ศักยภาพของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยต่อการเกษตร

สุลีรัก อารักษณ์ธรรม

ดุษฎีนิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2559

ศักยภาพของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยต่อการเกษตร

สุลีรัก อารักษณ์ธรรม

ดุษฎีนิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อานัฐ ตันโช)
วันที่ 3 เดือน มี.ค. พ.ศ. 2559

กรรมการที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)
วันที่ 11 เดือน มี.ค. พ.ศ. 2559

กรรมการที่ปรึกษา .....
(อาจารย์ ดร.ศรีกาญจนา คล้ายเรือง)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

กรรมการที่ปรึกษา .....
(ดร.ภัทรพร รัตนวารี)
วันที่ 3 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2559

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตร .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ภูมิสุทธาผล)
วันที่ 13 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2559

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรภัทร วาฤทธิ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 16 เดือน มี.ค. พ.ศ. 2559

ชื่อเรื่อง ศักยภาพของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยต่อการเกษตร
ชื่อผู้เขียน นางสาวสุลีรัก อารักษณ์ธรรม
ชื่อปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.อานัฐ ตันโช

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการจำแนกชนิดแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ได้เก็บตัวอย่างที่ในใช้ในการศึกษา 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 1) ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากบ่อผลิตปุ๋ยหมัก 2) ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากฟาร์มเลี้ยงวัวนม 3) ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* เก็บจากดินในพื้นที่เกษตร 4) ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และ 5) น้ำหมักมูลไส้เดือนดินเก็บจากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดินผลิตปุ๋ยหมักทางการค้า การศึกษาด้วยวิธีการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีการไม่เพาะเลี้ยง (non-culturable methods) ด้วยเทคนิค PCR-DGGE สามารถคัดเลือกแถบดีเอ็นเอจำนวน 66 แถบ ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์ 16S rRNA ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม BLAST เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Type strains โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม BioEdit และ MEGA 6 พบตัวอย่างของแบคทีเรียที่ศึกษามีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 82–99% โดยพบ 5 กลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วย Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Bacteroidetes และกลุ่ม Tenericutes ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม Betaproteobacteria สามารถพบในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างจากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* ที่เก็บจากพื้นที่เกษตร ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidetes พบเฉพาะตัวอย่างมูลไส้เดือนดิน และแบคทีเรียกลุ่ม Tenericutes พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ส่วนผลการศึกษาการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีการแบบเพาะเลี้ยง (culturable methods) สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างจำนวน 73 ไอโซเลท และนำไอโซเลทที่คัดแยกได้จำแนกชนิดแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์ 16S rRNA ด้วยโปรแกรม BLAST กับฐานข้อมูล eztaxon-e และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Type strains โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม BioEdit และ MEGA 6 โดยพบ 3 กลุ่มแบคทีเรียที่ศึกษามีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 97–100% ประกอบด้วยGammaproteobacteria, Betaproteobacteria และกลุ่ม Firmicutes ซึ่งถูกจำแนกอยู่ในแบคทีเรีย 13 สกุล ประกอบด้วย *Aeromonas, Pseudomonas, Enterobacter, Paenibacillus, Staphylococcus, Enterococcus, Lysinibacillus, Shewanella, Citrobacter, Rummeliibacillus, Neisseria* และ *Vibrio* โดย *Bacillus* เป็นสกุลที่พบในทุกตัวอย่าง ซึ่งแบคทีเรียต่างๆที่จำแนกและคัดแยกได้เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์หรือเซลลูโลส (Cellulolytic Bacteria) สร้างสารส่งเสริมการ

เจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoters) ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Free-living nitrogen fixers) และละลายธาตุฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงในดิน (Phosphate solubilizers)

ในส่วนของการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Perionyx sp.*, ที่คัดแยกได้ต่อการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) และการส่งเสริมการงอกของเมล็ดพืช พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มี 8 ไอโซเลท ที่สามารถผลิต IAA ที่มีความเข้มข้น โดยแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 119.83-131.99 µg/ml รองลงมาคือแบคทีเรียสกุล *Aeromonas* และ *Bacillus* สามารถผลิต IAA ได้ในระดับ 51.74-80.44 µg/ml และ 32.45 µg/ml ตามลำดับ และมีแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท ที่สามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดได้ดีกว่าตำรับทดลองควบคุม โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มีศักยภาพส่งเสริมการงอกของเมล็ดอยู่ในสกุล *Bacillus* ในส่วนของการศึกษาอายุการเก็บรักษามูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน (Shelf life) เป็นเวลานาน 12 เดือน พบว่า ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด ไนโตรเจนในรูปไนเตรท ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม อินทรียวัตถุ การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยมีปริมาณที่วัดได้สูงที่สุดในระยะเวลาการเก็บนาน 3 เดือน และเริ่มลดต่ำลงภายหลังการเก็บนานขึ้นที่ 6 ถึง 12 เดือน ส่วนปริมาณแอมโมเนียม สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (ออกซิน จิบเบลเรลลิน ไซโตไคนิน) และปริมาณจุลินทรีย์ ลดต่ำลงอย่างต่อเนื่องแปรผันตรงกับระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น หากพิจารณาถึงคุณค่าธาตุอาหารพืชโดยเฉพาะธาตุหลัก คือ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) จะพบว่า มีค่าเพิ่มขึ้น 59 % หลังเก็บนาน 1 เดือน มีค่าเพิ่มขึ้น 156 % หลังเก็บนาน 3 เดือน มีค่าเพิ่มขึ้น 145 % หลังเก็บนาน 6-12 เดือน สามารถสรุปได้ว่าระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ดีที่สุดพิจารณาในแง่ของปริมาณธาตุอาหารพืชก่อนนำไปใช้คือช่วงระหว่าง 3 ถึง 6 เดือน หลังเก็บปุ๋ยจากบ่อเลี้ยง แต่ปุ๋ยหมักยังคงมีคุณภาพดียาวนานถึง 12 เดือน

คำสำคัญ: ไส้เดือนดิน, มูลไส้เดือนดิน, แบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้, เทคนิค DGGE, อายุการเก็บรักษาปุ๋ยหมัก

Title	Potential of Bacteria from Thai Local Earthworms for Agriculture
Author	Miss Suleeruk Arluktham
Degree of	Doctor of Philosophy in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Associate Professor Dr. Arnat Tancho

ABSTRACT

The study on the identification of bacteria that live in the intestines of earthworms, vermicompost and liquid vermicompost, was conducted using 5 samples; (1) intestine of *Perionyx* sp. earthworm collected from a composting pond; (2) intestine of *Perionyx* sp. eathwrom collected from dairy farm; (3) intestine of *Metaphire posthuma* earthworm collected from farm lands; (4) vermicompost; and (5) liquid vermicompost collected from commercial vermicomposting farm. Using a combination of non-*culturable method* (PCR-DGGE) and culturable method on Nutrient Agar and MRS agar, the percentage of homology was compared by sequencing the fragments of bacterial 16s rRNA gene of the sample using the BLAST program compared with nucleotide in NCBI database and then followed by the analysis of evolution correlation of bacteria whose type strains were compared by phylogenetic tree structure using the BioEdit and MEGA 6 programs. Results showed bacterial samples with 82-99% similarity to database; namely; Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Bacteroidetes and Tenericutes. Bacteria in Betaproteobacteria was found in all samples except from the intestine sample of *Metaphire posthuma* collected from agriculture areas. Meanwhile, bacteria called Bacteroidetes was found only in vermicmompost sample and a bacterial group Tenericutes bacteria, was found only in liquid vermicompost sample.

Results of the study on the classification of bacteria using culturable methods, showed the identification of 73 isolates and which were grouped through comparison of the percent similarity (homology) of the sequencing of nucleotide around 16s rRNA gene, using the BLAST program with eztaxon-e database and then analyzed the correlation on evolution to compare the type strains by building a phylogenetic tree with the use of BioEdit and MEGA 6 programs. As a result, 3 bacterial groups were found having homology percent of 97-100%, consisting of : Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria and Firmicutes and with 13 genera, follow as *Aeromonas, Pseudomonas, Enterobacter,*

Paenibacillus, Staphylococcus, Enterococcus, Lysinibacillus, Shewanella, Citrobacter, Rummeliibacillus, Neisseria and *Vibrio* with *Bacillus* genus found in *all samples*. All bacterial groups identified and selected were found to belong to a microbial group that could dissolve organic substance or cellulose and are called cellulytic bacteria, producing plant growth promoters, free-living nitrogen fixers and phosphate solubilizers.

On the study of the potential of bacteria found in earthworm intestines vermicompost and liquid vermicompost, the *Perionyx* sp. earthworm that was selected to produce IAA and promote germination of plant seeds, was found to contain 8 isolates that could produce IAA with concentration by *Enterobacter* that could produce IAA at a maximum of 119.83-131.99 µg/ml free IAA, followed by *Aeromonas* and *Bacillus* which could produce 51.74-80.44 µg/ml and 32.45 µg/ml, respectively. In addition, 9 bacterial isolates were able to promote germination of seeds much better than the control with most bacteria found in genus *Bacillus*. Results of the study on the shelf life of vermicompost and liquid vermicompost for 12 months, showed that total amount of nitrogen, nitrate, available phosphorus, exchangeable potassium and organic matter, having germination index that indicated highest retention period of 3 months but afterward started to drop until 6 to 12 months. Ammonium nitrogen, carbon to nitrogen ratio, plant growth regulators (Auxin (free IAA), free GA_3, Cytokinin) and total plate count of microorganisms decreased consistently in correlation with too long storage period. When considering the valuable plant nutrients, especially the main elements, nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K), the value increased by 59% after storage for one month, increased 156% after storage for three months, and increased 145% after storage for 6-12 months. It can be concluded that the longer the duration of storage, the higher the quality of fertilizer in terms of plant nutrients prior to application, which was 3 to 6 months after harvesting but compost fertilizer retained the good quality for up to 12 months.

Keywords: Earthworms, Vermicompost, Culturable Bacteria, DGGE, Shelf life of compost

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณท่านรองศาสตราจารย์ ดร.อานัฐ ตันโช ประธานกรรมการที่ปรึกษาดุษฎีนิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์ อาจารย์ ดร.ศรีกาญจนา คล้ายเรือง ดร.ภัทรพร รัตนวารี คณะกรรมการที่ปรึกษาดุษฎีนิพนธ์ทุกท่าน ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษาและแนวทางในการดำเนินการวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องดุษฎีนิพนธ์เล่มนี้อย่างใกล้ชิด โดยดุษฎีนิพนธ์เล่มนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2556 รวมถึง ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ขอขอบพระคุณหน่วยงานทั้งสองอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ รวมถึงขอบคุณหน่วยวิจัยเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ (BCC) คณะวิทยาศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาไส้เดือนดิน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อำนวยความสะดวกในด้านห้องปฏิบัติการ และคณะบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญช่วยเหลือในการวิจัยครั้งนี้จนเป็นผลสำเร็จ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครูบาอาจารย์ที่เคยได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้มาโดยตลอดตั้งแต่อดีตจวบจนปัจจุบัน ขอขอบพระคุณครอบครัว เพื่อน พี่ น้อง ที่ได้ให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

สุลีรัก อารักษณ์ธรรม

กุมภาพันธ์ 2559

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

บทที่ 1
บทนำ

การผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน คือ กระบวนการเลี้ยงไส้เดือนดินโดยให้ไส้เดือนดินกินขยะอินทรีย์รวมทั้งมูลสัตว์ และผลผลิตมูลไส้เดือนดินที่ได้เรียกว่า ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน ปัจจุบันมีการส่งเสริมกันอย่างกว้างขวางในการใช้ไส้เดือนดินกำจัดขยะอินทรีย์เพื่อผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน โดยนำมาใช้ในทางการเกษตร โดยเฉพาะการบำรุงต้นพืช และบำรุงดิน โดยใช้ในรูปของปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์

ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (vermicompost) หรือ มูลไส้เดือนดินที่ถูกขับถ่ายออกจากไส้เดือนดินนั้นจะมีมวลชีวภาพของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะประชากรของแบคทีเรีย และยังมีกิจกรรมของเอ็นไซม์ acid phosphatases และ alkaline phosphatases เพิ่มสูงขึ้นกว่าในอาหารที่ไส้เดือนดินกิน (Aira and Dom´inguez, 2009) ทั้งนี้เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่างไส้เดือนดินกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนดินนั้นมีการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน โดยไส้เดือนดินทำหน้าที่ในการกินและบดย่อยอาหารให้มีขนาดเล็กและสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการอาศัยอยู่และการเกิดกิจกรรมต่างๆของจุลินทรีย์ (Edwards and Bohlen,1996) มูลไส้เดือนดินจะมีปริมาณธาตุอาหารพืชสูงกว่าดินในบริเวณที่อาศัยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Aira *et al*., 2003) ทั้งนี้ก็ด้วยกิจกรรมของเอ็นไซม์ที่ถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในมูลไส้เดือนดินนั้น (Aira *et al*., 2005)

จากการทดลองปลูกผักกาดหอมห่อของเกษตรกรในศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย ด้วยการรองพื้นด้วยมูลกระต่ายและปล่อยไส้เดือนดินท้องถิ่นพันธุ์ *Amynthas* sp. 10 ตัว/ตารางเมตร พบว่าสามารถเก็บผลผลิตผักกาดหอมห่อได้เร็วกว่าแปลงควบคุม 1 สัปดาห์ และได้น้ำหนักผลผลิตผักกาดหอมห่อมากกว่าแปลงควบคุม 41 % มีธาตุฟอสฟอรัส (P) สูงกว่าแปลงควบคุม 32 % (อานัฐ, 2551) และจากการทดลองปลูกเยอบีร่าในสถานีเกษตรหลวงปางดะ โดยผสมดินปลูกกับมูลวัวใหม่ ขุยมะพร้าวและแกลบดำและปล่อยไส้เดือนดินในกระถาง 20 ตัว/กระถาง พบว่า ดินปลูกที่ไม่มีไส้เดือนดินค่า EC (electrical conductivity) ที่วัดได้สูงมากเท่ากับ 2.1 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร (dS/m) ส่งผลเป็นพิษต่อต้นเยอบีร่าที่ปลูกเหลืองและตายในที่สุด แต่กระถางที่ปล่อยไส้เดือนดินพบว่ามีค่า EC เท่ากับ 700 ไมโครซีเมนต์ต่อเมตร (µS/cm) และต้นเยอบีร่าไม่แสดงอาการเหลืองหรือตายและสามารถเจริญเติบโตได้ปกติ (อานัฐ, 2551)

การทดลองดังกล่าวนี้ทำให้ทราบว่าไส้เดือนดินมีส่วนอย่างมากในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งในแง่ของการเพิ่มธาตุอาหารพืช ลดความเป็นพิษของปุ๋ยหมักหรือมูลสัตว์ใหม่ที่ไม่ผ่านการหมักรวมถึงความสามารถในการปรับปรุงโครงสร้างทางกายภาพของดิน ซึ่งผลดังกล่าวคาดว่าน่าจะมาจากการทำงานของตัวไส้เดือนดินเองและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของไส้เดือนดิน ดังนั้นเพื่อให้เกิดองค์ความรู้ที่สามารถอธิบายได้ว่าเกิดกระบวนการใดในระหว่างการใช้ตัวไส้เดือนดินและมูลไส้เดือนดินดังกล่าวต่อการปลูกพืช จึงได้ทำการวิจัยในเรื่องนี้เพิ่มในส่วนของการจำแนกชนิดแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดิน ในมูลไส้เดือนดิน และในน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ศึกษากิจกรรมของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของไส้เดือนดินและในมูลไส้เดือนดิน ความเร็วในการย่อยสลายที่สมบูรณ์ของขยะอินทรีย์และมูลสัตว์ใหม่ที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนดินเพื่อผลิตปุ๋ย รวมถึง

การเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารพืชในรูปที่เป็นประโยชน์ ความเข้มข้นของฮอร์โมนพืช และชีวมวลของจุลินทรีย์ (microbial biomass)ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ซึ่งองค์ความรู้เหล่านี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพจากไส้เดือนดินได้ อันจะส่งผลให้เกิดการลดต้นทุนการซื้อปุ๋ยชีวภาพจากตลาดที่มีราคาแพงและเข้าถึงได้ยาก การใช้ปุ๋ยชีวภาพจากไส้เดือนดินที่เข้าถึงได้ง่ายนั้นจะส่งผลให้เกษตรกรรู้จักการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพที่กว้างขึ้นและแพร่หลายมากขึ้นในอนาคตอันจะส่งผลต่อเนื่องไปถึงการลดการใช้ปุ๋ยเคมีที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย

ความสำคัญของปัญหา

ที่ผ่านมามีการทดสอบนำปุ๋ยมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินไปใช้ในแปลงเกษตรกร พบว่าปุ๋ยมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสามารถส่งเสริมการแตกราก การออกดอก และการติดเมล็ดของพืชได้ดี รวมทั้งส่งผลให้ดินที่ใช้มีปริมาณธาตุฟอสฟอรัส (P) ในดินเพิ่มสูงกว่าดินที่ไม่ได้ใช้ ผลดังกล่าวน่าจะมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในลำไส้ไส้เดือนดิน ซึ่งปัจจุบันในประเทศไทยยังขาดข้อมูลและองค์ความรู้ด้านจุลินทรีย์ในลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่ส่งเสริมอยู่ในขณะนี้ ทำให้ไม่มีข้อมูลองค์ความรู้ในการควบคุมคุณภาพ หรือการพัฒนาต่อยอดผลิตภัณฑ์ได้ ทั้งนี้การเลี้ยงไส้เดือนดินเพื่อผลิตปุ๋ยมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน นั้นจัดเป็นกระบวนการผลิตปุ๋ยหมัก ที่ใช้ต้นทุนต่ำและได้ปุ๋ยอินทรีย์คุณภาพสูงกว่าปุ๋ยหมักทั่วไป และเมื่อผ่านการศึกษาวิจัยได้ข้อมูลองค์ความรู้ในด้านจุลินทรีย์ในปุ๋ยมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินแล้ว มีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถประยุกต์นำมาใช้สร้างผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพจากผลิตภัณฑ์มูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยสายพันธุ์ *Perionyx* sp., *Metaphire posthuma* จากธรรมชาติ และสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยง

2. เพื่อศึกษาชนิดแบคทีเรียในมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตจากไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.

3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีชีวภาพ และอายุการเก็บรักษา (shelf life) ของมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนสายพันธุ์ *Perionyx* sp.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. และสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* และ ชนิดของแบคทีเรียในมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตจากไส้เดือนดินพันธุ์ *Perionyx* sp.

2. ศักยภาพของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินต่อการผลิต plant growth promoters อายุการเก็บรักษา (shelf life) ผลิตภัณฑ์มูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน

3. องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยสามารถต่อยอดเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพจากไส้เดือนดินท้องถิ่นไทย เพื่อการเกษตรอย่างน้อย 1 ชนิด

ขอบเขตของการทำวิจัย

เก็บตัวอย่างไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* และสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากธรรมชาติในจังหวัดเชียงใหม่ และทำการศึกษาชนิดแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินทั้ง 2 สายพันธุ์โดยวิธีการแบบไม่เพาะเลี้ยง (unculturable technique) และแบบเพาะเลี้ยงได้ (culturable technique) จากนั้นนำไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. มาเลี้ยงในบ่อกินขยะอินทรีย์เพื่อผลิตปุ๋ยหมักและทำการศึกษาชนิดแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินจากบ่อเลี้ยงและจากมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตได้ รวมทั้งศึกษาถึงคุณสมบัติทางเคมีชีวภาพ และอายุการเก็บรักษา (shelf life) ของมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือน

นิยามศัพท์เชิงปฏิบัติการ

A	ลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma*
PO	ลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากฟาร์มวัวนม
PI	ลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน
V	มูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน
LV	น้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน
MRSLV	แบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS
N1-N15	แถบดีเอ็นเอบน acrylamide gel ที่แยกด้วยเทคนิค DGGE จากตัวอย่างลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma*
N16-N26	แถบดีเอ็นเอบน acrylamide gel ที่แยกด้วยเทคนิค DGGE จากตัวอย่างลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.จากฟาร์มวัวนม
N27-N38	แถบดีเอ็นเอบน acrylamide gel ที่แยกด้วยเทคนิค DGGE จากตัวอย่างลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดิน
N39-N48	แถบดีเอ็นเอบน acrylamide gel ที่แยกด้วยเทคนิค DGGE จากตัวอย่างปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตโดยใช้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.
N49-N66	แถบดีเอ็นเอบน acrylamide gel ที่แยกด้วยเทคนิค DGGE จากตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่ผลิตโดยใช้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.
IAA	Indol-3-acetic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
bp	Base Pairs
NCBI	National Center for Biotechnology Information
DMRT	Duncan's Multiple-Range Test

บทที่ 2
ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

ไส้เดือนดินและการใช้ประโยชน์

ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของไส้เดือนดิน (บพิธ และนันทพร, 2538)

ลักษณะลำตัวภายนอกที่เด่นชัดที่สุดของไส้เดือนดิน คือลักษณะการเป็นปล้องตั้งแต่หัวจนถึงส่วนท้ายของลำตัว มีรูปร่างเป็นรูปทรงกระบอกยาว หัวท้ายเรียวแหลม ลำตัวยาวประมาณ 10 – 20 เซนติเมตร บางชนิดอาจสั้นกว่าหรือยาวกว่านี้ เมื่อโตเต็มที่จะมีปล้องประมาณ 120 ปล้อง แต่ละปล้องจะมีเดือยเล็กๆ เรียงอยู่โดยรอบปล้อง ไส้เดือนดินไม่มีส่วนหัวที่ชัดเจน ไม่มีตา ไม่มีหนวดเหมือนในตัวแม่เพรียง แต่มีไคลเทลลัม เมื่อถึงระยะสืบพันธุ์ไคลเทลลัมจะเห็นได้ชัดเจนอยู่ตรงปล้องที่ 14-16 นอกจากนี้บริเวณลำตัวของไส้เดือนดินยังมีอวัยวะต่างๆ ที่สำคัญ ดังนี้

1. พรอสโตเมียม (Prostomium) มีลักษณะเป็นพูเนื้อที่ยืดหดได้ติดอยู่กับผิวด้านบนของช่องปากซึ่งเป็นตำแหน่งหน้าสุดของไส้เดือนดิน ยังไม่ถือว่าเป็นปล้องลักษณะคล้ายริมฝีปากเท่านั้น สำหรับหน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัด บางตำรากล่าวว่าใช้สำหรับกวาดอาหารเข้าปาก

2. เพอริสโตเมียม (Peristomium) ส่วนนี้นับเป็นปล้องแรกของไส้เดือนดินอยู่ถัดจาก โพรสโตเมียม มีลักษณะเป็นเนื้อบางๆ อยู่ล้อมรอบช่องปากและยืดหดได้

3. ช่องปาก อยู่ในปล้องที่1-3 เป็นช่องทางผ่านของอาหารเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งจะมีต่อมน้ำลายอยู่ในเยื่อบุช่องปากด้วย

4. เดือยหรือขน (Setae) มีลักษณะเป็นขนแข็งสั้นเป็นสารพวกไคตินที่งอกออกมาบริเวณผนังร่างกายชั้นนอกของไส้เดือนดิน สามารถยืดขยายหรือหดสั้นได้โดยอาศัยการทำงานของกล้ามเนื้อยืดหดที่ติดอยู่บริเวณฐานของรูขนแต่ละเส้น โดยทั่วไปรูปทรงของเดือยบนลำตัว ไส้เดือนดินจะมีรูปทรงดังต่อไปนี้ คือ รูปทรงกระบอก รูปทรงคล้ายเข็ม และรูปทรงคล้ายเส้นผม เดือยมีหน้าที่หลัก คือ ช่วยในการเกาะยึดและเคลื่อนที่ของไส้เดือนดิน

5. ช่องเปิดกลางหลัง (Dorsal pore) เป็นช่องเปิดขนาดเล็กตั้งอยู่ในร่องระหว่างปล้องบริเวณแนวกลางหลัง สามารถพบช่องเปิดชนิดนี้ได้ในไส้เดือนดินเกือบทุกชนิด ยกเว้นไส้เดือนดินจำพวกที่อาศัยอยู่ในน้ำหรือกึ่งน้ำ ในร่องระหว่างปล้องแรกๆ บริเวณส่วนหัวมักจะไม่ค่อยพบช่องเปิดกลางหลัง และในไส้เดือนดินบางสายพันธุ์จะแยกช่องเปิดกลางหลังได้ค่อนข้างยาก แต่ในบางสายพันธุ์จะสามารถมองเห็นได้ชัดเจน ช่องเปิดดังกล่าวจะเชื่อมต่อกับช่องภายในลำตัวและของเหลวในช่องลำตัว มีหน้าที่ขับของเหลวหรือเมือกภายในลำตัวออกมาช่วยให้ลำตัวภายนอก ชุ่มชื่นป้องกันการระคายเคือง และทำให้เคลื่อนไหวได้ง่าย

6. รูขับถ่ายของเสีย (Nephridiopore) เป็นรูที่มีขนาดเล็กมากและยากต่อการ สังเกตเห็น รูขับของเสียดังกล่าว เป็นทางออกของของเสียจากร่างกาย เป็นรูเปิดภายนอกของเนฟริเดีย (อวัยวะขับถ่าย

ของไส้เดือนดิน) รูขับถ่ายมีเกือบทุกปล้อง ยกเว้น 3-4 ปล้องแรก โดย *Pheretima* จะมีรูขับถ่ายของเสียขนาดเล็กมากและมีจำนวนต่อปล้องมาก สำหรับ *Lumbricus* มี 1 คู่ต่อ 1 ปล้อง ตั้งอยู่บริเวณด้านข้างท้องของลำตัวทั้งสองด้าน

7. ช่องสืบพันธุ์เพศผู้ (Male pore) เป็นช่องปล่อยสเปิร์ม จะมีอยู่ 1 คู่ ตั้งอยู่บริเวณลำตัวด้านท้องหรือด้านข้างท้อง ในปล้องที่ 18 ในสกุล *Pheretima* และอยู่ในปล้องที่ 15 ในสกุล *Lumbricus* หรือปล้องที่ 13 ช่องสืบพันธุ์เพศผู้แต่ละช่องจะมีลักษณะเป็นแอ่งคล้ายหลอดเล็กยาวเข้าไปภายใน ซึ่งไส้เดือนดินบางสายพันธุ์จะมีรูดังกล่าวอยู่บนต่อมปุ่มยึด (glandular papillae) สำหรับไส้เดือนดินพันธุ์อื่นๆ รูตัวผู้ดังกล่าวอาจตั้งอยู่ในปล้องที่แตกต่างกันกับที่ระบุเล็กน้อย

8. ช่องสืบพันธุ์เพศเมีย (Female pore) เป็นช่องออกไข่โดยทั่วไปมักจะตั้งอยู่ในปล้องถัดจากปล้องที่มีรังไข่ (ovary) มักจะพบเพียง 1 คู่ ตั้งอยู่ในร่องระหว่างปล้องหรือบนปล้อง ตำแหน่งที่ตั้งมักจะแตกต่างกันในไส้เดือนแต่ละสายพันธุ์ โดยไส้เดือนดินในวงศ์ Lumbricidae ช่องสืบพันธุ์เพศเมียจะตั้งอยู่บนปล้องที่ 14 ในสกุล *Pheretima* ช่องสืบพันธุ์เพศเมียจะมีเพียงรูเดียวตั้งอยู่กลางลำตัวด้านท้องปล้องที่ 14

9. ช่องเปิดสเปิร์มมาทีกา (Spermathecal pores) เป็นช่องรับสเปิร์มจากไส้เดือนดินคู่ผสมอีกตัวหนึ่งขณะมีการผสมพันธุ์แลกเปลี่ยนสเปิร์มซึ่งกันและกัน ช่องเปิดสเปิร์มมาทีกามี 2-4 คู่ บริเวณร่องระหว่างปล้องที่ 5/6, 6/7, 7/8 และ 8/9 โดยสกุล *Pheretima* มี 4 คู่ สำหรับสกุล *Lumbricus* มีเพียง 2 คู่เท่านั้น ในร่องระหว่างปล้องที่ 9/10 กับ 10/11 เมื่อรับสเปิร์มแล้วจะนำไปเก็บไว้ในถุงเก็บสเปิร์ม (seminal receptacle)

10. ปุ่มยึดสืบพันธุ์ (Genital papilla) เป็นอวัยวะที่ใช้ช่วยในการเกาะยึดขณะที่ไส้เดือนดินจับคู่ผสมพันธุ์กัน โดย *Pheretima posthuma* มี 2 คู่ บนปล้องที่ 17 และ 19 สำหรับ *Pheretima* ชนิดอื่นๆ มีหลายคู่อยู่ใต้ปล้องที่มีช่องสืบพันธุ์เพศผู้ ส่วนมากมี 4-5 คู่ สำหรับสกุล *Lumbricus* ไม่มี genital papilla แต่มีเดือยสืบพันธุ์ (genital setae) ซึ่งเป็นเดือยที่เปลี่ยนแปลงไปช่วยยึดเกาะ และจะพบบริเวณปล้องที่มีช่องสืบพันธุ์เพศผู้ และปล้องที่มีช่องเปิดของสเปิร์มมาทีกา นอกจากนี้ยังใช้เมือกบริเวณ ไคลเทลลัมช่วยยึดเกาะด้วย

11. ไคลเทลลัม (Clitellum) เป็นอวัยวะที่ใช้ในการสร้างเมือกไข่ขาว (albumen) หุ้มไข่ และสร้างเมือกโคคูน ไคลเทลลัมจะพบในไส้เดือนดินตัวเต็มวัยเท่านั้น โดยจะตั้งอยู่บริเวณปล้องด้านหน้าใกล้กับส่วนหัว ครอบคลุมปล้องตั้งแต่ 2-5ปล้อง โดยไส้เดือนดินในน้ำจืด *Nais* sp. มีไคลเทลลัม 2 ปล้อง (ปล้องที่ 6 และ 7) ส่วนไส้เดือนดินสกุล *Pheretima* มี 3 ปล้อง (ปล้องที่ 14-16) และสกุล *Lumbricus* มี 6-7 ปล้อง (ปล้องที่ 32-37)

12. ทวารหนัก (Anus) เป็นรูเปิดที่ค่อนข้างแคบเปิดออกในปล้องสุดท้าย ซึ่งใช้สำหรับขับกากอาหารที่ผ่านการย่อยและดูดซึมแล้วออกภายนอกลำตัว

บทบาทที่เป็นประโยชน์ของไส้เดือนดิน

1. ช่วยพลิกกลับดิน นำดินด้านล่างขึ้นมาด้านบนโดยการกินดินที่มีแร่ธาตุบริเวณด้านล่าง แล้วถ่ายมูลบริเวณผิวดินด้านบน ช่วยให้เกิดการผสมคลุกเคล้าแร่ธาตุในดิน นำแร่ธาตุที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในชั้นใต้ดินขึ้นมาด้านบนให้พืชดูดนำไปใช้ได้

2. ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน ซากพืช ซากสัตว์ และอินทรียวัตถุต่างๆ ทำให้ธาตุต่างๆ อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น ไนโตรเจน ในรูป แอมโมเนียม และ ไนเตรท ฟอสฟอรัส ในรูปที่เป็นประโยชน์ โพแทสเซียม ที่แลกเปลี่ยนได้ และธาตุอาหารพืชอื่นๆ อีกหลายชนิด รวมทั้งสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และวิตามิน จะถูกปลดปล่อยออกมาด้วย

3. ช่วยเพิ่มและแพร่กระจายจุลินทรีย์ในดินที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น ไรโซเบียม ไมคอร์ไรซา ในบริเวณรากพืช

4. การชอนไชของไส้เดือนดิน ทำให้ดินร่วนซุย การถ่ายเทน้ำและอากาศดี ดินอุ้มน้ำได้ดีขึ้น เพิ่มช่องว่างในดินทำให้รากพืชชอนไชได้ดี

แนวทางการนำไส้เดือนดินมาใช้ประโยชน์

จากผลการวิจัยไส้เดือนดินในด้านต่างๆ ในปัจจุบัน ทำให้มีการนำไส้เดือนดินไปใช้ประโยชน์ในแนวทางต่างๆ มากขึ้น ดังต่อไปนี้

1. ปรับปรุงโครงสร้างของดินและเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน

2. จัดการปัญหาขยะโดยนำไส้เดือนดินมาย่อยสลายขยะอินทรีย์และเศษอาหารจากบ้านเรือนเพื่อผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินนำกลับมาใช้ในภาคเกษตร

3. นำผลผลิตของไส้เดือนดินที่ขยายได้มาใช้เลี้ยงสัตว์ เนื่องจากเนื้อเยื่อไส้เดือนดินมีส่วนประกอบของโปรตีนที่สูงมาก ช่วยลดค่าใช้จ่ายค่าอาหารสัตว์

4. ใช้เป็นอาหาร ยาบำบัดโรค หรือยาบำรุงเพื่อเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ

5. ใช้เป็นดัชนีทางสิ่งแวดล้อมในการตรวจสอบธาตุโลหะหนัก และการปนเปื้อนของสารเคมีทางการเกษตรในดิน (อานัฐ, 2543)

การใช้ไส้เดือนดินในด้านการปรับปรุงดินและสภาพแวดล้อม

ในการพลิกฟื้นผืนดินที่ปล่อยร้างไว้มาใช้ใหม่ สมัยก่อนมักใช้วิธีการสร้างความอุดมสมบูรณ์ให้กับดินที่ปลูกพืชที่เสื่อมลง โดยการปล่อยร้างทิ้งไว้หลายๆปี เติมปุ๋ยคอกหรือใช้วิธีการปลูกพืชคลุมดินสิ่งที่กล่าวผ่านมานั้นเป็นการเพิ่มอินทรียวัตถุในดินเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก ดังนั้นในการนำไส้เดือนดินมาใช้ในการปรับปรุงโครงสร้างดินที่ไม่ดีให้เกิดประสิทธิภาพที่ดีขึ้นและเร็วขึ้น เนื่องจากไส้เดือนดินทำให้ดีระบายน้ำและอากาศได้ดีขึ้น ทำให้จุลินทรีย์ต้องการใช้ออกซิเจนต่างๆ เจริญเติบโตได้ดีและมีแหล่งอินทรียวัตถุเป็นอาหาร ทำให้เกิดสภาพนิเวศที่เกื้อกูลกันระหว่างไส้เดือนดินกับจุลินทรีย์ในดินในการย่อยสลายอินทรียวัตถุและเกิดเป็นธาตุอาหารที่มีประโยชน์ต่อพืช ไส้เดือนดินสีเทาถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความคงทนต่อสภาพของพื้นที่ใน

แปลงปลูกพืชได้มากกว่าเนื่องจากเป็นไส้เดือนดินที่พบในดินสวนที่มีอินทรียวัตถุต่ำ ดังนั้น เพื่อให้ประสิทธิภาพในการทำงานของไส้เดือนดินควรเลือกใช้ไส้เดือนดินให้เหมาะสมกับสภาพ เช่น การใช้ไส้เดือนดินสีเทาปล่อยลงในแปลงเพาะปลูกร่วมกับเพิ่มอินทรียวัตถุให้กับพื้นที่ที่จะทำการปรับปรุงโครงสร้าง หากใส่ไส้เดือนดินมากเกินไปความสามารถในการรองรับของไส้เดือนดินก็จะขาดแคลนอาหาร ไส้เดือนดินกินอินทรียวัตถุสูงความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารก็สูงมากขึ้นด้วย

นอกจากการปล่อยไส้เดือนดินลงในแปลงเพาะปลูกเพื่อปรับปรุงโครงสร้างของดินโดยตรงแล้ว การใส่มูลไส้เดือนดินลงไปก็ทำให้ดินมีความอุดมสมบรูณ์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมูลไส้เดือนดินมีค่า pH ที่เหมาะสม และมีอินทรียวัตถุสูง มีไนโตรเจนอยู่ในรูปไนเตรทและแอมโมเนีย แมกนีเซียมและฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์สูง ดินที่มีอินทรียวัตถุสูงและมีส่วนประกอบของธาตุอาหารที่ได้จากการย่อยสลายอินทรียวัตถุ (อานัฐ, 2550)

ไส้เดือนดินช่วยแพร่กระจายเชื้อจุลินทรีย์และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ในบริเวณที่มีความอุดมสมบรูณ์ไม่มีสารพิษปนเปื้อนจะมีจุลินทรีย์จำนวนมากซึ่งยังขึ้นอยู่กับปริมาณอินทรียวัตถุด้วย จุลินทรีย์จะประกอบด้วย เชื้อรา 25 % เชื้อแบคทีเรีย 20-25 % และสัตว์ขนาดเล็กในดินอีก 5 % ในดินที่มีพื้นที่ 1,000 ตารางเมตร มีจุลินทรีย์คิดเป็นน้ำหนัก 700 กิโลกรัม คิดเป็นน้ำหนักแห้ง 140 กิโลกรัม มีองค์ประกอบที่เป็นคาร์บอน จำนวน 70 กิโลกรัม ไนโตรเจน 11 กิโลกรัม ซึ่งลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนลดการใช้สารเคมี จุลินทรีย์ขนาดเล็กช่วยส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตหลายทาง เช่น จะเห็นได้ว่าไส้เดือนดินนอกจากจะกินอาหารแบบพึ่งพาอาศัยกัน และจะกินอาหารที่มีส่วนประกอบของจุลินทรีย์ต่างๆแล้ว ไส้เดือนดินยังแพร่กระจายจุลินทรีย์ที่กินเข้าไปแพร่ไปยังพื้นที่ต่างๆได้ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายหรือสิ้นเปลื้องแรงงานมากแต่ได้ผลประโยชน์คุ้มค่า (อานัฐ, 2550)

ตารางที่ 1 จำนวนจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Lumbricus rubellus*

จุลินทรีย์	จำนวน (x 10^6)		
	ลำไส้ส่วนหน้า	ลำไส้ส่วนกลาง	ลำไส้ส่วนท้าย
แอคติโนมัยซิส	26	358	15,000
แบคทีเรีย	475	32,900	440,700

ที่มา : ดัดแปลงจาก Parle (1959)

กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์บางกลุ่มในสภาพธรรมชาติจะไม่เคลื่อนที่ และจะสร้างโคโลนีอยู่เป็นแห่งๆ ดังนั้นจุลินทรีย์จะมีความสามารถน้อยมากในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หากปราศจากการช่วยเหลือให้เกิดการแพร่กระจายตัวลงสู่ดินในบริเวณรากพืช แต่ในการทำการเกษตรในปัจจุบัน

เกษตรกรจะช่วยแพร่กระจายเชื้อดังกล่าวโดยการผสมเชื้อดังกล่าวกับเมล็ดที่ปลูก หรือ การผสมเชื้อดังกล่าวลงไปในดินโดยตรงซึ่งก็ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แต่วิธีการเหล่านี้เมื่อนำไปใช้กับแปลงปลูกขนาดใหญ่จะทำได้ลำบากต้องใช้แรงงานคนมากและจุลินทรีย์สามารถแพร่กระจายตัวได้อย่างจำกัดในดินนอกจากวิธีการข้างต้นแล้ว ยังมีการนำพาจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวหรือกลุ่มอื่นๆ ลงไปในดินได้โดยการนำพาของกระแสน้ำซึ่งจะเป็นการนำพาลงไปในดินแนวดิ่ง และโดยไส้เดือนดิน ซึ่งไส้เดือนดินจะนำพาหรือแพร่กระจายเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยการเคลื่อนที่ของไส้เดือนดินในพื้นดินทั้งในแนวดิ่งและแนวนอน ซึ่งการเคลื่อนที่ของไส้เดือนดินดังกล่าวจะสามารถช่วยส่งเสริมการแพร่กระจายตัวของจุลินทรีย์หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ลงสู่ดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยจุลินทรีย์ดังกล่าว ประกอบด้วย *Pseudomonas, Rhizobium* และ เชื้อ *Mycorrhiza* ซึ่งไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Lumbricus rubellus* จะช่วยแพร่กระจายเชื้อ *Pseudomonas putida* และ *Bradyrhizobium japonicum* ในบริเวณที่มีน้ำไหลซึมลงไปในดินได้อย่างน้อย 5% และ 1% ตามลำดับ (Madsen and Alexander, 1982) นอกจากนี้พบว่า เชื้อรา *Rhizobium japonicum* ซึ่งเป็นเชื้อราชนิดที่พบว่ามีการสร้างปุ่มปมในรากของต้นถั่วลิสง จะถูกไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* และ *Lumbricus terrestris* กินเข้าไปและผ่านลำไส้ของไส้เดือนดินออกมาโดยไม่ได้รับอันตรายและเมื่อไส้เดือนดินเคลื่อนที่ในดินและถ่ายมูลพร้อมเชื้อราดังกล่าวออกมาในดินในบริเวณต่างๆก็จะทำให้เชื้อราดังกล่าวแพร่กระจายตัวและเจริญเติบโตและสร้างกลุ่มอยู่บริเวณกองมูลเหล่านั้น นอกจากนี้บริเวณที่พบไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Lumbricus terrestris* อยู่ จะพบว่ามีปริมาณปุ่มปมบนรากถั่วลิสงจำนวนมากขึ้นด้วย (Rouelle, 1983) ซึ่งนอกจากการถ่ายมูลของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆที่ไส้เดือนดินกินเข้าไปโดยไม่ได้รับอันตรายแล้ว ยังพบว่า ในการย่อยสลายอินทรียวัตถุที่มีเชื้อ *Mycorrhiza* ติดอยู่ของไส้เดือนดิน จะส่งเสริมให้เกิดการแพร่กระจายของสปอร์ และเส้นใยที่แตกหักของเชื้อ *Mycorrhiza* ดังกล่าวได้ด้วย (Reddell and Spain, 1991)

ในการใส่ไส้เดือนดินลงไปในดินต้องคำนึงถึงจำนวนไส้เดือนต่อพื้นที่ด้วย เนื่องจากมีข้อจำกัดของประชากรไส้เดือนดินต่อพื้นที่ หากใส่ไส้เดือนมากเกินความสามารถในการรองรับของดินไส้เดือนดินก็จะขาดแคลนอาหาร และเมื่อใส่ไส้เดือนดินลงไปในพื้นที่แล้ว การใส่ปูนขาวลงไปในดินมีผลทำให้ประชากรของไส้เดือนเพิ่มสูงขึ้นได้ นอกจากนี้ควรดูแลในเรื่องความชื้นด้วย เนื่องจากความชื้นจะทำให้จุลินทรีย์ในดินย่อยสลายอินทรียวัตถุได้เร็ว ทำให้ไส้เดือนดินสามารถดูดกินอินทรียวัตถุที่เน่าสลายได้เร็วขึ้นด้วย ทำให้ดินมีอินทรียวัตถุเพิ่มสูงขึ้นและมีส่วนประกอบของธาตุอาหารที่เกิดจากการย่อยสลายอินทรียวัตถุของไส้เดือนดินอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้เพิ่มสูงขึ้นด้วย (อานัฐ, 2550) เคยมีตัวอย่างของการนำไส้เดือนดินพันธุ์ *Allolobophora caliginosa* และ *Lumbricus terrestris* ไปใส่ในดินที่ปลูกไม้ผลบริเวณริมชายฝั่งแม่น้ำในอัตรา 800 ตัว/ต้น พบว่า ไม้ผลดังกล่าวบริเวณที่มีไส้เดือนดินอยู่จะเจริญเติบโตมากกว่าต้นที่ไม่ใส่ไส้เดือนดิน (Rhee, 1971)

นอกจากการปล่อยไส้เดือนดินลงไปในแปลงเพาะปลูกเพื่อปรับปรุงโครงสร้างดินโดยตรงแล้ว การใส่มูลไส้เดือนดินลงไปในดิน ก็สามารถปรับปรุงโครงสร้างของดินและทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์มากขึ้นได้ด้วยเช่นกัน เนื่องจากมูลไส้เดือนมักจะมีค่าพีเอชที่เหมาะสม และมีอินทรียวัตถุสูง มีไนโตรเจน ในรูป

แอมโมเนียม และ ไนเตรท แมกนีเซียม และ ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ในปริมาณสูง และมีความสามารถในการกักเก็บความชื้นได้ดีรวมทั้งมีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์อยู่หลายชนิด (Lunt and Jacobson, 1944)

Springett and Syers (1979) ได้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของรากต้นกล้าหญ้าไร (Ryegrass) ในบริเวณที่มีมูลของไส้เดือนสายพันธุ์ *Allolobophora caliginosa* และ *Lumbricus rubellus* กับบริเวณที่ไม่มีมูลของไส้เดือนสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่า ต้นกล้าหญ้าไรที่ในบริเวณที่มีมูลไส้เดือนดินดังกล่าวเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นกล้าหญ้าไรในบริเวณที่ไม่มีมูลของไส้เดือนดิน พวกเขาสรุปว่า ไส้เดือนดินเหล่านั้นจะเปลี่ยนธาตุอาหารพืชให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ ทำให้ต้นกล้าหญ้าไรสามารถดูดธาตุอาหารนั้นไปใช้ได้ดี ส่งผลให้ต้นเจริญเติบโต และกล่าวได้ว่า มูลของไส้เดือนดินพันธุ์ *Lumbricus rubellus* อาจมีส่วนประกอบของสารที่มีคุณสมบัติคล้ายกับออกซิน (Auxin) หรือสารบางอย่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ ออกซินในพืช เช่นเดียวกับ Graff and Makeschin (1980) ที่ได้ทดสอบผลของสารที่ผลิตโดยไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Lumbricus terrestris, Allolobophora caliginosa* และ *Eisenia foetida* ต่อการผลิตหญ้าไรในประเทศเยอรมนี และได้สรุปว่าสารที่ปลดปล่อยจากไส้เดือนดินทั้ง 3 ชนิด มีผลกระทบต่อผลผลิตที่ได้

การใช้ไส้เดือนดินกำจัดขยะอินทรีย์ชนิดต่างๆ

มีการวิจัยในด้านการจัดการปัญหาขยะอินทรีย์ที่เกิดจากการเลี้ยงสัตว์หรือการผลิตพืช และของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ โดยใช้ไส้เดือนดินอย่างกว้างขวาง ในระยะเริ่มแรกมีการวิจัยที่สถานีทดลองโรธาม์ส ในประเทศอังกฤษ ในปี 1980 ซึ่งขยะอินทรีย์ที่ใช้ไส้เดือนดินย่อยสลาย ประกอบด้วย มูลหมู มูลวัว มูลม้า มูลกระต่าย ของเสียจากการเลี้ยงไก่ไข่ ไก่กระทง ไก่งวง และเป็ด และกากเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตต่างๆ (Edwards, 1985) ซึ่งในภายหลังได้มีการวิจัยใช้ไส้เดือนดินกำจัดเศษเหลือทิ้งจากการผลิตผักด้วย โดยเฉพาะเศษเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมการผลิตเห็ด อุตสาหกรรมมันฝรั่ง อุตสาหกรรมการผลิตเหล้าและเบียร์ และเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ ซึ่งในการทดลองระยะเริ่มต้นได้ทดลองในห้องปฏิบัติ การขนาดเล็ก แต่ต่อมาได้พัฒนาและขยายขนาดไปทดลองในระดับพื้นที่ที่ใหญ่ขึ้น เช่น ในฟาร์ม และในที่สุดก็พัฒนาระบบต่างๆ ให้เหมาะสมสำหรับไปใช้ในเชิงพาณิชย์

ในกระบวนการจัดการขยะเหลือทิ้งต่างๆ เหล่านี้โดยใช้ไส้เดือนดิน โดยมากจะมีวัตถุประสงค์ 2 ข้อหลัก คือ

1. เพื่อนำเศษเหลือใช้หรือขยะอินทรีย์ทางการเกษตรมาให้ไส้เดือนดินย่อยสลาย แล้วนำผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายขยะอินทรีย์เหล่านั้นมาใช้เป็นปุ๋ยใส่เข้าไปในพื้นดินที่ทำการเกษตรเพื่อปรับปรุงโครงสร้างของดินและเพิ่มแร่ธาตุอาหารแก่พืช และนำมาใช้กับการผลิตพืชสวนประดับ เช่น การใช้เป็นวัสดุเพาะกล้า หรือใช้ผสมกับวัสดุปลูกอื่นๆ สำหรับปลูกไม้กระถางทางการค้า เพื่อลดต้นทุนการซื้อปุ๋ยเคมี

2. เพื่อนำผลผลิตของตัวไส้เดือนดินที่ขยายได้จากขบวนการกำจัดขยะ นำมาผ่านขบวนการที่เหมาะสมเพื่อผลิตเป็นอาหารโปรตีนสูงสำหรับเลี้ยงสัตว์ต่างๆ เช่น ปลา ไก่ หมู และสัตว์ชนิดอื่นๆ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการซื้อโปรตีนอาหารสัตว์

สายพันธุ์ไส้เดือนดินที่ใช้กำจัดขยะอินทรีย์ทางการค้า

การจัดจำแนกวงศ์ไส้เดือนดังที่กล่าวมาเป็นเพียงตัวอย่างบางส่วนเท่านั้นยังมีนักวิทยาศาสตร์ อีกหลายท่านที่ได้จัดจำแนกไส้เดือนในระดับอื่นๆ อีกหลายระดับ ที่มีความซับซ้อนมากกว่านี้ ซึ่งในปัจจุบันได้จัดจำแนกไส้เดือนดินทั่วโลกได้ 4,000 กว่าชนิด แต่มีสายพันธุ์ไส้เดือนดินที่นิยมนำมาใช้กำจัดขยะอินทรีย์ทางการค้าประมาณ 15 ชนิดเท่านั้น โดยส่วนใหญ่จะเป็นไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Megadrili ในวงศ์ Lumbricidae ซึ่งเป็นไส้เดือนดินกลุ่มที่อาศัยอยู่ในขยะอินทรีย์ และในมูลสัตว์ เป็นส่วนใหญ่ ตัวอย่างสายพันธุ์ไส้เดือนดินที่นิยมใช้ทางการค้า ประกอบด้วย

อายซิเนีย ฟูทิดา (*Eisenia foetida*)

ชื่อสามัญ: The Tiger worm, Manure Worm, Compost Worm

ไส้เดือนดินสายพันธุ์ อายซิเนีย ฟูทิดา (*Eisenia foetida*) เป็นไส้เดือนดินสีแดงที่มีลำตัวกลมขนาดเล็ก ลำตัวมีสีแดงสด เห็นปล้องแต่ละปล้องแบ่งอย่างชัดเจน สามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว และมีกลิ่นตัวที่รุนแรง

โดยทั่วไปประเทศในแถบยุโรป และอเมริกา ส่วนมากมักจะใช้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* หรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันคือ สายพันธุ์ *Eisenia andrei* ในการกำจัดขยะอินทรีย์ซึ่งมีหลายเหตุผลที่ทำให้เลือกใช้ไส้เดือนสายพันธุ์นี้ คือไส้เดือนสายพันธุ์นี้มีอยู่ทั่วไปในบริเวณที่มีขยะอินทรีย์อยู่ โดยพวกมันจะสร้างกลุ่มและเจริญเติบโตอยู่ในกองขยะอินทรีย์เหล่านั้น และมีความทนทานต่อช่วงอุณหภูมิที่กว้าง และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในขยะอินทรีย์ที่มีความชื้นได้หลายระดับ โดยรวมแล้วจะเป็นไส้เดือนสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมดีมาก และเลี้ยงง่ายเหมาะสมในการนำมาเลี้ยงในขยะอินทรีย์ได้หลายชนิดที่ปะปนกัน และพบว่าเมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไส้เดือนสายพันธุ์อื่น ภายในฟาร์ม พบว่า จะมีความทนทานมากกว่าไส้เดือนสายพันธุ์อื่นๆ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานานจะพบว่ามีอัตราส่วนประชากรที่เพิ่มขึ้นของไส้เดือนสายพันธุ์ *Eisenia foetida* อยู่เป็นจำนวนมากกว่าไส้เดือนสายพันธุ์อื่นที่เลี้ยงพร้อมกัน ดังนั้นจึงสามารถนำมาเลี้ยงใช้กำจัดขยะอินทรีย์ได้ดี

ยูดริลลัส ยูจีนิแอ (*Eudrilus eugeniae*)

ชื่อสามัญ: African Night Crawler

ไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler มีขนาดลำตัวค่อนข้างใหญ่ สามารถเคลื่อนที่ได้รวดเร็วและไต่ขึ้นขอบบ่อได้เก่งมาก ซึ่งมีการเลี้ยงไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้กันอย่างกว้างขวาง ไส้เดือนสายพันธุ์นี้มีความเหมาะสมมากในการนำมาผลิตเป็นโปรตีนสำหรับเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีขนาดใหญ่และมีอัตราการแพร่พันธุ์ได้สูงมาก แต่มีข้อเสียตรงที่ไส้เดือนสายพันธุ์นี้ไม่ค่อยทนทานต่ออุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม เลี้ยงยาก และเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ยากด้วย สำหรับในด้านการนำมาใช้จัดการกับขยะพบว่า ไส้เดือนสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการย่อยสลายขยะในปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว เป็นไส้เดือนดินสายพันธุ์ในเขตร้อน ซึ่งจะชอบอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง โดยจะเจริญเติบโตได้ไม่ดี ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 16 องศาเซลเซียส และจะตายในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส (Viljoen *et al.*,1992) ดังนั้นการเลี้ยงไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้ใน

ประเทศ เขตหนาวจะถูกจำกัดการเลี้ยงเฉพาะภายในโรงเรือนที่มีการควบคุมอุณหภูมิในช่วงฤดูหนาวเท่านั้นถึงจะเลี้ยงได้ สำหรับการเลี้ยงแบบภายนอกโรงเรือน จะเหมาะสมกับเฉพาะพื้นที่ในเขตร้อน หรือกึ่งร้อนนั้น

ลัมบริคัส รูเบลลัส (*Lumbricus rubellus*)

ชื่อสามัญ: Red worm, Red Marsh Worm, Red Wriggler

ไส้เดือนสายพันธุ์ ลัมบริคัส รูเบลลัส (*Lumbricus rubellus*) เป็นไส้เดือนแดงที่มีลำตัวแบนและมีลำตัวขนาดกลางไม่ใหญ่มาก โดยจะมีลำตัวใหญ่กว่าไส้เดือนสายพันธุ์อายซิเนีย ฟูทิดา และเล็กกว่าไส้เดือนสายพันธุ์อัฟริกัน ไนท์ ครอเลอร์

ไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้พบได้ทั่วไปในดินที่มีความชุ่มชื้น หรือบริเวณที่มีมูลสัตว์หรือกากสิ่งปฏิกูล ไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้มีความทนทานต่อสภาพอุณหภูมิ และความชื้นในช่วงกว้าง ไม่ค่อยเคลื่อนไหวมาก กินเศษซากอินทรียวัตถุได้มากและเร็ว เป็นไส้เดือนดินพันธุ์การค้าที่มีความเหมาะสมและนิยมนำมาใช้ย่อยสลายขยะอินทรีย์เพื่อผลิตเป็นปุ๋ยหมักในต่างประเทศ

โพลีฟีเรททิมา อีลองกาตา (*Polypheretima elongata*)

ไส้เดือนสายพันธุ์นี้เคยนำมาทดลองใช้ในกระบวนการกำจัดขยะอินทรีย์ เช่น ขยะที่ได้จากเทศบาล ขยะหรือของเสียที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ ของเสียจากมนุษย์ สัตว์ปีก มูลวัว และเศษเหลือทิ้งจากการผลิตเห็ดในอินเดีย ซึ่งในประเทศอินเดียได้ใช้ไส้เดือนสายพันธุ์นี้ในการทำปุ๋ยหมักทางการค้าที่สะดวกและได้ผลดีโดยสามารถย่อยสลายขยะที่เป็นกากได้ 8 ตัน/วัน ไส้เดือนสายพันธุ์นี้พบเฉพาะในเขตร้อน และไม่สามารถดำรงชีวิตรอดได้ในเขตหนาว

เดนโดรแบนา วีนีตา (*Dendrobaena veneta*)

ไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้มีลำตัวขนาดใหญ่ และมีศักยภาพพอสำหรับนำไปใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน ไส้เดือนสายพันธุ์นี้จะอาศัยอยู่ในดิน และเจริญเติบโตได้ช้าและแพร่พันธุ์ได้ไม่ค่อยเร็วนัก ไส้เดือนสายพันธุ์นี้ไม่เหมาะสมหรือมีความเหมาะสมน้อยมากสำหรับนำไปใช้ในการย่อยสลายขยะอินทรีย์

เพอริโอนีกซ์ เอกซ์คาวาตัส (*Perionyx excavatus*)

ชื่อสามัญ: Indian Blue Worm

ไส้เดือนสายพันธุ์นี้เป็นไส้เดือนดินในเขตร้อน ซึ่งขยายพันธุ์ได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายเหมือนกับไส้เดือนสายพันธุ์ *Eisenia foetida* และในการเก็บเกี่ยวผลผลิตหรือแยกไส้เดือนดินออกจากปุ๋ยหมักได้ง่ายมาก แต่มีข้อเสีย คือ มันมีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมได้ค่อนข้างต่ำ สำหรับการเลี้ยงไส้เดือนสายพันธุ์นี้ในเขตหนาว แต่ในสภาพเขตร้อนจะเหมาะสมมากสำหรับการเลี้ยงไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้โดยเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่พบได้ทั่วไปในเอเชียและมีการนำมาใช้ในกระบวน การผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินในประเทศฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย (Kale *et al.*,1982; Edwards *et al.*,1995; Neuhauser *et al.*,1988)

การผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (อานัฐ, 2550)

ในการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินจากขยะอินทรีย์และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ มีขั้นตอนการเตรียมการดังต่อไปนี้

1. คัดเลือกสายพันธุ์ไส้เดือนดินที่จะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน โดยพิจารณาในด้านอัตราการแพร่พันธุ์ การเจริญเติบโต การอยู่รอด และความต้านทานต่อสภาพแวดล้อม

2. จัดหาพื้นที่ที่เหมาะสมกับไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่เลือกใช้โดยพิจารณาจากสภาพแหล่งที่อยู่อาศัยเดิมในธรรมชาติของไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่จะนำมาเลี้ยง ซึ่งหากเลือกใช้พื้นที่ที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ไส้เดือนดินที่ใช้ ก็จะสามารถลดค่าใช้จ่ายในด้านการจัดการควบคุมสภาพแวดล้อมในระบบการผลิตลดลงได้

3. ศึกษาถึงแหล่งอาหารของไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่จะนำมาเลี้ยงว่าประกอบด้วยอะไรบ้าง และสายพันธุ์ดังกล่าวชอบอะไรเป็นพิเศษ เช่น ไส้เดือนดินที่อาศัยอยู่ในมูลสัตว์จะมีแหล่งอาหารมาจากมูลสัตว์ ไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่อาศัยอยู่ใต้เศษซากพืชก็จะมีแหล่งอาหารมาจากเศษพืชเหล่านั้นเป็นต้น

4. เลือกรูปแบบหรือระบบการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน โดยพิจารณาถึงความคุ้มค่าและประสิทธิภาพในการกำจัดขยะเพื่อผลิตปุ๋ยหมัก โดยง่ายต่อการจัดการ สามารถปรับปรุงและพัฒนาระบบการผลิตหรือขยายขนาดของระบบการผลิตต่อไปได้ในอนาคต

5. จัดหาแหล่งขยะอินทรีย์ที่จะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่เหมาะสมต่อไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่คัดเลือก เช่น เศษขยะสดในตลาดหรือชุมชน มูลสัตว์ต่างๆ หรือ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และจากภาคอุตสาหกรรม

6. ศึกษาถึงวิธีการนำปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ได้จากการผลิตมาผลิตเป็นวัสดุสำหรับปลูกพืชชนิดต่างๆ โดยนำปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารต่างๆ แล้วนำไปทดสอบกับพืชหาข้อจำกัดแล้วนำมาปรับปรุงคุณภาพจนได้ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่มีคุณภาพดีจึงผ่านขบวนการบรรจุเพื่อจำหน่ายต่อไป

7. ศึกษาวิธีการเก็บผลผลิตจากตัวไส้เดือนดินที่ขยายเพิ่มขึ้น แล้วนำไปผ่านขบวน การผลิตเป็นอาหารโปรตีนสูงใช้เป็นอาหารเสริมเลี้ยงสัตว์ชนิดต่างๆ โดยวิเคราะห์หาปริมาณคุณค่าทางด้านโภชนา การและทดสอบความเป็นพิษต่อสัตว์ด้วย

ปุ๋ยหมักและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน (อานัฐ, 2550)

ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (Vermicompost) หมายถึง เศษซากพืชอินทรียวัตถุต่างๆ รวมทั้งดินและจุลินทรีย์ที่ไส้เดือนดินกินเข้าไปแล้วผ่านกระบวนการย่อยสลายอินทรียวัตถุเหล่านั้นภายในลำไส้ของไส้เดือนดิน แล้วจึงขับถ่ายเป็นมูลออกมาทางรูทวาร ซึ่งมูลที่ได้จะมีลักษณะเป็นเม็ดสีดำ มีธาตุอาหารพืชอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ในปริมาณที่สูง และมีจุลินทรีย์จำนวนมาก ซึ่งในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักโดยใช้ไส้เดือนดินขยะอินทรีย์ ที่ไส้เดือนดินกินเข้าไป และผ่านการย่อยสลายในลำไส้แล้วขับถ่ายออกมา มูลไส้เดือนดินที่ได้เรียกว่า “ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน”

น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน (Liquid Vermicompost) หมายถึง น้ำที่ได้จากกระบวน การผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินซึ่งเป็นน้ำที่ได้จากการเน่าสลายของเศษขยะอินทรีย์ที่ใช้เป็นอาหารของไส้เดือนดินซึ่งเป็นน้ำในเซลล์ของพืชผัก ผลไม้ และเศษอาหารต่างๆ หรือน้ำที่ได้จากวัสดุที่นำมาใช้ให้ไส้เดือนดินกำจัด โดยน้ำหมักที่ได้จะมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลดำ คล้ายน้ำโคล่า ไม่มีกลิ่นเหม็น มีส่วนประกอบของธาตุอาหารพืช และจุลินทรีย์หลายชนิด

ตารางที่ 2 ปริมาณธาตุอาหารพืชที่มีในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน ที่ใช้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ขี้ตาแร่ย่อยสลาย

ชนิดขยะอินทรีย์	ปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน						
	%N	ส่วนในล้านส่วน (ppm)				EC mS/cm	pH
		P	K	Ca	Mg		
มูลวัวนม	0.770	3,664	9,478	3,394	1,332	5,900	9.0
เปลือกแตงโม	0.035	5,872	9,799	16,466	2,616	6,300	9.1
กากมะพร้าว	0.105	406	1,790	2,943	524	1,420	7.1
เปลือกแตงโมผสมกับกากมะพร้าว	0.280	2,368	5,758	8,206	1,544	2,600	8.1
เปลือกแตงโมผสมกับมูลวัวนม	0.035	6,680	10,828	19,204	3,179	6,100	9.4
เปลือกแตงโมผสมกับมูลวัวนมและกากมะพร้าว	0.070	4,385	9,310	13,660	2,468	4,900	9.2

ที่มา : นิรันดร์ (2547)

แบคทีเรียและเทคนิคการจำแนกแบคทีเรีย

การจำแนกกลุ่มแบคทีเรียตามอนุกรมวิธาน (ชาญณรงค์, 2558)

การจัดกลุ่มแบคทีเรียตามหลักวิชาของการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่ (Taxonomy) จัดตามพื้นฐานของความเหมือนกันหรือความสัมพันธ์กันของแบคทีเรีย (similarities or relationships)

1.Kingdom

สิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต (Procaryote organisms) ทั้งหมดจะถูกจัดอยู่ใน Kingdom Procaryotae โปรคาริโอต (Procaryotes) หมายความรวมถึง แบคทีเรียและแบคทีเรียที่ก่อโรค (bacterial pathogens) ของคนและสัตว์ ขณะที่ยูคาริโอต (Eucaryotes) หมายความรวมถึงยีสต์ (yeasts) รา (fungi) โปรโตซัว (protozoa) พืชชั้นสูง (higher plants) คน และสัตว์ ความแตกต่าง ของ โปรคาริโอตและยูคาริโอต

Procaryotae มีโครงสร้างทางพันธุกรรมที่เป็นโครงสร้างดั้งเดิม (primitive genetic Structure) คือมีนิวเคลียสที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane)

Eucaryotae มีนิวเคลียสที่เป็น True Nucleus คือมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส

2. Divisions

แบคทีเรียของสัตว์และคนจัดแบ่งเป็น 3 Divisions ตามชนิดของผนังเซลล์ (Cell Wall type) Firmicutes Gram Positive, Gracilicutees Gram Negative, Tenericutes No rigid cell wall

3. Classes

การแบ่ง Class ส่วนใหญ่มีการใช้กันนาน ๆ ครั้ง (seldom used) ที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นการ ใช้ในการบ่งชี้ (determination) พวกแบคทีเรียที่ก่อโรคในทางสัตวแพทย์ (Veterinary bacterial pathogens)

4. Orders

เหมือน Class คือมีการใช้กันนาน ๆ ครั้ง (Seldom used) แต่ยกเว้นพวก Order Chlamydiales และ Rickettsiales ที่ใช้ Order ในการจัดหมวดหมู่อยู่เสมอ

5. Families

แบคทีเรียบาง Families จัดกลุ่มและตั้งชื่อให้มีความสัมพันธ์กันกับ Genera ที่อยู่ในกลุ่ม เช่น Family Enterobacteriaceae เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ส่วน Families อื่น ๆ คือกลุ่มของแบคทีเรียใน Genera ที่มีลักษณะพื้นฐานคล้ายคลึงกัน

6. Genera

การตั้งชื่อ Genus จะบ่งบอกลักษณะของ Species มีการตั้งชื่อตามลักษณะ (Morphology) ของแบคทีเรีย เช่น *Streptococcus* เป็นชื่อของ Genus ที่แบ่งตามลักษณะการเรียง ตัวของแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นทรงกลม (sphere or cocci) และเรียงตัวกันเป็นสายโซ่ (Chains), *Bacillus* เป็นชื่อ Genus ที่แบ่งตามลักษณะของแบคทีเรียที่เป็นรูปแท่ง (bacilli) ส่วน Spirochaeta เป็นชื่อของ Genus ที่แบ่งตามลักษณะของแบคทีเรียที่เป็นรูปเกลียว (Spirilli) เป็นต้น อาจตั้งชื่อ Genus ตามชื่อนักวิทยาศาสตร์ผู้ค้นพบเชื้อนั้น ๆ สถานที่ที่ค้นพบ หรือตั้งชื่อตาม ลักษณะที่เด่นชัดของเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Escherichia* ตั้งชื่อตามนักวิทยาศาสตร์ผู้ค้นพบชื่อ Escherich หรือ *Pasteurella* ตั้งชื่อตามนักวิทยาศาสตร์ผู้ค้นพบชื่อ Pasteur เป็นต้น

7. Species

Species คือการจัดหมวดหมู่พื้นฐานของแบคทีเรีย ใช้ในการเรียกชื่อคู่กับ Genera หรือ Genus ยกเว้นพวก *Leptospira* และ *Salmonella* ที่ใช้ Serovar เป็นการจัดหมวดหมู่ขั้นพื้นฐาน หรือ Species คือกลุ่มของ Strains ที่มีคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ แตกต่างกันออกไป

8. Subspecies

Subspecies คือการจัดกลุ่มของแบคทีเรียขั้นต่ำที่สุด (Lowest taxonomic rank) species หนึ่ง ๆ อาจจัดเป็น 2 Subspecies หรือมากกว่า ใช้กันมากในการบอกความแตกต่างของแบคทีเรียแต่ ละตัวที่อยู่ใน Species เดียวกัน เช่น *Campylobacter fetus* ss. *Venerialis* และ *Campylobacter fetus ss. fetus* เป็นต้น

ในการจัดกลุ่มของแบคทีเรียและการเรียกชื่อภายใน Species (Taxonomic classification and terminology within the species) ประกอบด้วย

1. Strains

1.1 Strain ใช้เพื่อแยกแบคทีเรียใน Species เดียวกันที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ กัน เช่น *Fusobacterium necrophorum* strain 2101 แยก (Isolate) ได้จากกรณี Bovine foot rot ส่วน *Fusobacterium necrophorum* strain อื่น ๆ ก็แยกได้จากแหล่งอื่น หรือตัวอย่างอื่น ๆ เป็นต้น

1.2 Reference strain ใช้บ่อยในการเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย เช่น *Brucella abortus* strain 2308 ที่แยกได้จากโคที่ Wisconsin ที่ป่วยเป็นโรค Brucellosis ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference Strain) ในการศึกษาทดลองเกี่ยวกับ Brucellosis เป็นต้น

2. Biovars

Biovars คือคุณสมบัติพิเศษทางชีวเคมี และสรีรวิทยาพิเศษ (Special biochemical and Physiological properties) เช่น *Fusobacterium necrophorum* Biovars A,B และ C จะแตกต่างกันในคุณสมบัติทางชีววิทยา

3. Serovars

Serovars (Serotypes) คือการแบ่งแยกแบคทีเรียในแต่ละ Species ตามคุณสมบัติของ antigen ที่พบ (antigenic properties) โดยในเรื่องของซีรั่มวิทยาของแบคทีเรีย (bacterial serology) แบ่งตามคุณสมบัติของ antigens หลายชนิดที่ แตกต่างกัน ที่พบในโครงสร้างบนผิวของแบคทีเรีย เช่น Capsular antigen (K-Antigen) พบที่ capsule ของแบคทีเรีย somatic antigen (O- Antigen) พบที่ผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียแก รมลบ Flagella antigen (H- Antigen) พบที่แฟลกเจลลา เป็นต้น

การเรียกชื่อแบคทีเรีย (Bacterial Nomenclature)

1. Nomenclature คือการเรียกชื่อแบคทีเรียตามแบบแผนทางวิทยาศาสตร์ ส่วนใหญ่การเรียกชื่อจะอ้างอิงจาก 2 แหล่งข้อมูลคือ

แบคทีเรีย ใน Division Firmicutes , Gracilicutes และ Tenericutes เรียกชื่อตาม Bergey's manual of systematic bacteriology

ชื่อ Genus ตั้งแต่มีการจัดพิมพ์ Bergey's manual of systematic Bacteriology จะ เรียกตาม International Journal of Systematic Bacteriology

2. Binomial Nomenclature คือการเรียกชื่อ Genus และ Species ของแบคทีเรียควบคู่กัน เช่น *Streptococcus suis, Listeria monocytogenes* เป็นต้น

ลักษณะที่ใช้เป็นหลักในการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย (Criteria for classification of bacteria)

1. **ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)** โดยศึกษาจากเชื้อบริสุทธิ์ ขนาด รูปร่าง โครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ โครงสร้างของเอนโดสปอร์ หรือ แฟลกเจลลา

2. **องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (Chemical composition)** เซลล์ของจุลินทรีย์จะประกอบด้วยสารอินทรีย์แตกต่างกัน เช่น ลิโพพอลิแซ็กคาไรด์, สารกรดไทโคอิก (teichoic acid) ที่ผนังเซลล์ และชนิดของกรดนิวคลีอิก เป็นต้น

3. **ลักษณะของการเลี้ยงเชื้อ (Cultural characteristics)** จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารแตกต่างกัน บางชนิดเลี้ยงในอาหารที่มีแต่สารอนินทรีย์ บางชนิดต้องการสารอินทรีย์หลายชนิด (เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล พิริมิดีน วิตามิน โคเอนไซม์) บางชนิดต้องการซีรัมเซลล์เม็ดเลือด เพปโทน สารสกัดจากยีสต์ บางชนิดไม่สามารถเลี้ยงในอาหารในห้องปฏิบัติการ ต้องเลี้ยงในโฮสต์ที่มีชีวิต หรือเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น เช่น ริกเกตเซียต้องเลี้ยงในไข่ไก่ฟัก เป็นต้น

4. **ลักษณะทางเมตาบอลิซึม (Metabolic characteristics)** กระบวนการดำรงชีวิตของเซลล์เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า เมแทบอลิซึม ปฏิกิริยานี้จะแตกต่างตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น จุลินทรีย์บางชนิดได้พลังงานจากแสง บางชนิดได้พลังงานจากการออกซิเดชันสารอินทรีย์หรืออนินทรียสาร จุลินทรีย์ยังแตกต่างกันที่วิถี (pathway) ของการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งปฏิกิริยาเคมีเกิดจากการทำงานของเอนไซม์

5. **ลักษณะทางแอนติเจน (Antigenic characteristics)** องค์ประกอบของเซลล์เป็นแอนติเจน ซึ่งเมื่อเข้าเซลล์สัตว์อื่นจะกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่เป็นซีรัมโปรตีนไปจับกับแอนติเจนนั้น แอนติบอดีมีความจำเพาะกับแอนติเจนที่กระตุ้นมัน และแอนติเจนมีแตกต่างกันมากมาย ดังนั้นแอนติบอดีที่สร้างขึ้น จึงใช้ช่วยในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้

6. **ลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic characteristics)** สารพันธุกรรมเป็น DNA 2 สาย (double-strand) มีลักษณะคงที่ และช่วยในการจัดหมวดหมู่ชนิดของจุลินทรีย์โดยศึกษาจาก

6.1 องค์ประกอบของเบสของ DNA (DNA base composition) DNA ประกอบด้วยคู่ของเบส คือ กวานีน (G) คู่กับไซโทซีน (C) และอะดีนีน (A) คู่กับไทมีน (T) จำนวนของนิวคลีโอไทด์เบสใน DNA คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของกวานีนกับไซโทซีนรวมกันทีเรียกว่า โมล %G+ C (mole % G + C) ค่านี้จะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ตั้งแต่ 23 ถึง 75

6.2 ลำดับ (sequence) ของนิวคลีโอไทด์เบสใน DNA ลำดับของนิวคลีโอไทด์เบสใน DNA นี้จะจำเพาะกับชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นหลักที่สำคัญที่สุดในการจัดหมวดหมู่จุลินทรีย์ นอกจาก DNA ในโครโมโซมแล้ว ในเซลล์จุลินทรีย์ยังอาจมี DNA ในพลาสมิดด้วย ซึ่งเป็น DNA วงกลม สามารถจำลองตัวเองได้อิสระภายในเซลล์ และทำให้มันแสดงลักษณะพิเศษบางอย่าง เช่น สร้างทอกซิน ทำให้ทนทานต่อสารปฏิชีวนะ หรือสามารถใช้สารเคมีบางอย่างเป็นอาหารได้

7. ความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity) ถึงแม้จะมีจุลินทรีย์จำนวนไม่มากนักที่ทำให้เกิดโรค จุลินทรีย์บางชนิดทำให้เกิดโรคกับสัตว์ พืช หรือจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bdellovibrio* เป็นตัวห้ำ (predetor) แบคทีเรียอื่นๆ หรือ แบคทีรีโอเฟจ เป็นไวรัสที่เข้าทำลายแบคทีเรีย

8. ลักษณะทางนิเวศวิทยา (Ecological characteristics) ถิ่นที่อยู่ (habitat) ของจุลินทรีย์ มีความสำคัญในการบอกลักษณะของจุลินทรีย์นั้นๆ เช่น จุลินทรีย์ที่อยู่ในทะเล จะแตกต่างจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำจืด หรือจุลินทรีย์ที่อยู่ในช่องปาก จะแตกต่างจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถอยู่อย่างกระจายทั่วไปในธรรมชาติ แต่บางชนิดจะจำกัดที่อยู่ในบางบริเวณเท่านั้น

แนวทางการจำแนกหมวดหมู่แบคทีเรีย

การจำแนกหมวดหมู่ของแบคทีเรียพัฒนาการมาโดยลำดับ ในอดีตนิยมจำแนกหมวดตามลักษณะที่ปรากฏให้เห็นได้ เรียกว่า **Artificial classification** แต่ในปัจจุบัน เทคโนโลยีการวิเคราะห์สารพันธุกรรมก้าวหน้าขึ้น ได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมเพื่อการจำแนกหมวดหมู่แบคทีเรีย เรียกแนวทางการจำแนกแบบนี้ว่า **Phylogenetic classification** ซึ่งโดยสรุป Artificial classification และ Phylogenetic classification แตกต่างกันดังนี้

Artificial classification จำแนกตามลักษณะปรากฏ เช่น ลักษณะของเซลล์ โคโลนี ความต้องการสารอาหาร การเปลี่ยนสีอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เป็นต้น แบคทีเรียที่มีลักษณะที่สังเกตพบใกล้เคียงกันจะถูกจัดให้อยู่ในหมวดหมู่เดียวกัน

Phylogenetic classification เป็นการจัดจำแนกตามความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการ โดยอาศัยการวิเคราะห์สารพันธุกรรม เช่น DNA หรือ RNA ซึ่งเป็นหน่วยเก็บข้อมูลพันธุกรรมของแบคทีเรีย บนพื้นฐานของสมมติฐานที่ว่า สิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน หรือวิวัฒนาการมาจากสายบรรพบุรุษเดียวกันจะมีรายละเอียดของสารพันธุกรรมใกล้เคียงกัน เช่น มีองค์ประกอบของยีนเหมือนกันหรือคล้ายกัน หรือมีลำดับการจัดเรียงตัวของสารพันธุกรรม (ลำดับนิวคลีโอไทด์) เหมือนกัน ซึ่งสมบัติดังกล่าวนี้ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตา ต้องอาศัยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพันธุกรรมเท่านั้น

ตารางที่ 3 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม

เทคนิค	ประโยชน์	ขอบเขต
Microscopy	สามารถสังเกตเซลล์ของจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว	ไม่สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียเด่นได้
Media-based methods	ง่ายต่อการทดลอง	ยากต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่เด่น
Indicator microorganism-based pathogen estimate	สามารถแสดงลักษณะของจุลินทรีย์แต่ละชนิด เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบ coliforms	-ใช้ระยะเวลาและความละเอียดสูง -เป็นการประมาณเชื้อโรคทางอ้อม
Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDAR)	ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเหมาะสำหรับการจำแนกจุลินทรีย์แบบกว้าง	การสกัด DNA และความแตกต่างของ PCR ไม่สามารถบอกเป็นเชิงปริมาณ
Ribosomao RNA intergenic spacer analysis (RISA)	ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เหมาะสำหรับการจำแนกจุลินทรีย์แบบกว้างๆ	-การสกัด DNA และความแตกต่างของ PCR -ไม่สามารถบอกเป็นเชิงปริมาณ บอกความแตกต่างตามความยาวและลำดับของแบคทีเรีย
Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)	-ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย -เหมาะสำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์แบบกว้างๆ -ใช้บอกความแตกต่างของลำดับ rRNA	-การสกัด DNA และความแตกต่างของ PCR -ไม่สามารถบอกเป็นเชิงปริมาณ ความจำเพาะทำให้เกิดปัญหาเนื่องจากลำดับสั้นเกินไป
Terminal-restriction fragment length polymorphism (t-RFLP)	สามารถเพาะเชื้อได้และเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์จุลินทรีย์ในช่วงกว้าง วิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและข้อมูลกึ่งปริมาณ	-การสกัด DNA และความแตกต่างของ PCR
Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)	-ข้อมูลเชิงปริมาณ -สามารถมองเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้	ไม่สามารถหาเซลล์ที่ตายแล้วได้
Fluorescent in situ hybridization (FISH) and confocal scanning laser microscopy (CSLM) Multiplex PCR	ข้อมูลเชิงปริมาณสามารถมองเห็นเซลล์แบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ช้า และแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ สามารถทำได้รวดเร็ว และตรวจสอบจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน	-เครื่องมือและอุปกรณ์ราคาแพง -การรวมกันของไพรเมอร์ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR เดี่ยว

ตารางที่ 3 (ต่อ)

เทคนิค	ประโยชน์	ขอบเขต
Nucleic acid microarrays	การใช้ประโยชน์หลากหลาย การประยุกต์ข้อมูลที่หลากหลาย	มีความละเอียดน้อยสำหรับตัวอย่างในสิ่งแวดล้อม กระบวนการตัวอย่างที่ซับซ้อน
On-chip technology	เป็นการรวม PCR กับ nucleic acid hybridization บน chip การรบกวนที่เกิดจากปฏิกิริยาน้อย	การปรับและการบรรจุ

ที่มา: Gerardi (2006)

เทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกชนิดแบคทีเรียแบบเพาะเลี้ยง (Culturable technique)

ในแหล่งธรรมชาตินั้นปกติเชื้อแบคทีเรียจะเติบโตอยู่รวมกันหลายๆสายพันธุ์ ดังนั้นในการคัดแยกแบคทีเรียเพื่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์นั้นจะต้องมีขั้นตอนหลายขั้นตอนซึ่งต้องอาศัยเทคนิคต่างๆดังต่อไปนี้

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อจากตัวอย่างในธรรมชาตินั้นเจริญเติบโตก่อนแล้วจึงคัดเลือกโคโลนีที่สนใจและจึงทำให้เชื้อที่คัดเลือกนั้นบริสุทธิ์ (pure culture) อีกครั้ง โดยในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีทั้งชนิดที่เป็นอาหารเหลว (broth) และชนิดแข็ง (solid) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งใช้สำหรับการคัดแยก การคัดเลือก หรือการจำแนกชนิดแบคทีเรีย และใช้หาความสัมพันธ์ของจำนวนแบคทีเรียในสิ่งตรวจ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวนั้น ใช้สำหรับแยกแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อย หรือแบคทีเรียที่เติบโตช้า โดยใช้ทวีจำนวนของแบคทีเรียก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการแยกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งต่อไป อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งแบ่งเป็น 3 ชนิด (นันทนา, 2537)

1. Enrichment media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีสารส่งเสริมทวีจำนวนของแบคทีเรียเพื่อแยกชนิด เช่น Blood agar ใช้ในการแยกแบคทีเรียก่อโรค ที่สามารถเห็นความแตกต่างในการทำลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรีย หรือ Chocolate agar ใช้สำหรับการแยกแบคทีเรียที่เจริญทวีคูณจำนวนช้า และเพาะเลี้ยงยาก เช่น *Haemophilus influenza*

2. Selective media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ประกอบด้วยสารเคมี หรือยาปฏิชีวนะเพื่อต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ แต่แบคทีเรียชนิดที่ต้องการแยกชนิดนั้นเจริญได้ดี อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ ได้แก่ Anaerobic blood agar ซึ่งประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ กาน่าไมซิน (kanamycin) และแวนโคไมซิน (vancomycin) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ ยกเว้น *Bacteroides* spp.

3. Differential media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารอาหาร และสารประกอบต่างๆ เช่น น้ำตาล และมีอินดิเคเตอร์สำหรับตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นกรด-ด่าง ทำให้เห็นความแตกต่างของ

แบคทีเรียต่างชนิดกัน โดยดูความแตกต่างของกระบวนการเมตาบอลิซึม หรือตรวจดูสารที่เกิดขึ้นหลังจากขบวนการเมตาบอลิซึมบางอย่าง เช่น MacConkey agar เหมาะสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เป็นต้น

โดยในส่วนของเทคนิคการคัดแยกแบคทีเรียที่นิยมทำกันคือ spread plate technique (นงลักษณ์ และปรีชา, 2541) ซึ่งเทคนิคนี้จะทำโดยนำตัวอย่างที่จะคัดแยกแบคทีเรียไปทำให้เจือจาง ลงด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ 0.85 % ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้มีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 100-200 เซลล์ หรือน้อยกว่า โดยทั่วไปทำเป็นลำดับ ๆ ละ 10 เท่า จากนั้นจะนำตัวอย่างไปเพาะบนจานเพาะเชื้อ (petri dish/plate) ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง แล้วจึงทำการเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วด้วยแท่งแก้วรูปตัว L หลังจากบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและมีระยะเวลาเพียงพอ จะปรากฏโคโลนี (colony) ของเชื้อแบคทีเรียขึ้น โดยแต่ละโคโลนีจะมีจำนวนแบคทีเรียอยู่จำนวนมาก และแต่ละโคโลนีจะถือว่ามาจากแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว ดังนั้นจะทำให้เกิดการแยกจุลินทรีย์ออกมาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ขึ้น เมื่อมองด้วยตาเปล่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โคโลนีจะมีลักษณะแตกต่างกันดัง นอกจากนั้นยังสามารถทำให้เชื้อมีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการนำโคโลนีที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารใหม่ด้วย เทคนิคที่เรียกว่า Streak-Plate Technique (Quinn *et al*., 1994) ทำโดยการคัดเลือกเชื้อโคโลนีที่สนใจและขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อคือ การทำให้เชื้อที่มีปริมาณมากค่อย ๆ กระจายออกจนแยกเป็น โคโลนี (Colony) เดี่ยว ๆ ซึ่งแต่ละโคโลนีจะเจริญมาจากเซลล์เดี่ยวจึงถือเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์โดยใช้ วิธีการในการขีดเชื้อแบบ Four - way cross Streak ใช้ Loop เผาไฟแล้วรอให้เย็นแล้วแตะเชื้อมาขีดบนอาหารแข็ง ตามแนว โดยในการขีดทุกแนวควรเปลี่ยน Loop ที่ใช้ หรือมีการเผาไฟทุกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อที่มาก เกินไป เชื้อจะหนาแน่นมากที่รอยขีดแรกแล้วค่อย ๆ หนาแน่นน้อยลงในรอยขีดท้าย ๆ จนแต่ละ เซลล์ออกจากกันได้ หลังจากที่นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับเชื้อ แต่ละเซลล์นั้นจะ แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ

เทคนิค Polymerase Chain Reaction : PCR

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) มีชื่อเต็มว่า เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม คือ ดีเอ็นเอ ให้มีปริมาณมากเป็นล้านเท่า ในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลัก การจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอเดิม เทคนิคนี้ใช้หลักการพื้นฐานในการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (หรือเข้ากัน) กับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมาก ประมาณว่าปฏิกิริยา

30 - 40 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่าพันล้านเท่า ดังนั้น แม้ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีปริมาณสารพันธุกรรมน้อยมาก

เทคนิค Agarose gel electrophoresis

เทคนิค Agarose Gel Electrophoresis เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ในตัวอย่าง โดยการนำ DNA มาแยกบนตัวกลางที่มีกระแสไฟฟ้า โดยอาศัยหลักที่ว่า DNA มีประจุเป็นลบ ดังนั้นจึงสามารถเคลื่อนไปยังขั้วบวกในสนามไฟฟ้าได้ ตัวกลางที่ใช้ได้แก่วุ้น (agarose) โดยเมื่อวุ้นแข็งตัวจะมีลักษณะเป็นรูพรุนอยู่ภายใน ขนาดของรูพรุนขึ้นกับความเข้มข้นของวุ้น ถ้าวุ้นเข้มข้นมากรูพรุนจะเล็ก DNA ที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไปได้ยาก DNA จะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าตามขนาดโมเลกุล โดยที่สารโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารโมเลกุลใหญ่ หลังจากที่ DNA ถูกแยกบนวุ้นแล้ว เราจะไม่เห็นแถบ DNA ต้องนำไปย้อมด้วยสาร Ethidium Bromide ซึ่งเป็นสารเรืองแสงอุลตราไวโอเลต Ethidium Bromide จะเข้าไปจับกับสาย DNA ทำให้เมื่อนำแผ่นวุ้นไปวางไว้ใต้แสงอุลตราไวโอเลตจะเห็นแถบ DNA เรืองแสงออกมา เราสามารถบันทึกภาพของ DNA ไว้ศึกษาต่อไปได้ ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีทดแทน Ethidium Bromide เพื่อความปลอดภัยมากกว่า ซึ่งไม่เป็นอันตรายใดใดต่อผู้ใช้ เช่น Gel Red, Gel Star หรือ Red Safe เป็นต้น

เทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกชนิดแบคทีเรียแบบไม่เพาะเลี้ยง (Unculturable technique)

การตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียในดิน น้ำ อากาศ และจากสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารจานเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Culturing methods หรือ Viable counts) ใช้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic methods หรือ Direct counts) และการวิเคราะห์ทางชีวเคมี (Biochemical methods) เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองเวลา ค่าใช้จ่าย และแรงงานมาก นอกจากนี้ วิธีการที่กล่าวมาข้างต้นยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถจำลองสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้จริง ดังนั้นจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้จำนวนชนิดจริงมากเทียบเท่าจำนวนตามธรรมชาติ มีรายงานว่าโดยทั่วไปแล้วจำนวนจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้มีปริมาณเพียงแค่ 0.1-10% ของจุลินทรีย์ที่นับได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งถือว่าเป็นจำนวนที่ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่วัดได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์นับโดยตรงหรือวิธีทางเคมีที่มีการใช้ Biomarker

ปัจจุบันการวิเคราะห์ในระดับอณูวิทยา (Molecular biology) ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมาก เนื่องจากสามารถสกัด DNA ออกมาได้โดยตรงจากตัวอย่างที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมทุกประเภท เช่น น้ำ ดิน อากาศ และ Biofilm โดยเฉพาะอย่างยิ่งการจำแนกแบคทีเรียทางอณูวิทยา (Molecular Characterization) นั้น ในปัจจุบันนี้ DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis) ได้ถูกเลือกและเป็นที่นิยมในการนำมาใช้เพื่อการวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ อีกทั้งยังเป็นที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพมาก เทคนิค DGGE เพื่อการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียนั้นตามปกติจะ

ใช้ร่วมกับช่วงสายของ 16S rDNA fragments (ซึ่งคือช่วงสายของ DNA ในส่วนที่ช่วยการสร้างไรโบโซม หรือ 16S rRNA gene)

หลักการ 16S rRNA gene

16S rRNA gene เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซม ซึ่งไรโบโซมเป็นสิ่งที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด 16S rRNA gene เป็นช่วงสาย DNA ที่มีรหัสสำหรับการสร้างไรโบโซมได้ถูกเลือกนำมาใช้ร่วมกับเทคนิค DGGE เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ เป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิด เป็นเหมือนยีนลายเซ็น (Signature gene) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีบางช่วงของสาย DNA ของ 16S rRNA gene ที่เหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด ในส่วนที่เหมือนกันนี้สามารถนำมาใช้เพื่อออกแบบ primer หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ 16S rRNA gene จะมีช่วงของสาย DNA ที่มีลำดับเบสช่วงนั้นเหมือนกันในทุกแบคทีเรีย ในขณะเดียวกัน 16S rRNA gene ก็มีช่วงของสาย DNA ที่แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ช่วงที่เหมือนและช่วงที่แตกต่างกันของลำดับเบสในสาย DNA นั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย โดยการที่สาย DNA ช่วงที่มีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดสามารถนำมาใช้เป็น primer ที่ถือว่าเป็นสากล (Universal primers) คือ primer 1 คู่นี้ สามารถขยายหรือเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ได้จากแบคทีเรียทุกชนิด ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ได้มาจากสิ่งแวดล้อมหรืออุตสาหกรรมที่จะนำมาศึกษาซึ่งโดยทั่วไปมีปริมาณน้อยในตัวอย่างธรรมชาติ

เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis: DGGE (ศรีสุดา, 2548)

DGGE ได้เข้ามามีบทบาทในการวิเคราะห์ในเชิงเปรียบเทียบของโครงสร้างและรูปแบบของความหลากหลายของกลุ่มแบคทีเรียต่างๆ นอกจากนี้ ส่วนของตัวสาย DNA ที่ถูกแยกมาจากการใช้เทคนิค DGGE คือสายของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียแต่ละชนิดนั่นเอง สามารถนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส และนำไปเปรียบเทียบกับสายของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้วในฐานข้อมูลข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว เพื่อตรวจสอบว่าคือชนิดใด การวิเคราะห์ทาง DGGE มีขั้นตอนดังนี้ สายของ DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน (PCR products) ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียโดยรวม ซึ่งได้จากตัวอย่างที่มาจากสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน จะถูกแยกบนเจล (DGGE gel) ซึ่งมีส่วนผสมของสารเคมีที่จะเป็นตัวแยกสาย DNA (Denaturant) อย่างเป็นสัดส่วน (Gradient) ตามความเข้มข้นของ Denaturant โดยความเข้มข้นน้อยจากข้างบนไปสู่ความเข้มข้นมากที่อยู่ส่วนล่างของเจล ดังนั้น ถึงแม้สาย DNA ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียโดยรวมที่นำมาแยกจะมีลำดับเบสที่มีขนาดความยาวเท่ากัน แต่ลำดับเบสในส่วนที่ไม่เหมือนกันจะมีอุณหภูมิการหลอมหรือการแยก (Melting temperature) ที่ไม่เท่ากัน ดังนั้น สาย DNA ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียทุกชนิดที่เพิ่มจำนวน DNA โดยรวมในขั้นตอนแรกๆ จะวิ่งไปบน DGGE gel ได้ไม่เท่ากัน มีการรายงานว่าสาย DNA สองสายที่มีความยาวเท่ากันแต่มีเบสต่างกันถึงแม้จะมีเพียงแค่ตัวเดียว สาย DNA ทั้งสองสายจะถูกแยกไปอยู่ที่ตำแหน่งต่างกันบนเจล เราจึงสามารถเห็นสาย DNA ของแบคทีเรียแต่ละชนิดถูกแยกออกจากกันบน DGGE gel

ขั้นตอนการวิเคราะห์ทาง DGGE

1. การสกัด DNA ทั้งหมด และการทำให้ DNA บริสุทธิ์

2. การเพิ่มจำนวน DNA โดยเน้นเจาะจงไปที่สาย DNA ของ 16S rRNA gene โดยใช้ Universal primer ของ 16S rRNA gene

3. ทำการแยกสายของ DNA จากตัวอย่างโดยใช้ DGGE

4. สาย DNA ที่แยกได้มาจาก DGGE จะถูกแยกออกมาจาก DGGE gel และนำไปหาลำดับเบส (Sequencing)

5. หาความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rRNA gene ที่ได้จากการลำดับเบสและการแจกแจงชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ (Phylogenetic Relationship)

ประโยชน์ของเทคนิค DGGE

1. สามารถทำให้นักวิทยาศาสตร์ และวิศวกรทางชีวภาพเข้าใจโครงสร้าง ชนิด และปริมาณของแบคทีเรียว่าเป็นอย่างไร มากหรือน้อยต่างกันแค่ไหนในระดับอณูวิทยา

2. สาย DNA ที่ถูกแยกแล้วบน DGGE gel สามารถถูกตัดหรือสกัด (Excise) ไปหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบว่าเป็นชนิดใด

3. เป็นการช่วยในการศึกษาทั้งในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารจานเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ (โดยทั่วไปแล้วจำนวนจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้จากสิ่งแวดล้อมมีปริมาณเพียงแค่ 0.1-10%) และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารจานเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไม่ได้ (unculturable) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีจำนวนมากกว่า

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไส้เดือนดิน ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน

และจากการทดลองของ สุลีรัก และอานัฐ (2553) พบว่าต้นเบญจมาศที่ปลูกในดินที่มีไส้เดือนดินอาศัยอยู่ 20 ตัวต่อกระถาง จะส่งผลให้มีรากยาวกว่า มวลรากแห้งมากกว่า มีช่อดอกแขนงมากกว่า ความยาวก้านดอกแขนงสั้นกว่าตำรับทดลองควบคุมและจากการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืชในดินปลูกทั้งสองตำรับทดลอง พบว่า ตำรับทดลองที่มีไส้เดือนดินจะมีค่าสูงกว่าตำรับทดลองที่ไม่มีไส้เดือนดินทุกตัวชี้วัด ยกเว้น ค่า EC ที่มีค่าต่ำกว่า โดยตำรับทดลองที่มีไส้เดือนดินจะมีอินทรียวัตถุ (OM) มากกว่าตำรับทดลองควบคุม 22 % มีธาตุไนโตรเจน (N) มากกว่า 23 % ธาตุฟอสฟอรัส (P) มากกว่า 23 % และธาตุโพแทสเซียม (K) มากกว่า 84 % ตามลำดับ

จากคุณสมบัติของไส้เดือนดินและจุลินทรีย์ในลำไส้ไส้เดือนดินดังกล่าวข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าการกินวัสดุอินทรีย์และการย่อยอาหารของไส้เดือนดินนับเป็นเป็นพื้นฐานของกระบวนการทำปุ๋ยหมักที่เร็วที่สุดในปัจจุบันก็ว่าได้ (Byzov *et al.*, 2007)โดยมีการนำไส้เดือนดินสายพันธุ์ต่างๆไปย่อยสลายขยะอินทรีย์เพื่อผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินสำหรับใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยเทคโนโลยีที่เรียกว่า vermicomposting ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้เลี้ยงไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ซึ่งเป็นไส้เดือนดินสาย

พันธุ์ที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยในบริเวณใต้กองมูลวัวจากฟาร์มเลี้ยงวัวนม หรือบริเวณซักล้างที่มีเศษอาหารและมีน้ำจากบ้านเรือนสำหรับผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินจากขยะอินทรีย์ไปยังเกษตรกร หน่วยงานต่างๆ ที่มีปัญหาขยะอินทรีย์ทั่วประเทศไทย (อานัฐ, 2553) และงานวิจัยการทดสอบผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินจากขยะอินทรีย์ชนิดต่างๆ ภายในประเทศไทย เช่น สุมา (2549) ได้ทดลองใช้ไส้เดือนดินพันธุ์ *Pheretima peguana* และ *Eisenia foetida* กินเศษผลไม้พบว่า ไส้เดือนดินมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงสุด และมีการเพิ่มจำนวนตัวไส้เดือนสูงสุดเมื่อให้กินมูลวัว ส่วนมูลไส้เดือนดินที่ได้ พบว่า การใช้มูลวัวเป็นอาหารให้กับไส้เดือนดินทั้ง 2 สายพันธุ์ ทำให้ได้มูลไส้เดือนดินที่มีคุณภาพดีที่สุด กรวิกา (2549) ได้ทำการศึกษาคุณภาพปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและมูลสัตว์ชนิดต่าง ๆ ของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Pheretima peguana* พบว่า มูลสุกรที่ผ่านการย่อยสลายโดยไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Pheretima peguana* จะให้ปริมาณธาตุไนโตรเจน (N) ปริมาณธาตุฟอสฟอรัส (P) ปริมาณธาตุแคลเซียม (Ca) และปริมาณธาตุโบรอน (B) มากที่สุด

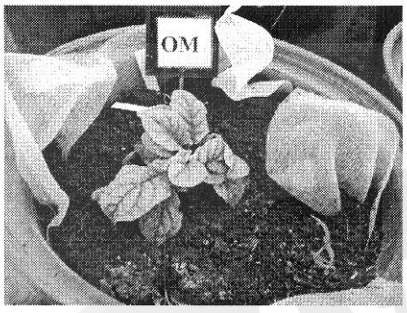
Tomati *et al.*, (1983) ได้ทำการทดสอบปุ๋ยหมักจากขยะอินทรีย์ที่ได้จากการใช้ไส้เดือนดินย่อยสลายนำไปใช้ทดสอบการเจริญเติบโตของพิทูเนีย และบีโกเนีย โดยใช้ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนเปรียบเทียบผลกับออกซินจิบเบอเรลลินและไซโตไคนินพบว่าการเจริญเติบโตของพืชที่ปลูกในกระถางที่เติมปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินจะแสดงลักษณะเช่นเดียวกันกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในกระถางอื่นๆและนอกจากนี้การขยายการทดลองไปยังพืชชนิดอื่นๆ เช่น ธัญพืชและเห็ด พบว่าผลที่ได้สนับสนุนผลสรุปในการทดลองข้างต้น

นอกจากนี้ Edwards and Burrows (1988) ได้อธิบายถึง การเจริญเติบโตของพืชหลายชนิดในวัสดุปลูกที่ผลิตได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินพันธุ์ *Eisenia foetida* พวกเขาสรุปว่าการปลูกพืชต่างๆ ดังกล่าวจะประสบผลสำเร็จในการใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินแม้ในปริมาณน้อยและรูปแบบการเจริญเติบโตของพืชเป็นผลมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีส่วนผสมของปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน

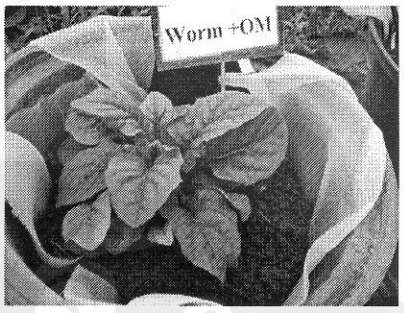
ตารางที่ 4 ค่า EC และฟอสฟอรัส (P)ในดินปลูกดอกเยอบีร่าในตำรับทดลองที่มีไส้เดือนดินและไม่มีไส้เดือนดิน

ตำรับทดลอง	EC	Available-p (ppm)
(T1) ดินผสมวัสดุปลูก	2.1 dS/m	112
(T2) ดินผสมวัสดุปลูก+ไส้เดือนดินสีเทาพันธุ์ *Amynthas* sp.	700 µS/cm	993

ที่มา : อานัฐ (2551)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 1 แสดงงานวิจัยทดสอบผลของไส้เดือนดินต่อการลดความเป็นพิษของมูลวัวใหม่ (ภาพ ก) กระถางปลูกเยอบีราที่ผสมมูลวัวใหม่ไม่ปล่อยไส้เดือน (ภาพ ข) กระถางปลูกเยอบีราที่ผสมมูลวัวใหม่ปล่อยไส้เดือนดินสีเทาพันธุ์ *Amynthas* sp. 20 ตัวต่อกระถาง

งานวิจัยด้านการจำแนกแบคทีเรีย ในลำไส้ไส้เดือนดิน และมูลไส้เดือนดิน

มีรายงานว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 343 ชนิด จากลำไส้ของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Pheretima sp.* ซึ่งประกอบด้วย แอคติโนมัยซิท แบคทีเรีย และเชื้อรา (Winding *et al.*, 1997)โดยพบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* และ *Enterobacter* (Valle-Molinas *et al.*, 2007; Byzov *et al.*, 2007; Singleton *et al.*, 2003) ซึ่งจุลินทรีย์ต่างๆ ดังกล่าวเป็นกลุ่มที่สร้าง สารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoters) ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (free-living nitrogen fixers) และละลายธาตุฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงในดิน(phosphate solubilizers) (Loreno-Osti *et al.*, 2004; Martínez-Romero, 2001) โดย Aira and Dom´inguez (2009)ได้ทดสอบการกินมูลวัวและมูลหมูของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* มูลไส้เดือนดินที่ได้จากการกินมูลสัตว์ทั้ง 2 ชนิด มีกิจกรรมของเอ็นไซม์ acid phosphatases และ alkaline phosphatases ที่วัดได้สูงมากกว่าที่วัดได้จากจากมูลวัวและมูลหมูที่ไม่ผ่านการกินโดยไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้

กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์บางกลุ่มในดินโดยธรรมชาติจะไม่เคลื่อนที่และสร้างโคโลนีอยู่เป็นแห่งๆ ดังนั้นจุลินทรีย์จะมีผลน้อยมากต่อการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหากปราศจากการแพร่กระจายตัวลงไปในดิน ไส้เดือนดินเป็นสิ่งมีชีวิตในดินชนิดหนึ่งที่พบว่าสามารถช่วยแพร่กระจายเชื้อจุลินทรีย์ในดินได้ โดยไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* และ *Lumbricus terrestris* จะกินดินและวัสดุอินทรีย์บริเวณผิวดินที่ปนเปื้อนเชื้อ *Rhizobium japonicum* เข้าไปเชื้อนั้นผ่านลำไส้ของไส้เดือนดินออกมาโดยไม่ได้รับอันตราย และเมื่อไส้เดือนดินถ่ายมูลพร้อมเชื้อดังกล่าวออกมาในบริเวณต่างๆ ของแปลงปลูก ก็จะทำให้เชื้อแพร่กระจายสร้างกลุ่มโคโลนีอยู่บริเวณกองมูลเหล่านั้น เชื้อรา *Rhizobium japonicum* นั้นเป็นเชื้อราชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศและมีการสร้างปุ่มปมในรากถั่วลิสง บริเวณที่พบไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Lumbricus terrestris* อาศัยอยู่จะพบว่ามีปุ่มปมบนรากถั่วลิสงจำนวนมาก (Rouelle, 1983)

จากการศึกษาคัดแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยเทคนิค culturable technique และ unculturable technique ของนักวิจัยที่ผ่านมา พบว่า มีการศึกษาชนิดแบคทีเรียจากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia fetida* ของ Hyun-Jung *et al.,*(2004) พบแบคทีเรียจำนวน 12 สกุล ประกอบด้วย

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เป็นกลุ่มหลัก 31% นอกจากนั้นพบสกุล 6% *Aeromonas*, 3% *Agromyces*, , 1% *Bosea*, 6% *Gordonia*, 6% *Klebsiella*, 7% *Microbacterium*, 2% *Nocardia*, 10% *Pseudomonas*, 19% *Rhodococcus*, 2% *Tsukamurella*, และ 7% *Streptomyces* นอกจากนี้ งานวิจัยของ Jayakumar *et al*.,(2013) ได้ศึกษาถึงชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตด้วยไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* พบแบคทีเรีย 13 สกุล ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacillus* (57%), *Pseudomonas* (15%), *Microbacterium* (12%), *Acinetobacter* (5%), *Chryseobacterium* (3%), *Arthrobacter, Pseudoxanthomonas, Stenotrophomonas, Paenibacillus, Rhodococcus, Enterobacter, Rheinheimera* และ *Cellulomonas*. รวมถึง Sung Wook *et al*., (2011) ได้ศึกษาถึงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* พบว่า ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Entomoplasma somnilux* และ *Bacillus licheniformis* นอกจากนี้ Idowu *et al*., (2006) ได้ศึกษาคัดแยกแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Libyodrillus violaceous* มูลไส้เดือนดิน และดิน พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus, Bacillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus mutans, Clostridium, Spirocheata spp., Azotobacter* spp., *Micrococcus lylae, Ainetobacter* spp., *Halobacterium* และการศึกษาของ Byzov *et al*., (2009) ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus terrestris*, และ *Eisenia fetida* รวมถึง คัดแยกจากดิน และมูลไส้เดือนดินใหม่ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ R2A agarized medium ในการคัดแยก พบแบคทีเรีย 4 กลุ่มคือ *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* และ *Firmicutes* และงานวิจัยของ Dwipendra *et al*.,(2010) ได้ศึกษาถึงแบคทีเรียที่เกาะแน่นอยู่ภายในผนังลำไส้ไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Lumbricus terrestris, Lumbricus friend*, *Aporrectodea caliginosa* และ*Aporrectodea longa* โดยใช้เทคนิค Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) บริเวณส่วน intergenic spacer (IGS) region ระหว่างยีน 16S-23S rRNA พบกลุ่มแบคทีเรียในกลุ่ม Proteobacteria, Firmicutes และ Actinobacteria และ Huang *et al*., (2013) พบกลุ่มแบคทีเรียหลักในตัวอย่างปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินอยู่ในกลุ่ม Firmicutes, Bacteroidetes และ Actinomycetes และงานวิจัยของ Nakamura and Sakai (2011) พบแบคทีเรียในกลุ่ม Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroides และ Firmicutes เป็นต้น

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

งานวิจัยที่ 1 การจำแนกชนิดแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยสายพันธุ์ *Perionyx* sp., *Metaphire posthuma* และชนิดแบคทีเรียในมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน โดยวิธีเพาะเลี้ยง (Culturable technique)

เก็บตัวอย่างไส้เดือนดินสีเทาพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากแปลงเกษตรบนพื้นที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และเก็บตัวอย่างไส้เดือนดินสีแดงพันธุ์ *Perionyx* sp.จากตัวอย่างฟาร์มเลี้ยงวัวนม 5 แห่งบริเวณพื้นที่ อ.สันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ รวมทั้งเก็บตัวอย่างไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน มาเตรียมตัวอย่างสำหรับใช้ในการศึกษาจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหาร และไม่เพาะเลี้ยง โดยคัดเลือกไส้เดือนดินตัวเต็มวัยจากตัวอย่างไส้เดือนดินที่เก็บรวบรวมได้ตัดลำไส้ส่วนปลายของไส้เดือนดินที่คัดเลือกชนิดละ 20 ตัว บดตัวอย่างด้วยโกร่งบดดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ละเอียด แบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งสกัด DNA เก็บแช่แข็งไว้สำหรับใช้จำแนกแบบไม่เพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อีกส่วนหนึ่งนำไปใช้จำแนกแบคทีเรียแบบเพาะเลี้ยงบนอาหาร ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดินเก็บไว้ในกล่องน้ำแข็งไม่เกิน 24 ชั่วโมงก่อนการคัดแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่าง 1 กรัม โดยทำ serial dilution 10^1- 10^7 ในสารละลาย 0.85 % normal saline solution และเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร Nutrient Agar (NA), de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพมี O_2 และไม่มี O_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA, MRS agar ในสภาพมี O_2 และไม่มี O_2 คัดเลือกเชื้อที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และคัดแยกแบคทีเรียที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยคัดเลือกจากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันภายใต้กล้อง stereomicroscope ด้วยเทคนิค streak plate จากนั้นเก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ที่มี 20 % Glycerol และสกัด DNA โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid®) เมื่อได้ DNA จากเชื้อบริสุทธิ์แล้ว ทำการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primers : 20F (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3') และ 1500R (5' GTT ACC TTG TTA CGA CTT3') ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอและขนาดของ PCR Products ที่ได้ ด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis แล้วตรวจสอบผลด้วย Gel Documentation System และโปรแกรม GeneSnap ของ SYNGENE ® จากนั้นนำ PCR product ที่บริสุทธิ์ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยใช้ primer 800R (5' TAC CAG GGT ATC TAA TCC 3') ที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี นำผล

ลำดับเบสที่ได้ไปจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ได้โดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูล eztaxon-e จากเว็บไซต์ http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/ezt_identify และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ type strains โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม BioEdit และ MEGA 6

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน โดยวิธีไม่เพาะเลี้ยง (Unculturable technique)

นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมไส้เดือนดินมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin Soil ยี่ห้อ MACHEREY-NAGEL, Germany เมื่อได้ดีเอนเอจากตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินแล้ว ทำการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primers 341F (GC-Clamp) และ 518R ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอและขนาดของ PCR Products ที่ได้ ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis แล้วตรวจสอบผลด้วย Gel Documentation System และโปรแกรม GeneSnap ของ SYNGENE ® จากนั้นนำตัวอย่าง PCR products ที่ได้ไปวิเคราะห์รูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนเจลด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel electrophoresis (DGGE) โดยใช้ 10% acrylamide gel ที่มีสาร denaturant เข้มข้น 30-50% ใช้กระแสไฟฟ้า 65V เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นนำ acrylamide gel ไปทำการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอและตัดแถบดีเอ็นเอบนเจลที่คัดเลือกขนาด 0.5 ซม. โดยใช้เครื่อง Dark Reader® Transilluminator (Clare Chemical Research, USA) เก็บชิ้นเจลไว้ในหลอด microcentrifuge เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงใน ตัวอย่างละ 22 ul เก็บไว้ที่ 4 °C จากนั้นเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ของสารละลายดีเอ็นเอจากแถบเจล ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วย primers 341F (GC-Clamp) และ 518R ตรวจสอบความเข้มข้นและขนาดของ PCR Products และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดทำให้ DNA บริสุทธิ์ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit ยี่ห้อ RBC Bioscience และเก็บ PCR product ที่บริสุทธิ์ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยใช้ primer 314F (5′-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′) ที่ First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย นำผลลำดับเบสที่ได้ไปจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากเว็บไซต์ http://ncbi.nlm.nih.gov/ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในลำไส้ไส้เดือนดิน ในมูลไส้เดือนดิน และในน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม BioEdit และ MEGA 6

งานวิจัยที่ 2 การศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp., ต่อการผลิต Plant growth promoters และการส่งเสริมการเจริญของเมล็ดพืช

การศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ต่อการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA)

การทดสอบความสามารถในการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตจากสายพันธุ์ *Perionyx* sp., จำนวน 72 ไอโซเลท ทดสอบด้วยวิธี colorimetrically ของ Gordon and Weber; 1951 โดยเลี้ยงแบคทีเรียเริ่มต้นในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่ประกอบด้วย NaCl 5 g, Peptone 10 g และ Beef extract 10 g โดยใช้เชื้อ 50 µl ในอาหาร NB ปริมาณ 5 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 100 µl ลงในอาหาร minimal salt (MS) medium ที่มี 5 mM L-tryptophan (Frankenberger and Poth, 1988) อาหาร minimal salt (MS) medium ประกอบด้วย KH_2PO_4 1.36 g/l, Na_2HPO_4 2.13 g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 g/l และ trace element ปรับ pH เป็น 7.0 ก่อนทำให้ปลอดเชื้อ เตรียมสารละลาย L-tryptophan เป็น stock solution ประกอบด้วย glucose 10 g, L-tryptophan 1 g, และ yeast extract 0.1 g ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 µm บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง วัดหาปริมาณ IAA โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเซลล์แล้วปริมาตร 1.5 ml มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml ผสมกับสารละลาย $FeCl_3$-$HClO_4$ บ่มทิ้งไว้ 25 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 nm คำนวณหาปริมาณ IAA โดยเตรียมกับกราฟสารละลายมาตรฐาน คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ได้ดีมายืนยันความสามารถในการผลิต IAA อีกครั้ง

การศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ต่อการส่งเสริมการงอกของเมล็ด

การทดสอบศักยภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินต่อการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว เมล็ดผักคะน้า และเมล็ดพริก ทำการทดสอบโดยทำการฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอกของเมล็ดทดสอบโดยการล้างด้วย 70% เอธานอล นาน 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง และแช่ในสารละลาย 0.2% acidified mercuric chloride นาน 3-5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 ครั้ง นำเมล็ดข้าวประมาณ 10 - 20 เมล็ด ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอกแล้วแช่ในสารละลายเซลล์ของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบนาน 15 - 30 นาที และเมล็ดทดสอบที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอกแล้วอีกประมาณ 10 - 20 เมล็ด วางบนจานอาหารแข็งที่มี 1% (w/v) agar ในสภาวะปลอดเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำผลการงอกของเมล็ดที่ได้จากการบันทึกการงอกของเมล็ดทุกวัน

มาคำนวนหา Germination index ตามวิธีของ Walker-Simmons and Sesing, 1990 โดย n1 ถึง n10 คือจำนวนของเมล็ดที่งอกในแต่ละวันเริ่มจากวันแรก (n1) จนถึงวันที่ 10 (n10)

$$\text{Germination Index} = \frac{(10\times n1 + 9\times n2 + \ldots\ldots\ldots\ldots + 1\times n10)}{\text{Total days} \times \text{Total seeds}}$$

งานวิจัยที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีชีวภาพตามอายุการเก็บรักษา (Shelf life) ของมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.

ในการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีชีวภาพของมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตด้วยไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. งานวิจัยได้ทำการทดสอบโดยเก็บผลผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินจากบ่อเลี้ยงทางการค้า ของกองทุนปุ๋ยอินทรีย์และไฮโดรโพนิคส์ มูลนิธิโครงการหลวงเป็นตัวอย่างในการศึกษา จากนั้นนำมาคัดแยกตัวไส้เดือนดินและสิ่งปลอมปนออกจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน คลุกเคล้าตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บมาให้เข้ากันดีแล้วแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กอง กองที่ 1 แบบเปียก บรรจุถุงซิปล็อคทันทีโดยไม่ผ่านการผึ่งลดความชื้น ส่วนอีกกองลดความชื้นโดยการผึ่งในที่ร่มประมาณ 4 วัน เมื่อตรวจวัดความชื้นไม่เกิน 30 เปอร์เซ็นต์แล้วจึงบดร่อนและบรรจุถุงพลาสติกแบบซิปล็อค ในส่วนของตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินเมื่อนำออกจากบ่อแล้วจะกรองผ่านกรวยที่ติดตะแกรงเพื่อคัดแยกสิ่งปลอมปนออก แล้วจึงบรรจุในขวดพลาสติกปิดฝาให้สนิท นำตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด เก็บรักษาไว้ในชั้นวาง 2 ช่วงอุณหภูมิ คือ อุณหภูมิห้อง (~30 องศาเซลเซียส) และในตู้เก็บที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 25 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง จากนั้นจึงส่งตัวอย่างส่งวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีชีวภาพทางด้าน Total Plate count การย่อยสลายที่สมบูรณ์ (GI), C/N ratio, OM, Total N, N-NH^+_4 ,N-NO^-_3 ,Available P, Exchangeable K, และ Plant Growth Promoters (GA, IAA, NA) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา (shelf life) 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

1. ทดสอบผลิตและเก็บรักษามูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ณ โรงเรือนผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาไส้เดือนดิน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

2. ศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ (culturable technique) ในลำไส้ไส้เดือนดิน ณ ห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ หน่วยวิจัยเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

3. การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีไม่เพาะเลี้ยง (unculturable technique) ในลำไส้ไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยสายพันธุ์ *Perionyx sp.*, *Metaphire posthuma* และชนิดแบคทีเรียในมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx sp.* ณ ห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาคารเสาวรัจนิตยวรรธนะ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย แม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

4. วิเคราะห์ Total plate counts (cfus/ml) ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน อาคารปฏิบัติการทางดินและปุ๋ยชั้นสูง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

5. วิเคราะห์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ (GI), C/N ratio, OM Total N, N-NH^+_4 , N-NO^-_3 , Available P, Exchangeable K , Plant Growth Promoters (GA, IAA, NA) ณ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง	มีนาคม 2556
สิ้นสุดการทดลอง	ตุลาคม 2557

บทที่4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

งานวิจัยที่ 1 การจำแนกชนิดแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยสายพันธุ์ *Perionyx* sp., *Metaphire posthuma* และชนิดแบคทีเรียในมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน โดยวิธีเพาะเลี้ยง (culturable technique)

ในการศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากตัวอย่างในลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* เก็บจากดินในพื้นที่เกษตร, ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากฟาร์มเลี้ยงวัวนม, ในลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากบ่อผลิตปุ๋ยหมัก, ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินเก็บจากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดินทางการค้า โดยคัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธีเพาะเลี้ยง (culturable technique) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) และ de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) บ่มเชื้อในสภาวะใช้ O_2 และไม่ใช้ O_2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้คือ

ตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* ที่เก็บจากดินในพื้นที่เกษตร สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 9 ไอโซเลท ประกอบด้วยเชื้อที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บ่มเชื้อในสภาวะใช้ O_2 จำนวน 5 ไอโซเลท คือ A-2, A-5, A-6, A-7 และ A-10 และเชื้อที่บ่มในสภาวะไม่ใช้ O_2 จำนวน 4 ไอโซเลท คือ AnA-3, AnA-4, AnA-9 และ AnA-10 (ตารางที่ 5)

ตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากฟาร์มเลี้ยงวัวนม สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 11 ไอโซเลท ประกอบด้วยเชื้อที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บ่มเชื้อในสภาวะใช้ O_2 จำนวน 10 ไอโซเลท คือ Po-2, Po-4, Po-5, Po-6, Po-9, Po-10, Po-12, Po-13, Po-14 และPo-15 และเชื้อที่บ่มในสภาวะไม่ใช้ O_2 จำนวน 1 ไอโซเลท คือ AnPo-3 (ตารางที่ 5)

ตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากบ่อเลี้ยง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 14 ไอโซเลท ประกอบด้วยเชื้อที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บ่มเชื้อในสภาวะใช้ O_2 จำนวน 12 ไอโซเลท คือ P1-1, P1-2, P1-5, P1-8, P1-10, P1-11, P1-12, P1-13, P1-15, P1-16, P1-19 และ P1-20 และเชื้อที่บ่มในสภาวะไม่ใช้ O_2 จำนวน 2 ไอโซเลท คือ AnP1-5 และAnP1-6 (ตารางที่ 5)

ตัวอย่างมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากบ่อเลี้ยง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 19 ไอโซเลท ประกอบด้วยเชื้อที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บ่มเชื้อในสภาวะใช้ O_2 ทั้ง 19 ไอโซเลท คือ V-1, V-2, V-3, V-4, V-5, V-6, V-7, V-9, V-10, V-11, V-12, V-15, V-17, V-18, V-19, V-20, V-22, V-23 และ V-24 (ตารางที่ 5)

ตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากบ่อเลี้ยง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 20 ไอโซเลท ประกอบด้วยเชื้อที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บ่มเชื้อในสภาวะใช้ O_2

จำนวน 11 ไอโซเลท คือ LV-2, LV-3, LV-4, LV-6, LV-7, LV-9, LV-11, LV-13, LV-14, LV-15 และ LV-18 และเชื้อที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) บ่มเชื้อในสภาวะใช้ O_2 จำนวน 9 ไอโซเลท คือ MRSLV-3, MRSLV-4, MRSLV-5, MRSLV-7, MRSLV-10, MRSLV-11, MRSLV-15, MRSLV-17, MRSLV-18 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างลำไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน

ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Metaphire posthuma* (ดินในพื้นที่เกษตร)	ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. (ฟาร์มวัวนม)	ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. (บ่อเลี้ยงไส้เดือน)	มูลไส้เดือนดินพันธุ์ *Perionyx* sp. (บ่อเลี้ยงไส้เดือน)	น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน *Perionyx* sp. (บ่อเลี้ยงไส้เดือน)
A-2	Po-2	P1-1	V-1	LV-2
A-5	Po-4	P1-2	V-2	LV-3
A-6	Po-5	P1-5	V-3	LV-4
A-7	Po-6	P1-8	V-4	LV-6
A-10	Po-9	P1-10	V-5	LV-7
AnA-3	Po-10	P1-11	V-6	LV-9
AnA-4	Po-12	P1-12	V-7	LV-11
AnA-9	Po-13	P1-13	V-9	LV-13
AnA-10	Po-14	P1-15	V-10	LV-14
	Po-15	P1-16	V-11	LV-15
	AnPo-3	P1-19	V-12	LV-18
		P1-20	V-15	MRSLV-3
		AnP1-5	V-17	MRSLV-4
		AnP1-6	V-18	MRSLV-5
			V-19	MRSLV-7
			V-20	MRSLV-10
			V-22	MRSLV-11
			V-23	MRSLV-15
			V-24	MRSLV-17
				MRSLV-18
9 ไอโซเลท	11 ไอโซเลท	14 ไอโซเลท	19 ไอโซเลท	20 ไอโซเลท

ในการจำแนกชนิดแบคทีเรียทั้ง 73 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ ศึกษาโดยทำการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 16S rRNA ด้วย primers 20F (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3') และ 1500R (5' GTT ACC TTG TTA CGA CTT3') ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR

product ด้วย primer 800R (5' TAC CAG GGT ATC TAA TCC 3') และนำผลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์ 16S rRNA ของตัวอย่างที่ศึกษากับฐานข้อมูล eztaxon-e ร่วมกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ในฐานข้อมูลโดยการสร้าง phylogenetic tree ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

ตัวอย่าง (A) ลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากดินในพื้นที่เกษตร คัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 9 ไอโซเลท แบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 98.70–100.00 % โดยมีความเหมือนกับแบคทีเรีย 5 genus คือ *Enterobacter*, *Aeromonas, Pseudomonas, Paenibacillus* และ *Bacillus* (ตารางที่ 6) และมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับแบคทีเรียดังต่อไปนี้ คือ (Complex: *Bacillus cereus*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*), *Aeromonas enteropelogenes*, *Bacillus flexus*, *Pseudomonas mendocina* และ *Paenibacillus barcinonensis* (ภาพที่ 2 - ภาพที่ 5)

ตารางที่ 6 ชนิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง (A) ลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* ที่เก็บจากดินในแปลงเกษตร

Query	Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession
A-2	622	*Enterobacter hormaechei* ATCC 49162^T	99.36	AFHR01000079
A-5	662	*Aeromonas sanarellii* A2-67^T	99.55	FJ230076
A-6	692	*Pseudomonas mendocina* LMG 1223^T	98.82	Z76664
A-7	681	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
A-10	682	(Complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.85	AE016877
AnA-3	702	*Bacillus megaterium* IAM 13418^T	99.57	D16273
AnA-4	692	*Bacillus drentensis* LMG 21831^T	100	AJ542506
AnA-9	692	*Paenibacillus barcinonensis* BP-23^T	98.70	AJ716019
AnA-10	692	*Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* LMG 2683^T	99.57	Z96079

ตัวอย่าง (PO) ลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากฟาร์มวัวนม คัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 11 ไอโซเลท แบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 97.97–100.00 % โดยมีความเหมือนกับแบคทีเรีย 3 genus คือ *Aeromonas, Bacillus* และ *Shewanella* (ตารางที่ 7) และมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับแบคทีเรียดังต่อไปนี้ คือ (Complex: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus asahii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus pseudomycoides*), (Complex: *Aeromonas enteropelogenes* , *Aeromonas punctata* subsp. *caviae*, *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*,

Aeromonas sanarellii), *Aeromonas enteropelogenes*, *Aeromonas popoffii* และ *Shewanella putrefaciens* (ภาพที่ 2 - ภาพที่ 5)

ตารางที่ 7 ชนิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง (PO) ลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากฟาร์มวัวนม

Query	Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession
Po-2	690	*Bacillus marisflavi* TF-11^T	99.42	AF483624
Po-4	670	*Bacillus aryabhattai* B8W22^T	100	EF114313
Po-5	690	*Bacillus marisflavi* TF-11^T	99.71	AF483624
Po-6	690	*Shewanella putrefaciens* LMG 26268^T	99.71	X81623
Po-9	690	*Aeromonas media* ATCC 33907^T	99.27	X74679
Po-10	690	(Complex) *Aeromonas enteropelogenes* ATCC 49657^T	99.27	X60415
Po-12	690	(Complex) *Aeromonas punctata* subsp. *punctata* NCIMB 13016^T	100	X60408
Po-13	689	*Bacillus asahii* MA001^T	97.97	AB109209
Po-14	690	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
Po-15	680	(Complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.85	AE016877
AnPo-3	672	*Aeromonas sanarellii* A2-67^T	99.7	FJ230076

ตัวอย่าง (P1) ลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 14 ไอโซเลท แบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 99.71–100.00 % โดยมีความเหมือนกับแบคทีเรีย 4 genus คือ *Paenibacillus, Citrobacter, Aeromonas* และ *Bacillus* (ตารางที่ 8) และมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับแบคทีเรีย ดังต่อไปนี้ คือ (Complex: *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*), (Complex: *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. amyloliquefaciens, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum), (Complex: *Bacillus altitudinis*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus aerophilus*,), *Bacillus marisflavi*, *Bacillus safensis*, *Bacillus aryabhattai*, *Paenibacillus oceanisediminis* และ *Citrobacter freundii* (ภาพที่ 2 - ภาพที่ 5)

ตารางที่ 8 ชนิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง (P1) ลำไส้ส่วนปลายไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน

Query	Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession
P1-1	680	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
P1-2	672	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	99.85	AJ831844
P1-5	681	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^T	99.85	AJVF01000043
P1-8	690	*Bacillus safensis* FO-036b^T	100	AF234854
P1-10	690	*Bacillus marisflavi* TF-11^T	99.71	AF483624
P1-11	690	*Bacillus aryabhattai* B8W22^T	100	EF114313
P1-12	690	(Complex) *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429^T	99.86	AMXN01000021
P1-13	690	*Bacillus drentensis* LMG 21831^T	99.84	AJ542506
P1-15	690	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
P1-16	630	*Paenibacillus oceanisediminis* L10^T	99.84	JF811909
P1-19	690	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
P1-20	690	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^T	99.85	AJVF01000043
AnP1-5	667	*Citrobacter freundii* ATCC 8090^T	100	ANAV01000046
AnP1-6	692	(Complex) *Aeromonas punctata* subsp. *punctata* NCIMB 13016^T	100	X60408

ตัวอย่าง (V) มูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 19 ไอโซเลท แบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 98.40–100.00 % โดยมีความเหมือนกับแบคทีเรีย 4 genus คือ *Lysinibacillus, Neisseria, Pseudomonas* และ *Bacillus* (ตารางที่ 9) และมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับแบคทีเรียดังต่อไปนี้ คือ (Complex: *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*, *Bacillus tequilensis*), *Bacillus licheniformis*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus safensis*, *Pseudomonas mendocina* และ *Pseudomonas alcaligenes* (ภาพที่ 2 - ภาพที่ 5)

ตารางที่ 9 ชนิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก (V) มูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน

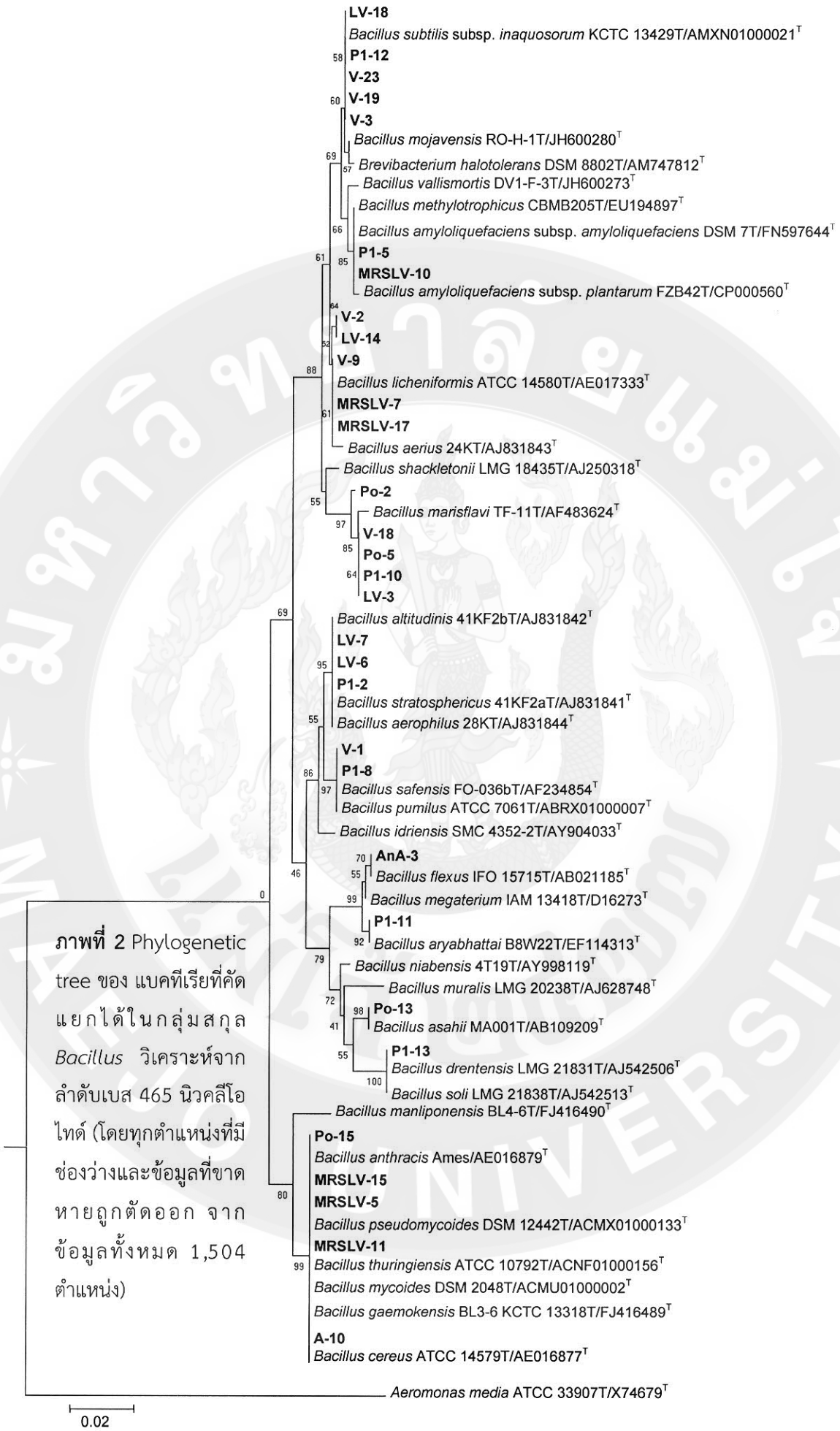
Query	Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession
V-1	660	*Bacillus safensis* FO-036b^T	99.85	AF234854
V-2	690	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.57	AE017333
V-3	680	(Complex) *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429^T	99.85	AMXN01000021
V-4	690	*Lysinibacillus sphaericus* C3-41^T	99.27	CP000817
V-5	690	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
V-6	690	*Neisseria subflava* U37^T	100	AJ239291
V-7	500	*Bacillus asahii* MA001^T	100	AB109209
V-9	500	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.8	AE017333
V-10	690	*Bacillus asahii* MA001^T	99.86	AB109209
V-11	680	*Pseudomonas alcaligenes* LMG 1224^T	99.26	Z76653
V-12	620	*Pseudomonas oleovorans* DSM 1045^T	99.35	Z76665
V-15	670	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
V-17	690	(Complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	100	AE016877
V-18	680	*Bacillus marisflavi* TF-11^T	99.71	AF483624
V-19	562	(Complex) *Bacillus tequilensis* 10b^T	99.82	HQ223107
V-20	690	*Bacillus kochii* WCC 4582^T	100	FN995265
V-22	690	*Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T	98.40	AB030583
V-23	689	(Complex) *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429^T	99.85	AMXN01000021
V-24	690	*Bacillus safensis* FO-036b^T	100	AF234854

ตัวอย่าง (LV) น้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน คัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 19 ไอโซเลท แบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 98.21–100.00 % โดยมีความเหมือนกับแบคทีเรีย 5 genus คือ *Vibrio, Staphylococcus, Enterococcus, Rummeliibacillus* และ *Bacillus* (ตารางที่ 10) และมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับแบคทีเรียดังต่อไปนี้ คือ (Complex: *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*, *Bacillus tequilensis*), (Complex: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Amyloliquefaciens*, *Bacillus methylotrophicus*), (Complex: *Bacillus aerophilus*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus altitudinis*), (Complex: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus asahii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus gaemokensis*,

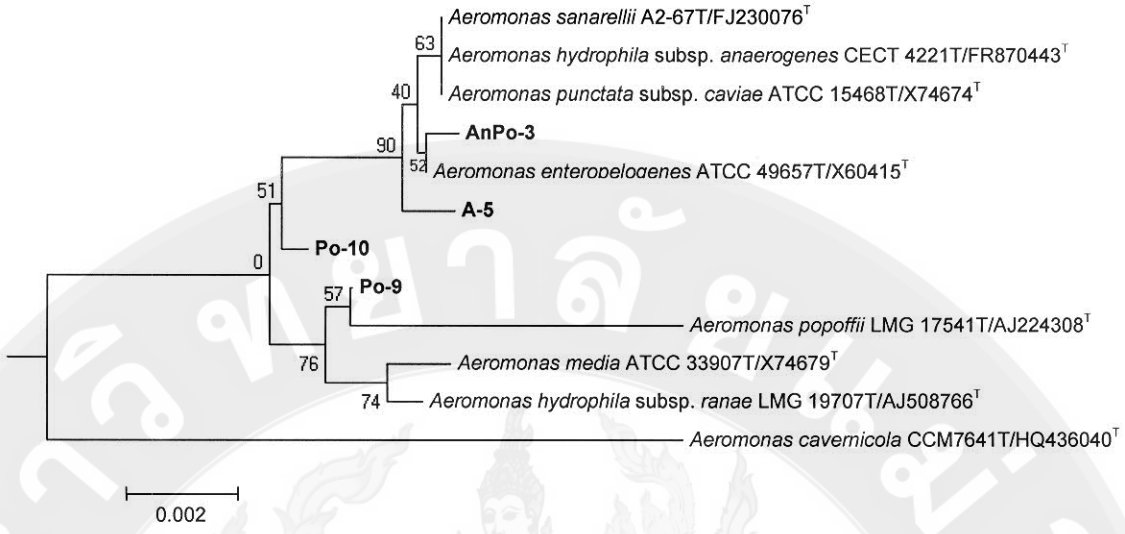
Bacillus pseudomycoides), *Bacillus licheniformis*, *Bacillus marisflavi*, *Vibrio metschnikovii* และ *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (ภาพที่ 2 - ภาพที่ 5)

ตารางที่ 10 ชนิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก (LV) น้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงอายุ 3 เดือน

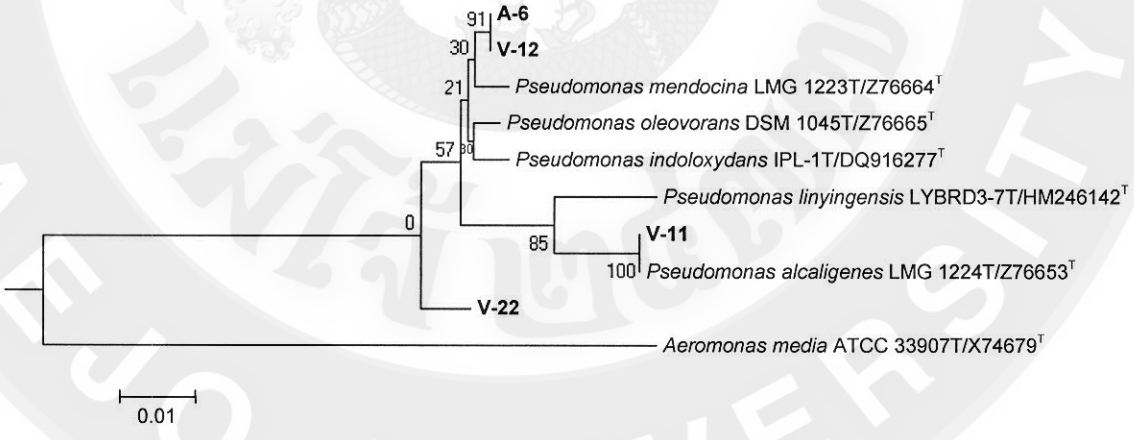
Query	Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession
LV-2	672	*Vibrio metschnikovii* CIP 69.14^T	98.21	ACZO01000009
LV-3	632	*Bacillus vietnamensis* 15-1^T	98.42	AB099708
LV-4	692	*Bacillus marisflavi* TF-11^T	100	AF483624
LV-6	682	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	99.85	AJ831844
LV-7	692	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	99.86	AJ831844
LV-9	692	*Bacillus circulans* ATCC 4513^T	99.86	AY724690
LV-1	692	*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* GTC 843^T	99.71	AB233327
LV-13	682	*Bacillus kochii* WCC 4582^T	99.85	FN995265
LV-14	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.42	AE017333
LV-15	692	(Complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
LV-18	692	(Complex) *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429^T	99.86	AMXN01000021
MRSLV-3	671	(Complex) *Bacillus anthracis* ATCC 14578^T	100	AB190217
MRSLV-5	692	(Complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.86	AE016877
MRSLV-7	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.71	AE017333
MRSLV-10	692	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^T	99.86	AJVF01000043
MRSLV-11	692	(Complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.86	AE016877
MRSLV-15	692	(Complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.71	AE016877
MRSLV-17	502	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.6	AE017333
MRSLV-18	692	*Enterococcus thailandicus* FP48-3^T	99.71	EF197994



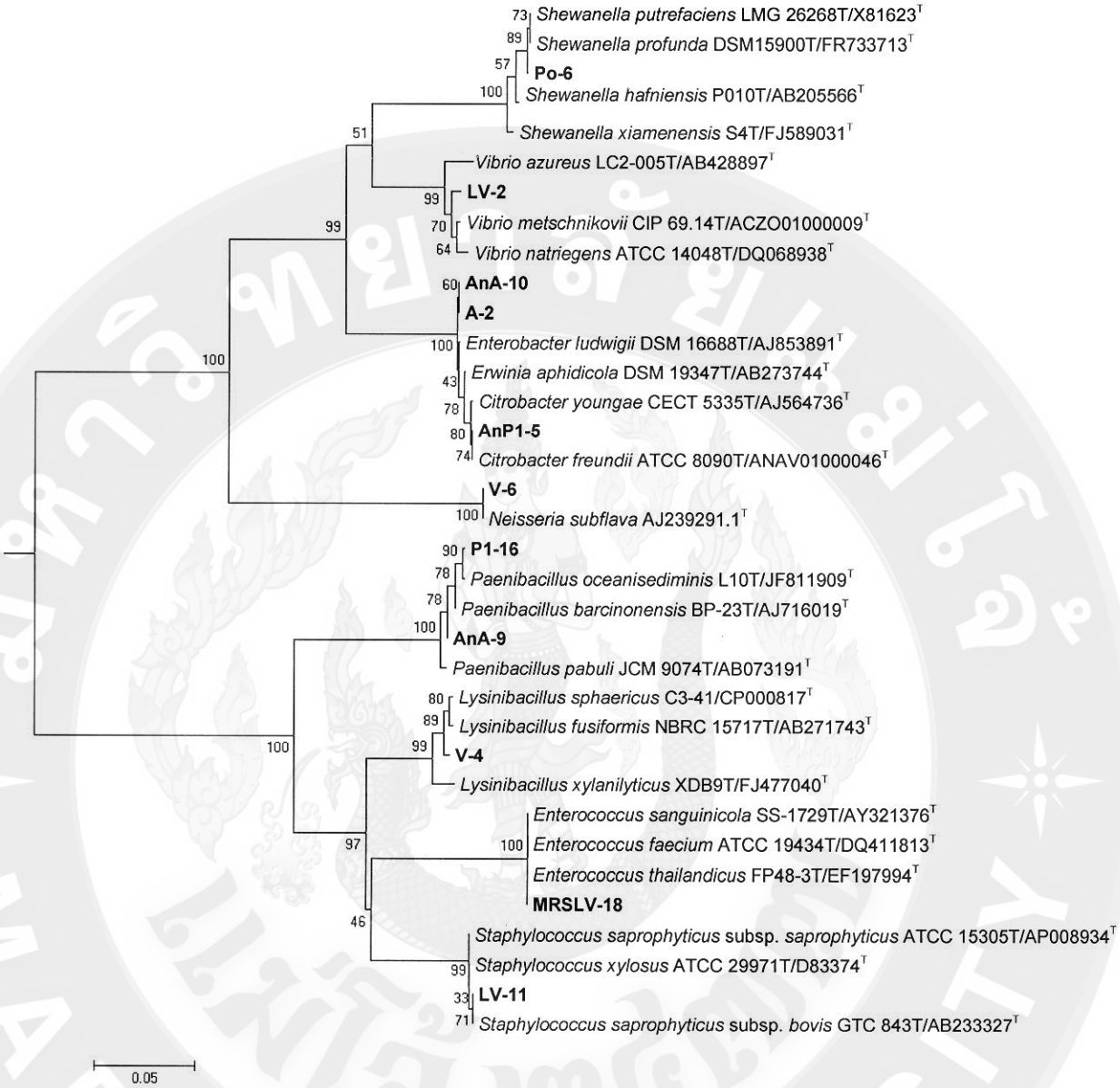
ภาพที่ 2 Phylogenetic tree ของ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในกลุ่มสกุล *Bacillus* วิเคราะห์จากลำดับเบส 465 นิวคลีโอไทด์ (โดยทุกตำแหน่งที่มีช่องว่างและข้อมูลที่ขาดหายถูกตัดออก จากข้อมูลทั้งหมด 1,504 ตำแหน่ง)



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree ของ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในกลุ่มสกุล *Aeromonas* วิเคราะห์จากลำดับเบส 648 นิวคลีโอไทด์ (โดยทุกตำแหน่งที่มีช่องว่างและข้อมูลที่ขาดหายถูกตัดออก จากข้อมูลทั้งหมด 1,455 ตำแหน่ง)



ภาพที่ 4 Phylogenetic tree ของ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในกลุ่มสกุล *Pseudomonas* วิเคราะห์จากลำดับเบส 614 นิวคลีโอไทด์ (โดยทุกตำแหน่งที่มีช่องว่างและข้อมูลที่ขาดหายถูกตัดออก จากข้อมูลทั้งหมด 1,455 ตำแหน่ง)



ภาพที่ 5 Phylogenetic tree ของ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในกลุ่มสกุล *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Enterococcus*, *Lysinibacillus*, *Shewanella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Neisseria*, *Vibrio* วิเคราะห์จากลำดับเบส 557 นิวคลีโอไทด์ (โดยทุกตำแหน่งที่มีช่องว่างและข้อมูลที่ขาดหาย ถูกตัดออกจากข้อมูลทั้งหมด 1,355 ตำแหน่ง)

ในส่วนของการจำแนกชนิดแบคทีเรียแบบเพาะเลี้ยงครั้งนี้ พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลใน 2 Phylum คือ Phylum Firmicutes และ Proteobacteria ประกอบด้วย 3 Class คือ Bacilli, Gammaproteobacteria และBetaproteobacteria โดยจำแนกอยู่ใน Class Bacilli จำนวน 53 ไอโซเลท Class Gammaproteobacteria จำนวน 15 ไอโซเลท และ Class Betaproteobacteria จำนวน 1 ไอโซ (ตารางที่ 11) จำแนกอยู่ใน 13 Genus คือ *Bacillus* (68.48 %), *Paenibacillus* (2.74 %), *Staphylococcus* (1.37 %), *Enterococcus* (1.37 %), *Lysinibacillus* (1.37 %) และ *Rummeliibacillus* (1.37 %), *Aeromonas* (9.58 %), *Pseudomonas* (5.47 %), *Enterobacter* (2.74 %), *Shewanella* (1.37 %), *Citrobacter* (1.37 %), *Neisseria* (1.37 %) และ *Vibrio* (1.37 %) ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Hyun-Jung *et al.,*(2004) ที่ศึกษาพบคัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia fetida* พบจำนวน 12 สกุลประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เป็นกลุ่มหลัก 31% นอกจากนั้นพบสกุล 6% *Aeromonas*, 3% *Agromyces*, , 1% *Bosea*, 6% *Gordonia*, 6% *Klebsiella*, 7% *Microbacterium*, 2% *Nocardia*, 10% *Pseudomonas*, 19% *Rhodococcus*, 2% *Tsukamurella*, และ 7% *Streptomyces* และในงานวิจัยของ Jayakumar *et al.*,(2013) ที่ได้ศึกษาถึงชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตด้วยไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* พบแบคทีเรีย 13 สกุล ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacillus* (57%), *Pseudomonas* (15%), *Microbacterium* (12%), *Acinetobacter* (5%), *Chryseobacterium* (3%), *Arthrobacter, Pseudoxanthomonas, Stenotrophomonas, Paenibacillus, Rhodococcus, Enterobacter, Rheinheimera* และ *Cellulomonas*. และ Sung Wook *et al.*, (2011) ได้ศึกษาถึงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* พบส่วนใหญ่เป็น *Entomoplasma somnilux* และ *Bacillus licheniformis* และ Idowu *et al.*, (2006) คัดแยกแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Libyodrillus violaceous* มูลไส้เดือนดิน และดิน พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus, Bacillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus mutans, Clostridium, Spirocheata spp., Azotobacter* spp., *Micrococcus lylae, Ainetobacter* spp., *Halobacterium*

เมื่อพิจารณาความหลากหลายของแบคทีเรียที่คัดแยกและจำแนกได้ในระหว่างตัวอย่างพบว่าในส่วนของความหลากหลายระหว่างตัวอย่างที่ใช้ศึกษา พบว่า ตัวอย่างจากลำไส้ไส้เดือนดินพันธุ์ *Metaphire posthuma* พบ 5 Genus (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Aeromonas,* และ *Pseudomonas*) และ ตัวอย่างจากน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน พบ 5 Genus (*Bacillus*, *Staphylococcus, Enterococcus, Rummeliibacillus* และ *Vibrio*) รองลงมาคือ ตัวอย่างจากลำไส้ไส้เดือนดินพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงไส้เดือน พบ 4 Genus (*Bacillus, Paenibacillus*, *Citrobacter* และ *Aeromonas*) และ ตัวอย่างจากมูลไส้เดือนดิน พบ 4 Genus (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Neisseria* และ *Pseudomonas*) ส่วนตัวอย่างจากลำไส้ไส้เดือนดินพันธุ์ *Perionyx* sp. จากฟาร์มวัวนม พบมีความหลากหลายน้อยที่สุด 3 Genus (*Bacillus, Aeromonas* และ *Shewanella*) โดย *Bacillus* เป็นสกุลที่พบในทุกตัวอย่าง *Aeromonas* และ *Paenibacillus* พบเฉพาะในตัวอย่างที่เป็นลำไส้ไส้เดือนดินไม่พบในตัวอย่างผลผลิตมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ซึ่งผลวิจัยในเรื่องนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ

Byzov *et al*., (2009) ที่สรุปว่ากลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินนั้นมีความแตกต่างกับกลุ่มที่คัดแยกได้จากดินและมูลไส้เดือนดิน รวมถึง Dwipendra *et al*., (2010) ที่สรุปว่าแหล่งที่อยู่อาศัยของไส้เดือนดินมีอิทธิพลต่อความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียมากกว่าชนิดของสายพันธุ์ไส้เดือนดิน ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้มีความต่างกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Idowu *et al*., (2006) ที่ศึกษาพบเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ไส้เดือนดินที่เก็บได้จากบริเวณที่ทิ้งขยะมีความหลากหลายมากที่สุด ตามด้วยตัวอย่างไส้เดือนดินที่เก็บได้จากบริเวณสวนพฤกษชาติ ในขณะที่ตัวอย่างไส้เดือนดินที่เก็บได้จากพื้นที่ทางการเกษตรพบความหลากหลายน้อยที่สุด และแตกต่างจากผลการศึกษาของ Byzov *et al*., (2009) ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus terrestris*, และ *Eisenia fetida* รวมถึง คัดแยกจากดิน และมูลไส้เดือนดินใหม่ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ R2A agarized medium ในการคัดแยก พบแบคทีเรีย 4 กลุ่ม*คือ* Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes และ Firmicutes ทั้งนี้เป็นไปได้ว่างานทดลองครั้งนี้ใช้ nutrient agar (NA) ซึ่งเป็นอาหารไม่เฉพาะที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และ de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) ซึ่งเป็นอาหารเฉพาะที่ใช้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* ในการศึกษาส่งผลให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ใน Phylum Proteobacteria และ Firmicutes เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่การศึกษาของ Byzov *et al*., (2009) ใช้ R2A agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเจริญได้ช้า และมักถูกกดด้วยชนิดที่โตเร็วกว่าในอาหารที่มีสารอาหารมาก (van der Linde *et al.,* 1999) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนานำไปเลี้ยงแบคทีเรียที่ไม่โตในอาหารที่มีสารอินทรีย์ที่ซับซ้อนมากอีกด้วย (Rola *et al*., 2002) จึงสามารถคัดแยกเชื้อหลากหลายกลุ่มมากกว่า

ตารางที่ 11 ผลการเปรียบเทียบกลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดิน ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินกับฐานข้อมูล eztaxon-e

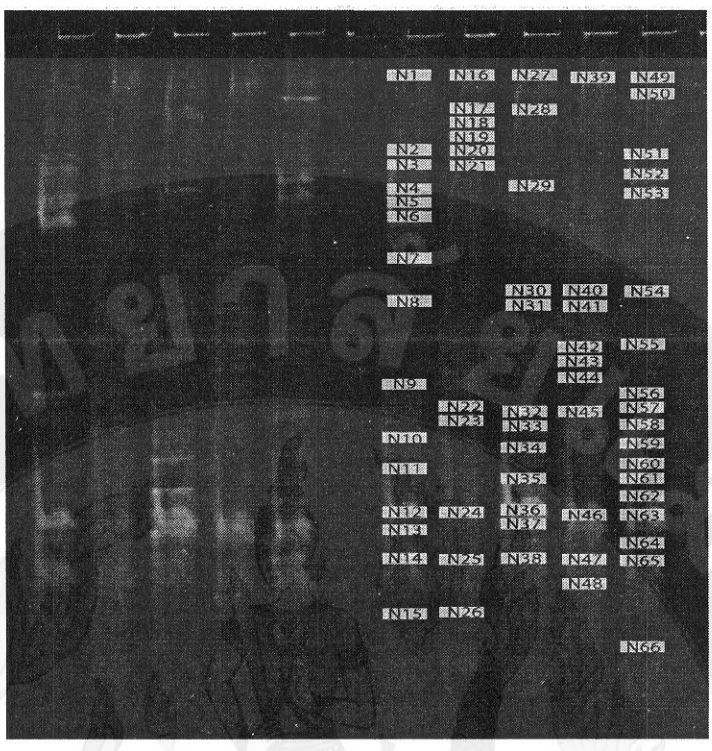
กลุ่มแบคทีเรีย	ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Metaphire posthuma* (ดินในพื้นที่เกษตร)	ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. (ฟาร์มวัวนม)	ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. (บ่อเลี้ยงไส้เดือน)	มูลไส้เดือนดินพันธุ์ *Perionyx* sp. (บ่อเลี้ยงไส้เดือน)	น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน *Perionyx* sp. (บ่อเลี้ยงไส้เดือน)
Proteobacteria					
γ-Proteobacteria	4 isolates	5 isolates	2 isolates	3 isolates	1 isolates
β-Proteobacteria	-	-	-	1 isolates	-
Firmicutes					
Bacilli	5 isolates	6 isolates	12 isolates	12 isolates	18 isolates

ในด้านของการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้น จากการค้นคว้าวิจัยพบว่าได้แบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* และ *Enterobacter* แบคทีเรียเหล่านี้เป็นกลุ่มที่สามารถสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoters) ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Free-living nitrogen fixers) และละลายธาตุฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงในดินได้ (Phosphate solubilizers) (Valle-Molinas *et al*., 2007; Byzov *et al*., 2007; Singleton *et al*., 2003) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Brevibacillus agri, Bacillus cereus, Bacillus licheniformis* และ *Brevibacillus parabrevis* ใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากเศษปลาได้ผลดี (Joong Kyun *et al*.,2010) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* นั้นได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการเกษตรหลายด้านด้วยกัน เช่น การใช้ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช ยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช คือ *Fusarium*, *oxysporum*, *Sclerotium* และ *Ralstonia solunaceurm* นอกจากนี้ยังมีการใช้ *Bacillus* sp. เติมลงไปในบ่อเลี้ยงกุ้งลดการเกิดโรคเรืองแสงที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* ด้วย (Loreno-Osti *et al*., 2004; Martínez-Romero, 2001) และใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย (vermifilter) โดยกลุ่มจุลินทรีย์หลักที่พบในระบบ vermifilter อยู่ในกลุ่ม Proteobacteria โดยเฉพาะ γ-Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, และ Planctomycetes (Jing *et al*.,2013)

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน โดยวิธีไม่เพาะเลี้ยง (Unculturable technique)

ในการศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากตัวอย่างในลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* เก็บจากดินในพื้นที่เกษตร, ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากฟาร์มเลี้ยงวัวนม, ในลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. เก็บจากบ่อผลิตปุ๋ยหมัก, ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินเก็บจากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดินทางการค้า โดยคัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธีไม่เพาะเลี้ยง (unculturable technique) โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 16S rRNA ด้วย primers 341F (GC-Clamp) และ 518R จากนั้นแยกโมเลกุลของ DNA ที่มีลำดับเบสต่างกันด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel electrophoresis (DGGE) โดยใช้ 10% acrylamide gel ที่มีสาร denaturant เข้มข้น 30-50% ใช้กระแสไฟฟ้า 65V เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

พบแถบดีเอ็นเอที่แยกออกมาได้จำนวน 66 แถบ ประกอบด้วย ตัวอย่างจาก (A) ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากดินในแปลงเกษตร จำนวน 15 แถบ (N1-N15) ตัวอย่างจาก (PO) ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp.จากฟาร์มวัวนม จำนวน 11 แถบ (N16-N26) ตัวอย่างจาก (P1) ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดิน จำนวน 12 แถบ (N27-N38) ตัวอย่างจาก (V) ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน จำนวน 10 แถบ (N39-N48) ตัวอย่างจาก (LV) น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน จำนวน 18 แถบ (N49-N66) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงแถบดีเอ็นเอของแบคทีรียจากตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดิน ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน บน 10 % acrylamide gel (A ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Metaphire posthuma*, PO ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp.จากฟาร์มวัวนม, P1 ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดิน, V ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน, LV น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน)

เมื่อทำการคัดเลือกแถบดีเอ็นจากตัวอย่างทั้ง 66 แถบ ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วย primers 341F (GC-Clamp) และ 518R จากนั้นส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยใช้ primer 314F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') ที่ First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย และนำผลลำดับเบสที่ได้ไปจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://ncbi.nlm.nih.gov/) ได้ผลดังต่อไปนี้

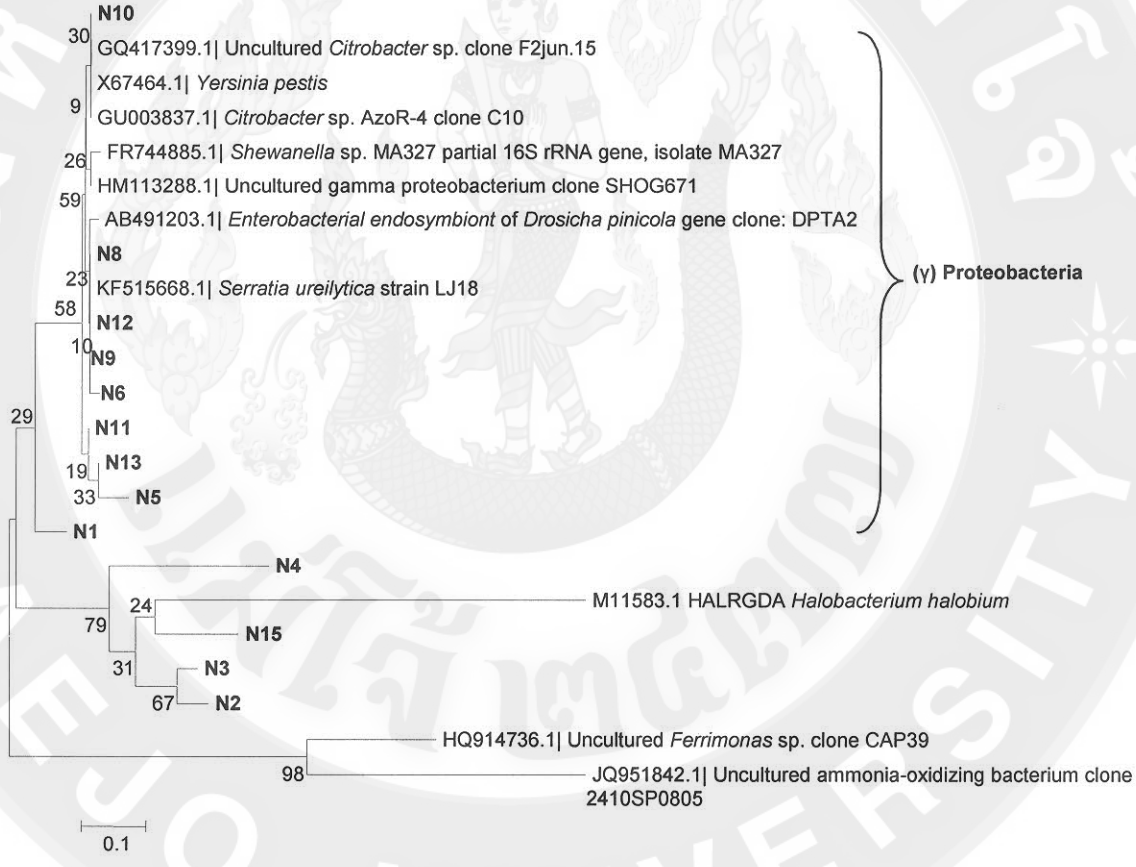
ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง (A) ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* ที่เก็บจากพื้นที่ทางการเกษตร จำนวน 15 แถบดีเอ็นเอ กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า ตัวอย่างที่สามารถเปรียบเทียบได้มีจำนวน 11 แถบดีเอ็นเอ โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 82-98 เปอร์เซ็นต์ โดยภายหลังจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่า แบคทีเรียจากตัวอย่าง A แถบดีเอ็นเอ N1, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N13 และ N14 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Gammaproteobacteria (ตารางที่ 12, ภาพที่ 7)

ตารางที่ 12 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง (A) ลำไส้ ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* ที่ เก็บจากพื้นที่ทางการเกษตรกับฐานข้อมูล NCBI

Sample ID	Identified as	Query cover	Ident	Accession	Taxonomy
N1	Uncultured *Ferrimonas* sp. clone CAP39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	85%	HQ914736	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Ferrimonadaceae; Ferrimonas;
N2	*Serratia ureilytica* strain LJ18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	95%	KF515668	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia.
N3	no significant similarity found				-
N4	Uncultured bacterium clone DJ-J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	77%	82%	FJ601386	Bacteria; environmental samples
N5	Enterobacterial endosymbiont of *Drosicha pinicola* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: DPTA2	100%	89%	AB491203	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae
N6	*Serratia ureilytica* strain LJ18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	95%	KF515668	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;Enterobacteriaceae; Serratia
N7	No significant similarity found				Eukaryota; environmental samples.
N8	Uncultured gamma proteobacterium clone SHOG671 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%	HM113288	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; environmental samples.
N9	Uncultured gamma proteobacterium clone SHOG671 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%	HM113288	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; environmental samples.
N10	Uncultured *Citrobacter* sp. clone F2jun.15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%	GQ417399	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Citrobacter
N11	Uncultured bacterium clone ncd96f03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	94%	HM256877	Bacteria; Gammaproteobacteria; environmental samples.

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Sample ID	Identified as	Query cover	Ident	Accession	Taxonomy
N12	Uncultured bacterium clone ncd96f03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%	HM256877	Bacteria; Gammaproteobacteria; environmental samples.
N13	Uncultured bacterium clone ncd96f03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	96%	HM256877	Bacteria; Gammaproteobacteria; environmental samples.
N14	No significant similarity found				-
N15	No significant similarity found				-



ภาพที่ 7 Phylogenetic tree ของ 16S rRNA gene จากตัวอย่าง (A) ลำไส้ไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Metaphire posthuma* สร้างจาก 150 นิวคลีโอไทด์

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง (PO) ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บได้จากฟาร์มเลี้ยงวัวนมจำนวน 11 แถบดีเอ็นเอ กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 83-97 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างที่สามารถเปรียบเทียบได้มีจำนวนทั้งหมด 11 แถบดีเอ็นเอ โดยมีความเหมือนกับฐานข้อมูล Uncultured bacterium clone จาก environmental samples ทั้งหมด ไม่สามารถระบุกลุ่มแบคทีเรียได้ โดยภายหลังจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่า แบคทีเรียจากตัวอย่าง PO แถบดีเอ็นเอ N16, N25 และ N22 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Alphaproteobacteria แถบดีเอ็นเอ N18, N19, N23 และ N26 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Gammaproteobacteria (ตารางที่ 13, ภาพที่ 8)

ตารางที่ 13 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง (PO) ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บได้จากฟาร์มเลี้ยงวัวนม กับฐานข้อมูล NCBI

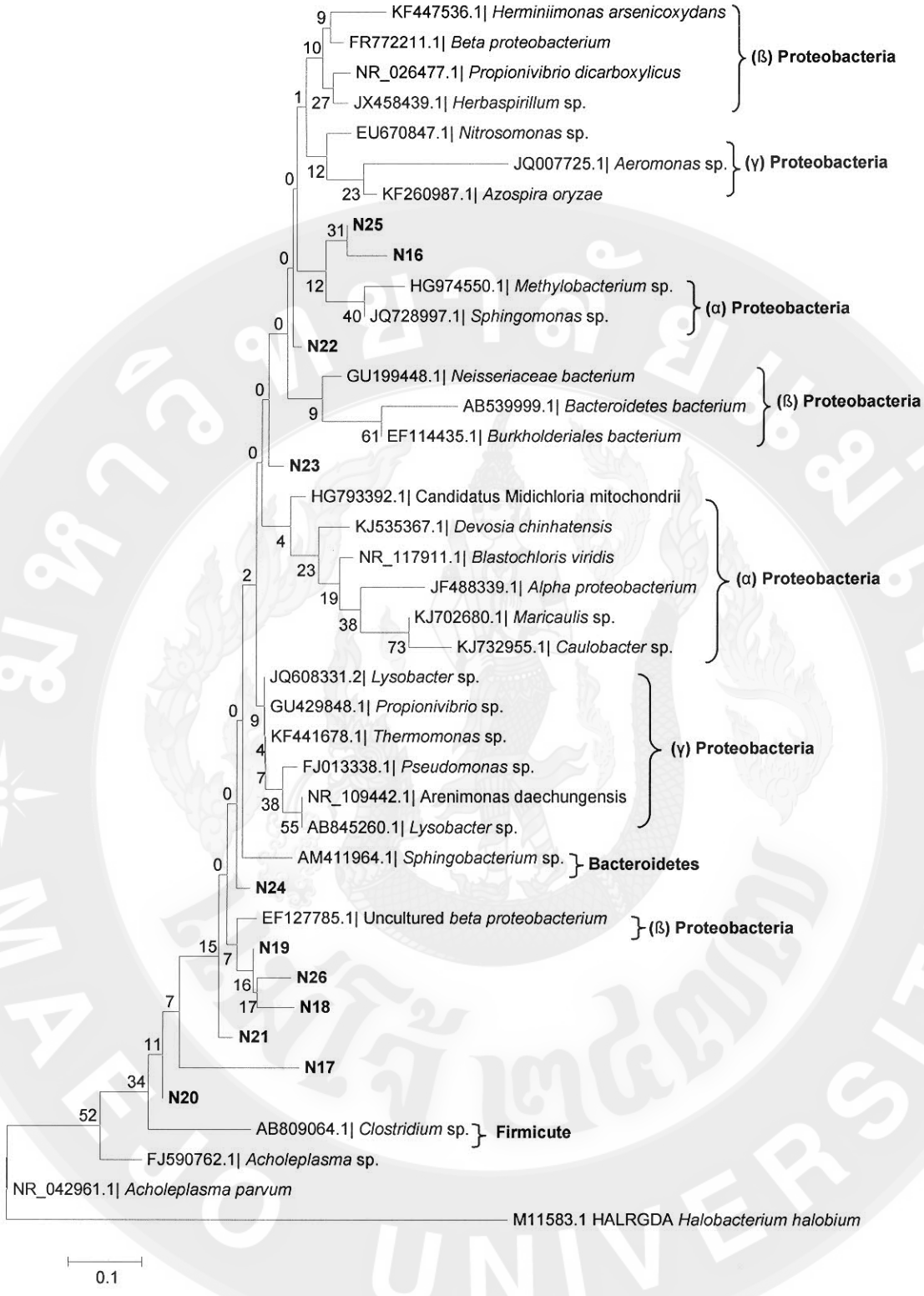
Sample ID	Identified as	Query cover	Ident	Accession	Taxonomy
N 16	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 22-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	87%	GQ351488	Bacteria; environmental samples
N 17	Uncultured bacterium clone PCDGW_51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54%	93%	GQ257654	Bacteria; environmental samples
N 18	Uncultured bacterium clone PCDGW_51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	48%	90%	GQ257654	Bacteria; environmental samples
N 19	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band W4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	49%	93%	JQ890611	Bacteria; environmental samples
N 20	Uncultured bacterium clone F1Q32TO04D8486 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	59%	90%	GU756544	Bacteria; environmental samples
N 21	Uncultured bacterium clone Pohang_WWTP_February.2006_2452 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	41%	95%	HQ485638	Bacteria; environmental samples
N 22	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band Yugang-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	85%	JQ180228	Bacteria; environmental samples
N 23	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: 47_12	47%	97%	AB517889	Bacteria; environmental samples
N 24	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	83%	EF127788	Bacteria; environmental samples

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Sample ID	Identified as	Query cover	Ident	Accession	Taxonomy
N 25	Uncultured bacterium clone F1Q32TO03C42JX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%	GU747634	Bacteria; environmental samples
N 26	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band W4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51%	92%	JQ890611	Bacteria; environmental samples

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง (P1) ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บได้จากบ่อเลี้ยงผลิตปุ๋ยหมักจำนวน 12 แถบดีเอ็นเอ กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 87-99 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างที่สามารถเปรียบเทียบได้มีจำนวนทั้งหมด 12 แถบดีเอ็นเอ โดยภายหลังจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่า แถบดีเอ็นเอ N27 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Betaproteobacteria แถบดีเอ็นเอ N27, N29, N31, N32, N33, N34, N35, N36, N37 และ N38 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Gammaproteobacteria (ตารางที่ 14, ภาพที่ 9)

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตจากการกินขยะอินทรีย์ของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. กับฐานข้อมูล NCBI จำนวน 10 แถบดีเอ็นเอ พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 85-99 % โดยภายหลังจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่า แบคทีเรียจากตัวอย่าง V แถบดีเอ็นเอ N39, N40, N41 และ N46 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Betaproteobacteria แถบดีเอ็นเอ N42 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Gammaproteobacteria และ แถบดีเอ็นเอ N43 และ N44 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Bacteroidetes (ตารางที่ 15, ภาพที่ 10)



ภาพที่ 8 Phylogenetic tree ของ 16S rRNA gene จากตัวอย่าง (PO) ลำไส้ไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บจากฟาร์มวัวนม สร้างจาก 150 นิวคลีโอไทด์

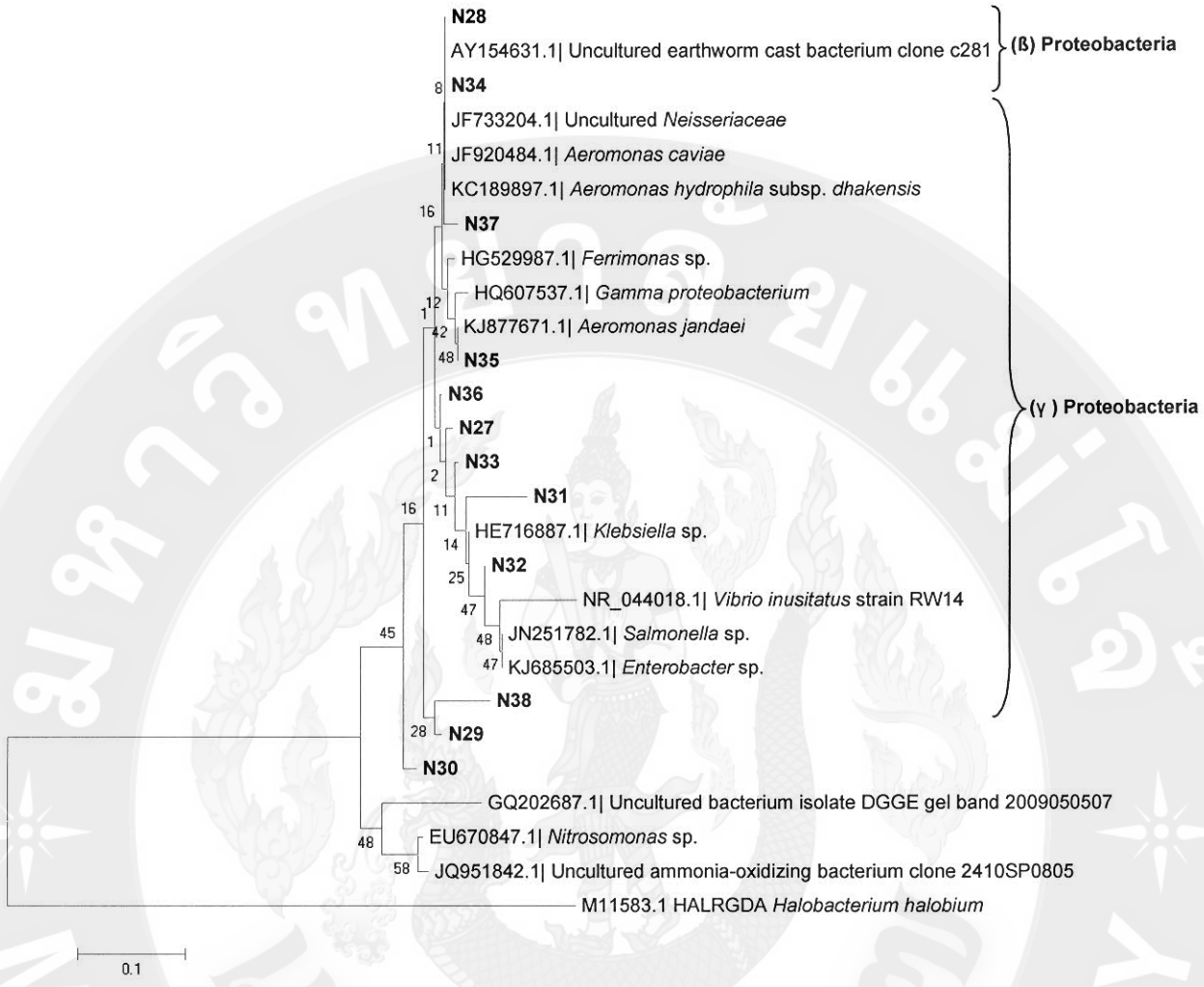
ตารางที่ 14 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง (P1) ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บได้จากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดินผลิตปุ๋ยหมัก กับฐานข้อมูล NCBI

Sample ID	Identified as	Query cover	Ident	Accession	Taxonomy
N 27	*Klebsiella* sp. BCA18 partial 16S rRNA gene, strain BCA18	100%	95%	HE716887	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;Enterobacteriaceae; Klebsiella.
N 28	Uncultured Neisseriaceae bacterium clone SIM039 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%	JF733204	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales; Neisseriaceae; environmental samples.
N 29	*Aeromonas* sp. POUE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	93%	JQ007725	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.
N 30	Uncultured bacterium clone aab20d10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%	DQ816622	Bacteria; environmental samples
N 31	Uncultured bacterium clone GXTJ5A301A5BBS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	92%	JX919123	Bacteria; environmental samples
N 32	*Enterobacter* sp. SB-YAKI-7B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	96%	KJ685503	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter
N 33	*Salmonella* sp. STM13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	96%	JN251782	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella.
N 34	*Aeromonas caviae* strain A4EL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%	JF920484	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.
N 35	*Aeromonas* sp. SCS5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%	KM091920	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Sample ID	Identified as	Query cover	Ident	Accession	Taxonomy
N 36	*Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* strain N2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%	KC189897	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.
N 37	*Aeromonas* sp. POUE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%	JQ007725	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas.
N 38	*Ferrimonas* sp. AK54 partial 16S rRNA gene, strain AK54	98%	87%	HG529987	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Ferrimonadaceae; Ferrimonas.

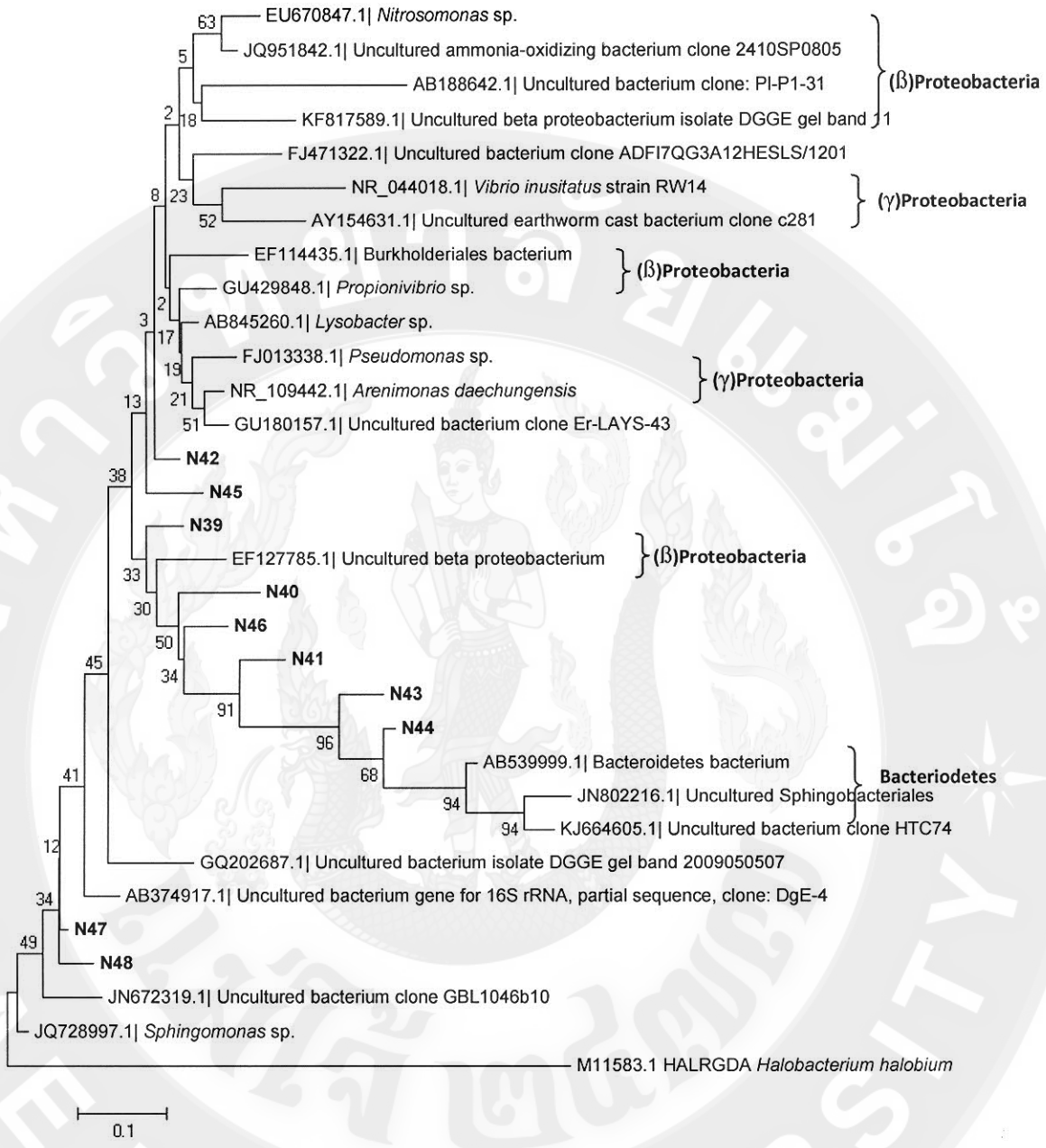
ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง (LV) น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน กับฐานข้อมูล NCBI จำนวน 18 แถบ พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 83-99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความเหมือนกับฐานข้อมูล Uncultured bacterium clone จาก environmental samples ทั้งหมด ไม่สามารถระบุกลุ่มแบคทีเรียได้ โดยภายหลังการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่า แบคทีเรียจากตัวอย่าง LV แถบดีเอ็นเอ N 52 และ N53 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Mollicutes แถบดีเอ็นเอ N50 และ N51 มีวิวัฒนาการใกล้กันกับแบคทีเรียใน Class Betaproteobacteria นอกจากนี้ไม่สามารถระบุกลุ่มได้ (ตารางที่ 16, ภาพที่ 11)



ภาพที่ 9 Phylogenetic tree ของ 16S rRNA gene จากตัวอย่าง (P1) ลำไส้ไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บจากบ่อเลี้ยง สร้างจาก 150 นิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง (V) ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตจากการกินขยะอินทรีย์ของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. กับฐานข้อมูล NCBI

Sample ID	Identified as	Query cover	Ident	Accession	Taxonomy
N39	Uncultured beta proteobacterium isolate DGGE gel band 11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	99%	EF127785	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; environmental samples
N40	Uncultured bacterium clone Er-LAYS-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	51%	92%	GU180157	Bacteria; environmental samples.
N41	Uncultured beta proteobacterium isolate DGGE gel band 11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	49%	93%	EF127785	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; environmental samples
N42	*Lysobacter* sp. ICRI9 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	60%	93%	AB845260	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Lysobacter
N43	Uncultured Sphingobacteriales bacterium clone 2A-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	92%	JN802216	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; environmental samples
N44	Uncultured bacterium clone HTC74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	90%	KJ664605	Bacteria; environmental samples.
N45	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone 2410SP0805 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	85%	JQ951842	Bacteria; environmental samples.
N46	Uncultured beta proteobacterium isolate DGGE gel band 11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	95%	EF127785	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; environmental samples
N47	Uncultured bacterium clone GBL1046b10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	89%	JN672319	Bacteria; environmental samples.
N48	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: DgE-4	51%	99%	AB374917	Bacteria; environmental samples.



ภาพที่ 10 Phylogenetic tree ของ 16S rRNA gene จากตัวอย่าง (V) ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน สร้างจาก 150 นิวคลีโอไทด์

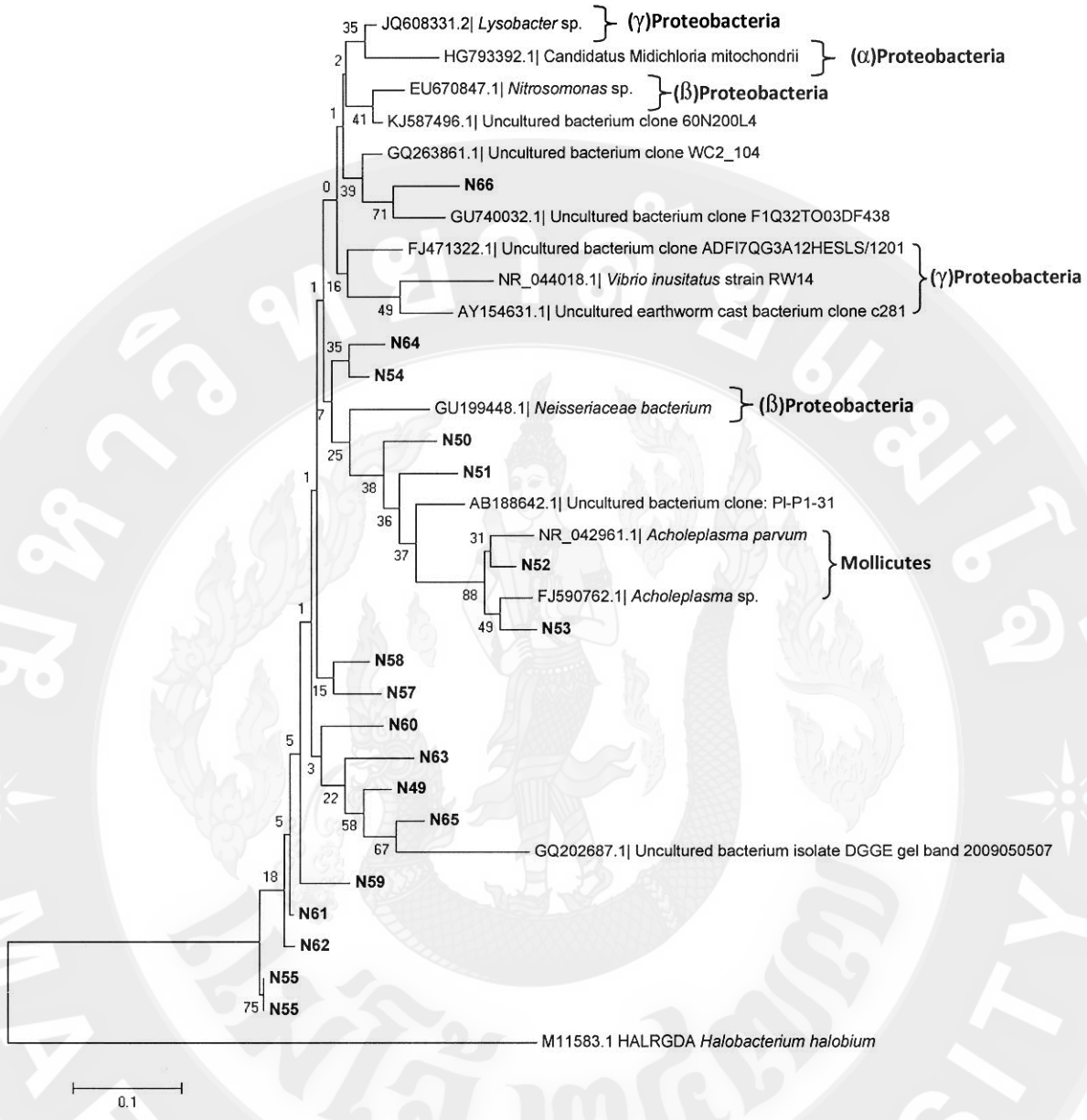
ตารางที่ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตจากการกินขยะอินทรีย์ของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. กับฐานข้อมูล NCBI

Sample ID	Identified as	Query cover	Ident	Accession	Taxonomy
LV 49	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: DgE-4	51%	99%	AB374917	Bacteria; environmental samples.
LV 50	Uncultured bacterium clone ANAER_P1_3G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	89%	KC110238	Bacteria; environmental samples.
LV 51	Uncultured bacterium clone 5A-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	91%	JQ923568	Bacteria; environmental samples.
LV 52	Uncultured bacterium clone LCH_B130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	93%	HM582716	Bacteria; environmental samples.
LV 53	Uncultured bacterium clone HJ1A286 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	91%	KC852988	Bacteria; environmental samples.
LV 54	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: Pl-P1-31	96%	85%	AB188642	Bacteria; environmental samples.
LV 55	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: UM-454-OTU2059_2clones	98%	84%	AB826339	Bacteria; environmental samples.
LV 56	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: UM-454-OTU2059_2clones	98%	84%	AB826339	Bacteria; environmental samples.
LV 57	Uncultured bacterium clone WC2_104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	83%	GQ263861	Bacteria; environmental samples.
LV 58	Uncultured bacterium clone GL29101i10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	95%	JN801137	Bacteria; environmental samples.
LV 59	Uncultured bacterium clone SPESB1_1045 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	70%	89%	KC325459	Bacteria; environmental samples.
LV 60	Uncultured bacterium clone GL29101i10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	97%	JN801137	Bacteria; environmental samples.
LV 61	Uncultured bacterium clone 60N200L4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	88%	KJ587496	Bacteria; environmental samples.
LV 62	Uncultured bacterium clone CRYS_SPR_11B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	86%	KC357998	Bacteria; environmental samples.
LV 63	Uncultured bacterium clone GL29101i10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	48%	96%	JN801137	Bacteria; environmental samples.

ตารางที่ 16 (ต่อ)

LV 64	Uncultured bacterium clone ADFI7QG3A12HESLS/1201 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	83%	FJ471322	Bacteria; environmental samples.
LV 65	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 2009050507 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	86%	GQ202687	Bacteria; environmental samples.
LV 66	Uncultured bacterium clone F1Q32TO03DF438 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	88%	GU740032	Bacteria; environmental samples.

ผลการเปรียบเทียบกลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดิน ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน จำนวน 5 ตัวอย่าง กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมด 66 แถบ สามารถเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลได้จำนวน 61 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ศึกษามีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 82–99% และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่า แบคทีเรียที่ศึกษามีสายวิวัฒนาการที่ใกล้กันกับแบคทีเรีย 3 Phylum ประกอบด้วย Phylum Bacteroidetes Class Sphingobacteria, Phylum Tenericutes Class Mollicutes และ Phylum Proteobacteria Class Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria และ Betaproteobacteria โดย Class Betaproteobacteria พบในทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากดินในแปลงเกษตร ส่วน Class Sphingobacteria พบเฉพาะตัวอย่างจากมูลไส้เดือนดิน และ Class Mollicutes พบเฉพาะตัวอย่างจากน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน (ตารางที่ 17) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้คล้ายกับงานวิจัยของ Dwipendra *et al*.,(2010) ที่ได้ศึกษาถึงแบคทีเรียที่เกาะแน่นอยู่ภายในผนังลำไส้ไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Lumbricus terrestris, Lumbricus friend, Aporrectodea caliginosa* และ*Aporrectodea longa* โดยใช้เทคนิค Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) บริเวณส่วน intergenic spacer (IGS) region ระหว่างยีน 16S-23S rRNA พบกลุ่มแบคทีเรียในกลุ่ม *Proteobacteria, Firmicutes และ Actinobacteria* และ Huang *et al*., (2013) พบกลุ่มแบคทีเรียหลักในตัวอย่างปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินอยู่ในกลุ่ม Firmicutes, Bacteroidetes และ Actinomycetes และงานวิจัยของ Nakamura and Sakai (2011) พบแบคทีเรียในกลุ่ม Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroides และ Firmicutes



ภาพที่ 11 Phylogenetic tree ของ 16S rRNA gene จากตัวอย่าง (LV) น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน สร้างจาก 150 นิวคลีโอไทด์

ในการเปรียบเทียบเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาจำแนกชนิดแบคทีเรียระหว่างวิธีแบบเพาะเลี้ยง (culturable technique) และวิธีแบบไม่เพาะเลี้ยง (unculturable technique) นั้นพบว่า วิธีแบบเพาะเลี้ยง คัดแยกแบคทีเรียได้ 2 Phylum คือ Firmicutes และ Phylum Proteobacteria ซึ่งแตกต่างกับวิธีแบบไม่เพาะเลี้ยงที่พบ 3 Phylum คือ Proteobacteria, Bacteroidetes และ Tenericutes ซึ่งจะมีความหลากหลายมากกว่าวิธีการแบบเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เพราะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะสามารถเพาะเลี้ยงได้เพียงเศษเสี้ยวของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่จริงในตัวอย่างเท่านั้น โดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีเท่านั้นที่จะสามารถเพาะเลี้ยงได้ (Madigan *et al.*, 2009) ในส่วนของการจำแนกชนิดแบคทีเรียแบบไม่เพาะเลี้ยง (unculturable technique) นั้นสามารถศึกษาแบคทีเรียในตัวอย่างได้โดยตรง เป็นการลดปัญหาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารในห้องปฏิบัติการได้ ในปัจจุบันสามารถทำได้กับยีนส์ที่มีขนาดประมาณ 200-500 bp เริ่มใช้ในการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในดินก่อนจะพัฒนาไปศึกษาถึงจุลินทรีย์ในอาหาร (Muyzer *et al.*, 1993)

ตารางที่ 17 ผลการเปรียบเทียบกลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดิน ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน กับฐานข้อมูล NCBI

ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Metaphire posthuma* (ดินในพื้นที่เกษตร)	ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. (ฟาร์มวัวนม)	ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. (บ่อเลี้ยงไส้เดือน)	มูลไส้เดือนดินพันธุ์ *Perionyx* sp. (บ่อเลี้ยงไส้เดือน)	น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน *Perionyx* sp. (บ่อเลี้ยงไส้เดือน)
Gammaproteobacteria	Alphaproteobacteria Betaproteobacteria	Gammaproteobacteria Betaproteobacteria	Gammaproteobacteria Betaproteobacteria Sphingobacteria	Betaproteobacteria Mollicutes
1 Class	2 Class	2 Class	3 Class	2 Class

งานวิจัยที่ 2 การศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Perionyx* sp., ต่อการผลิต Plant growth promoters และการส่งเสริมการเจริญของเมล็ดพืช

การศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp., ต่อการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA)

จากการทดสอบความสามารถในการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน จำนวน 72 ไอโซเลท ด้วยวิธี colorimetrically ของ Gordon and Weber; 1951 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร minimal salt (MS) medium ที่มี 5 mM L-Tryptophan (Frankenberger and Poth, 1988) ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 um บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48-36 ชั่วโมง วัดปริมาณ IAA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm คำนวณหาปริมาณ IAA โดยเตรียมกับกราฟสารละลายมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวน 72 ไอโซเลทนั้นสามารถผลิต IAA ได้จำนวน 69 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่จะสามารถผลิต IAA ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1 µg/ml โดยมีแบคทีเรียในกลุ่มนี้จำนวน 34 ไอโซเลท ประกอบด้วย LV-2, AnA-4, V-12, MRSLV-18, V-7, V-10, V-9, Po-13, LV-9, V-20, A-6, LV-13, Po-5, V-4, LV-6, P1-1, P1-2, Po-6, LV-14, V-6, V-2, P1-12, V-5, MRSLV-7, Po-2, P1-13, V-15 และ V-3 (ตารางที่ 18) แบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA เข้มข้นในระดับ 1-15 µg/ml จำนวน 27 ไอโซเลท ประกอบด้วย V-23, MRSLV-11, V-17, MRSLV-5, MRSLV-17, V-18, A-10, MRSLV-3, LV-3, P1-20, MRSLV-15, LV-4, AnA-9, P1-5, P1-8, V-1, LV-18, Po-15, P1-15, V-22, P1-16, P1-19, Po-14, P1-11, Po-12, Po-4 และ AnA-3 (ตารางที่ 19) และมี 8 ไอโซเลทที่สามารถผลิต IAA ความเข้มข้นสูงในระดับ 32-131 µg/ml ซึ่งประกอบด้วย PO-4 ผลิต IAA ได้เท่ากับ 32.45 µg/ml , PO-9 เท่ากับ 51.74 µg/ml , PO-10 เท่ากับ 65.28 µg/ml, A-5 เท่ากับ 71.39 µg/ml, AnPO-3 เท่ากับ 72.780 µg/ml, AnP1-6 เท่ากับ 80.44 µg/ml, AnA-10 เท่ากับ 119.83 µg/ml, และ A-2 ผลิต IAA ได้สูงสุดเท่ากับ 131.98 µg/ml โดยแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถผลิต IAA ความเข้มข้นสูงเหล่านี้นั้น พบว่า แบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* ไอโซเลท A-2 และ AnA-10 จำแนกอยู่ในสกุล *Enterobacter* สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 119.83-131.98 µg/ml รองลงมาคือแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงวัวนม ไอโซเลท PO-9 (51.74 µg/ml), PO-10 (65.28 µg/ml) และ AnPO-3 (72.780 µg/ml) รวมถึงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บจากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดิน ไอโซเลทที่ AnP1-6 (80.44 µg/ml) และแบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* ไอโซเลท A-5 (71.39 µg/ml) จำแนกอยู่ในสกุล *Aeromonas* และแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงวัวนม ไอโซเลท PO-4 (32.45 µg/ml) จำแนกอยู่ในสกุล *Bacillus* ตามลำดับ (ตารางที่ 20)

ซึ่งการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ร้อยละ 26 ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่สามารถผลิต IAA ได้นั้นส่วนใหญ่จะอยู่ใน Genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* และ *Enterobacter* (Madhuri and Sahasrabudhe, 2011; Pathma *et al*., 2011; Wahyudi *et al*., 2011; Forni *et al*., 1992, Haahtela *et al*., 1990). ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่า Genus ที่ผลิต IAA ได้ในระดับความเข้มข้นสูง ประกอบด้วย Genus *Enterobacter*, *Aeromonas* และ *Bacillus* โดยในงานวิจัยของ Jayakumar *et al*., (2013) พบแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* จำนวน 51 ไอโซเลท สามารถผลิต IAA ได้ในระดับ 1.50 ถึง 36.00 µg/ml แบคทีเรีย strain *B. subtilis* BVC53 ผลิต IAA ได้ในระดับ 36.00 µg/ml (Khare and Arora, 2010) และแบคทีเรีย 5 strains ที่คัดแยกได้จากดินในสวนลำไย ผลิต IAA ได้ในระดับ 11.4 ถึง 57.6 µg/ml (ศรีกาญจนา และคณะ, 2557) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียใน strain *Pseudomonas* sp. TLC ผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 7.16 µg/ml (Kefeng Li and Wusirika Ramakrishna, 2011) และ Charin *et al*., (2011) พบ *Azospirillum* isolate S^{23} ผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 53.57 µg/ml และงานวิจัยของ Khin Mya Lwin *et al*., (2012) พบแบคทีเรีย strain R1 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 121.1 µg/ml ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากดินในแปลงเกษตร ใน Genus *Enterobacter* สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 119.83-131.99 µg/ml ซึ่งสูงกว่างานที่วิจัยที่เคยศึกษามาดังกล่าวข้างต้น

ตารางที่ 18 ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินต่อการผลิต Indol-3-acetic acid (IAA) ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1 µg/ml

Isolates code	IAA (µg/ml)	Identify as			
		Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession number
V-3	0.97	680	(complex) *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429^T	99.85	AMXN01000021
V-15	0.94	670	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
P1-13	0.84	690	*Bacillus drentensis* LMG 21831^T	99.84	AJ542506
Po-2	0.82	690	*Bacillus marisflavi* TF-11^T	99.42	AF483624
MRSLV-7	0.78	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.71	AE017333
P1-12	0.76	690	(complex) *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429^T	99.86	AMXN01000021
V-5	0.76	690	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
V-2	0.75	690	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.57	AE017333
V-6	0.73	690	*Neisseria subflava* U37^T	100	AJ239291
LV-14	0.7	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.4	AE017333
LV-15	0.65	692	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
Po-6	0.65	690	*Shewanella putrefaciens* LMG 26268^T	99.71	X81623
V-24	0.64	690	*Bacillus safensis* FO-036b^T	100	AF234854
A-7	0.6	681	*Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
V-11	0.59	680	*Pseudomonas alcaligenes* LMG 1224^T	99.26	Z76653

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Isolates code	IAA (μg/ml)	Identify as			
		Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession number
LV-7	0.56	692	*Bacillus aerophilus* 28K^T	99.86	AJ831844
P1-1	0.55	680	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
P1-2	0.55	672	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	99.85	AJ831844
V-4	0.53	690	*Lysinibacillus sphaericus* C3-41^T	99.27	CP000817
LV-6	0.53	682	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	99.85	AJ831844
LV-13	0.51	682	*Bacillus kochii* WCC 4582^T	99.85	FN995265
Po-5	0.51	690	*Bacillus marisflavi* TF-11^T	99.71	AF483624
A-6	0.46	682	*Pseudomonas mendocina* LMG 1223^T	98.82	Z76664
LV-9	0.45	692	*Bacillus circulans* ATCC 4513^T	99.86	AY724690
V-20	0.45	690	*Bacillus kochii* WCC 4582^T	100	FN995265
Po-13	0.44	689	*Bacillus asahii* MA001^T	97.97	AB109209
V-10	0.43	690	*Bacillus asahii* MA001^T	99.86	AB109209
V-9	0.43	500	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.8	AE017333
V-7	0.39	500	*Bacillus asahii* MA001^T	100	AB109209
MRSLV-18	0.38	692	*Enterococcus thailandicus* FP48-3^T	99.71	EF197994
V-12	0.34	620	*Pseudomonas oleovorans* DSM 1045^T	99.35	Z76665
AnA-4	0.33	692	*Bacillus drentensis* LMG 21831^T	100	AJ542506
LV-2	0.33	672	*Vibrio metschnikovii* CIP 69.14^T	98.21	ACZO01000009

ตารางที่ 19 ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินต่อการผลิต Indol-3-acetic acid (IAA) ได้ในระดับความเข้มข้นมากกว่า 1 μg/ml

Isolates code	IAA (μg/ml)	Identify as			
		Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession number
AnA-3	15.28	702	*Bacillus megaterium* IAM 13418^T	99.57	D16273
Po-4	14.11	670	*Bacillus aryabhattai* B8W22^T	100	EF114313
Po-12	12.97	690	(complex) *Aeromonas punctata* subsp. *punctata* NCIMB 13016^T	100	X60408
P1-11	8.15	690	*Bacillus aryabhattai* B8W22^T	100	EF114313
Po-14	7.69	690	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
P1-19	6.65	690	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
P1-16	6.4	630	*Paenibacillus oceanisediminis* L10^T	99.84	JF811909
V-22	6.27	690	*Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T	98.40	AB030583
P1-15	6.2	690	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^T	100	AJ831844
Po-15	5.41	680	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.85	AE016877
LV-18	5.1	692	(complex) *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429^T	99.86	AMXN01000021

ตารางที่ 19 (ต่อ)

Isolates code	IAA (µg/ml)	Identify as			
		Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession number
P1-8	4.55	690	*Bacillus safensis* FO-036b^T	100	AF234854
P1-5	3.59	681	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^T	99.85	AJVF01000043
LV-4	3.55	692	*Bacillus marisflavi* TF-11^T	100	AF483624
AnA-9	3.55	692	*Paenibacillus barcinonensis* BP-23^T	98.7	AJ716019
MRSLV-15	3.24	692	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.71	AE016877
P1-20	2.82	690	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^T	99.85	AJVF01000043
LV-3	2.05	632	*Bacillus vietnamensis* 15-1^T	98.42	AB099708
MRSLV-3	1.95	671	*Bacillus anthracis* ATCC 14578^T	100	AB190217
A-10	1.84	682	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.85	AE016877
V-18	1.76	680	*Bacillus marisflavi* TF-11^T	99.71	AF483624
MRSLV-5	1.48	692	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.86	AE016877
MRSLV-17	1.48	502	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T	99.60	AE017333
V-17	1.24	690	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	100	AE016877
MRSLV-11	1.18	692	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^T	99.86	AE016877
V-23	1.16	689	*Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* KCTC 13429^T	99.85	AMXN01000021

ตารางที่ 20 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินในกลุ่มที่สามารถผลิต Indol-3-acetic acid (IAA) ได้ในระดับความเข้มข้นสูง

Isolates code	IAA (µg/ml)	Identify as			
		Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession number
A-2	131.99	622	*Enterobacter hormaechei* ATCC 49162^T	99.36	AFHR01000079
AnA-10	119.83	692	*Enterobacter cloacae subsp. dissolvens* LMG 2683^T	99.57	Z96079
AnP1-6	80.44	692	*Aeromonas punctata subsp. punctata* NCIMB 13016^T	100.00	X60408
AnPo-3	72.80	672	*Aeromonas sanarellii* A2-67^T	99.70	FJ230076
A-5	71.39	662	*Aeromonas sanarellii* A2-67^T	99.55	FJ230076
Po-10	65.28	690	*Aeromonas enteropelogenes* ATCC 49657^T	99.27	X60415
Po-9	51.74	690	*Aeromonas media* ATCC 33907^T	99.27	X74679
Po-4	32.45	670	*Bacillus aryabhattai* B8W22^T	100.00	EF114313

การศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp., ต่อการส่งเสริมการงอกของเมล็ด

การทดสอบศักยภาพของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินต่อการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว เมล็ดผักคะน้า และเมล็ดพริก ทำการทดสอบโดยแช่เมล็ดทดสอบในสารละลายเซลล์ของแบคทีเรียที่ทดสอบนาน 15 - 30 นาที ทำตัวควบคุมคือเมล็ดแช่ในน้ำเปล่าและแช่ในอาหาร Nutrient broth (NB) จากนั้นและนำเมล็ดทดสอบจำนวน 10 เมล็ด เพาะบนอาหารแข็งที่มี 1% (w/v) agar ทำ 2 ซ้ำในสภาวะปลอดเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำผลการงอกของเมล็ดทุกวันมาคำนวนหา Germination index ตามวิธีของ Walker-Simmons and Sesing, 1990 โดย n1 ถึง n10 คือจำนวนของเมล็ดที่งอกในแต่ละวันเริ่มจากวันแรก (n1) จนถึงวันที่ 10 (n10) ตามสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Germination Index} = \frac{(10\times n1 + 9\times n2 + \ldots\ldots\ldots\ldots + 1\times n10)}{\text{Total days} \times \text{Total seeds}}$$

1. ดัชนีการงอกของเมล็ดข้าว

ผลการทดลอง พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดข้าว ที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน เปรียบเทียบกับเมล็ดที่แช่ในน้ำเปล่า และ NB มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเมล็ดข้าวที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท V-20, A-10 และ MRSLV-10 ให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวสูงสุดเท่ากับ 4.42, 4.05 และ 4.05 ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทข้างต้นถูกจำแนกอยู่ในสปีชี่ส์ *Bacillus kochii*, *Bacillus* sp. และ *Bacillus siamensis* รองลงมาคือ ไอโซเลท V-9, AnA-3, V-17, LV-3, LV-9, MRSLV-15, MRSLV-5, P1-20, P1-19, V-12, A-2, MRSLV-7, P1-1, AnA-10, P1-5 และ LV-6 วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดได้เท่ากับ 3.70, 3.69, 3.65, 3.65, 3.65, 3.63, 3.61, 3.60, 3.48, 3.48, 3.45, 3.42, 3.32, 3.25, 3.22 และ 3.03 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท PO-13, V-4, LV-11, V-18, LV-15, V-23, V-2, V-11 และ LV-14 วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวได้ในระดับต่ำ เท่ากับ 2.96, 2.94, 2.87, 2.79, 2.73, 2.73, 2.69, 2.60, และ 2.57 ตามลำดับ ในส่วนของดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวที่แช่ในอาหาร NB และ น้ำเปล่า วัดได้เท่ากับ 3.52 และ 3.91 ตามลำดับ (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน

Isolates code	Germination Index	Length (bp)	Identify as Closest match	% Similarity	Accession number
V-20	**4.42^{A}**	**690**	***Bacillus kochii* WCC 4582^{T}**	**100**	**FN995265**
A-10	**4.05^{AB}**	**682**	**(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}**	99.85	AE016877
MRSLV-10	**4.05^{AB}**	**692**	***Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}**	99.86	AJVF01000043
V-9	3.70^{BCD}	500	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.8	AE017333
AnA-3	3.69^{BCD}	702	*Bacillus megaterium* IAM 13418^{T}	99.57	D16273
V-17	3.65^{BCD}	690	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	100	AE016877
LV-3	3.65^{BCD}	632	*Bacillus vietnamensis* 15-1^{T}	98.42	AB099708
LV-9	3.65^{BCD}	692	*Bacillus circulans* ATCC 4513^{T}	99.86	AY724690
MRSLV-15	3.63^{BCD}	692	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	99.71	AE016877
MRSLV-5	3.61^{BCD}	692	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	99.86	AE016877
P1-20	3.60^{BCD}	690	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}	99.85	AJVF01000043
P1-19	3.48^{CDE}	690	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	100	AJ831844
V-12	3.48^{CDE}	620	*Pseudomonas oleovorans* DSM 1045^{T}	99.35	Z76665
A-2	3.45^{CDE}	622	*Enterobacter hormaechei* ATCC 49162^{T}	99.36	AFHR01000079
MRSLV-7	3.42^{CDEF}	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.71	AE017333
P1-1	3.32^{DEFG}	680	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	100	AJ831844
AnA-10	3.25^{DEFGH}	692	*Enterobacter* sp. *Enterobacter* subsp. *dissolvens*	99.57	Z96079
P1-5	3.22^{DEFGH}	681	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}	99.85	AJVF01000043
LV-6	3.03^{EFGHI}	682	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	99.85	AJ831844
PO-13	2.96^{FGHI}	689	*Bacillus asahii* MA001^{T}	97.97	AB109209
V-4	2.94^{FGHI}	690	*Lysinibacillus sphaericus* C3-41^{T}	99.27	CP000817
LV-11	2.87^{GHI}	692	*Staphylococcus* sp. *Staphylococcus saprophyticus subsp. bovis*	99.71	AB233327
V-18	2.79^{HI}	680	*Bacillus marisflavi* TF-11^{T}	99.71	AF483624
LV-15	2.73^{I}	692	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	100	AJ831844
V-23	2.73^{I}	689	*Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* KCTC 13429^{T}	99.85	AMXN01000021
V-2	2.69^{I}	690	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.57	AE017333
V-11	2.60^{I}	680	*Pseudomonas alcaligenes* LMG 1224^{T}	99.26	Z76653
LV-14	2.57^{I}	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.4	AE017333
Control NB	3.52^{CDE}				
Control water	3.91^{BC}				
%CV	5.96				
F-test	**				

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

2. ดัชนีการงอกของเมล็ดผักคะน้า

ผลการทดลอง พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดผักคะน้าที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน กับเมล็ดที่แช่ในน้ำเปล่า และอาหารเลี้ยงเชื้อ NB มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในแต่ละตำรับทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเมล็ดผักคะน้าที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท P1-5, P1-1, AnA-3, A-2, V-9 และ P1-19 ให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดผักคะน้าสูงสุดเท่ากับ 5.17, 4.98, 4.98, 4.84, 4.70 และ 4.70 ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทดังกล่าวข้างต้นถูกจำแนกอยู่ในสปีชี่ส์ *Bacillus siamensis*, (complex) *Bacillus aerophilus*, *Bacillus megaterium, Enterobacter hormaechei, Bacillus licheniformis* และ (complex) *Bacillus aerophilus* ตามลำดับ แบคทีเรียไอโซเลทที่วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดผักคะน้าได้ในระดับรองลงมาคือ ไอโซเลท LV-14, LV-3, V-12, MRSLV-5, AnA-10, V-18, V-23, V-17, LV-15, MRSLV-7, MRSLV-15, V-4, A-10, LV-6, V-20, MRSLV-10, LV-11, PO-13 และ V-2 วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดได้เท่ากับ 4.67, 4.65, 4.65, 4.64, 4.62, 4.61, 4.60, 4.53, 4.51, 4.48, 4.42, 4.38, 4.33, 4.31,4.31, 4.28, 4.22, 4.22, และ 4.18 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท LV-9, V-11 และ P1-20 วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดผักคะน้าได้ในระดับต่ำ เท่ากับ 3.93, 3.89 และ 3.09 ตามลำดับ ในส่วนของดัชนีการงอกของเมล็ดผักคะน้าที่แช่ในอาหาร NB และ น้ำเปล่า วัดได้เท่ากับ 4.65 และ 3.93 ตามลำดับ (ตารางที่ 22)

3. ดัชนีการงอกของเมล็ดพริก

ผลการทดลอง พบว่า ดัชนีการงอกของเมล็ดพริกที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน กับเมล็ดที่แช่ในน้ำเปล่า และอาหารเลี้ยงเชื้อ NB มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในแต่ละตำรับทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเมล็ดพริกที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท LV-15, V-23, P1-5 และ MRSLV-5 วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพริกได้สูงสุดเท่ากับ 1.79, 1.71, 1.64 และ 1.61 ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ดังกล่าวข้างต้นถูกจำแนกอยู่ในสปีชี่ส์ (complex) *Bacillus aerophilus, Bacillus subtilis subsp. inaquosorum, Bacillus siamensis* และ (complex) *Bacillus cereus* ตามลำดับ แบคทีเรียไอโซเลทที่วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพริกได้ในระดับรองลงมาคือ ไอโซเลท MRSLV-7, P1-20, MRSLV-15, V-11, AnA-3, LV-6, PO-13, V-18, LV-11, MRSLV-10, A-10, LV-14, LV-9, V-4, V-2, LV-3 และ V-17 วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพริกได้เท่ากับ 1.54, 1.50, 1.45, 1.44, 1.43, 1.33, 1.26, 1.22, 1.20, 1.19, 1.17, 1.15, 1.08, 1.06, 1.06, 1.05 และ 1.00 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท V-12, V-9, A-2, V-20, P1-19, AnA-10 และ P1-1 วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพริกได้ในระดับต่ำ เท่ากับ 0.94, 0.89, 0.92, 0.88, 0.82, 0.78 และ 0.66 ตามลำดับ ในส่วนของดัชนีการงอกของเมล็ดพริกที่แช่ในอาหาร NB และ น้ำเปล่า วัดได้เท่ากับ 1.01 และ 1.28 ตามลำดับ (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 22 ค่าดัชนีการงอกของ เมล็ดผักคะน้าที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน

Isolates code	Germination Index	Identify as			
		Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession number
P1-5	**5.17^{A}**	**681**	***Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}**	99.85	AJVF01000043
P1-1	**4.98^{AB}**	**680**	**(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}**	100	AJ831844
AnA-3	**4.98^{AB}**	**702**	***Bacillus megaterium* IAM 13418^{T}**	99.57	D16273
A-2	4.84^{ABC}	622	*Enterobacter hormaechei* ATCC 49162^{T}	99.36	AFHR01000079
V-9	4.70^{ABCD}	500	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.8	AE017333
P1-19	4.70^{ABCD}	690	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	100	AJ831844
LV-14	4.67^{BCD}	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.4	AE017333
LV-3	4.65^{BCD}	632	*Bacillus vietnamensis* 15-1^{T}	98.42	AB099708
V-12	4.65^{BCD}	620	*Pseudomonas oleovorans* DSM 1045^{T}	99.35	Z76665
MRSLV-5	4.64^{BCD}	692	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	99.86	AE016877
AnA-10	4.62^{BCD}	692	*Enterobacter* sp. *Enterobacter* subsp. *dissolvens*	99.57	Z96079
V-18	4.61^{BCD}	680	*Bacillus marisflavi* TF-11^{T}	99.71	AF483624
V-23	4.60^{BCD}	689	*Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* KCTC 13429^{T}	99.85	AMXN01000021
V-17	4.53^{BCD}	690	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	100	AE016877
LV-15	4.51^{BCD}	692	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	100	AJ831844
MRSLV-7	4.48^{BCD}	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.71	AE017333
MRSLV-15	4.42^{CDE}	692	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	99.71	AE016877
V-4	4.38^{CDEF}	690	*Lysinibacillus sphaericus* C3-41^{T}	99.27	CP000817
A-10	4.33^{CDEF}	682	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	99.85	AE016877
LV-6	4.31^{DEF}	682	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	99.85	AJ831844
V-20	4.31^{DEF}	690	*Bacillus kochii* WCC 4582^{T}	100	FN995265
MRSLV-10	4.28^{DEF}	692	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}	99.86	AJVF01000043
LV-11	4.22^{DEF}	692	(Complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	99.71	AB233327
PO-13	4.22^{DEF}	689	*Bacillus asahii* MA001^{T}	97.97	AB109209
V-2	4.18^{DEF}	690	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.57	AE017333
LV-9	3.93^{EF}	692	*Bacillus circulans* ATCC 4513^{T}	99.86	AY724690
V-11	3.89^{F}	680	*Pseudomonas alcaligenes* LMG 1224^{T}	99.26	Z76653
P1-20	3.09^{G}	690	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}	99.85	AJVF01000043
Control NB	4.65^{BCD}	-	-	-	-
Control water	3.93^{EF}	-	-	-	-
%CV	4.49				
F-test	**				

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 23 ค่าดัชนีการงอกของ เมล็ดพริกที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน

Isolates code	Germination Index	Identify as			
		Length (bp)	Closest match	% Similarity	Accession number
LV-15	**1.79^{A}**	**692**	**(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}**	100	AJ831844
V-23	**1.71^{AB}**	**689**	***Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* KCTC 13429^{T}**	99.85	AMXN01000021
P1-5	**1.64^{ABC}**	**681**	***Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}**	99.85	AJVF01000043
MRSLV-5	**1.61^{ABC}**	**692**	**(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}**	99.86	AE016877
MRSLV-7	1.54^{BCD}	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.71	AE017333
P1-20	1.50^{BCDE}	690	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}	99.85	AJVF01000043
MRSLV-15	1.45^{CDEF}	692	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	99.71	AE016877
V-11	1.44^{CDEFG}	680	*Pseudomonas alcaligenes* LMG 1224^{T}	99.26	Z76653
AnA-3	1.43^{CDEFGH}	702	*Bacillus megaterium* IAM 13418^{T}	99.57	D16273
LV-6	1.33^{DEFGHI}	682	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	99.85	AJ831844
PO-13	1.26^{EFGHIJK}	689	*Bacillus asahii* MA001^{T}	97.97	AB109209
V-18	1.22^{FGHIJKL}	680	*Bacillus marisflavi* TF-11^{T}	99.71	AF483624
LV-11	1.20^{GHIJKL}	692	*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* GTC 843^{T}	99.71	AB233327
MRSLV-10	1.19^{HIGKLM}	692	*Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T}	99.86	AJVF01000043
A-10	1.17^{IJKLMN}	682	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	99.85	AE016877
LV-14	1.15^{IJKLMN}	692	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.4	AE017333
LV-9	1.08^{JKLMNO}	692	*Bacillus circulans* ATCC 4513^{T}	99.86	AY724690
V-4	1.06^{JKLMNOP}	690	*Lysinibacillus sphaericus* C3-41^{T}	99.27	CP000817
V-2	1.06^{JKLMNOP}	690	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.57	AE017333
LV-3	1.05^{JKLMNOP}	632	*Bacillus vietnamensis* 15-1^{T}	98.42	AB099708
V-17	1.00^{LMNOPQ}	690	(complex) *Bacillus cereus* ATCC 14579^{T}	100	AE016877
V-12	0.94^{MNOPQ}	620	*Pseudomonas oleovorans* DSM 1045^{T}	99.35	Z76665
V-9	0.89^{OPQR}	500	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580^{T}	99.8	AE017333
A-2	0.92^{NOPQ}	622	*Enterobacter hormaechei* ATCC 49162^{T}	99.36	AFHR01000079
V-20	0.88^{OPQR}	690	*Bacillus kochii* WCC 4582^{T}	100	FN995265
P1-19	0.82^{PQR}	690	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	100	AJ831844
AnA-10	0.78^{QR}	692	*Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* LMG 2683^{T}	99.57	Z96079
P1-1	0.66^{R}	680	(complex) *Bacillus aerophilus* 28K^{T}	100	AJ831844
Control NB	1.01^{KLMNOPQ}	-	-	-	-
Control water	1.28^{EFGHIJ}	-	-	-	-
%CV	8.32				
F-test	**				

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

งานวิจัยที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีชีวภาพและอายุการเก็บรักษา (shelf life) ของมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางคุณสมบัติทางเคมีชีวภาพของมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตด้วยไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงทางการค้า ของกองทุนปุ๋ยอินทรีย์และไฮโดรโพนิคส์ มูลนิธิโครงการหลวง จ.เชียงใหม่ ศึกษาโดยเก็บรักษาตัวอย่างที่ใช้ทดสอบไว้บนชั้นวางที่อุณหภูมิห้อง (~30 องศาเซลเซียส) และเก็บรักษาไว้ในตู้ปรับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลองและที่ระยะเวลาการเก็บรักษา (shelf life) 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในด้าน จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total Plate count), การย่อยสลายที่สมบูรณ์ (GI), C/N ratio, OM, Total N, N-NH^+_4, N-NO^-_3, Available P, Exchangeable K, และ Plant Growth Promoters (GA, IAA, NA) ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate count)

จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้ง ชนิดเปียก และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวางเป็นเวลา 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน ที่ 2 ระดับอุณหภูมิ คืออุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่นับได้มีค่าลดต่ำลงแปรผันตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น ในส่วนของอุณหภูมิ พบว่า ตัวอย่างมูลไส้เดือนดินแห้งที่เก็บในอุณหภูมิห้องมีค่าสูงกว่าที่เก็บในอุณหภูมิ 25 °C ส่วนมูลไส้เดือนดินเปียกและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ในส่วนของจำนวนเซลล์จุลินทรีย์เปรียบเทียบระหว่างชนิดปุ๋ย พบว่า มูลไส้เดือนแห้งที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องมีจำนวนเซลล์มากที่สุดเท่ากับ 1.39×10^7 cfu/mg รองลงมาคือ มูลไส้เดือนแห้งที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 25 °C เท่ากับ 1.31×10^7 cfu/mg ตามด้วยมูลไส้เดือนเปียกที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง และ 25 °C เท่ากับ 5.4×10^6 และ 5.8×10^6 cfu/mg ส่วนน้ำหมักมูลไส้เดือนที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 25 °C มีจำนวนเซลล์น้อยที่สุด เท่ากับ 2.26×10^5 และ 1.63×10^5 cfu/mg ตามลำดับ ในด้านอายุการเก็บรักษา พบว่า ที่อายุการเก็บรักษา 0 วัน มีจำนวนเซลล์มากที่สุดเท่ากับ 2.45×10^7 cfu/mg รองลงมาคือ อายุการเก็บรักษา 3 เดือน 1 เดือน เท่ากับ 3.79×10^6 และ 1.89×10^6 cfu/mg ตามลำดับ ส่วนอายุการเก็บรักษาที่ 6 เดือน และ 12 เดือน มีจำนวนเซลล์น้อยที่สุดเท่ากับ 1.10×10^6 และ 8.50×10^5 cfu/mg ตามลำดับ (ตารางที่ 24) ซึ่งค่าสูงสุดของจุลินทรีย์ที่ตรวจนับได้จากการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 2.45×10^7 cfu/mg แต่มีค่าต่ำกว่าในงานวิจัยของ Jens *et al.*,(1993) ซึ่งพบจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม heterotrophs ในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินเท่ากับ 2.1×10^9 cfu/g ในการศึกษาครั้งนี้จุลินทรีย์ที่นับได้มีจำนวนเซลล์อยู่ในระดับ 10^7 cfu/mg เมื่อเริ่มทดลองที่ 0 วัน และที่ 12 เดือน ลดต่ำลงในระดับ 10^5 cfu/mg ซึ่งสอดคล้องกับในการศึกษาของ Biswarup and Chandra (2009) และ Rola *et al.*, (2002) ที่สรุปว่าจำนวนประชากร

แบคทีเรียที่นับได้จะมีค่าลดต่ำลงตามช่วงระยะเวลาในการผลิตปุ๋ย และจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินนั้นขึ้นอยู่กับชนิดอาหารที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนดิน (Parthasarathi *et al*.,2007)

ตารางที่ 24 จำนวนจุลินทรีย์ (Total Plate Count) ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน

	(B) ชนิดปุ๋ย (จำนวนจุลินทรีย์ x 10^5 cfu/mg)						
(A) อายุเก็บรักษา	B1 มูลไส้เดือนแห้ง (อุณหภูมิห้อง)	B2 มูลไส้เดือนเปียก (อุณหภูมิห้อง)	B3 น้ำหมักมูลไส้เดือน (อุณหภูมิห้อง)	B4 มูลไส้เดือนแห้ง (อุณหภูมิ 25 °C)	B5 มูลไส้เดือนเปียก (อุณหภูมิห้อง 25 °C)	B6 น้ำหมักมูลไส้เดือน (อุณหภูมิห้อง 25 °C)	AVG (A)
A1 เก็บรักษา 0 วัน	480.00^{A}	250.00^{B}	6.23^{U}	480.00^{A}	250.00^{B}	6.23^{U}	245.41^{A}
A2 เก็บรักษา 1 เดือน	31.00^{EF}	5.12^{J}	2.00^{J}	58.00^{D}	17.00^{GHI}	0.21^{J}	18.89^{C}
A3 เก็บรักษา 3 เดือน	147.00^{C}	8.25^{HIJ}	2.39^{J}	59.10^{D}	9.48^{HIJ}	1.29^{J}	37.92^{B}
A4 เก็บรักษา 6 เดือน	18.10^{GH}	6.70^{HIJ}	0.14^{J}	34.60^{E}	6.36^{U}	0.07^{J}	10.99^{D}
A5 เก็บรักษา 12 เดือน	17.30^{GHI}	0.17^{J}	0.56^{J}	23.80^{FG}	8.83^{HIJ}	0.35^{J}	8.50^{D}
AVG (B)	138.68^{A}	54.05^{C}	2.26^{D}	131.10^{B}	58.33^{C}	1.63^{D}	64.34
CV. (%)				7.27			
F-test				(A) **, (B) **, (AxB) **			

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

2. สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (Carbon to Nitrogen ratio :C/N ratio)

ระยะเวลาการเก็บที่ 0 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 0 วัน พบว่า ค่า C/N ratio ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า C/N ratio สูงที่สุดเท่ากับ 14.59 รองลงมาคือ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า C/N ratio เท่ากับ 12.72 ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า C/N ratio ต่ำที่สุดเท่ากับ 7.65 ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา(ปัจจัย B) และ ปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ C/N Ratio ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 วัน

ชนิดปุ๋ย (A)	อุณหภูมิเก็บรักษา (B)		AVG (A)
	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	14.59	12.72	14.59^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	14.59	12.72	12.72^{B}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	7.65	7.65	7.65^{C}
AVG (B)	11.65	11.65	11.65
CV. (%)	0.36		
F-test	(A)**, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 1 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 1 เดือน พบว่า ค่า C/N ratio ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า C/N ratio สูงที่สุด เท่ากับ 16.86 รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า C/N ratio 13.73 และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า C/N ratio ต่ำที่สุดเท่ากับ 11.84 ส่วน ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างตำรับทดลอง โดย ค่า C/N ratio ระหว่างปัจจัย A3B1 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 19.2 รองลงมา คือ A1B2, A3B2, A2B2, A1B1 และ A2B1 เท่ากับ 15.74, 14.52, 12.12, 11.73 และ11.57 ตามลำดับ (ตารางที่ 26)

ตารางที่ 26 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ C/N Ratio ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดปุ๋ย (A)	อุณหภูมิ (B)		AVG (A)
	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	11.73^{E}	15.74^{B}	13.73^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	11.57^{F}	12.12^{D}	11.84^{C}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	19.2^{A}	14.52^{C}	16.86^{A}
AVG (B)	14.17	14.13	14.15
CV. (%)	0.32		
F-test	(A)**, (B)^{ns}, (AxB)**		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 3 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 3 เดือน พบว่า ค่า C/N ratio ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) ระหว่างอุณหภูมิการเก็บรักษา (B) และ (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างตำรับทดลองโดยมีค่า C/N ratio อยู่ระหว่าง 8.66-15.43 (ตารางที่ 27)

ตารางที่ 27 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ C/N Ratio ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ชนิดปุ๋ย (A)	อุณหภูมิ (B)		AVG (A)
	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	10.84	8.66	9.75
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	9.84	12.2	11.02
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	15.43	12.36	13.89
AVG (B)	12.04	11.07	11.55
CV. (%)	35.70		
F-test	(A)ns, (B) ns, (AxB)ns		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 6 เดือน พบว่า ค่า C/N ratio ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า C/N ratio สูงสุดเท่ากับ 11.10 และ 10.95 ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า C/N ratio ต่ำสุดเท่ากับ 5.02 ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบความแตกต่างทางสถิติ โดย B1 อุณหภูมิห้อง มีค่าสูงกว่า B2 อุณหภูมิ 25 °C เท่ากับ 9.33 และ 8.72ส่วน ปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างตำรับทดลอง โดย ค่า C/N ratio ระหว่างปัจจัย A1B1, A1B2, A2B1, A2B2 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 10.7, 10.5, 10.81, 11.79 รองลงมา คือ A3B1 และ A3B2เท่ากับ 6.09 และ 4.06 ตามลำดับ (ตารางที่ 28)

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ C/N Ratio ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ชนิดปุ๋ย	อุณหภูมิ (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	10.7^{A}	10.5^{A}	11.10^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	10.81^{A}	11.79^{A}	10.95^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	6.09^{B}	4.06^{C}	5.02^{B}
AVG (B)	9.33^{A}	8.72^{B}	9.03
CV. (%)	4.24		
F-test	(A)**, (B)** ,(AxB)**		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 12 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 12 เดือน พบว่า ค่า C/N ratio ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า C/N ratio สูงสุดเท่ากับ 16,45 และ 13.59 ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า C/N ratio ต่ำสุดเท่ากับ 10.64 ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบความแตกต่างทางสถิติ โดย B1 อุณหภูมิห้อง มีค่าสูงกว่า B2 อุณหภูมิ 25 °C เท่ากับ 14.77 และ 12.34 ส่วน ปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างตำรับทดลอง โดย ค่า C/N ratio ระหว่างปัจจัย A1B1, A1B2, A2B1, A2B2 และ A3B1 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 16.35, 16.55, 12.50, 14.68, และ 15.47 ตามลำดับ ส่วน A3B2 มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.80 (ตารางที่ 29)

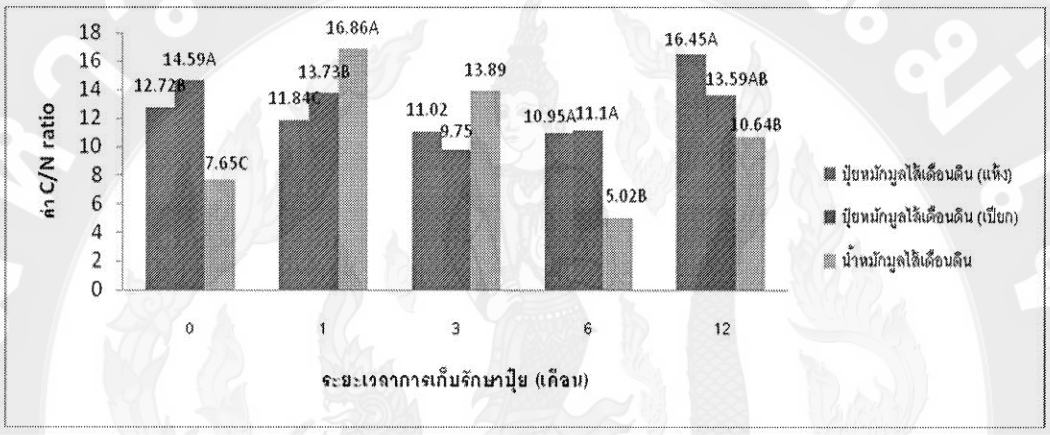
ตารางที่ 29 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ C/N Ratio ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน

ชนิดปุ๋ย	อุณหภูมิ (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	16.35^{A}	16.55^{A}	16.45^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	12.50^{A}	14.68^{A}	13.59^{AB}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	15.47^{A}	5.80^{B}	10.64^{B}
AVG (B)	14.77^{A}	12.34^{B}	13.56
CV. (%)	14.75		
F-test	(A)** , (B)*, (AxB)**		

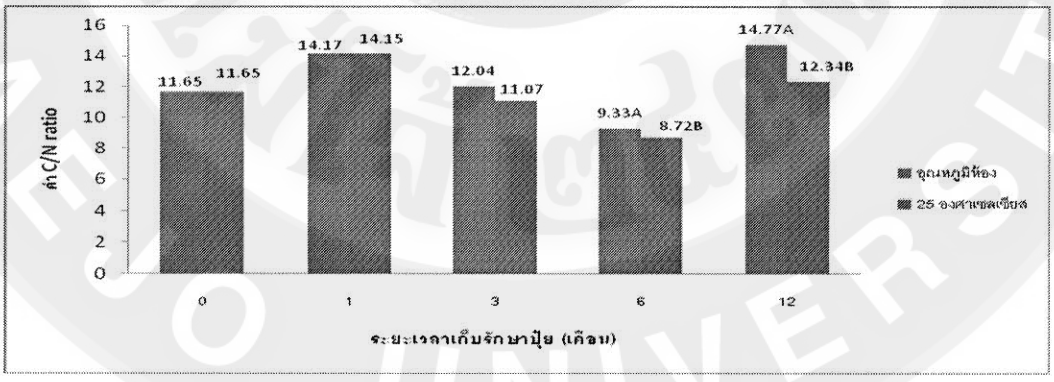
หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%
* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปภาพรวมของค่า C/N ratio ในตัวอย่างปุ๋ยที่วิเคราะห์ช่วงระยะเวลาการเก็บนาน 12 เดือน พบว่า ค่า C/N ratio มีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดช่วงระยะเวลาในการเก็บรักษาที่ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดปุ๋ยจะพบว่าน้ำหมักมูลไส้เดือนดินจะมีค่า C/N ratio อยู่ในช่วงค่าระหว่าง 5.02-16.86 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า C/N ratio อยู่ในช่วงค่าระหว่าง 10.95-16.45 และปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า C/N ratio อยู่ในช่วงค่าระหว่าง 9.75-14.59 (ภาพที่ 12) ในส่วนของปัจจัยด้านอุณหภูมิการเก็บรักษาพบว่าในช่วงการเก็บรักษาที่ 1-3 เดือนแรกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ในการเก็บรักษาที่ 6 และ 12 เดือน พบว่าค่า C/N ratio ที่วัดได้จากปุ๋ยที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องมีค่าสูงกว่าที่วัดได้จากปุ๋ยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 13) จากข้อมูลจะพบว่าตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งกับมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างกับตัวอย่างที่เป็นน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ซึ่งมีค่า C/N raio ในช่วงที่กว้างกว่า แต่ทั้งนี้ปุ๋ยทั้ง 3 ชนิดจัดเป็นปุ๋ยหมักที่มีคุณภาพดีผ่านเกณฑ์มาตรฐานกรมวิชาการเกษตรที่กำหนดให้มีค่า C/N ratio ไม่เกิน 20 ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ค่า C/N ratio มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chandra *et al.*, (2007) ที่พบว่าการทำปุ๋ยหมักโดยใช้ไส้เดือนดินค่า C / N ratio ของปุ๋ยวัดได้ประมาณ 16.4 ซึ่งต่ำกว่าการทำปุ๋ยด้วยวิธีการอื่นซึ่งวัดค่า C / N ratio ได้ระหว่าง 18.6-29.8 และเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kaushik *et al.*, (2003); Garg *et al.*, 2005) พบว่าค่า C / N ratio ของปุ๋ยจะลดต่ำลงตามช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตปุ๋ย อีกเหตุผลหนึ่งที่ส่งผลให้ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินมีค่า C/N ratio ต่ำเนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้เศษผัก เศษผลไม้ เศษอาหาร และมูลวัว ซึ่งเป็นวัสดุที่ย่อยสลายได้ง่ายในการเลี้ยงไส้เดือนดินจึงส่งผลให้ปุ๋ยที่ได้มีค่า C/N ratio ต่ำ (ทิพวรรณ, 2547) ปุ๋ยหมักที่มีค่า C/N อยู่ระหว่าง 10 - 25 จัดเป็นปุ๋ยอินทรีย์ที่มีปริมาณคาร์บอนปานกลาง

ควบคู่กับมีปริมาณไนโตรเจนมากเกินพอต่อความต้องการใช้ของจุลินทรีย์ดิน เป็นสารอินทรีย์ที่ผ่านการย่อยสลายส่วนหนึ่งมาก่อนแล้ว จึงมีความเหมาะสมในการเป็นปุ๋ยอินทรีย์ที่มีบทบาทในการเป็นแหล่งให้ธาตุอาหารไนโตรเจนและซัลเฟตเป็นหลัก ให้ฟอสฟอรัสรองลงไป และให้จุลธาตุทุกชนิดแก่พืช ส่วนปุ๋ยอินทรีย์ที่มีระดับ C/N อยู่ในช่วง 7-10 นั้น จัดเป็นพวกฮิวมัส (humin and humic acids) เป็นสารที่มีประจุที่ผิวที่เป็นทั้งประจุบวกและลบมีบทบาทในเรื่องการดูดซับธาตุอาหารต่างๆ (ion exchange capacity) และเพิ่มความคงทนของก้อนดิน ทำให้โครงสร้างดินพัฒนาเป็นแบบเม็ดกลมเล็ก ซึ่งลดช่องว่างขนาดใหญ่และช่วยชะลอการไหลชะล้างธาตุอาหารโดยน้ำในหน้าตัดดิน (สุนทรี, 2554)



ภาพที่ 12 แสดงผลวิเคราะห์ C/N ratio ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (Shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน



ภาพที่ 13 แสดงผลวิเคราะห์ C/N ratio ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (Shelf life) ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3. อินทรียวัตถุ (Organic matter :OM))

ระยะเวลาการเก็บที่ 0 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 0 วัน พบว่า ค่า OM ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า OM สูงที่สุดเท่ากับ 34.46 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า OM เท่ากับ 31.58 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า OM ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.13 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา(ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 30)

ระยะเวลาการเก็บที่ 1 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 1 เดือน พบว่า ค่า OM ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า OM สูงที่สุดเท่ากับ 30.73 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า OM เท่ากับ 23.94 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า OM ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.16 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ แต่ปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A2B2, A2B1, A1B1, และ A1B2 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 32.40, 29.05, 25.64 และ 22.23 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 0.17 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 31)

ตารางที่ 30 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ OM ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 วัน

ชนิดปุ๋ย	OM % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	34.46	34.46	34.46^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	31.58	31.58	31.58^{B}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.13	0.13	0.13^{C}
AVG (B)	22.06	22.06	22.06
CV. (%)	0.18		
F-test	(A)**, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 31 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ OM ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดปุ๋ย	OM % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	25.64^{C}	22.23^{D}	23.94^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	29.05^{B}	32.40^{A}	30.73^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.17^{E}	0.15^{E}	0.16^{C}
AVG (B)	18.29	18.26	18.27
CV. (%)	0.23		
F-test	(A)**, (B) ^{ns}, (AxB)**		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 3 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 3 เดือน พบว่า ค่า OM ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า OM สูงที่สุดเท่ากับ 33.11 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า OM เท่ากับ 30.74 เปอร์เซ็นต์ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า OM ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.13 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา(ปัจจัย B) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ แต่ปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A2B2, A2B1, A1B1, และ A1B2 มีค่า OM สูงสุดเท่ากับ 34.48, 31.72, 31.78 และ 29.70 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่า OM ต่ำสุด เท่ากับ 0.13 และ 0.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 32)

ตารางที่ 32 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ OM ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ชนิดปุ๋ย	OM % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	31.78^{B}	29.70^{C}	30.74^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	31.72^{B}	34.49^{A}	33.11^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.13^{D}	0.13^{D}	0.13^{C}
AVG (B)	21.21	21.44	21.33
CV. (%)	1.82		
F-test	(A)**, (B)^{ns}, (AxB)**		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 6 เดือน พบว่า ค่า OM ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า OM สูงที่สุดเท่ากับ 48.75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า OM เท่ากับ 30.20 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า OM ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.06 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา(ปัจจัย B) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน โดย B2 อุณหภูมิ 25 °C มีค่า OM เท่ากับ 33.59 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่า B1 อุณหภูมิห้อง มีค่า OM เท่ากับ 19.08 เปอร์เซ็นต์ และปัจจัยร่วม (AxB) ก็พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A1B2, A2B2, A2B1, และ A1B1 มีค่า OM เท่ากับ 69.30, 31.42, 28.98 และ 28.20 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 0.07 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 33)

ตารางที่ 33 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ OM ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ชนิดปุ๋ย	OM % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	28.2^{D}	69.3^{A}	48.75^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	28.98^{C}	31.42^{B}	30.20^{B}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.07^{E}	0.06^{E}	0.06^{C}
AVG (B)	19.08^{B}	33.59^{A}	26.34
CV. (%)	1.14		
F-test	(A)**, (B)**, (AxB)**		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 12 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 12 เดือน พบว่า ค่า OM ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า OM สูงที่สุดเท่ากับ 24.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า OM ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.09 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน โดย B2 อุณหภูมิ 25 °C มีค่า OM เท่ากับ 16.76 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่า B1 อุณหภูมิห้อง มีค่า OM เท่ากับ 15.64 เปอร์เซ็นต์ และปัจจัยร่วม (AxB) ก็พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A1B2, A2B2, A2B1, และ A1B1 มีค่า OM เท่ากับ 25.39, 24.80, 23.71 และ 23.11 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 0.10 และ 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 34)

ตารางที่ 34 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ OM ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน

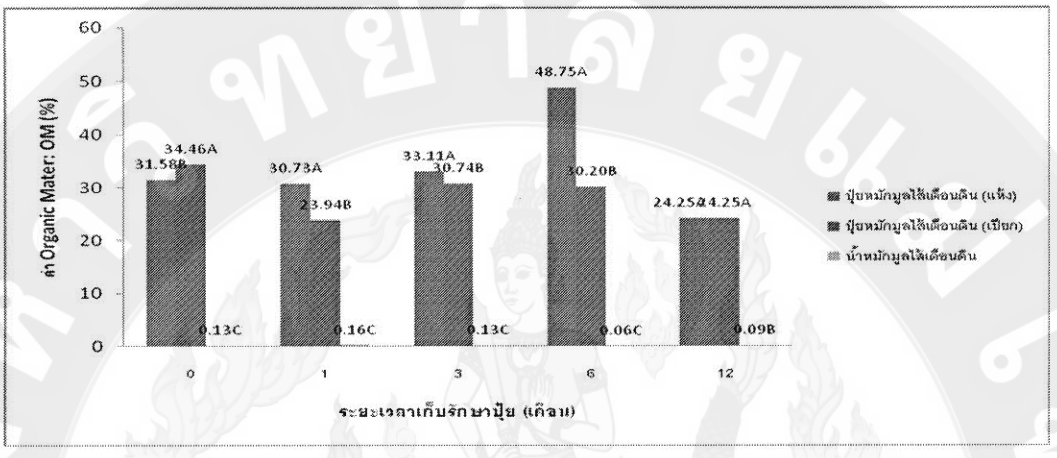
ชนิดปุ๋ย	OM % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	23.11^{D}	25.39^{A}	24.25^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	23.71^{C}	24.80^{B}	24.25^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.10^{E}	0.08^{E}	0.09^{B}
AVG (B)	15.64^{B}	16.76^{A}	16.20
CV. (%)	1.01		
F-test	(A)**, (B)**, (AxB)**		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

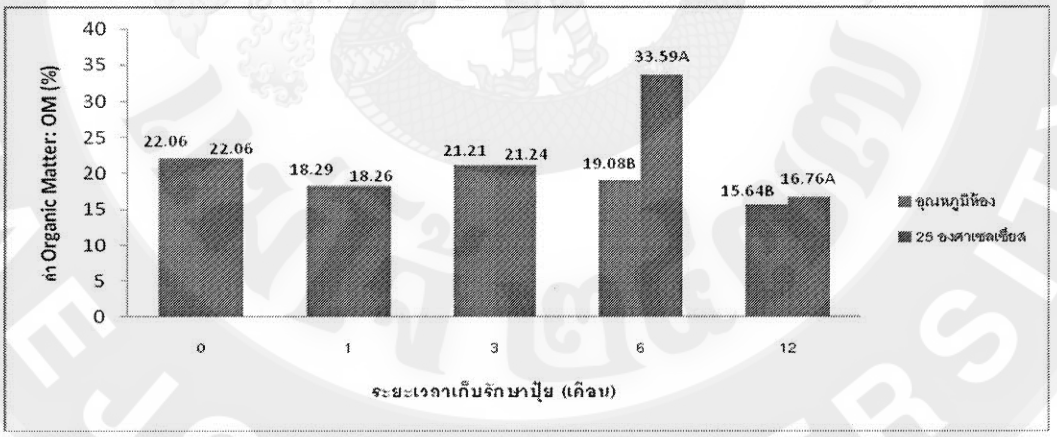
สรุปภาพรวมของการศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน เป็นเวลา 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า OM ในตัวอย่างปุ๋ย พบว่า ค่า OM ที่วิเคราะห์ได้ระหว่างตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งกับมูลไส้เดือนดินชนิดเปียก และตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงเริ่มต้นของการเก็บที่ 1-6 เดือนแรก แต่เข้าช่วงการเก็บรักษาที่ 12 เดือน ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งกับมูลไส้เดือนดินชนิดเปียก แต่ยังคงแตกต่างกับตัวอย่างที่เป็นน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดปุ๋ยจะพบว่า ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า OM สูงที่สุดอยู่ในช่วงค่าระหว่าง 24.25-48.75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า OM อยู่ในช่วงค่าระหว่าง 24.25-34.46 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีค่า OM อยู่ในช่วงค่าระหว่าง 0.06-0.13 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 14) ในด้านปัจจัยอุณหภูมิที่เก็บรักษาพบว่า ในช่วง 1-3 เดือนแรกของการเก็บรักษาปุ๋ยค่า OM ที่วัดได้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างอุณหภูมิเก็บรักษา แต่เดือนที่ 6 กับเดือนที่ 12 พบว่าค่า OM ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 15)

ในส่วนของค่า OM ในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งมีค่าค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 30-34 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงการเก็บรักษา 6 เดือนแรก และมีค่าลดลงเมื่อเก็บนาน 12 เดือน อยู่ในระดับ 24 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ค่า OM ที่วัดได้สอดคล้องกับค่า C/N ratio ที่วิเคราะห์ได้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ค่า C/N ratio ลดต่ำลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายพันธะคาร์บอนในตัวอย่างปุ๋ยหมักด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Jayakumar *et al.*,

(2013) พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่มีความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ cellulase ถึง 100 ไอโซเลท จากตัวอย่างทั้งหมด 196 ไอโซเลท และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sangwan *et al.*, (2008) และ Yadav *et al.*, (2009) ซึ่งพบว่าปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ผลิตได้นั้นค่า Total Organic Carbon (TOC) , และ OM จะมีค่าลดต่ำลงตามระยะเวลาการผลิต



ภาพที่ 14 ผลวิเคราะห์ Organic matter (OM) ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (Shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน



ภาพที่ 15 ผลวิเคราะห์ Organic matter (OM) ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (Shelf life) ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4. การย่อยสลายที่สมบูรณ์ (Germination Index : GI)

ระยะเวลาการเก็บที่ 0 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 0 วัน พบว่า ค่า GI ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า GI สูงที่สุดเท่ากับ 124.70 เปอร์เซ็นต์

รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า GI เท่ากับ 64.70 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า GI ต่ำที่สุดเท่ากับ 55.20 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา(ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 35)

ตารางที่ 35 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ GI ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 วัน

ชนิดปุ๋ย	GI % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	64.7	64.7	64.70^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	55.2	55.2	55.20^{C}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	124.7	124.7	124.70^{A}
AVG (B)	81.53	81.53	81.53
CV. (%)	0.05		
F-test	(A)**, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 1 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 1 เดือน พบว่า ค่า GI ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า GI สูงที่สุดเท่ากับ 124.70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า GI เท่ากับ 66.55 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า GI ต่ำที่สุดเท่ากับ 47.00 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A3B1, A3B2, A1B2, และ A1B1 มีค่า GI เท่ากับ 131.60, 122.91, 71.80 และ 59.30 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A2B1 และ A2B2 มีค่า GI ต่ำสุดเท่ากับ 45.80 และ 48.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 36)

ตารางที่ 36 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณGI ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดปุ๋ย	GI % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง.	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	59.30^{C}	71.80^{B}	65.55^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	45.80^{D}	48.20^{D}	47.00^{C}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	131.60^{A}	122.91^{A}	127.26^{A}
AVG (B)	78.90	80.97	79.94
CV. (%)	5.54		
F-test	(A)**, (B)^{ns}, (AxB)**		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 3 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 3 เดือน พบว่า ค่า GI ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า GI สูงที่สุดเท่ากับ 112.20 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า GI เท่ากับ 88.70 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า GI ต่ำที่สุดเท่ากับ 80.65 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัย B2 อุณหภูมิ25 °C ค่า GI เท่ากับ 96.57 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าปัจจัย B1 อุณหภูมิห้อง ค่า GI เท่ากับ 91.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A3B1, A3B2, A1B2, และ A2B2 มีค่า GI เท่ากับ 114.50, 109.9, 92.70 และ 87.10 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A1B1 และ A2B1 มีค่า GI ต่ำสุดเท่ากับ 84.70 และ 74.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 37)

ตารางที่ 37 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณGIของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ชนิดปุ๋ย	GI% (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	84.70^{E}	92.70^{C}	88.70^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	74.20^{F}	87.10^{D}	80.65^{C}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	114.50^{A}	109.90^{B}	112.20^{A}
AVG (B)	91.13^{B}	96.57^{A}	93.85
CV. (%)	0.54		
F-test	(A)**, (B)**, (AxB)**		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 6 เดือน พบว่า ค่า GI ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า GI สูงที่สุดเท่ากับ 117.45 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า GI เท่ากับ 80.35 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า GI ต่ำที่สุดเท่ากับ 70.10 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัย B1 อุณหภูมิห้อง ค่า GI เท่ากับ 90.37 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าปัจจัย B2 อุณหภูมิ25 °C ค่า GI เท่ากับ 88.23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A3B1, A3B2, A2B1, และ A2B2 มีค่า GI เท่ากับ 119.60, 115.30, 84.90 และ 75.80 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A1B1 และ A2B1 มีค่า GI ต่ำสุดเท่ากับ 70.90 และ 69.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 38)

ระยะเวลาการเก็บที่ 12 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 12 เดือน พบว่า ค่า GI ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า GI สูงที่สุดเท่ากับ 154.80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า GI เท่ากับ 82.10 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า GI ต่ำที่สุดเท่ากับ 71.97 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัย B2 อุณหภูมิ25 °C ค่า GI เท่ากับ 106.38 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าปัจจัย B1 อุณหภูมิห้อง ค่า GI เท่ากับ 99.54 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 39)

ตารางที่ 38 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ GI ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ชนิดปุ๋ย	GI% (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	70.90^{E}	69.30^{F}	70.10^{C}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	84.90^{C}	75.80^{D}	80.35^{B}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	115.30^{B}	119.60^{A}	117.45^{A}
AVG (B)	90.37^{A}	88.23^{B}	89.30
CV. (%)	0.42		
F-test	(A)**, (B)**, (AxB)**		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

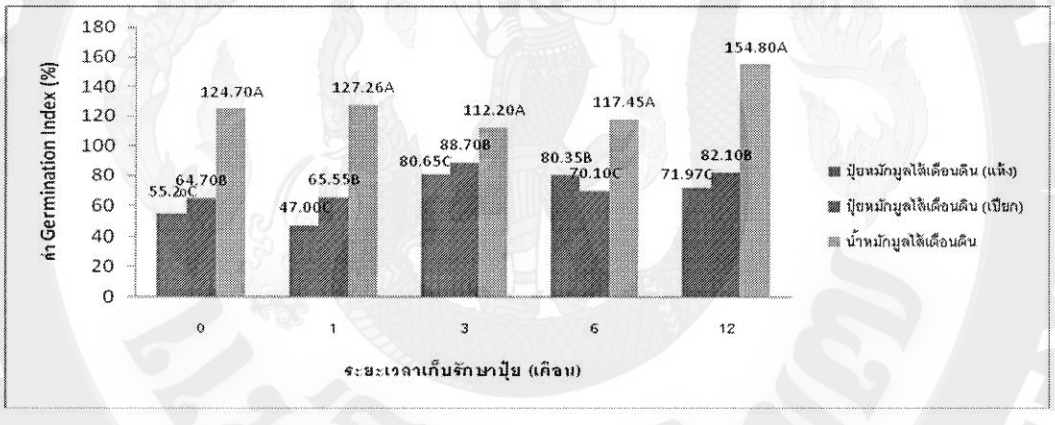
ตารางที่ 39 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ GI ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน

ชนิดปุ๋ย	GI% (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	66.42	77.53	71.97^{C}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	79.72	84.49	82.10^{B}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	152.48	157.12	154.80^{A}
AVG (B)	99.54^{B}	106.38^{A}	102.96
CV. (%)	4.86		
F-test	(A)**, (B)* , (AxB)^{ns}		

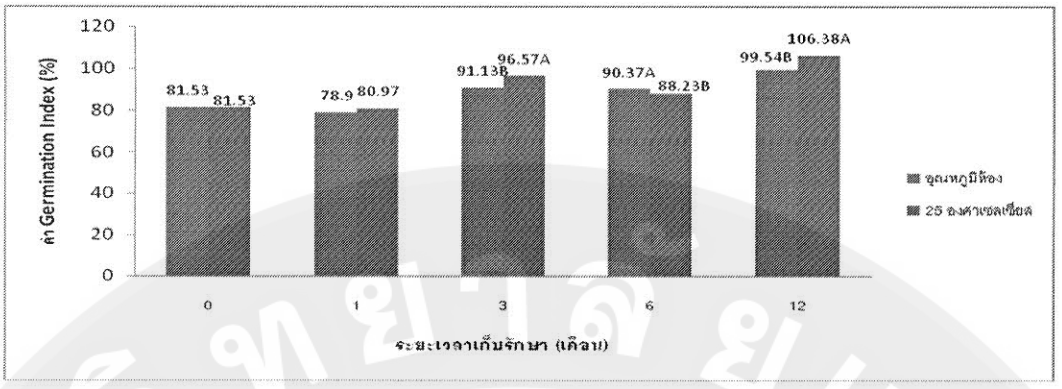
หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%
* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในด้านการทดสอบความเป็นพิษของปุ๋ยหมักโดยวัดเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ ด้วยการทดสอบดัชนีการงอกของเมล็ด (Germination Index: GI) ในการทดลองนี้ พบว่า ค่า GI ที่วัดได้มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเก็บรักษานานขึ้น โดยในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินทั้งชนิดแห้งและชนิดเปียก จาก 55 และ64

เปอร์เซ็นต์ เพิ่มขึ้นเป็น 80 และ 88 เปอร์เซ็นต์ แต่ลดต่ำลงในส่วนของตัวอย่างที่เป็นน้ำหมักมูลไส้เดือนดินเป็น 114 จาก 124 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังอยู่ใช่ช่วงมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ที่กำหนดไว้คือไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80 ในด้านปัจจัยของอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาปุ๋ยพบว่า ในช่วง 0 วัน และ 1 เดือนแรก ค่า GI ที่วัดค่าได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา แต่เดือนที่ 3 และเดือนที่ 12 พบว่าค่า GI ที่เก็บรักษาในชั้นวางที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าที่เก็บในชั้นที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในเดือนที่ 6 ค่า GI ที่เก็บรักษาในชั้นวางที่อุณหภูมิห้องมีค่าสูงกว่าที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 24) ดังนั้นผลกระทบของอุณหภูมิต่อค่าการเปลี่ยนแปลงของ GI ยังคงไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนจากการศึกษาครั้งนี้จำเป็นต้องศึกษาต่อในด้านอุณหภูมิการเก็บรักษาที่กว้างขึ้นและในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นในภายหลังต่อไป ในด้านชนิดตัวอย่างปุ๋ยหมัก พบว่า ค่า GI ระหว่างตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งกับมูลไส้เดือนดินชนิดเปียก และตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา โดยน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีค่า GI สูงที่สุด รองลงมาคือ มูลไส้เดือนดินชนิดเปียกและมูลไส้เดือนดินชนิดแห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 16 ผลวิเคราะห์ Germination Index (GI) ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน



ภาพที่ 17 ผลวิเคราะห์ Germination Index (GI) ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5. ปริมาณไนโตรเจน : Total N

ระยะเวลาการเก็บที่ 0 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 0 วัน พบว่า ค่า Total N ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Total N สูงที่สุดเท่ากับ 1.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า Total N เท่ากับ 1.37 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Total N ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และ ปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 40)

ระยะเวลาการเก็บที่ 1 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 1 เดือน พบว่า ค่า Total N ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Total N สูงที่สุดเท่ากับ 1.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า Total N เท่ากับ 1.22 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Total N ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติโดยปัจจัยร่วมระหว่าง A2B2, A2B1, A1B1, และ A1B2 มีค่า Total N เท่ากับ 1.55, 1.46, 1.27, และ 1.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่า Total N ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 41)

ตารางที่ 40 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ Total Nของตัวอย่างปุ๋ยมูล ไส้เดือนดินที่เก็บรักษาใน อุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 วัน

ชนิดปุ๋ย	Total N % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	1.37	1.37	1.37^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1.44	1.44	1.44^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.01	0.01	0.01^{C}
AVG (B)	0.94	0.94	0.94
CV. (%)	2.62		
F-test	(A)**, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 41 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ Total N ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาใน อุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Total N %(B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	1.27^{C}	1.18^{D}	1.22^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1.46^{B}	1.55^{A}	1.50^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.01^{E}	0.01^{E}	0.01^{C}
AVG (B)	0.91	0.91	0.91
CV. (%)	3.49		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, (AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 3 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 3 เดือน พบว่า ค่า Total N ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน

(แห้ง) มีค่า Total N สูงที่สุดเท่ากับ 1.85 และ 1.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Total N ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B)ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) พบความแตกต่างทางสถิติโดยปัจจัยร่วมระหว่าง A1B2, A2B1, A1B1, และ A2B2 มีค่า Total N เท่ากับ 1.99, 1.87, 1.70, และ 1.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่า Total N ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 42)

ตารางที่ 42 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด Total N ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Total N % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	1.70^{C}	1.99^{A}	1.85^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1.87^{B}	1.64^{D}	1.75^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.01^{E}	0.01^{E}	0.01^{B}
AVG (B)	1.19	1.21	1.20
CV. (%)	24.93		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, (AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 6 เดือน พบว่า ค่า Total N ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Total N สูงที่สุดเท่ากับ 1.42 และ 1.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Total N ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 43)

ตารางที่ 43 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด Total N ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Total N % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	1.46	1.38	1.42^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1.6	1.6	1.60^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.006	0.01	0.01^{B}
AVG (B)	1.02	1.00	1.01
CV. (%)	31.59		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 12 เดือน

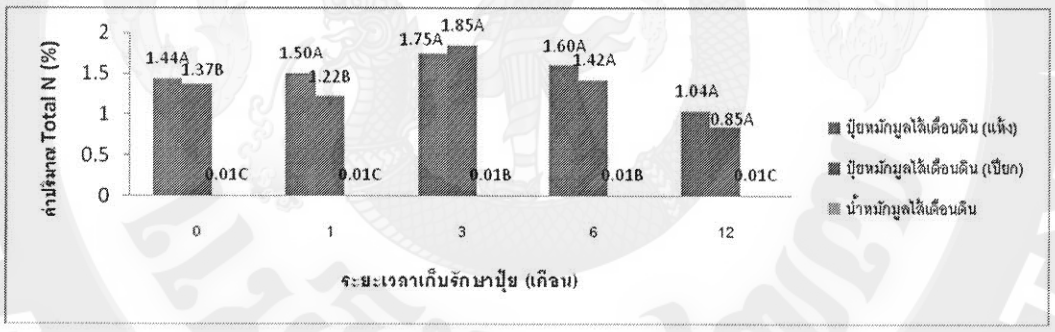
ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 12 เดือน พบว่า ค่า Total N ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Total N สูงที่สุดเท่ากับ 0.85 และ 1.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Total N ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 44)

ปริมาณ Total N ที่วัดได้จากตัวอย่างปุ๋ยหมักที่เก็บรักษาในช่วง 1 ถึง 6 เดือนแรก พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น แต่พบว่าลดต่ำลงเมื่อเก็บนาน 12 เดือน ในด้านอุณหภูมิที่เก็บรักษาพบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่า Total N ที่เก็บรักษาในชั้นวางที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กับที่เก็บในชั้นที่อุณหภูมิห้อง ในด้านชนิดตัวอย่างปุ๋ยหมัก พบว่า ค่า Total N ระหว่างตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งกับมูลไส้เดือนดินชนิดเปียก และตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา โดยปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินชนิดแห้ง มีค่า Total N สูงที่สุด รองลงมาคือ มูลไส้เดือนดินชนิดเปียก และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ตามลำดับ (ภาพที่ 25และ ภาพที่ 26) การศึกษาครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Rola *et al.*, (2002), Kaushik *et al.*, (2003), Gupta *et al.*, (2008), Garg *et al.*, (2005) และ Sangwan *et al.*, (2008) ที่ศึกษาพบว่าปริมาณ Total N เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการผลิตปุ๋ยหมักที่มีไส้เดือนดิน

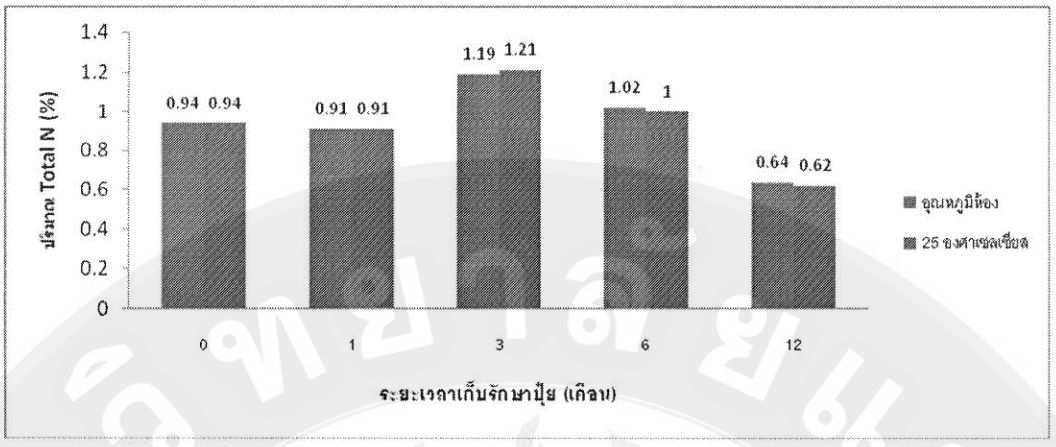
ตารางที่ 44 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด Total N ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Total N % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	0.82	0.89	0.85^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1.10	0.98	1.04^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.01	0.00	0.01^{B}
AVG (B)	0.64	0.62	0.63
CV. (%)	25.76		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ภาพที่ 18 ผลวิเคราะห์ Total N ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน



ภาพที่ 19 ผลวิเคราะห์ Total N ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

6. ปริมาณแอมโมเนียม (Extractable NH_4^+)

ระยะเวลาการเก็บที่ 0 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 0 วัน พบว่า ค่า Extractable NH_4^+ ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า Extractable NH_4^+ สูงที่สุดเท่ากับ 330 ppm รองลงมาคือ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Extractable NH_4^+ เท่ากับ 127 ppm ตามลำดับ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NH_4^+ ต่ำที่สุดเท่ากับ 0 ppm ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 45)

ตารางที่ 45 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณN-NH_4^+ ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 วัน

ชนิดปุ๋ย (A)	N-NH_4^+ ppm (B)		AVG (A)
	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	330	330	330^A
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	127	127	127^B
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0	0	0^C
AVG (B)	152.33	152.33	152.33
CV. (%)	2.42		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 1 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 1 เดือน พบว่า ค่า Extractable NH_4^+ ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า Extractable NH_4^+ สูงที่สุดเท่ากับ 237 ppm รองลงมาคือ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Extractable NH_4^+ เท่ากับ 202 ppm ตามลำดับ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NH_4^+ ต่ำที่สุดเท่ากับ 0 ppm ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน คือ B2 อุณหภูมิ 25 °C มีค่า Extractable NH_4^+ ที่วัดได้ 158.67 ppm สูงกว่า B1 อุณหภูมิห้อง 134.33 ppm ระหว่างปัจจัยร่วม (AxB) ก็เช่นเดียวกันพบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วม A1B1, A2B2, A1B2 และ A2B1 มีค่า Extractable NH_4^+ ที่วัดได้สูงตามลำดับคือ 234, 245, 231 และ 160 ppm ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่า Extractable NH_4^+ ที่วัดได้เท่ากับ 0 ppm (ตารางที่ 46)

ตารางที่ 46 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ N-NH_4^+ ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดปุ๋ย	N-NH_4^+ ppm. (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	243^A	231^B	237^A
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	160^C	245^A	202^B
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0^D	0^D	0^C
AVG (B)	134.33^B	158.67^A	146.50
CV. (%)	2.04		
F-test	(A) **,(B) **, (AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 3 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 3 เดือน พบว่า ค่า Extractable NH_4^+ ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Extractable NH_4^+ สูงสุดเท่ากับ 82 และ 85 ppm ตามลำดับ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NH_4^+ ต่ำที่สุดเท่ากับ 4 ppm ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดย B1 อุณหภูมิห้อง มีค่าเท่ากับ 79.67 ppm สูงกว่า B2 อุณหภูมิ 25

°C มีเท่ากับ 33.33 ppm ระหว่างปัจจัยร่วม (AxB) ก็เช่นเดียวกันพบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วม A2B1, A1B1, A1B2 และ A2B2 มีค่า Extractable NH_4^+ ที่วัดได้สูงตามลำดับคือ 132, 103, 62 และ 34 ppm ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่า Extractable NH_4^+ ที่วัดได้เท่ากับ 4 ppm (ตารางที่ 47)

ตารางที่ 47 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณN-NH_4^+ ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ชนิดปุ๋ย	N-NH_4^+ppm. (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	103^B	62^C	82^A
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	132^A	34^D	83^A
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	4^E	4^E	4^B
AVG (B)	79.67^A	33.33^B	56.50
CV. (%)	6.81		
F-test	(A) **,(B) **, (AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 6 เดือน พบว่า ค่า Extractable NH_4^+ ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Extractable NH_4^+ สูงสุดเท่ากับ 39 ppm รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า Extractable NH_4^+ เท่ากับ 19 ppm ตามลำดับ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NH_4^+ ต่ำที่สุดเท่ากับ 3.5 ppm ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดย B1 อุณหภูมิห้อง มีค่าเท่ากับ 24.33 ppm สูงกว่า B2 อุณหภูมิ 25 °C มีเท่ากับ 17 ppm ระหว่างปัจจัยร่วม (AxB) ก็เช่นเดียวกันพบความแตกต่างทางสถิติ โดยปัจจัยร่วม A2B1, A2B2, A1B1 และ A1B2 มีค่า Extractable NH_4^+ ที่วัดได้สูงตามลำดับคือ 48, 30, 21 และ 18 ppm ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่า Extractable NH_4^+ ที่วัดได้เท่ากับ 4 และ 3 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 48)

ตารางที่ 48 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ N-NH_4^+ ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน

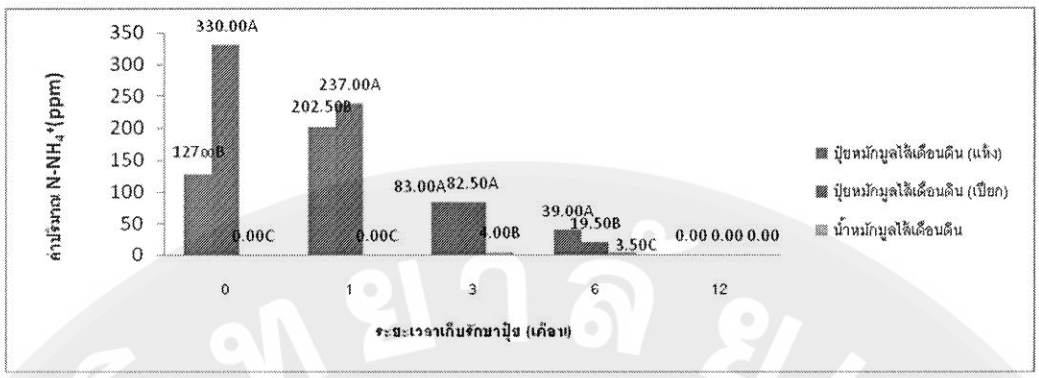
ชนิดปุ๋ย	N-NH_4^+ ppm. (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	21^C	18^C	19.00^B
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	48^A	30^B	39.00^A
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	4^D	3^D	3.50^C
AVG (B)	24.33^A	17.00^B	20.67
CV. (%)	7.22		
F-test	(A) **, (B) **, (AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

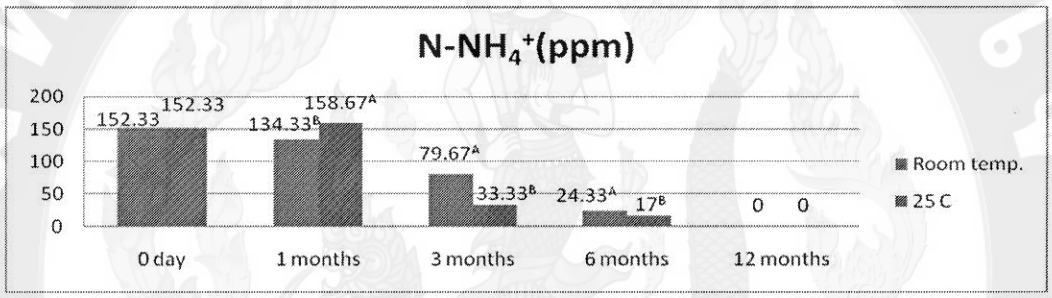
ระยะเวลาการเก็บที่ 12 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 12 เดือน ผลการทดลองพบว่า ในทุกตำรับทดลองตรวจไม่พบค่า Extractable NH_4^+

สรุปภาพรวมของผลวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียม (Extractable NH_4^+) พบว่า ปริมาณ NH_4^+ ที่วัดได้จากตัวอย่างปุ๋ยหมักที่เก็บรักษาในช่วง 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน มีแนวโน้มลดต่ำลงตามลำดับ และไม่สามารถวัดค่าได้เมื่อเก็บนาน 12 เดือน ในด้านอุณหภูมิที่เก็บรักษา พบว่า เดือนที่ 1 ตัวอย่างปุ๋ยหมักที่เก็บรักษาในชั้นวางที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดค่าได้สูงกว่า แต่ในเดือนที่ 3 และ 6 ตัวอย่างปุ๋ยหมักที่เก็บในชั้นวางที่อุณหภูมิห้องวัดค่าได้สูงกว่า ในด้านชนิดตัวอย่างปุ๋ยหมัก พบว่า ปริมาณ NH_4^+ ระหว่างตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งกับมูลไส้เดือนดินชนิดเปียก และตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา โดยปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกมีปริมาณ NH_4^+ สูงที่สุดในช่วงเวลาเก็บรักษาเริ่มแรกที่ 0 วัน และ 1 เดือน แต่เมื่อเก็บนาน 6 เดือน พบว่า ตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกมีค่าสูงกว่า ส่วนน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีค่าปริมาณ NH_4^+ ที่วัดได้ต่ำที่สุด (ภาพที่ 27 และ ภาพที่ 28)



ภาพที่ 20 ผลวิเคราะห์ N-NH_4^+ ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน



ภาพที่ 21 ผลวิเคราะห์ N-NH_4^+ ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

7. ปริมาณไนเตรท (Extractable NO_3^-)

ระยะเวลาการเก็บที่ 0 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยที่ 0 วัน พบว่า ค่า N-NO_3^- ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า Extractable NO_3^- สูงสุดเท่ากับ 553 ppm รองลงมาคือ A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NO_3^- เท่ากับ 11 ppm ส่วน A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NO_3^- ต่ำที่สุดเท่ากับ 0 ppm ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และ ระหว่างปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 49)

ตารางที่ 49 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ N-NO_3^- ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 วัน

ชนิดปุ๋ย (A)	Extractable NO_3^- ppm (B)		AVG (A)
	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	553	553	553^A
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	0	0	0^C
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	11	11	11^B
AVG (B)	188	188	188
CV. (%)	1.65		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 1 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 1 เดือน พบว่า ค่า Extractable NO_3^- ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัย A) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Extractable NO_3^- สูงสุดเท่ากับ 1,074.50 ppm รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า Extractable NO_3^- เท่ากับ 357 ppm ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NO_3^- ต่ำที่สุดเท่ากับ 6 ppm ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดย B1 อุณหภูมิห้อง มีค่า 608.67 ppm สูงกว่า B2 อุณหภูมิ 25 °C เท่ากับ 349.67 ppm และ ระหว่างปัจจัยร่วม (AxB) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A2B1, A2B2, A1B1 และ A1B1 มีค่าสูงตามลำดับ คือ 1,419, 730, 401 และ 313 ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่าเท่ากับ 6 และ 6 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 50)

ตารางที่ 50 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณไนเตรท Extractable NO_3^- ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Extractable NO_3^- ppm (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	401.00^{C}	313.00^{D}	357.00^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	$1,419.00^{A}$	730.00^{B}	1074.50^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	6.00^{E}	6.00^{E}	6.00^{C}
AVG (B)	608.67^{A}	349.67^{B}	479.17
CV. (%)	0.95		
F-test	(A) **, (B) **, (AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 3 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 3 เดือน พบว่า ค่า Extractable NO_3^- ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัย A) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า Extractable NO_3^- สูงสุดเท่ากับ 1,592 ppm รองลงมาคือ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Extractable NO_3^- เท่ากับ 1,374.50 ppm ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NO_3^- ต่ำที่สุดเท่ากับ 18 ppm ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดย B2 อุณหภูมิ 25 °C มีค่า 1,243.67 ppm สูงกว่า B1 อุณหภูมิห้อง เท่ากับ 746 ppm และ ระหว่างปัจจัยร่วม (AxB) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A1B2, A2B2, A2B1 และ A1B1 มีค่าสูงตามลำดับ คือ 2,156, 1,558, 1,191 และ 1,028 ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่าเท่ากับ 19 และ 17 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 51)

ตารางที่ 51 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ N-NO_3^- ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Extractable NO_3^- ppm (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	1028^{D}	2156^{A}	1592^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1191^{C}	1558^{B}	1374.50^{B}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	19^{E}	17^{E}	18^{C}
AVG (B)	746^{B}	1243.67^{A}	994.83
CV. (%)	0.30		
F-test	(A) **,(B) **, (AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 6 เดือน พบว่า ค่า Extractable NO_3^- ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัย A) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Extractable NO_3^- สูงสุดเท่ากับ 922.50 ppm รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่า Extractable NO_3^- เท่ากับ 663.67 ppm ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NO_3^- ต่ำที่สุดเท่ากับ 17.50 ppm ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดย B1 อุณหภูมิห้อง มีค่า 565 ppm สูงกว่า B2 อุณหภูมิ 25 °C เท่ากับ 504.11 ppm และ ระหว่างปัจจัยร่วม (AxB) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A2B1, A2B2, A1B2 และ A1B1 มีค่าสูงตามลำดับ คือ 1,077, 768, 726 และ 601 ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่าเท่ากับ 17 และ 18 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 52)

ตารางที่ 52 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ $N\text{-}NO_3^-$ ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ชนิดปุ๋ย	$N\text{-}NO_3^-$ ppm.(B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง.	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	601^{D}	726^{C}	663.67^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1077^{A}	768^{B}	922.50^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	17^{E}	18^{E}	17.50^{C}
AVG (B)	565^{A}	504.11^{B}	534.56
CV. (%)	0.08		
F-test	(A) **,(B) **, (AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 12 เดือน

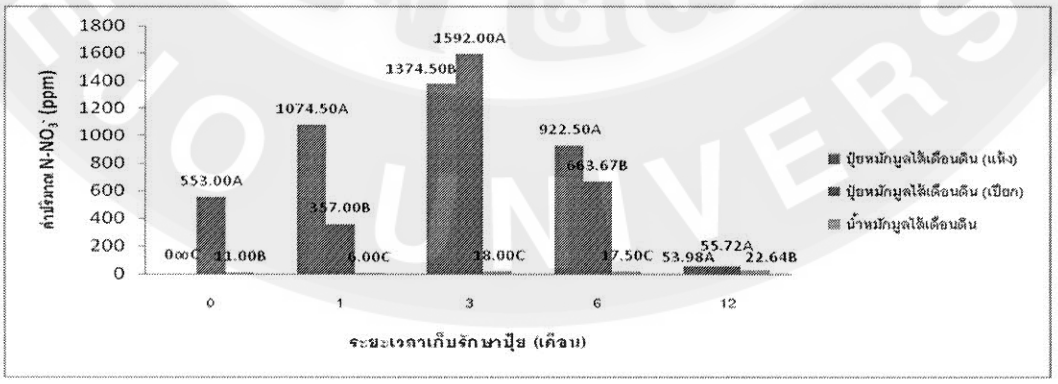
ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 12 เดือน พบว่า ค่า Extractable NO_3^- ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัย A) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่า Extractable NO_3^- สูงสุดเท่ากับ 55.72 และ 53.98 ppm ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่า Extractable NO_3^- ต่ำที่สุดเท่ากับ 22.64 ppm ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดย B2 อุณหภูมิ 25 °C มีค่า 48.76 ppm สูงกว่า B1 อุณหภูมิห้องเท่ากับ 39.47 ppm และ ระหว่างปัจจัยร่วม (AxB) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A2B2, A1B2, A1B1 และ A2B1 มีค่าสูงตามลำดับ คือ 66.17, 62.69, 48.76 และ 41.86 ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่าเท่ากับ 27.86 และ 17.41 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 53)

ตารางที่ 53 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ $N\text{-}NO_3^-$ ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน

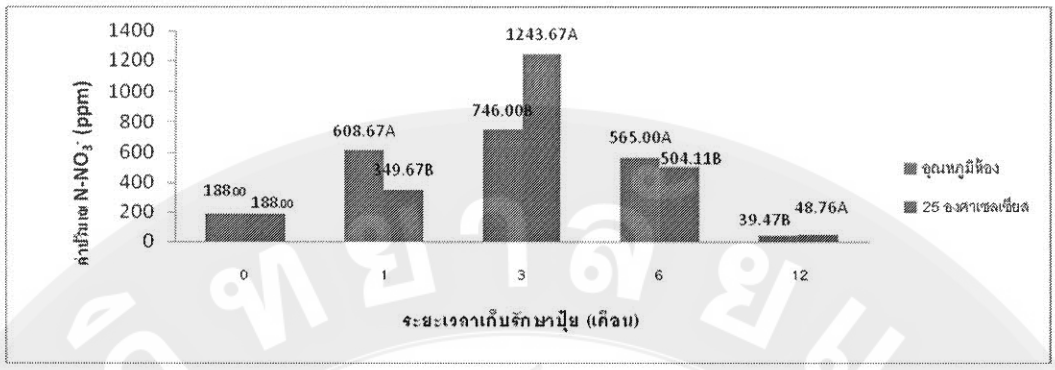
ชนิดปุ๋ย	$N\text{-}NO_3^-$ ppm.(B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง.	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	48.76^{B}	62.69^{A}	55.72^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	41.79^{B}	66.17^{A}	53.98^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	27.86^{C}	17.41^{D}	22.64^{B}
AVG (B)	39.47^{B}	48.76^{A}	44.11
CV. (%)	9.06		
F-test	(A) **, $(B)^{**}$, $(AxB)^{**}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

สรุปภาพรวมของปริมาณไนโตรเจนในรูปไนเตรท NO_3^- ในปุ๋ยหมักและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือนนั้น พบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเริ่มแรกของการเก็บรักษาในช่วงเดือนที่1-3 พบค่าสูงสุดอยู่ในระดับ 0.16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Jim *et al.*, (2007) ที่วัดปริมาณ NO_3^- เท่ากับ 0.27 เปอร์เซ็นต์ ในด้านอุณหภูมิการเก็บรักษา พบว่า เดือนที่ 1 และเดือนที่ 6 ตัวอย่างปุ๋ยหมักที่เก็บรักษาในชั้นวางที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าได้สูงกว่า แต่ในเดือนที่ 3 และ 12 ตัวอย่างปุ๋ยหมักที่เก็บในชั้นวางที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดค่าได้สูงกว่าตัวอย่างปุ๋ยหมักที่เก็บรักษาในชั้นวางที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดถึงผลกระทบของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อการปลดปล่อย NO_3^- ในตัวอย่างปุ๋ยแต่ละชนิด (ภาพที่ 29 และ ภาพที่ 30)



ภาพที่ 22 ผลวิเคราะห์ $N\text{-}NO_3^-$ ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน



ภาพที่ 23 ผลวิเคราะห์ $N\text{-}NO_3^-$ ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

8. ปริมาณฟอสฟอรัส (P_2O_5)

ระยะเวลาการเก็บที่ 0 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 0 วัน พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัย A) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าสูงสุด เท่ากับ 1.42 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าเท่ากับ 1.34 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิต (ตารางที่ 54)

ตารางที่ 54 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ Phosphorus ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 วัน

ชนิดปุ๋ย (A)	Phosphorus % (B)		AVG (A)
	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	1.34	1.34	1.34^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1.42	1.42	1.42^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.01	0.01	0.01^{C}
AVG (B)	0.92	0.92	0.92
CV. (%)	3.36		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 1 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 1 เดือน พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าเท่ากับ 0.78 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยค่าฟอสฟอรัสจากปุ๋ยที่เก็บในอุณหภูมิห้องมีค่าเท่ากับ 0.73 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่า อุณหภูมิ 25 °C ซึ่งเท่ากับ 0.55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) ก็พบความแตกต่างกันทางสถิตเช่นเดียวกัน โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A1B1 และ A2B2 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.23 และ 1.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A2B1 และ A1B2 เท่ากับ 0.95 และ 0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 55)

ระยะเวลาการเก็บที่ 3 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 3 เดือน พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.06 และ 2.04 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิต (ตารางที่ 56)

ตารางที่ 55 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ Phosphorus ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Phosphorus% (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	1.23^{A}	0.33^{C}	0.78^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	0.95^{B}	1.3^{A}	1.12^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.01^{D}	0.01^{D}	0.01^{C}
AVG (B)	0.73^{A}	0.55^{B}	0.64
CV. (%)	5.08		
F-test	(A) **,(B) **,(AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 56 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ Phosphorus ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Phosphorus% (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	2.06	2.06	2.06^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	2.1	1.99	2.04^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.01	0.01	0.01^{B}
AVG (B)	1.39	1.35	1.37
CV. (%)	25.77		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 6 เดือน พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.14 และ 2.21 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิต (ตารางที่ 57)

ตารางที่ 57 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณPhosphorus ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Phosphorus % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	2.69	1.79	2.14^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	2.63	2.38	2.21^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.004	0.006	0.01^{B}
AVG (B)	1.48	1.43	1.45
CV. (%)	20.68		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 12 เดือน

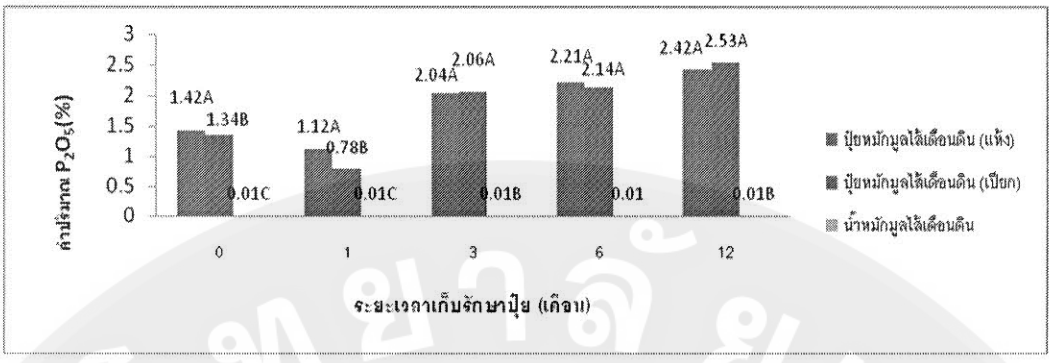
ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 12 เดือน พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.53 และ 2.42 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิต (ตารางที่ 58)

ตารางที่ 58 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ Phosphorus ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน

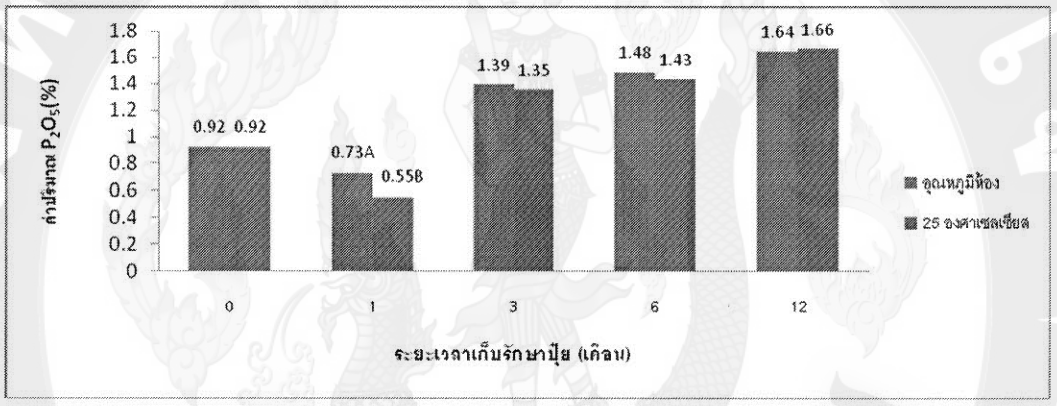
ชนิดปุ๋ย	Phosphorus % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	2.44	2.62	2.53^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	2.48	2.36	2.42^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.01	0.01	0.01^{B}
AVG (B)	1.64	1.66	1.65
CV. (%)	20.68		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

สรุปภาพรวมของปริมาณฟอสฟอรัส P_2O_5 ในปุ๋ยหมักและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินภายหลังเก็บรักษาในชั้นวางเป็นเวลา 12 เดือน พบว่า การเก็บรักษาเป็นเวลาที่นานขึ้นปริมาณ P_2O_5 จะเพิ่มสูงขึ้น แปรผันตามระยะเวลาที่เก็บรักษา สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaushik *et al.*, (2003), Chandra *et al.*, (2007), Gupta *et al.*, (2008), Garg *et al.*, (2005) และ Sangwan *et al.*, (2008) ที่ศึกษาพบว่าปริมาณ P_2O_5 ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินจะมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยหมักที่มีไส้เดือนดิน ในส่วนของอุณหภูมิการเก็บรักษา พบว่ามีความแตกต่างในช่วงเดือนที่ 1 โดยปุ๋ยหมักที่เก็บในอุณหภูมิห้องวัดค่า P_2O_5 ได้สูงกว่าที่เก็บในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่การเก็บรักษาที่ 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ในด้านชนิดตัวอย่างปุ๋ยหมัก พบว่า ปริมาณ P_2O_5 ระหว่างตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งกับมูลไส้เดือนดินชนิดเปียก และตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา โดยปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งมีปริมาณ P_2O_5 สูงที่สุดในช่วงเวลาเก็บรักษาเริ่มแรกที่ 0 วัน และ 1 เดือน แต่ในระยะการเก็บที่ 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน ไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่เป็นมูลไส้เดือนดิน ส่วนน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีปริมาณ P_2O_5 ที่วัดได้ต่ำที่สุด (ภาพที่ 31 และ ภาพที่ 32)



ภาพที่ 24 ผลวิเคราะห์ P_2O_5 ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน



ภาพที่ 25 ผลวิเคราะห์ P_2O_5 ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

9. ปริมาณโพแทสเซียม (K_2O)

ระยะเวลาการเก็บที่ 0 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 0 วัน พบว่า ปริมาณโพแทสเซียมที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัย A) ระหว่างอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 59)

ตารางที่ 59 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ Potassiumของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 วัน

ชนิดปุ๋ย	Potassium % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง.	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	0.9	0.9	0.90
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	0.94	0.94	0.94
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.89	0.89	0.89
AVG (B)	0.91	0.91	0.91
CV. (%)	4.11		
F-test	(A) ^{ns}, (B)^{ns}, (AxB)^{ns}		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ระยะเวลาการเก็บที่ 1 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 1 เดือน พบว่า ปริมาณโพแทสเซียมที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.54 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่าท่ากับ 0.96 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.79 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน โดย ค่าโพแทสเซียมที่วัดได้จากปุ๋ยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีค่า 1.27 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอุณหภูมิ 25°C เท่ากับ 0.92 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) ก็พบความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A1B1 และ A2B2 มีค่าโพแทสเซียมที่วัดได้สูงที่สุดเท่ากับ 1.61 และ 1.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือปัจจัย A2B1, A3B1, A3B2 และ A1B2 เท่ากับ 1.39, 0.82, 0.77 และ 0.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 60)

ตารางที่ 60 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ Potassiumของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Potassium % (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	1.61^{A}	0.3^{D}	0.96^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1.39^{B}	1.68^{A}	1.54^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.82^{C}	0.77^{C}	0.79^{C}
AVG (B)	1.27^{A}	0.92^{B}	1.10
CV. (%)	3.63		
F-test	(A) **,(B) **,(AxB) **		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 3 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 3 เดือน พบว่า ปริมาณโพแทสเซียมที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าสูงที่สุดท่ากับ 2.10 และ 2.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.24 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 61)

ระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 6 เดือน พบว่า ปริมาณโพแทสเซียมที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) และ A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าสูงที่สุดท่ากับ 1.79 และ 2.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) และปัจจัยร่วม (AxB) ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 62)

ตารางที่ 61 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณPotassiumของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Potassium% (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	2.06	2.14	2.10^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	2.14	1.97	2.06^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.24	0.24	0.24^{B}
AVG (B)	1.48	1.45	1.47
CV. (%)	24.18		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 62 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณPotassium ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Potassium% (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง.	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	2.11	1.38	1.79^{A}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	1.53	2.5	2.01^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.21	0.18	0.20^{B}
AVG (B)	1.34	1.33	1.34
CV. (%)	26.47		
F-test	(A) **, $(B)^{ns}$, $(AxB)^{ns}$		

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ระยะเวลาการเก็บที่ 12 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษาปุ๋ยนาน 12 เดือน พบว่า ปริมาณโพแทสเซียมที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ย (ปัจจัยA) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง) มีค่าสูงสุด

เท่ากับ 2.83 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก) มีค่าท่ากับ 2.19 เปอร์เซ็นต์ ส่วน A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.26 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนอุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย B) ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน โดย ค่าโพแทสเซียมที่วัดได้จากปุ๋ยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีค่า 1.92 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอุณหภูมิ 25°C เท่ากับ 1.60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปัจจัยร่วม (AxB) ก็พบความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน โดยปัจจัยร่วมระหว่าง A2B1 มีค่าโพแทสเซียมที่วัดได้สูงที่สุดเท่ากับ 3.27 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปัจจัย A1B1, A1B2 และ A2B2 เท่ากับ 2.26, 2.13 และ 2.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน A3B1 และ A3B2 มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.24 และ 0.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 63)

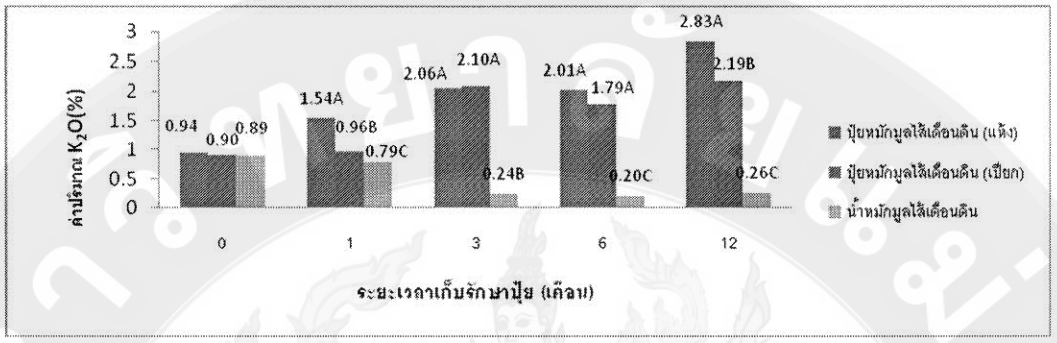
ตารางที่ 63 ผลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณ Potassium ของตัวอย่างปุ๋ยมูลไส้เดือนดินที่เก็บรักษาในอุณหภูมิที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน

ชนิดปุ๋ย	Potassium% (B)		AVG
(A)	B1 อุณหภูมิห้อง.	B2 อุณหภูมิ 25 °C	(A)
A1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (เปียก)	2.26^{B}	2.13^{B}	2.19^{B}
A2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (แห้ง)	3.27^{A}	2.38^{B}	2.83^{A}
A3 น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน	0.24^{C}	0.29^{C}	0.26^{C}
AVG (B)	1.92^{A}	1.60^{B}	1.76
CV. (%)	26.47		
F-test	(A) **, (B)**, (AxB)**		

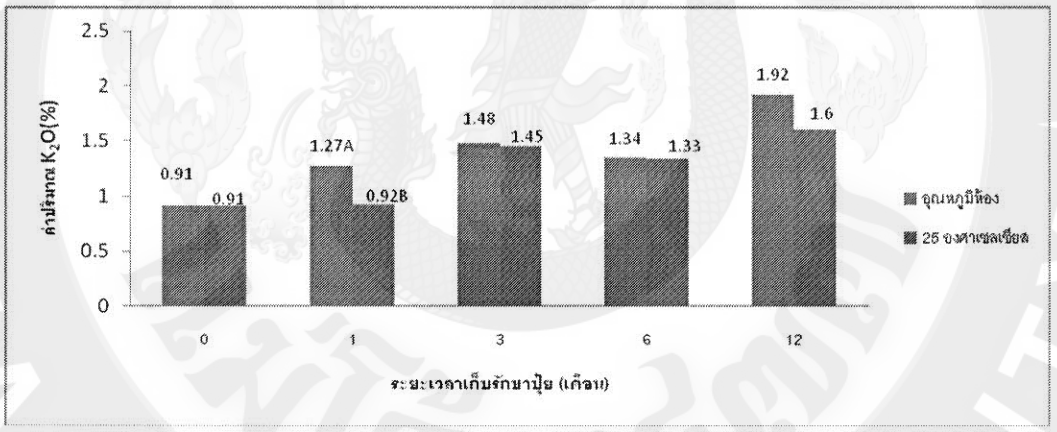
หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

สรุปภาพรวมของปริมาณโพแทสเซียม K_2O ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินภายหลังเก็บรักษาที่ชั้นวางเป็นเวลา 12 เดือน พบว่า การเก็บรักษาเป็นเวลาที่นานขึ้นปริมาณ K_2O จะเพิ่มสูงขึ้นแปรผันตามระยะเวลาที่เก็บรักษา เช่นเดียวกับการงานวิจัยของ Kaushik *et al.*, (2003), Gupta *et al.,* (2008) และ Chandra *et al.*, (2007) ซึ่งพบว่ามูลไส้เดือนดินที่ผลิตได้มีค่า K_2O สูงขึ้นตามช่วงระยะเวลาในการผลิตปุ๋ยหมัก แต่ค่า K_2O ในการศึกษาครั้งนี้สูงกว่าการศึกษาของ Jim *et al.*, (2007) ที่พบว่าปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินมีค่าปริมาณธาตุโพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 0.33 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของอุณหภูมิการเก็บรักษา พบว่ามีความแตกต่างในช่วงเดือนที่ 1 โดยปุ๋ยหมักที่เก็บในอุณหภูมิห้องวัดค่า K_2O ได้สูงกว่าที่เก็บในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่การเก็บรักษาที่ 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ในด้านชนิดตัวอย่างปุ๋ยหมัก พบว่า ปริมาณ K_2O ระหว่างตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดแห้ง กับมูลไส้เดือนดินชนิดเปียก และตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา โดยปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งมีปริมาณ K_2O สูงที่สุดใน

ช่วงเวลาเก็บรักษาเริ่มแรกที่ 1 เดือน แต่ในระยะการเก็บที่ 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน ไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่เป็นมูลไส้เดือนดิน ส่วนน้ำหมักมูลไส้เดือนดินมีปริมาณ K_2O ที่วัดได้ต่ำที่สุด (ภาพที่ 33 และ ภาพที่ 34)



ภาพที่ 26 ผลวิเคราะห์ K_2O ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน



ภาพที่ 27 ผลวิเคราะห์ K_2O ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

10. ปริมาณออกซิน (free IAA)

ผลวิเคราะห์ออกซิน(free IAA)ในตัวอย่างมูลไส้เดือนและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน พบว่า ผลวิเคราะห์ที่ได้พบออกซิน(free IAA)ในปริมาณความเข้มข้นต่ำระดับ 0.001-4.06 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบสูงสุดในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกที่อายุเก็บรักษา 0 วันเท่ากับ 4.06 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 64)

11. ปริมาณจิบเบอเรลลิน (free GA_3)

ผลวิเคราะห์จิบเบอเรลลิน (free GA_3) ในตัวอย่างมูลไส้เดือนและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน พบว่า พบจิบเบอเรลลิน (free GA_3)ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างในปริมาณความเข้มข้นต่ำระดับ 0.001-1.58 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบสูงสุดในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกที่อายุเก็บรักษา 0 วันเท่ากับ1.58 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 65)

12. ปริมาณไซโตไคนิน (Cytokinins)

ผลวิเคราะห์ไซโตไคนิน (Cytokinins) ในตัวอย่างมูลไส้เดือนและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน พบว่า พบไซโตไคนิน (Cytokinins) ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างในปริมาณความเข้มข้นต่ำระดับ 0.007-0.079 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบสูงสุดในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกที่อายุเก็บรักษา 1 เดือนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.079 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 66)

ตารางที่ 64 ผลวิเคราะห์ Free IAA ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน

	Shelf life				
	ที่ 0 วัน	ที่ 1 เดือน	3 เดือน	ที่ 6 เดือน	ที่ 12 เดือน
มูลไส้เดือนดินเปียก					
อุณหภูมิห้อง	4.06	0.003	0.00	0.002	0.00
25 °C	4.06	0.003	0.00	0.002	0.00
มูลไส้เดือนดินแห้ง					
อุณหภูมิห้อง	0.00	0.00	0.00	0.001	0.00
25 °C	0.00	0.001	0.00	0.004	0.00
น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน					
อุณหภูมิห้อง	0.00	0.001	0.00	0.007	0.50
25 °C	0.00	0.00	0.00	0.002	0.00

วิเคราะห์โดย : ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตารางที่ 65 ผลวิเคราะห์ Free GA_3 ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน

	Shelf life				
	ที่ 0 วัน	ที่ 1 เดือน	3 เดือน	ที่ 6 เดือน	12 เดือน
มูลไส้เดือนดินเปียก					
อุณหภูมิห้อง	1.58	0.00	0.00	0.48	0.07
25 °C	1.58	0.00	0.00	0.02	0.07
มูลไส้เดือนดินแห้ง					
อุณหภูมิห้อง	0.19	0.00	0.33	0.28	0.12
25 °C	0.19	0.00	0.21	0.03	0.08
น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน					
อุณหภูมิห้อง	0.77	0.00	0.00	0.04	0.10
25 °C	0.77	0.00	0.00	0.01	0.06

วิเคราะห์โดย : ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตารางที่ 66 ผลวิเคราะห์ Free Cytokinins ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่เก็บรักษาในชั้นวาง (shelf life) ที่อายุ 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน

	Shelf life				
	ที่ 0 วัน	ที่ 1 เดือน	3 เดือน	ที่ 6 เดือน	12 เดือน
มูลไส้เดือนดินเปียก					
อุณหภูมิห้อง	0.068	0.037	0.015	0.011	0.010
25 °C	0.068	0.079	0.014	0.014	0.010
มูลไส้เดือนดินแห้ง					
อุณหภูมิห้อง	0.046	0.069	0.019	0.011	0.00
25 °C	0.046	0.073	0.016	0.011	0.00
น้ำหมักมูลไส้เดือนดิน					
อุณหภูมิห้อง	0.037	0.030	0.017	0.007	0.030
25 °C	0.037	0.064	0.017	0.008	0.010

วิเคราะห์โดย : ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ในส่วนของผลวิเคราะห์ฮอร์โมนในตัวอย่างมูลไส้เดือนและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน 3 ชนิด คือ ออกซิน(free IAA), จิบเบอเรลลิน (free GA_3) และไซโตไคนิน (Cytokinins) พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในระหว่างชนิดปุ๋ยที่เก็บในช่วงระยะเวลานาน 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน รวมถึงไม่พบความแตกต่างทางสถิติของระดับอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ต่างกัน 2 ระดับคืออุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยภาพรวมผลวิเคราะห์ที่ได้พบฮอร์โมนในปริมาณความเข้มข้นต่ำ โดยพบออกซินในตัวอย่างปุ๋ยทั้ง 3 ชนิดในระดับ 0.001-4.06 มิลลิกรัมต่อลิตร (พบสูงสุดในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกที่อายุเก็บรักษา 0 วัน) พบจิบเบอเรลลินในตัวอย่างปุ๋ยทั้ง 3 ชนิดในระดับ 0.001-1.58 มิลลิกรัมต่อลิตร (พบสูงสุดในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกที่อายุเก็บรักษา 0 วัน) และพบไซโตไคนินในตัวอย่างปุ๋ยทั้ง 3 ชนิดในระดับ 0.008-0.079 มิลลิกรัมต่อลิตร (พบสูงสุดในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกที่อายุเก็บรักษา 1 เดือนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้นส่งผลให้ฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มลดต่ำลงและลดต่ำลงมากที่สุดในระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน ทั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 ที่พบว่า น้ำหมักจากผลไม้รวมหลังจากหมักนาน 6 เดือน ปริมาณฮอร์โมนพืชในตัวอย่างปุ๋ยจะลดต่ำลงแต่ยังคงตรวจสอบพบสารทั้ง 3 กลุ่ม (ออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน) จนถึง 1 ปี (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

งานวิจัยที่ 1 การจำแนกชนิดแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยสายพันธุ์ *Perionyx* sp., *Metaphire posthuma* และชนิดแบคทีเรียในมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.

การศึกษาชนิดแบคทีเรียในตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* ที่เก็บจากดินในแปลงเกษตร, ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงวัวนม, ลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp. ที่เก็บจากบ่อผลิตปุ๋ยหมัก, ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน และ น้ำหมักมูลไส้เดือนดินที่เก็บจากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดินทางการค้า โดยใช้วิธีทั้งแบบเพาะเลี้ยง (culturable technique) และแบบไม่เพาะเลี้ยง (unculturable technique) ผลการศึกษา พบว่า วิธี unculturable technique โดยการสกัด DNA จากตัวอย่างโดยตรงและเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 16S rRNA ด้วย primers 341F (GC-Clamp) และ 518R ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นแยกโมเลกุลของ DNA ที่มีลำดับเบสต่างกันด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel electrophoresis (DGGE) โดยใช้ 10% acrylamide gel ที่มีสาร denaturant เข้มข้น 30-50% ใช้กระแสไฟฟ้า 65V เป็นเวลา 14 ชั่วโมง สามารถแยกโมเลกุลของ DNA ที่มีลำดับเบสต่างกันจำนวน 66 แถบ โดยพบสูงสุดจำนวน 18 แถบ จากตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน รองลงมาคือตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากดินในแปลงเกษตร จำนวน 15 แถบ, ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดิน จำนวน 12 แถบ, ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. จากฟาร์มวัวนม จำนวน 11 แถบ และ ตัวอย่างจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน พบน้อยที่สุดจำนวน 10 แถบ จากนั้นเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ของสารละลายดีเอ็นเอจากแถบเจลด้วย primers 341F (GC-Clamp) และ 518R ด้วยเทคนิค PCR และ และวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product โดยใช้ primer 314F จากนั้นเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์ 16S rRNA ของตัวอย่างที่ศึกษากับฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากเว็บไซต์ http://ncbi.nlm.nih.gov/ พบว่า ตัวอย่างที่ศึกษามีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 82–99% และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่า แบคทีเรียที่ศึกษามีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย 3 Phylum ประกอบด้วย Phylum Bacteroidetes Class Sphingobacteria, Phylum Tenericutes Class Mollicutes และ Phylum Proteobacteria Class Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria และ Betaproteobacteria โดย Class Betaproteobacteria พบในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากดินในแปลงเกษตร ส่วน Class

Sphingobacteria พบเฉพาะตัวอย่างจากมูลไส้เดือนดิน และ Class Mollicutes พบเฉพาะตัวอย่างจากน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน

ในส่วนของการศึกษาจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยวิธี culturable technique คัดแยกเชื้อโดยทำ serial dilution 10^{-1}- 10^{-7} ในสารละลาย 0.85 % normal saline solution จากนั้นเพาะเชื้อบนอาหาร Nutrient Agar (NA), de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) ด้วยเทคนิค spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพมี O_2 และไม่มี O_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียจากลักษณะโคโลนีที่ต่างกันภายใต้กล้อง stereomicroscope และคัดแยกเชื้อที่คัดเลือกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate พบว่า ได้แบคทีเรียจากตัวอย่างทั้งหมด 73 ไอโซเลท โดยคัดแยกได้สูงสุดจำนวน 20 ไอโซเลทจากตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน รองลงมา คือ ตัวอย่างมูลไส้เดือนดิน จำนวน 19 ไอโซเลท, ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงไส้เดือนดิน จำนวน 14 ไอโซเลท, ลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Perionyx* sp. จากฟาร์มวัวนม จำนวน 11 ไอโซเลท ส่วนตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากดินในแปลงเกษตร คัดแยกได้น้อยที่สุด จำนวน 9 ไอโซเลท จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 73 ไอโซเลทที่คัดแยกได้สกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 16S rRNA ด้วย primers 20F (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3') และ 1500R (5' GTT ACC TTG TTA CGA CTT3') ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ด้วย primer 800R (5' TAC CAG GGT ATC TAA TCC 3') และนำผลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์ 16S rRNA ของตัวอย่างที่ศึกษากับฐานข้อมูล eztaxon-e (นิรนาม; 2556: ระบบออนไลน์) พบว่า ตัวอย่างที่ศึกษามีความเหมือนกับฐานข้อมูลในระดับ 97–100% และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงจากฐานข้อมูลโดยการสร้าง phylogenzetic tree พบว่า แบคทีเรียที่ศึกษามีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียใน Phylum *Firmicutes* Class *Bacilli* ประกอบด้วย 6 Genus คือ *Bacillus* (68.48 %), *Paenibacillus* (2.74 %), *Staphylococcus* (1.37 %), *Enterococcus* (1.37 %), *Lysinibacillus* (1.37 %) และ *Rummeliibacillus* (1.37 %) และ Phylum *Proteobacteria* Class *Gammaproteobacteria* ประกอบด้วย 7 Genus คือ *Aeromonas* (9.58 %), *Pseudomonas* (5.47 %), *Enterobacter* (2.74 %), *Shewanella* (1.37 %), *Citrobacter* (1.37 %), *Neisseria* (1.37 %) และ *Vibrio* (1.37 %) รวมทั้งหมด 13 Genus โดยพบ *Bacillus* ในทุกตัวอย่าง ส่วน *Aeromonas* และ *Paenibacillus* พบเฉพาะในตัวอย่างที่เป็นลำไส้ไส้เดือนดิน

ในส่วนของความหลากหลายระหว่างตัวอย่างที่ใช้ศึกษา พบว่า ตัวอย่างจากลำไส้ไส้เดือนดินพันธุ์ *Metaphire posthuma* พบ 5 Genus (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Aeromonas,* และ *Pseudomonas*) และ ตัวอย่างจากน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน พบ 5 Genus (*Bacillus*, *Staphylococcus, Enterococcus, Rummeliibacillus* และ *Vibrio*) รองลงมาคือ ตัวอย่างจากลำไส้ไส้เดือนดินพันธุ์ *Perionyx* sp. จากบ่อเลี้ยงไส้เดือน พบ 4 Genus (*Bacillus, Paenibacillus*, *Citrobacter* และ *Aeromonas*) และ ตัวอย่างจากมูลไส้เดือนดิน พบ 4 Genus (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Neisseria* และ

Pseudomonas) ส่วนตัวอย่างจากลำไส้ไส้เดือนดินพันธุ์ *Perionyx* sp. จากฟาร์มวัวนม พบมีความหลากหลายน้อยที่สุด 3 Genus (*Bacillus, Aeromonas* และ *Shewanella*)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค unculturable กับ culturable ที่ใช้ในการจำแนกชนิดแบคทีเรียในระดับ Phylum และ ระดับ Class พบว่า เทคนิค unculturable มีศักยภาพในการใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียได้หลากหลายกว่า โดยสามารถจำแนกได้ 3 Phylum คือ Phylum Bacteroidetes, Tenericutes และ Proteobacteria ประกอบด้วย 5 Class คือ Sphingobacteria, Mollicutes, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria และ Betaproteobacteria ในขณะที่เทคนิค culturable สามารถจำแนกได้ 2 Phylum คือ Phylum Firmicutes และ Proteobacteria ประกอบด้วย 2 Class คือ Bacilli และ Gammaproteobacteria แต่เทคนิค culturable สามารถจำแนกชนิดได้ถึงระดับ Genus และ Species ในขณะที่เทคนิค unculturable ทำไม่ได้ในระดับเดียวกันนี้ ดังนั้นในการเลือกใช้เทคนิคใดจึงควรคำนึงถึงวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้งานเป็นหลัก

ในการศึกษาครั้งนี้แบคทีเรียที่คัดแยกได้หลายชนิดอยู่ใน Genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* และ *Enterobacter* เป็นกลุ่มที่สามารถสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoters) ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ(Free-living nitrogen fixers) และละลายธาตุฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงในดินได้ (Phosphate solubilizers) (Valle-Molinas *et al*., 2007; Byzov *et al*., 2007; Singleton *et al*., 2003) นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* และ *Bacillus licheniformis* ใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากเศษปลาได้ผลดี (Joong Kyun *et al*.,2010) และเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* นั้นได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการเกษตรหลายด้านด้วยกัน เช่น การใช้ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช ยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช คือ *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium* และ *Ralstonia solunaceurm* นอกจากนี้ยังมีการใช้ *Bacillus* sp. เติมลงไปในบ่อเลี้ยงกุ้งลดการเกิดโรคเรืองแสงที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* (Loreno-Osti *et al*., 2004; Martínez-Romero, 2001) และใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย (vermifilter) โดยกลุ่มจุลินทรีย์หลักที่พบในระบบ vermifilter อยู่ในกลุ่ม Proteobacteria โดยเฉพาะ Gammaproteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes และ Planctomycetes (Jing *et al*.,2013) ด้วยข้อมูลดังกล่าวข้างต้น สามารถต่อยอดงานวิจัยนี้ในการนำเชื้อที่คัดแยกได้ใน Genus ต่างๆที่สนใจไปศึกษาทดลองเพิ่มเติมในส่วนของ functional ในด้านต่างๆ สำหรับประยุกต์ใช้งานทางการเกษตรหรือสิ่งแวดล้อมต่อไป

งานวิจัยที่ 2 การศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในในมูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp., ต่อการผลิต Plant growth promoters และการส่งเสริมการเจริญของเมล็ดพืช

ในการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียจำนวน 73 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินในงานวิจัยที่ 1 ต่อการผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) ทดสอบด้วยวิธี colorimetrically ของ Gordon and Weber (1951) โดยเลี้ยงแบคทีเรียเริ่มต้นในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่มี L-Tryptophan (Frankenberger and Poth, 1988) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C

เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง วัดปริมาณ IAA โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1.5 ml ปั่นแยกเซลล์และนำส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml ผสมกับสารละลาย $FeCl_3$-$HClO_4$ บ่มทิ้งไว้ 25 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm คำนวณหาปริมาณ IAA โดยเตรียมกับกราฟสารละลายมาตรฐาน คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ได้ดีมาทดสอบความสามารถในการผลิต IAA อีกครั้ง ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้สามารถผลิต IAA ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1 μg/ml จำนวน 34 ไอโซเลท และมีแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA เข้มข้นในระดับมากกว่า 1 μg/ml จำนวน 27 ไอโซเลท และมีเพียงจำนวน 8 ไอโซเลท ที่สามารถผลิต IAA ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 30 μg/ml โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิต IAA ความเข้มข้นสูงนั้น พบว่า Genus *Enterobacter* สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 119.83-131.99 μg/ml รองลงมาคือ Genus *Aeromonas* และ *Bacillus* สามารถผลิต IAA ได้ในระดับ 51.74-80.44 μg/ml และ 32.45 μg/ml ตามลำดับ

ในส่วนของการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินต่อการส่งเสริมการงอกของเมล็ดพืชโดยได้ทดสอบกับเมล็ดข้าว เมล็ดผักคะน้า และเมล็ดพริก ทำการทดสอบโดยแช่เมล็ดทดสอบในน้ำเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียที่ทดสอบนาน 15 - 30 นาที ทำตัวควบคุมคือ น้ำเปล่า และ Nutrient broth (NB) จากนั้นและนำเมล็ดทดสอบเพาะบนอาหารแข็งที่มี 1% (w/v) agar ทำ 2 ซ้ำในสภาวะปลอดเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (~28 องศาเซลเซียส)เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำผลการงอกของเมล็ดทุกวันมาคำนวนหา Germination index ตามวิธีของ Walker-Simmons and Sesing, 1990 พบว่า น้ำเลี้ยงแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท มีศักยภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดทดสอบดีกว่าตำรับทดลองควบคุม คือ ไอโซเลท A-10 (*Bacillus cereus*), P1-1 (*Bacillus* sp.), V-20 (*Bacillus kochii*), AnA-3 (*Bacillus megaterium*), LV-15 (*Bacillus* sp.), P1-5 (*Bacillus siamensis*), MRSLV-10 (*Bacillus siamensis*), V-23 (*Bacillus* sp.) และไอโซเลท MRSLV-5 (*Bacillus cereus*) โดยดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท V-20, A-10 และ MRSLV-10 ให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวสูงสุดเท่ากับ 4.42, 4.05 และ 4.05 ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % กับค่าดัชนีการงอกของเมล็ดที่แช่ใน NB และ น้ำเปล่า วัดค่าได้เท่ากับ 3.52 และ 3.91 ตามลำดับ ส่วนเมล็ดผักคะน้าที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท P1-5, P1-1 และ AnA-3 ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดผักคะน้าสูงสุดเท่ากับ 5.17, 4.98 และ 4.98 ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % กับค่าดัชนีการงอกของเมล็ดผักคะน้าที่แช่ใน NB และ น้ำเปล่า วัดได้เท่ากับ 4.65 และ 3.93 ตามลำดับ และเมล็ดพริกที่แช่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท LV-15, V-23, P1-5 และ MRSLV-5 วัดค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพริกได้สูงสุดเท่ากับ 1.79, 1.71, 1.64 และ 1.61 ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % กับค่าดัชนีการงอกของเมล็ดผักคะน้าที่แช่ใน NB และ น้ำเปล่า วัดได้เท่ากับ 1.01 และ 1.28 ตามลำดับ

ซึ่งการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ร้อยละ 26 ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่สามารถผลิต IAA ได้นั้นส่วนใหญ่จะอยู่ใน Genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* และ *Enterobacter* (Madhuri and Sahasrabudhe, 2011; Pathma *et al*., 2011; Wahyudi *et al*., 2011;

Forni *et al*., 1992, Haahtela *et al*., 1990). โดยในงานวิจัยของ Jayakumar *et al*., (2013) พบแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Eisenia foetida* จำนวน 51 ไอโซเลท สามารถผลิต IAA ได้ในระดับ 1.50 ถึง 36.00 μg/ml แบคทีเรีย strain *B. subtilis* BVC53 ผลิต IAA ได้ในระดับ 36.00 μg/ml (Khare and Arora, 2010) และแบคทีเรีย 5 strains ที่คัดแยกได้จากดินในสวนลำไย ผลิต IAA ได้ในระดับ 11.4 ถึง 57.6 μg/ml (Srikanjana *et al*., 2014) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียใน strain *Pseudomonas* sp. TLC ผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 7.16 μg/ml (Kefeng Li and Wusirika Ramakrishna, 2011) และ Charin *et al*., (2011) พบ *Azospirillum* isolate S^{23} ผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 53.57 μg/ml และงานวิจัยของ Khin Mya Lwin *et al*., (2012) พบแบคทีเรีย strain R1 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 121.1 μg/ml ซึ่งในทางการเกษตรนั้นจะใช้ IAA ในระดับความเข้มข้นที่ 20 μg/ml ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และใช้ความเข้มข้น 50 μg/ml ในการทำกิ่งปักชำ ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากดินในแปลงเกษตร ใน Genus *Enterobacter* สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดในระดับ 119.83-131.99 μg/ml ซึ่งสูงกว่างานที่วิจัยที่เคยศึกษามาดังกล่าวข้างต้น จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีชีวภาพ และอายุการเก็บรักษา (Shelf life) ของมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx* sp.

ในการศึกษาอายุการเก็บรักษา (Shelf life) ที่ระยะเวลา 0 วัน 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน ต่อคุณภาพของมูลไส้เดือนดินและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน พบว่า ปุ๋ยมีคุณสมบัติในด้านความเป็นประโยชน์และปริมาณธาตุอาหารพืชเพิ่มสูงขึ้น แต่จำนวนจุลินทรีย์ และฮอร์โมนพืชลดต่ำลง โดยจากการวัดการย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยด้วยการทดสอบดัชนีการงอกของเมล็ด (Germination Index: GI) ในการทดลองนี้ พบว่า ค่า GI ที่วัดได้มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเก็บรักษาปุ๋ยนานขึ้น โดยในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินทั้งชนิดแห้งและชนิดเปียกเพิ่มเป็น 80 และ 88 จาก 55 และ64 เปอร์เซ็นต์ และลดต่ำลงในส่วนของตัวอย่างที่เป็นน้ำหมักมูลไส้เดือนดินเป็น 114 จาก 124 เปอร์เซ็นต์ (แต่ยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์คือไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80) ผลดังกล่าวแสดงถึงปุ๋ยปราศจากสารที่เป็นพิษและเป็นปุ๋ยที่มีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (Wei *et al*., 2000) ในส่วนของค่าสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N Ratio) มีค่าลดต่ำลงอยู่ในระดับ 5-11 เป็นค่าที่ปุ๋ยมีความเป็นประโยชน์ต่อพืชสูงขึ้น (มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์กำหนดให้ไม่เกิน 20:1) ส่วนปริมาณอินทรียวัตถุ (Organic Matter ,OM) เพิ่มสูงขึ้นเป็น 48 จาก 34 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความเป็นประโยชน์ของปุ๋ยต่อพืชเพิ่มสูงขึ้น ส่วนปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ (%Total N) เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อวิเคราะห์แยกรูปไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืช พบว่า ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียม (NH_4^+) ลดต่ำลง ส่วนไนโตรเจนในรูปไนเตรท (NO_3^-) เพิ่มสูงขึ้น (เกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชั่น (nitrification) ด้วยแบคทีเรียไนตริไฟอิงออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และไนเตรท) นอกจากนี้ในส่วนของปริมาณธาตุฟอสฟอรัส (%P_2O_5) และโพแทสเซียม (%K_2O) ก็พบว่าเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ในส่วนของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

(*Total plate count*) ในผลผลิตมูลไส้เดือนดินทั้งชนิดแห้ง ชนิดเปียก และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน พบว่าเก็บรักษาในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์สูงกว่าที่เก็บในอุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งจะมีปริมาณจุลินทรีย์ที่นับได้สูงกว่ามูลไส้เดือนดินชนิดเปียก และน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ตามลำดับ ในส่วนของระยะเวลาที่เก็บรักษานานขึ้นส่งผลให้จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างลดต่ำลง โดยมีอัตราการลดลงสูงมากในการเก็บรักษา 1 เดือนแรก และค่อนข้างคงที่ในการเก็บรักษาเดือนที่ 3 และเดือนที่ 6 โดยมูลไส้เดือนดินชนิดแห้งมีจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงได้ในเดือนแรกถึงเดือนที่ 6 เท่ากับ$10^7 \rightarrow 10^6$ cfu/mg. มูลไส้เดือนดินชนิดเปียก$10^7 \rightarrow 10^5$ cfu/mg. ในส่วนของตัวอย่างน้ำหมักมูลไส้เดือนดินพบการเปลี่ยนแปลงน้อยอยู่ในระดับ $10^5 \rightarrow 10^4$ cfu/mg.

ผลวิเคราะห์ฮอร์โมนในตัวอย่างมูลไส้เดือนและน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน 3 ชนิด คือ ออกซิน(free IAA), จิบเบอเรลลิน (free GA_3) และไซโตไคนิน (Cytokinins) พบว่า ระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้นส่งผลให้ฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มลดต่ำลงและลดต่ำลงมากที่สุดในระยะเวลาการเก็บที่ 6 เดือน และฮอร์โมนพืชที่วัดได้ในระหว่างชนิดปุ๋ยไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่เก็บรักษานาน 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน รวมถึงไม่พบความแตกต่างทางสถิติของระดับอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ต่างกัน 2 ระดับคืออุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยภาพรวมผลวิเคราะห์ที่ได้พบฮอร์โมนในปริมาณความเข้มข้นต่ำ โดยพบออกซินในตัวอย่างปุ๋ยทั้ง 3 ชนิดในระดับ 0.001-4.060 มิลลิกรัมต่อลิตร (พบสูงสุดในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกที่อายุเก็บรักษา 0 วัน) พบจิบเบอเรลลินในตัวอย่างปุ๋ยทั้ง 3 ชนิดในระดับ 0.001-1.580 มิลลิกรัมต่อลิตร (พบสูงสุดในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกที่อายุเก็บรักษา 0 วัน) และพบไซโตไคนินในตัวอย่างปุ๋ยทั้ง 3 ชนิดในระดับ 0.008-0.079 มิลลิกรัมต่อลิตร (พบสูงสุดในตัวอย่างมูลไส้เดือนดินชนิดเปียกที่อายุเก็บรักษา 1 เดือนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

1. งานวิจัยนี้ศึกษาพบว่า เทคนิค unculturable สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียในตัวอย่างลำไส้ไส้เดือนดิน มูลไส้เดือนดิน และน้ำหมักมูลไส้เดือนดินออกเป็น 3 Phylum 5 Class ในขณะที่เทคนิค culturable สามารถจำแนกออกเป็น 2 Phylum 2 Class แต่เทคนิค culturable สามารถจำแนกได้ถึงระดับ Genus และ Species และมีเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จริงสามารถทดสอบการใช้งานในประโยชน์ด้านต่างๆ ต่อไปได้ ในขณะที่เทคนิค unculturable ทำไม่ได้ในระดับเดียวกันนี้ ดังนั้นในการเลือกใช้เทคนิคใดจึงควรคำนึงถึงวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้งานเป็นหลัก

2. งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ไส้เดือนดิน จากมูลไส้เดือนดิน และจากน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน และทำการจำแนกชนิดแบคทีเรีย พบว่า กลุ่มประชากรหลักที่คัดแยกได้อยู่ในสกุล*Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* และ *Enterobacter* ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปทดสอบความสามารถในการผลิต IAA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter hormaechei* และ *Enterobacter* sp. ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Metaphire posthuma* จากพื้นที่เกษตรสามารถผลิต IAA ได้สูงกว่าที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) จากงานวิจัยที่ผ่านมา

รวมทั้งพบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในสกุล *Bacillus* หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ดี ซึ่งเชื้อที่มีประสิทธิภาพดังกล่าวข้างต้น 15 Strains โครงการได้นำฝากแบบเผยแพร่แก่สาธารณะ(For public access) ไว้ที่ Thailand Bioresource Research Center(TBRC) ซึ่งหน่วยงานหรือนักวิจัยสามารถทำเรื่องขอเชื้อไปใช้ประโยชน์หรือศึกษาวิจัยเพื่อให้ทราบประโยชน์และประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางยิ่งขึ้นต่อไปได้

3. งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรีย *B.cereus* และ *B.licheniformis* ซึ่งจากการตรวจเอกสารงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีความสามารถย่อยสารอินทรีย์ได้ดี ซึ่งจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตปุ๋ยหมัก น้ำหมัก หรือ ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อน้ำเสีย และบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมถึงพบว่ามีเชื้อ *Bacillus* บางชนิดที่คัดแยกได้สามารถควบคุมเชื้อไวรัสก่อโรคเรืองแสงในบ่อกุ้งได้ สมควรที่จะได้มีการศึกษาวิจัยต่อยอดการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ต่อไปในงานต่างๆดังกล่าวนี้

4. จากการทดสอบ Shelf life ของผลิตภัณฑ์มูลไส้เดือนดินในงานวิจัยนี้ พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์มูลไส้เดือนดินไว้นาน 3- 12 เดือน ในอุณหภูมิห้อง ค่าฟอสฟอรัส (P) และ โพแทสเซียม (K) จะเพิ่มสูงขึ้นกว่าเมื่อเริ่มแรก 150% ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเป็นผลจากการทำงานของ *Bacillus* ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในมูลไส้เดือนดินซึ่งหลายชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตส ช่วยย่อยปลดปล่อยธาตุฟอสฟอรัสออกมาอยู่ในรูปที่เป็นประโยชนต่อพืช ดังนั้นฟาร์มเลี้ยงไส้เดือนดิน หรือสถานประกอบการต่างๆที่จำหน่ายปุ๋ยอินทรีย์ หรือมูลไส้เดือนดิน สามารถนำวิธีการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์มูลไส้เดือนดินดังกล่าวไปใช้เพื่อเพิ่มคุณค่าธาตุอาหารพืชในผลิตภัณฑ์ หรือใช้องค์ความรู้นี้เผยแพร่ให้กับลูกค้าหรือเกษตรกรได้ทราบต่อไปเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการใช้ผลิตภัณฑ์มูลไส้เดือนดินในการส่งเสริมการออกดอก ติดผล และการออกรากของพืชในกลุ่มต่างๆต่อไป

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร. 2546. **ฮอร์โมนพืชและธาตุอาหารพืชในน้ำหมักชีวภาพ**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

กรวิกา บุญมาวรรณ. 2549. **การศึกษาคุณภาพปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและมูลสัตว์ชนิดต่าง ๆ ของไส้เดือนดินสายพันธุ์** ***Pheretima peguana***. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ชาญณรงค์ รอดคำ. 2558. **การจัดหมวดหมู่เชื้อแบคทีเรีย**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541. **การแยกเชื้อบริสุทธิ์ และ ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

นิรันดร์ หิรัญสุข. 2547. **ศักยภาพจากไส้เดือนดินสายพันธุ์** ***Pheretima peguana*** **ในการย่อยสลายขยะอินทรีย์และการผลิตปุ๋ยหมักในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

นิรนาม. 2556. **ฐานข้อมูล eztaxon-e**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/ezt_identify (24 ตุลาคม 2556)

บพิธ จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์. 2538. **สัตววิทยา**. กรุงเทพฯ: รุ่งวัฒนาการพิมพ์.

ศรีกาญจนา คล้าเรือง, ฐปน ชื่นบาล, ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และ นลิน วงศ์ขัตติยะ. 2557. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียรีดิวส์คลอเรตเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตร. น. 59-62. ใน **รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ปี พ.ศ. 2555**. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ศรีสุดา ธรรมวิชุกร. 2548. การวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม โดยใช้ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR-DGGE. **LAB. TODAY**, 4(23), 29-33.

สุมา หนูแก้ว. 2549. **การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพและปริมาณของปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินที่ได้จากการย่อยสลายขยะอินทรีย์ชนิดต่างๆ ของไส้เดือนดินกำจัดขยะที่เป็นการค้าในระบบผลิตพืช**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สุนทรี ยิ่งชัชวาลย์. 2554. **ใช้อินทรียวัตถุให้ถูกประเภท.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.cab.ku.ac.th/suntaree/pdf/54OrganiMatterExplain.pdf (6 ตุลาคม 2557)

สุลีรัก อารักษณ์ธรรม และ อานัฐ ตันโช. 2553. การประยุกต์ใช้ไส้เดือนดินท้องถิ่นเพื่อปรับปรุงสมบัติทางกายภาพและความอุดมสมบูรณ์ของดิน. น. 79. ใน **ผลงานวิจัยของมูลนิธิโครงการหลวงประจำปี 2553**. เชียงใหม่: มูลนิธิโครงการหลวง.

อานัฐ ตันโช. 2543. การทำปุ๋ยจากขยะโดยใช้ไส้เดือนดิน. **วารสารแม่โจ้ปริทัศน์**. 1(6), 98-102.

_____. 2550. **ไส้เดือนดิน**. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ทรีโอ แอดเวอร์ไทซิ่ง แอนด์ มีเดีย.

_____ . 2551. การทดสอบหาไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อเลี้ยงร่วมกับการปลูกพืชในแปลงปลูกเกษตรกรเพื่อปรับปรุงโครงสร้างและเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินในพื้นที่การเกษตรบนที่สูงอย่างยั่งยืน. น.110-116 ใน **รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ประจำปี 2551**. เชียงใหม่: มูลนิธิโครงการหลวง.

_____. 2553. **คู่มือการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินจากขยะอินทรีย์**. พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่: ทรีโอแอดเวอร์ไทซิ่ง แอนด์ มีเดีย.

อานัฐ ตันโช และสุลีรัก อารักษณ์ธรรม. 2553. การใช้ไส้เดือนดินท้องถิ่นไทยปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน. น. 37-38. ใน **รายงานผลงานวิจัยปี 2553**. เชียงใหม่: มูลนิธิโครงการหลวง.

Aira, M. & Domínguez, J. 2009. Microbial and nutrient stabilization of two animal manures after the transit through the gut of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny,1826). **J Hazard Mater**, 161, 1234-1238.

Aira, M., Monroy, F. & Dom´ınguez, J. 2005. Ageing effects on nitrogen dynamics and enzyme activities in casts of *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). **Pedobiologia**, 49, 467-473.

Aira, M., Monroy, F. & Dom´ınguez, J. 2003. Effects of two species of earthworms (Allolobophora sp.) on soil systems: a microfaunal and biochemical analysis. **Pedobiologia**, 47, 877–881.

Biswarup, S. & Chandra, T.S. 2009. Do earthworms affect dynamics of functional response and genetic structure of microbial community in a lab-scale composting system. **Bioresource Technology**, 100, 804-811

Byzov, B. A., Nechitaylo, T., Bumazhkin Yu, B.K., Kurakov, A.V., Golyshin, N. & Zvyagintsev, D.G. 2009. Culturable Microorganisms from the Earthworm Digestive Tract. **Microbiology**, 78, 360-368.

Byzov B.A., N.V. Khomyakov, S.A. Kharin and A.V. Kurakov. 2007. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. **European Journal of Soil Biology**, 43: 146-156.

Chandra R., Kumar, N. & Tyagi, A.K. 2007. Nutrient dynamics and decomposition rates during composting of sulphitation pressmud by different methods. **J Environ Sci Eng**, 49(3), 183-188.

Dwipendra T., Schmidt, O. Finan, D., Egan D. & Doohan, F. M. 2010. Gut wall bacteria of earthworms: a natural selection process. **The ISME Journal**, 4: 357-366

Edwards, C. A. 1985. Production of feed protein from animal wastes by earthworms. **Phil. Trans. Roy.Soc**, 310, 299-307.

Edwards C. A. & Burrows, I. 1988. **The potential of earthworm composts as plant growth media, in Earthworms in Environmental and Waste Management.** Netherlands: SPB Acad. Publishers.

C. A., Bohlen, P. J., Linden D. R. & Subler, S. 1995. **Earthworms in agroecosystems, in Earthworm Ecology and Biogeography in North America. P. F. Hendrix (Ed.).** Florida: Lewis Publishers.

Edwards, C. A. & Bohlen, P. J. 1996. **Biology and ecology of earthworm**. 3rd ed. London: Chapman and Hall.

Franken, B. T. & Poth, M. 1988. L-Tryptophan transaminase of a bacterium isolated from the rhizosphere of Festuca octofrora (Gramineae). **Soil Biology and Biochemistry**, 20, 299-304.

Garg, V. K. & Kaushik, P. 2005. Vermistabilization of textile mill sludge spiked with poultry droppings by an epigeic earthworm Eisenia foetida. **Bioresour Technol**, 96(9), 1063-1071.

Gerardi, H. M. 2006. **Wastewater Bacteria**. USA: A john willey & sons inc.

Gordon, S. A. & Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indole-acetic acid. **Plant Physiology**, 26, 192-195.

Graff, O. & Makeschin, F. 1980. Beeinflussung des Ertrags von Weidelgras (Lolium multiflormu) durch Ausscheidungen von Regenwurmern dreier verschiedener Arten. **Pedobiologia**, 20, 176-80.

Gupta, R. & Garg, V. K. 2008. Stabilization of primary sewage sludge during vermicomposting. **J Hazard Mater,** 153(3), 1023-1030.

Huang, K., Li, F., Wei, Y. Chen, X. & Fu, X. 2013. Changes of bacterial and fungal community compositions during vermicomposting of vegetable wastes by *Eisenia foetida*. **Bioresour Technol**, 150, 235-241.

Hyun, J. K., Kwang H. S., Chang, J. C., & Hor, G. H. 2004. Analysis of Aerobic and Culturable Bacterial Community Structures in Earthworm (*Eisenia fetida*) Intestine. **Agric Chem Biotechnol,** 47(3), 137-142.

Idowu, A. B., Edema, M. O. & Adeyi, A. O. 2006. Distribution of bacteria and fungi in the earthworm *Libyodrillus violaceous* (Annelida: Oligochaeta), a native earthworm from Nigeria. **Revista de biologia tropical**, 54, 49-58.

Jader, G. B., Livia, S. L., Natalia, O. A., Luciano, P. C. & Fabio, L. O. 2012. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. **Bioresource Technology**, 110, 390-395.

Jayakumar, P. & Natarajan, S. 2013. Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. **Applied Soil Ecology**, 70, 33-47.

Jens, C. P. & Niels, B. H. 1993. Effect of passage through the intestinal tract of detritivore earthworms (*Lumbricus* spp.) on the number of selected Gram-negative nd total bacteria. **Biol Fertil Soils**, 16, 227-232.

Jim, F., Graham, H. & Andrew, M. H. 2007. Effect of pre-composting and vermicomposting on compost characteristics. **European Journal of Soil Biology,** 43, 320-326.

Jing, L., Zhibo, L., Jie, Z., Meiyan, X. & Jian, Y. 2013. Phylogenetic characterization of microbial communities in a full-scalevermifilter treating rural domestic sewage. **Ecological Engineering**, 61, 100-109.

Joong, K. K., Van, T. D., In, S. K. & Hyung, H. L. 2010. Identification and characterization of microorganisms from earthworm viscera for the conversion of fish wastes into liquid fertilizer. **Bioresource Technology**, 101, 5131-5136.

Kale, R. D., Bano, K. & Krishnamoorthy, R. V. 1982. Potetial of Perionyx excavatus for utilizing organic wastes. **Pedobiologia**, 23, 419-425.

Kaushik, P. & Garg, V. K. 2003. Vermicomposting of mixed solid textile mill sludge and cow dung with the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. **Bioresour Technol**, 90(3), 311-316.

Knapp, B.A., Podmirseg, S. M., Seeber, J., Meyer, E. & Insam, H. 2009. Diet-related composition of the gut microbiota of *Lumbricus rubellus* as revealed by a molecular fingerprinting technique and cloning. **Soil Biology and Biochemistry**, 41, 2299-2307.

Loreno, O. C., Lopez, R. L. & Espinosa, V. D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramineas: Una revision. **Terra Latinoamericana**, 22, 225-239.

Lunt, H. A. & Jacobson, G. M. 1944. The chemical composition of earthworm casts. **Soil Sci**, 58, 367.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, D.P. 2009. **Brock Biology of Microorganisms**. 12th ed. San Francisco: Pearson Education Inc.

Madsen, E. L. & Alexander, M. 1982. Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. **Soil Sci Soc Am J**, 46, 557-560.

Marı´a Go,´B., Cristina, L., Marta, L. & Domı´nguez, J. 2010. Detritivorous earthworms modify microbial community structure and accelerate plant residue decomposition. **Applied Soil Ecology**, 44, 237-244.

Martínez, R. E. 2001. Poblaciones de Rhizobia nativas de Mexico. **Acta Zool. Mex.** 1, 29-38.

Muyzer, G., Ellen, C. D. W. & Andree, G. U. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 59(3), 695-700.

Nakamura, K. & Sakai, K. 2011. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of gut bacterial community for the Japanese earthworms. **Soil Science and Plant Nutrition**, 57, 519-552.

Neuhauser, E. F., Loehr, R. C. & Malecki, M. R. 1988. **The potential of earthworms for managing sewage sludge, in Earthworms and Waste Management, (ed. Edwards C. A. and Neuhauser E. F.)**. Nerherlands: SPB Acad.

Parle, H. K. & Patel, R. M. 1959. Preliminary observations on the control of earthworms by soapdust (Sapindus laurifolius Vahl) extract. **Indian J. Ent**, 21, 251-255.

Pramanik, P., Ghosh, G. K., Ghosal, P.K. & Banik, P. 2007. Changes in organic - C, N, P and K and enzyme activities in vermicompost of biodegradable organic wastes under liming and microbial inoculants. **Bioresource Technology**, 98, 2485-2494

Quinn, P.J. Carter, M.E., Markey, B.K. & Carter, G.R. 1994. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe

Reasoner, D. J., Blannon, J. C. & Geldreich, E. E. 1979. Rapid seven-hour fecal coliform test. **Appl. Environ Microbiol**, 38(2), 229–36.

Reddell, P. & Spain, A. V. 1991. Transmission of infective Frankia (Actinomycetales) propagules in casts of the endogenic earthworm *Pontoscolex cordthrurus* (Oligochaeta: Glossoscolecidae). **Soil Biol. Biochem**, 23, 775-778.

Rola, M. A., Dominguez, J., Subler, S. & Edwards, C. A. 2002. Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouch) and the effects on seedling growth. **Pedobiologia**, 44, 709-724.

Rouelle, J. 1983. **Introduction of an amoeba and *Rhizobium japonicum* into the gut of *Eisenia fetida* (Sav.) and *Lumbrucus terrestris* L., in Earthworm Ecology, From Darwin to Vermiculture.** New York: Chapman & Hall.

Rhee, J. A. van. 1971. Some aspects of the productivity of orchards in relation to earthworm activities. **Ann Zool. Ecol. Anim.**, 4, 99-108.

Sangwan, P., Kaushik, C. P. & Garg, V. K. 2008. Vermiconversion of industrial sludge for recycling the nutrients. **Bioresour Technol**, 99(18), 8699-8704.

Singleton, D.R., Hendrix, P.F., Coleman, D.C. & Whitman, W.B. 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae: Oligochaeta). **Soil Biol. Biochem**, 35, 1547-1555.

Springett, J. A. & Syers, J. K. 1979. The effect of earthworm casts on ryegrass Seedlings. pp. 44-77. In **Proceedings of the 2nd Australasian conference on grassland invertebrate ecology.** Wellington: Government Printer.

Sung, W. H., Ju, S. L., & Kun, S. C. 2011. Effect of enzyme producing microorganisms on the biomass of epigeic earthworms (*Eisenia fetida*) in vermicompost. **Bioresource Technology**, 102, 6344–6347.

Tomati, U., Grappellli, A. & Galli, E. 1983. Fertility factors in earthworm humus. pp. 49-56. In **Proceedings of International Symposium On Agricultural and Environmental Prospects in Earthworm Farming**. Rome: Minist. Ric. Sci. Tech.

Valle, M. R., Borges, S. & Rios, V. C. 2007. Characterization of possible symbionts in \Onychochaeta borincana (Annelida:Glossoscolecidae). **European Journal of Soil Biology**, 43, 4-18.

Van der Linde, K., Lim, B. T., Rondeel, J. M., Antonissen, L. P. & de Jong, G. M. 1999. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 14(10), 2433-2437.

Viljoen, S. A. & Reinecke, A. J. 1992. The temperature requirements of the epigeic earthworm species *Endrilus eugeniae* (Oligochaeta)-a laboratory study. **Soil Biol. Biochem,** 24, 1345-1350.

Walker, S. M. & Sesing, J. 1990. Temperature effects on embryonic abscisic acid levels during development of wheat grain dormancy. **J Plant Growth Regul**, 9, 51-56.

Wei, Y.S., Fan, Y.B., Wang, M.J. & Wang, J.S. 2000. Composting and compost application in China. **Resource Conservation and Recycling**, 30, 277-300.

Winding, A., Rohn, R. & Hendriksen, N.B. 1997. Bacteria and protozoa in soil microhabitats as affected by earthworms. **Biol Fertil Soils**, 24, 133-140.

Yadav, A. & Garg, V. K. 2009. Feasibility of nutrient recovery from industrial sludge by vermicomposting technology. **J Hazard Mater**, 168(1), 262-268.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin Soil ยี่ห้อ MACHEREY-NAGEL, Germany

1. ใส่ตัวอย่างลงใน Bead tube 250-500 mg. เติม SL1 หรือ SL2 700 ul.
2. เติม Enhancer SX 150 ul.
3. นำไป Vortex 5 นาที เพื่อทำการย่อยผนังเซลล์
4. นำไป Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
5. เติม SL3 150 ul. และนำไป Vortex 5 นาที
6. นำไปเก็บไว้ที่ 0-4 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไป Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
7. ใส่ column (red ring) ลงใน collection tube (มีฝา)
8. เทส่วนใสลงใน column (red ring)
9. นำไป Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
10. ทิ้ง column (red ring)
11. เติม SB 250 ul. ลงใน collection tube (มีฝา) และนำไป Vortex 5 นาที
12. ใส่ column ใหม่ (green ring) ลงใน collection tube (ไม่มีฝา)
13. ใช้ปิเปตดูดสารละลายจาก collection tube (มีฝา) 550 ul. ใส่ลงใน column ใหม่ (green ring)
14. นำไป Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดตัวอย่างที่เหลือใน collection tube (มีฝา) ใส่ลงใน column (green ring) จนหมด และ Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง
15. เทส่วนใสทิ้ง และเติม SB 500 ul และนำไป Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
16. เทส่วนใสทิ้ง และเติม SW1 550 ul และนำไป Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที

17. เทส่วนใสทิ้ง และเติม SW2 700 ul นำไป Vortex 2 วินาที และ Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
18. เทส่วนใสทิ้ง และเติม SW2 700 ul นำไป Vortex 2 วินาที และ Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
19. เทส่วนใสทิ้งและ Centrifuge 11,000 rpm อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที
20. ย้าย column (green ring) ใส่ลงใน eppendorf ใหม่
21. เติม SE (Elution buffer) 30-100 ul. และนำไป Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

การตรวจสอบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ หรือ PCR product ด้วยวิธี Gel electrophoresis

1. นำ 1.5% agarose gel 30 ml ไปหลอมด้วยไมโครเวฟ
2. ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 50°C
3. ใส่ gel star 1 ul./10 ml.
4. เทเจลลงในแม่พิมพ์และเสียบหวี (comb) ลงไป เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับยอดตัวอย่าง
5. รอให้เจลแข็งโดยนำไปบ่มไว้ในที่มืด
6. เมื่อเจลแข็งให้ค่อยๆดึงหวีออก แล้วนำแผ่นเจลไปวางไว้ในเครื่อง electrophoresis
7. เติม 1X TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล นำ marker และตัวอย่างมาหยอดลงในแต่ละช่อง ดังนี้

   สำหรับ marker : marker 1 ul. + 1X TAE buffer 4 ul. + loading dye 2 ul.

   สำหรับตัวอย่าง : ตัวอย่าง DNA 2 ul. + loading dye 2 ul.
8. ปิดฝาเครื่อง electrophoresis โดยตั้งค่าไว้ที่ 100V เคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก
9. ทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาที จากนั้นปิดเครื่อง electrophoresis
10. นำแผ่นเจลไปวางไว้บนเครื่อง Transilluminator เพื่อตรวจสอบจีโนมิกส์หรือแถบดีเอ็นเอ

สูตรการเตรียม 1.5 % Agarose gel

Agarose gel	1.5	g
1X TAE buffer	100	ml
Gel star	1 ul/10 ml	

ส่วนผสมในการทำ PCR ต่อ 1 ปฏิกิริยา

Quick Taq	25	ul
Primer I 341F-GC	1	ul
Primer II 518R	1	ul
dH_2O	22	ul
DNA template	1	ul

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR

Denaturation	95 °C	5 นาที
Denaturation	94 °C	1 นาที
Annealing	65 °C	45 วินาที (ลด 0.5 °C ทุกๆ Cycle)
Extension	72 °C	1 นาที
	(24 Cycles)	
Denaturation	94 °C	1 นาที
Annealing	55 °C	45 วินาที
Extension	72 °C	1 นาที
	(15 Cycles)	
Final Extension	72 °C	10 นาที

สูตรการเตรียม 10% Acrylamide gel สำหรับการทำ DGGE

การเตรียม Denaturing solution (ต่อ 20 ml.)

สารเคมี	ความเข้มข้น 30%	ความเข้มข้น 50%
Urea	2.52 g	4.20 g
40% Acrylamide	4.0 ml	4.0 ml
Formamide	2.4 ml	4.0 ml
50X TAE buffer	0.4 ml	0.4 ml
dH_2O	to 20.0 ml	to 20.0 ml

การเตรียม 10% Acrylamide gel

สารเคมี	ความเข้มข้น 30%	ความเข้มข้น 50%
Denaturing solution	15 ml	15 ml
APS	180 ul	180 ul
TEMED	15 ul	15 ul
Loading dye	150 ul	-

การทำ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

1. ใช้กระดาษทิชชู (ชนิดไม่เป็นขุย) เช็ดทำความสะอาด glass plates, spacers และ combs ด้วย isopropanol
2. ทำการประกอบ glass plates และ spacers เข้าด้วยกันโดยใช้น้ำมันปิโตรเลียมทาบริเวณที่ประกบ (เพื่อป้องกันการเกิดช่องว่างและการรั่วขณะเตรียมเจล) จากนั้นนำไปประกอบกับ plate clamps (ทำสองชุด) และนำไปประกอบ บน gel casters
3. เตรียมสารละลาย denaturing solution ความเข้มข้น 30% และ 50% เพื่อทำการเตรียม 10% Acrylamide gel โดยทำการโหลดเจลลงใน gel caster ซึ่งเจลมีลักษณะเป็น gradient gel โดยมีความเข้มข้นด้านบนต่ำและด้านล่างสูงตามลำดับ จากนั้นเสียบ comb และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว
4. เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว ถอดชุดประกอบออกจาก gel casters ค่อยๆ ดึง comb ออกจากเจลและนำชุดประกอบไปประกอบกับ casting stands

5. ทำการปรับอุณหภูมิ 1X TAE buffer ใน DGGE tank ให้เป็น 70 °C เป็นเวลา2 ชั่วโมง จากนั้นนำชุดประกอบ ใส่ลงไปใน DGGE tank
6. เตรียมตัวอย่างเพื่อหยอดลงในช่องว่างบนเจล โดยใช้ตัวอย่าง PCR product 11 ul. ผสมกับ loading dye 11 ul.
7. ทำการหยอดตัวอย่างลงในช่องว่างบนเจล โดยใช้ DGGE tip (tip ปลายยาว) จากนั้นทำการตั้งค่าเครื่องโดยปรับอุณหภูมิบัฟเฟอร์ ให้เป็น 60 °C จากนั้นทำการรัน โดยใช้กระแสไฟฟ้า 65 V และเวลา 840 นาที

การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ โดยใช้ ชุดทำให้ DNA บริสุทธิ์ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit ยี่ห้อ RBC Bioscience

1. นำ PCR product ที่ได้ใส่ลงไปใน eppendorf ประมาณ 300 mg (PCR product ทั้งหมด)
2. เติม DF buffer 500 ul.
3. นำไป Vortex
4. บ่มที่ 55°C เป็นเวลา 10-15 นาที กลับหลอดไปมาทุก 2-3 นาที
5. เอา DF column ใส่ลงใน collection tube
6. นำตัวอย่างใส่ลงใน DF column
7. Centrifuge 11,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
8. เทของเหลวทิ้ง
9. เติม wash buffer 500 ul
10. Centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที และเทของเหลวทิ้ง
11. Centrifuge 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
12. ย้าย DF column ใส่ลงใน eppendorf ใหม่
13. เติม elution buffer 30 ul. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
14. Centrifuge เต็ม speed เป็นเวลา 2 นาที
15. เก็บ purified DNA ที่ได้ ไปทำการรัน Gel electrophoresis และส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส ต่อไป

ภาคผนวก ข

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุลีรัก อารักษณ์ธรรม	
เกิดเมื่อ	6 ตุลาคม 2524	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2550	วท.ม. สาขาปฐพีศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัด เชียงใหม่
	พ.ศ. 2546	วท.บ. สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ.2543	มัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทย์-คณิต) โรงเรียนสามัคคีวิทยาคม จังหวัดเชียงราย
ประวัติการทำงาน	พ.ศ.2554-ปัจจุบัน	นักวิจัย สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาไส้เดือนดิน มหาวิทยาลัยแม่โจ้
	พ.ศ 2547-2553	ผู้ช่วยนักวิจัย โครงการกองทุนปุ๋ยอินทรีย์และไฮโดรโพนิคส์ มูลนิธิโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่
อีเมล	atiptara@yahoo.com	