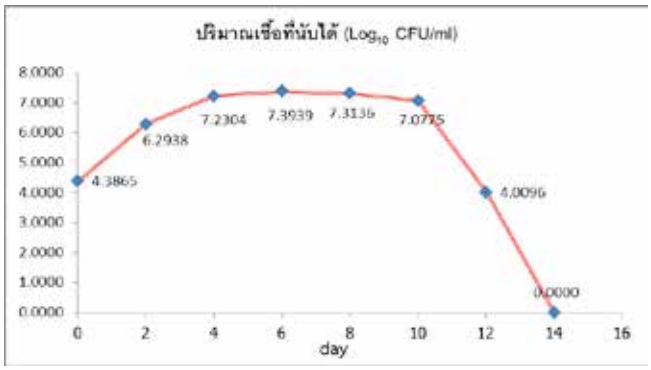
สามารถเจริญได้ในวัสดุรองรับสูตรที่ 1 ที่มีส่วนผสมของถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนเพียงสูตรเดียว โดยมีอัตราการเจริญสูงสุดในวันที่ 6 พบการเจริญของเชื้อเท่ากับ 7.39 ($Log_{10}$ CFU/g) และมีจำนวนคงที่ถึงวันที่ 10 จากนั้นลดลงจนกระทั่งไม่พบเชื้อในวันที่ 14 แสดงให้เห็นว่าถ่านชีวภาพมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อดังกล่าว แต่เนื่องจากเชื้อดังกล่าวไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ จึงค่อยๆ ตายลงจนกระทั่งไม่พบเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 2

**เชื้อ *Trichoderma harzianum* TISTR 3553**

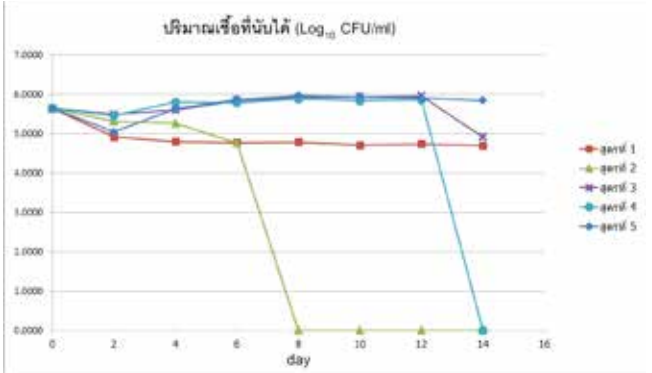
สามารถเจริญได้บนวัสดุรองรับทั้ง 5 สูตร ในวันที่ 14 พบการเจริญของเชื้อในวัสดุรองรับสูตรที่ 5, 3, และ1 เท่ากับ 5.84, 4.91, 4.70 $Log_{10}$ CFU/g ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าในวัสดุรองรับสูตรที่ 1 ซึ่งมีส่วนประกอบคือถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนเพียงอย่างเดียว และสูตรที่ 5 ซึ่งมีส่วนประกอบของโปรตีนเกษตรเพียงอย่างเดียว พบการเจริญของเชื้อจนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง และมีแนวโน้มคงที่ ในขณะที่ วัสดุรองรับที่มีส่วนผสมระหว่างถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนและโปรตีนเกษตร มีแนวโน้มของอัตราการรอดชีวิตต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 3




รูปที่ 1 ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* TISTR 008 ในวัสดุรองรับ 5 สูตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน




รูปที่ 2 ปริมาณเชื้อ *P. fluorescens* TISTR 358 ในวัสดุรองรับสูตรที่ 1 เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน




รูปที่ 3 ปริมาณเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ในวัสดุรองรับสูตรต่างๆ เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน

## 4. สรุป (Conclusion)

ถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนมีธาตุโพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้ในปริมาณสูง ซึ่งสามารถเป็นอาหารให้แก่พืชและจุลินทรีย์ในดินได้ ศึกษาอัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตรในวัสดุรองรับ พบว่า เชื้อในกลุ่ม *B. subtilis* และ *T. harzianum* สามารถอยู่รอดได้ในวัสดุรองรับที่มีถ่านชีวภาพเป็นส่วนผสมเพียงอย่างเดียวโดยไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งอาหารอื่น สอดคล้องกับการค้นพบของ Luo, Y. และคณะ ซึ่งพบว่าถ่านชีวภาพที่เผาที่อุณหภูมิต่ำ 350 องศาเซลเซียส ยังมีธาตุอาหารจำพวกคาร์บอนอินทรีย์และไนโตรเจนอนินทรีย์ที่ละลายน้ำเหลืออยู่ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้ในการเจริญได้ และการเติมถ่านชีวภาพดังกล่าวลงในดินสามารถดึงดูดจุลินทรีย์บางกลุ่มให้มาอยู่ในรูพรุนของถ่าน และกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ กล่าวคือ ถ่านชีวภาพมีสภาวะเหมาะสมที่จะเป็นบ้านของจุลินทรีย์ [7] การทดลองนี้จึงสรุปในเบื้องต้นได้ว่าถ่านชีวภาพจากเปลือกทุเรียนมีศักยภาพที่จะใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตรได้อย่างน้อย 2 ชนิด ทั้งนี้ จำเป็นต้องศึกษาสภาวะและระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมต่อไป

## 5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์บริการ ปีงบประมาณ 2556-2557 ขอบคุณสำนักเทคโนโลยีชุมชนที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ขอบคุณนางสาวฉวีวรรณ เหลืองวุฒิวิโรจน์ ที่ให้คำปรึกษาก่อนดำเนินการวิจัย และ นางสุบงกช ทรัพย์แตง ที่ให้ความร่วมมือในการตรวจความถูกต้องของเอกสาร

## 6. เอกสารอ้างอิง (References)

[1] CHIA, C. H. et. al. 2008. *Development of Synthetic Terra Preta (STP): Characterization and initial research findings.* [Online]. [Viewed 12 May 2016]. Available from: http://www.biochar-international.org/images/Joseph_IBI_poster_PM.pdf

[2] CHAN, K.Y. et al. Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. *Australian Journal of Soil Research,* 2007, 45, 629-634.

[3] HUNT, J. et al. The basics of biochar: A natural soil amendment. *Soil Crop Management,* 2010, 30,1-6.

[4] GLASER, B., J. LEHMANN and W. ZECH. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal - a review. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 35, 219-230.

[5] ดุสิต อธินุวัฒน์. จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ด้านการเกษตร Beneficial Microbes in Agriculture. *Thai Journal of Science and Technology*, 2556, 2(1), 18-35.

[6] สายจิต ดาวสุโข และคณะ. *รายงานการวิจัย เรื่อง การพัฒนาถ่านจากเศษผลไม้ที่มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปลูกหน่อไม้ฝรั่ง.* กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 2554.

[7] LUO, Y. et al. 2010. *Impact of biochar on soil microbial activity and its mechanisms.* [online]. [viewed 17 May 2016]. Available from: http://www.biochar-international.org/sites/default/files/LuoYu.pdf