รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเลในน้ำหมักชีวภาพ สำหรับกิจกรรมที่ใช้น้ำทะเล

Potential of marine microorganism in effective microorganism solution for marine activity

พัฒนา ภูลเปี่ยม

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 159039
สัญญาเลขที่ 154/2557

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเลในน้ำหมักชีวภาพ สำหรับกิจกรรมที่ใช้น้ำทะเล

Potential of marine microorganism in effective microorganism solution for marine activity

พัฒนา ภูลเปี่ยม
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๘

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 154/2557 ได้รับความอนุเคราะห์หัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทำน้ำหมักชีวภาพในสภาพน้ำจืดจากบริษัท อี เอ็ม คิวเซ จำกัด ผู้ทำการวิจัยใคร่ขอขอบคุณเป็นอย่างมากไว้ ณ โอกาสนี้ และเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านที่มีส่วนช่วยทำให้งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเลในน้ำหมักชีวภาพสำหรับกิจกรรมที่ใช้น้ำทะเล

พัฒนา ภูลเปี่ยม
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน จังหวัดชลบุรี 20131

บทคัดย่อ

คัดแยกแบคทีเรียน้ำเค็มจำนวน 5 สายพันธุ์ จากดินตะกอนบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา สามารถเจริญได้ในสารละลายกากน้ำตาล ไม่เจริญบนอาหาร TCBS agar และสามารถย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองได้ เมื่อเติมแบคทีเรียที่คัดแยกได้ลงในสารละลายกากน้ำตาล ในช่วงแรกความหนาแน่นของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และเริ่มคงตัวช่วงสัปดาห์ที่ 10-19 เท่ากับ $1.74x10^{6}$-$1.81x10^{6}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร พบกรดแลคติกเข้มข้นระหว่าง 5-34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า pH เท่ากับ 4.7 เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 25 ผลิตแก๊สในช่วงสัปดาห์ที่ 2-12 ของการทดลอง เมื่อเติมน้ำหมักชีวภาพที่มีอายุการหมัก 9 สัปดาห์ 1 ต่อ 10 ส่วน ลงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เริ่มพบการย่อยสลายของน้ำมันถั่วเหลืองที่เวลา 24 ชั่วโมง และย่อยละลายหมดใน 11 วันของทดลอง

คำสำคัญ : น้ำหมักชีวภาพ, ปุ๋ยชีวภาพ, แบคทีเรียน้ำเค็ม

Potential of marine microorganism in effective microorganism solution for marine activity

Pattana POONPIUM
Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131

Abstract

Selection of the marine bacteria 5 strain from Ang Sila jetty sediment, That were grow in molasses solution, non-grow on TCBS agar and soybean oil digestion. When add selective bacteria into molasses solution. Bacterial density increased in the Initial phase and steady phase at 10-19 were $1.74x10^{6}$-$1.81x10^{6}$ CFU/mL Lactic acid concentration were 5-34 mg/mL. pH were 4.7 at end of treatment in 25 weeks. Gas produced at 2-12 week of treatment. Add the 9 weeks effective microorganism solution 1/10 to Yeast extract-peptone broth combine with soybean oil. Incubate at 35 °C 20 rpm by shaker. Soybean oil were initial digestion at 24 hours and completely digestion in 11 days of treatment.

Keywords: effective microorganism solution, Biofertilizer, Marine bacteria

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	
บทคัดย่อภาษาไทย	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญรูป	(3)
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	4
วิธีดำเนินการวิจัย	15
ผลและวิจารณ์ผล	18
สรุปผล	47
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก	51
ประวัติผู้วิจัย	55

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากชายฝั่งทะเลปากคลองตำหรุ 21
1.2 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแครง 22
1.3 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา 22
1.4 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแมงภู่ 23
1.5 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณแหลมแท่น 24
1.6 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณสะพานปลาหาดวอนนภา 25
1.7 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น 26
1.8 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากชายฝั่งทะเลชุมชนบางพระ 27
1.9 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินโดยรอบเกาะลอยศรีราชา 28
1.10 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากป่าชายเลนชุมชนบ้านแหลมฉบัง 29
1.11 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณโบสถ์กลางน้ำ
วัดจิตตภาวันวิทยาลัย 29
1.12 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งพัทยาเหนือ 30
1.13 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งพัทยากลาง 31
1.14 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งพัทยาใต้ 32
1.15 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งนาจอมเทียน 33
2.1 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา 34
2.2 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากบริเวณแหลมแท่น 34
2.3 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น 35
3.1 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา 36
3.2 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากบริเวณแหลมแท่น 36
3.3 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น 36

ตารางผนวกที่ **หน้า**

1 ความหนาแน่นของแบคทีเรียในน้ำหมักชีวภาพ 53
2 ปริมาณกรดแลคติกและค่า pH ของน้ำหมักชีวภาพ 54

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะโคโลนีของ ท.1	38
1.2	ลักษณะโคโลนีของ ท.2	38
1.3	ลักษณะโคโลนีของ ท.3	38
1.4	ลักษณะโคโลนีของ ท.4	38
2.1	ลักษณะโคโลนีของ อ.1	39
2.2	ลักษณะโคโลนีของ อ.2	39
2.3	ลักษณะโคโลนีของ อ.3	39
2.4	ลักษณะโคโลนีของ อ.4	39
2.5	ลักษณะโคโลนีของ อ.5	39
3.1	ลักษณะโคโลนีของ ม.1	40
3.2	ลักษณะโคโลนีของ ม.2	40
3.3	ลักษณะโคโลนีของ ม.3	40
3.4	ลักษณะโคโลนีของ ม.4	40
3.5	ลักษณะโคโลนีของ ม.5	40
3.6	ลักษณะโคโลนีของ ม.6	40
4	ลักษณะการย่อยสลายของชั้นน้ำมันถั่วเหลือง	41
5	ความหนาแน่นของแบคทีเรียในน้ำหมัก	43
6	ค่า pH และปริมาณกรดแลคติกของน้ำหมักชีวภาพ	44
7	หัวเชื้อน้ำหมักชีวภาพสำหรับการหมักในสภาพน้ำจืด	45
8	น้ำหมักชีวภาพที่เริ่มต้นด้วยแบคทีเรียจากตะกอนดินสะพานปลาอ่างศิลา	46

ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเลในน้ำหมักชีวภาพสำหรับกิจกรรมที่ใช้น้ำทะเล

Potential of marine microorganism
in effective microorganism solution for marine activity

บทนำ

ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และอ่าวไทยตอนบนเป็นบริเวณที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นภูมิภาคที่มีความงดงามทางธรรมชาติที่เหมาะสมสำหรับเป็นแหล่งท่องเที่ยวพักผ่อนหย่อนใจ และเป็นบริเวณที่อยู่ในแผนพัฒนาพื้นที่ชายฝั่งให้เป็นฐานเศรษฐกิจทางด้านอุตสาหกรรมแห่งใหม่ตามแผนพัฒนาประเทศมาตั้งแต่ต้นปี พ.ศ.2524 (สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, 2537) ปัจจุบันพบว่าสภาพโดยรวมทางระบบนิเวศของอ่าวไทยตอนบน และชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก มีสภาพเลื่อมโทรมลงอย่างมาก ประสบกับปัญหามลภาวะบริเวณชายฝั่ง อันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม จากโรงแรม จากแหล่งชุมชนขนาดใหญ่ จำนวนมากที่ตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งทะเล และอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งตั้งแต่ชายฝั่ง ในการใช้น้ำทะเลและปล่อยน้ำทิ้งที่มีปริมาณของเสียปะปนอยู่กลับสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่สามารถปฏิเสธได้ว่าไม่มีส่วนในการทำลายคุณภาพน้ำทะเลและระบบนิเวศบริเวณชายฝั่งทะเล นอกจากมาตรการควบคุมและป้องกันในด้านต่างๆ อาจไม่เพียงพอ จำเป็นอย่างยิ่งที่ควรจะมีมาตรการหรือวิธีการเพื่อฟื้นฟูสภาพของระบบนิเวศบริเวณชายฝั่งทะเล วิธีการทางชีวภาพในปัจจุบันได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมาใช้ในการแก้ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากใช้ความรู้พื้นฐานแบบง่ายๆ ต้นทุนต่ำ อุปกรณ์หาได้ไม่ยาก วิธีการและขั้นตอนกระทำได้ง่ายไม่ยุ่งยากซับซ้อน หนึ่งในวิธีการด้านชีวภาพที่เป็นที่ยอมรับว่าใช้กันมานานตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และกำลังได้รับความนิยมนำมาใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ น้ำหมักชีวภาพ หรือน้ำ EM (Effective Microorganisms) เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการใช้สารเคมีซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้วัสดุหรือผลผลิตจากธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมีซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตลงได้อีกทางหนึ่งด้วย ผลผลิตที่ได้จากการผลิตมีความปลอดภัยต่อผู้ผลิตเอง และส่งผลต่อผู้บริโภคให้มีความปลอดภัยจากการใช้หรือบริโภคผลผลิตต่างๆ มากขึ้นด้วย ส่งเสริมให้เกิดความสมดุลของระบบนิเวศ ส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อม

น้ำหมักชีวภาพ หมายถึง ของเหลวที่ได้จากการหมักชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ต้น ใบ ดอก และผล หรือชิ้นส่วนของสัตว์ ในสภาวะไม่มีอากาศ โดยมีน้ำตาลหรือกากน้ำตาล (โมลาส) เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้กระบวนการหมักเกิดได้เร็วขึ้น สังเกตได้จากฟองอากาศเกิดขึ้นขณะทำการหมัก ของเหลวที่ได้สามารถเรียกต่างๆ กัน เช่น น้ำหมักชีวภาพ ปุ๋ยน้ำชีวภาพ น้ำสกัดชีวภาพ น้ำเอนไซม์ น้ำจุลินทรีย์ น้ำหมักพืช เป็นต้น (ชีววิถี, 2551) หรือเรียกตามวัตถุดิบที่นำมาใช้ เช่นใช้ผลมะกรูดในการหมักก็เรียกน้ำหมักมะกรูดชีวภาพ เป็นต้น โดยจะลงท้ายด้วยคำว่าชีวภาพหรือมีคำว่า

ชีวภาพเป็นส่วนประกอบอยู่ในชื่อที่เรียก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายมาก โดยอาจนำมากล่าวเพียงบางส่วน เช่น เป็นปุ๋ยน้ำ ใช้กำจัดศัตรูพืช ใช้ฟื้นฟูสภาพดินและบำบัดน้ำเสีย ใช้ฉีดพ่นในฟาร์ม และในบริเวณต่างๆ ที่มีการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายของสัตว์ที่เลี้ยง ฉีดพ่นภายในครัวเรือน สถานประกอบการร้านอาหาร โรงเรียน เพื่อขจัดกลิ่นเหม็นที่เกิดขึ้นจากการสะสมและเน่าเหม็นของเศษอาหารและขยะมูลฝอย ผสมอาหารสัตว์เพื่อใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำหมักช่วยให้ระบบการย่อยอาหารของสัตว์ที่เลี้ยงเกิดได้ดีมากขึ้น ใช้ในระบบการเลี้ยงสัตว์ใหญ่และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ ใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตสบู่เหลว น้ำยาสระผม น้ำยาทำความสะอาดพื้นผิวห้องน้ำและสุขภัณฑ์ (ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2550) หรือแม้แต่ใช้ในแง่ของยาสมุนไพรสำหรับรักษาโรคต่างๆ

จากคุณประโยชน์ของน้ำหมักชีวภาพดังกล่าวข้างต้น สามารถนำมาใช้ในการฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมได้เป็นอย่างดี ทำให้ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง แต่ถ้าหากคำนึงถึงกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการใช้น้ำทะเล และสภาวะแวดล้อมของชายฝั่งและทะเลโดยรวม เพื่อลดการใช้สารเคมีที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของชายฝั่งทะเล ยังถือว่าไม่ตรงลักษณะการใช้งานและมีความแตกต่างกันอย่างมาก เนื่องจากน้ำหมักชีวภาพที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นการหมักในสภาวะน้ำจืด จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่เจริญเติบโตในน้ำหมักก็เป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะน้ำจืด แต่ในบางกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับน้ำทะเลเช่นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม อาทิเช่น การทำความสะอาดบ่อเพื่อเตรียมการเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มทั้งในรอบแรกและรอบการเลี้ยงต่อๆ ไป การทำความสะอาดพื้นผิวบริเวณท่าเทียบเรือและสะพานปลา สถานบริการร้านอาหาร บ้านและชุมชนที่ตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลบางส่วน เป็นต้น เมื่อน้ำหมักสัมผัสกับความเค็มของน้ำทะเล น้ำหมักอาจไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะน้ำหมักในที่นี้หมายถึงจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในระหว่างการหมัก อาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและกิจกรรมเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเค็ม นอกจากนี้จุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นรวมทั้งตัวสารอาหารภายในน้ำหมักเองเมื่อแพร่กระจายออกสู่ระบบนิเวศชายฝั่งทะเลก็จะมีลักษณะเป็นเพียงสารเคมีปนเปื้อนที่ธรรมชาติต้องรับภาระในการย่อยสลายทิ้งไป เป็นการเพิ่มความสกปรกให้ระบบนิเวศชายฝั่งทะเลโดยตรงอีกทางหนึ่งด้วย แต่ถ้าหากว่าจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่เจริญเติบโตในน้ำหมักเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบได้ดีในสภาวะที่มีความเค็ม อาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการอนุรักษ์และฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมชายฝั่งทะเลได้เป็นอย่างดี เพราะเมื่อน้ำหมักสัมผัสกับความเค็มในกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวเนื่องกับน้ำทะเล จุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นสามารถเจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเสียได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งน่าจะมีความเหมาะสมในการนำไปใช้และช่วยฟื้นฟูระบบนิเวศชายฝั่งทะเลได้มากกว่ารูปแบบที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเลสำหรับใช้ฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมของระบบนิเวศชายฝั่งทะเล เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานต่อยอดไปยังแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ ทั้งในระดับการทดลองและการนำไปใช้งานจริงในระบบนิเวศเพื่อลดผลกระทบของกิจกรรมต่างๆ บริเวณชายฝั่งทะเล

ขอบเขตของโครงการวิจัย ดำเนินการศึกษาวิจัยโดยคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ทะเลจากธรรมชาติและแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มในพื้นที่ชายฝั่งทะเลเป็นแหล่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่จำเป็นต่อการบำบัด เพื่อทดลองใช้ในรูปแบบน้ำหมักชีวภาพในการย่อยสลายของเสียในรูปแบบที่มีความเค็มเป็นสภาวะกำหนด โดยเปรียบเทียบศักยภาพการย่อยสลายของเสียของผลิตผลน้ำหมักชีวภาพที่ได้กับน้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาวะปกติ

ดำเนินการวิจัยโดยทำการคัดเลือกชนิดจุลินทรีย์ทะเลจากน้ำและดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกในแหล่งที่มีกิจกรรมหรือการสะสมของเสียในปริมาณมาก เช่น สะพานปลา สถานประกอบการ โรงแรม ร้านอาหาร ชุมชนชายฝั่งทะเล ฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม เลือกชนิดที่สามารถเจริญเติบโตและมีศักยภาพในการย่อยสลายของเสียได้ดี ไม่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำ เพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้นในการผลิตน้ำหมักชีวภาพในสภาวะน้ำเค็ม และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเสียเทียบกับน้ำหมักชีวภาพปกติที่หมักในสภาวะน้ำจืด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการฟื้นฟูสภาวะแวดล้อมชายฝั่งทะเลต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ จุลินทรีย์ทะเลที่คัดเลือกได้ มีศักยภาพสามารถย่อยสลายของเสียได้ดี สามารถดัดแปลงไปใช้ต่อยอดทดลองทางวิทยาศาสตร์ในแนวทางต่างๆ ทำให้เกิดความสมดุลของระบบนิเวศและสภาพแวดล้อมต่อไปในอนาคต

ทบทวนวรรณกรรม

น้ำหมักชีวภาพ หมายถึงของเหลวที่ได้จากการหมักชิ้นส่วนของพืช เช่น ต้น ใบ ดอก และผล รวมถึง ผัก ผลไม้ และสมุนไพร ด้วย จากการหมักชิ้นส่วนของสัตว์ หรือจากการหมักสารอินทรีย์ต่างๆ ที่หาได้ในท้องถิ่นหรือครัวเรือน อาจหมักรวมกับกากน้ำตาล น้ำตาลทราย น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลมะพร้าว น้ำอ้อย หรือน้ำผึ้ง แล้วแต่ความสะดวกและวัตถุประสงค์ของการใช้ประโยชน์ เช่น หมักเพื่อการบริโภค หรือใช้เป็นยาบำบัดโรคนิยมใช้น้ำตาลทราย น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลมะพร้าว น้ำอ้อย หรือน้ำผึ้ง ร่วมในการหมัก ใช้เป็นปุ๋ยน้ำในการเกษตร ใช้ในการชำระล้างสิ่งสกปรก ก็มักใช้กากน้ำตาลในการหมัก ซึ่งในการหมักไม่จำเป็นต้องหมักจากชิ้นส่วนของพืชหรือสัตว์เสมอไป หากต้องการใช้ประโยชน์ในแง่ของน้ำหมักจุลินทรีย์หรือปุ๋ยน้ำก็อาจก็อาจทำการหมักโดยใช้กากน้ำตาลเป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์เพียงอย่างเดียวก็ได้ เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มหลักในน้ำหมักส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เมื่อเจริญเติบโตในสภาพการหมักแบบไม่ต้องการออกซิเจน แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่ให้ความหวานต่างๆ ไปเป็นกรดแลคติก และหากถ้าวัตถุดิบที่นำมาใช้มีน้ำตาลหรือสารอินทรีย์ที่ให้ความหวานอยู่แล้วก็ไม่จำเป็นต้องทำการหมักร่วมกับกากน้ำตาลก็ได้ นอกจากนี้ในน้ำหมักยังพบว่ามีจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ เจริญเติบโตอยู่ด้วยซึ่งในระหว่างการเจริญเติบโตจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารประกอบตัวอื่นๆ ได้อีก เช่น แอลกอฮอล์ และกรดน้ำส้ม เป็นต้น ในระหว่างการหมักสามารถสังเกตได้ว่ากระบวนการหมักเกิดขึ้นได้ดีหรือไม่โดยการสังเกตจากฟองอากาศที่เกิดขึ้นในน้ำหมักและผุดขึ้นสู่ผิวหน้าของน้ำหมัก ฝาภาชนะที่ใช้ในการหมักมีแรงดันของแก๊สเกิดขึ้นเมื่อเปิดหรือคายเกลียว

น้ำหมักชีวภาพ นิยมแบ่งตามประเภทวัตถุดิบที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมัก 2 ประเภท คือ

1. น้ำหมักชีวภาพจากชิ้นส่วนของพืช แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1.1 ชนิดที่ใช้ผัก และเศษพืช ได้จากการหมัก เศษพืช เศษผัก น้ำหมักที่ได้มีลักษณะเป็นน้ำข้นสีน้ำตาล มีกลิ่นหอม น้ำหมักชีวภาพที่ได้ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน กรดแลคติค กรดอินทรีย์ระเหยง่าย วิตามิน แร่ธาตุต่างๆ ฮอร์โมน และเอนไซม์

1.2 ชนิดที่ใช้ขยะเปียก ได้จากการหมักขยะที่มีส่วนประกอบของสารอาหารในครัวเรือน เช่น เศษอาหาร เศษผักผลไม้ น้ำหมักที่ได้มีลักษณะข้นสีน้ำตาล ปกติมีสีจางกว่าชนิดแรก มีกลิ่นหอมน้อยกว่าหรือมีกลิ่นเหม็นเล็กน้อย ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการหมักเศษอาหาร วัตถุดิบที่ใช้จะมีส่วนประกอบของสารที่ให้ความหวานหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบดอยู่ในปริมาณน้อย มักจะเติมกากน้ำตาลเพื่อเป็นอาหารของจุลินทรีย์และเร่งกระบวนการหมักให้เร็วขึ้น น้ำหมักชีวภาพที่ได้มีองค์ประกอบคล้ายชนิดแรก แต่ปกติจะมี วิตามิน ฮอร์โมน และเอนไซม์ ในปริมาณที่ต่ำกว่าชนิดแรก

2. น้ำหมักชีวภาพจากชิ้นส่วนของสัตว์ ได้จากการหมักเศษเนื้อต่างๆ เช่น เนื้อปลา หัวปลา ไส้ปลา ครีบปลา หนังสัตว์ เนื้อหอย เป็นต้น น้ำหมักที่ได้จะมีสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นเหม็นมากกว่าน้ำหมัก

ชีวภาพที่ได้จากชิ้นส่วนของพืช ต้องใช้กากน้ำตาลเป็นส่วนผสมเพื่อเป็นอาหารของจุลินทรีย์และเร่งกระบวนการหมักให้เร็วขึ้น น้ำหมักชีวภาพที่ได้มี โปรตีน กรดอะมิโน สูงกว่าน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากชิ้นส่วนของพืช

“น้ำหมักชีวภาพ” นิยมเรียกกันในอีกหลายชื่อ เช่น น้ำสกัดชีวภาพ น้ำเอนไซม์ น้ำจุลินทรีย์ น้ำหมักพืช น้ำไอออนิก พลาสมา เซลล์ฟู้ดซ์ ปุ๋ยน้ำชีวภาพ เป็นต้น หรือเรียกตามวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการหมัก เช่น ถ้าใช้ชิ้นส่วนของปลามาทำการหมักก็เรียกว่า ปุ๋ยน้ำหมักปลา ถ้าใช้ผลมะกรูดมาทำการหมักก็เรียกว่า น้ำหมักมะกรูด เป็นต้น โดยนิยมลงท้ายของชื่อด้วยคำว่า “ชีวภาพ”

น้ำหมักชีวภาพในระยะแรกถูกนำมาใช้เพื่อการเกษตรและสิ่งแวดล้อม ทั้งด้านการเพาะปลูกพืชเพื่อกระตุ้นการเจริญ ป้องกันและส่งเสริมความต้านทานต่อโรคและแมลงของพืช ด้านปศุสัตว์ เช่น ส่งเสริมสุขภาพสัตว์ ผสมในอาหารสัตว์เพิ่มการย่อยสลายและดูดซึมอาหาร ทำความสะอาดบริเวณเลี้ยงสัตว์ ลดกลิ่นเหม็นจากการเน่าเสียของอาหารที่เหลือตกค้างและมูลที่สัตว์ขับถ่ายออกมา และใช้ในครัวเรือน เช่น ผสมน้ำยาล้างจาน ซักผ้า แชมพู แชมพู สบู่ สบู่เหลว ใช้อาบน้ำขจัดกลิ่นตัว

- ในด้านการเพาะปลูกนิยมแบ่งน้ำหมักชีวภาพออกเป็น 3 ประเภท คือ

1) สูตรบำรุงใบลำต้น ได้จากการหมักเศษอาหาร ชิ้นส่วนของพืช ชิ้นส่วนของสัตว์และหอยต่างๆ เช่น หอยเชอรี่

2) สูตรฮอร์โมนบำรุงดอกและผล ได้จากการหมักผลไม้สุกต่างๆ

3) สูตรสมุนไพรป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้จากการหมักพืชสมุนไพรต่างๆ เช่น ใบกระถิน ใบขี้เหล็ก ใบตะไคร่ เป็นต้น

ต่อมาได้รับกระแสความนิยมบริโภคน้ำหมักชีวภาพเมื่อมีธุรกิจขายตรงเอกชนนำเข้าน้ำลูกยอมาจำหน่ายในราคาสูง โดยอ้างสรรพคุณมากมายในด้านการรักษาโรค และที่มีผลดีต่อสุขภาพ เช่น เบาหวาน ไขมันในเลือดสูง ภูมิแพ้ มะเร็ง โรคเรื้อรังต่างๆ ปวดเมื่อย ข้อเสื่อม ตลอดจนการรักษาผู้ติดเชื้อ HIV โดยการบรรยายสรรพคุณของผู้ธุรกิจ ทำให้เครือข่ายเกษตรกรและประชาชนทั่วไปนำน้ำหมักชีวภาพที่ใช้อยู่ก่อนแล้วในภาคการเกษตรไปใช้เพื่อดูแลสุขภาพมากขึ้น ก่อให้เกิดกระแสความนิยมทั้งในการบริโภคและการผลิตอย่างแพร่หลาย โดยผ่านกระบวนการหมักด้วยวิธีธรรมชาติ มีวิธีการผลิตอย่างง่าย ทำให้การผลิตน้ำหมักชีวภาพมีความหลากหลายมากขึ้น มีการนำสมุนไพรชนิดต่างๆ มาเป็นวัตถุดิบในการหมัก เช่น น้ำพลูคาว และน้ำมะขามป้อม รวมทั้งน้ำสมุนไพรรวม เป็นยารักษาโรคต่างๆ อย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน ซึ่งยังถือได้ว่าได้รับความนิยมแต่ไม่ได้รับการส่งเสริมที่ดีพอ มากพอ และเพียงพอ เนื่องจากยังขาดหน่วยงานที่จะเข้ามาช่วยเหลือข้อมูลวิธีการที่เป็นวิทยาศาสตร์ ยากต่อการควบคุมคุณภาพ การคัดเลือกวัตถุดับป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราซึ่งบางชนิดสามารถผลิตแพกตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบเปลี่ยนเป็นเมทิลแอลกอฮอล์ได้ หรือมีการปนเปื้อนของยีสต์ที่ติดมากับผักและผลไม้ส่วนใหญ่ที่เป็นวัตถุดิบสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอททิลแอลกอฮอล์ได้ ซึ่งหากนำผักและผลไม้ที่เป็นวัตถุดิบนั้นไป

ผ่านไอน้ำที่ความร้อนระดับหนึ่งจะช่วยลดปริมาณยีสต์ปนเปื้อนลงได้ ทั้งเมททิลแอลกอฮอล์และเอททิลแอลกอฮอล์มีผลต่อตับ ระบบประสาท และสายตา โดยเฉพาะเมทิลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังรวมถึงการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคกับระบบทางเดินอาหารและลำไส้ด้วย ส่งผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคน้ำหมักชีวภาพ ทำให้ขาดความน่าเชื่อถือในการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพอย่างเต็มที่ การผลิตน้ำหมักชีวภาพที่ดี ต้องสามารถควบคุมผลิตภัณฑ์ให้ปลอดจากการปนเปื้อนของเมททิลแอลกอฮอล์ และเอททิลแอลกอฮอล์ นอกจากการใช้ความร้อนและการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบแล้ว ต้องมีการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพจากการปนเปื้อนของยีสต์และจุลินทรีย์ก่อโรคด้วย

น้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภคมีสรรพคุณค่อนข้างมากในด้านการส่งเสริมสุขภาพ กระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพที่ดีสามารถลดปนเปื้อนของสารเคมีและเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับระบบลำไส้และทางเดินอาหารที่นิยมในปัจจุบันสามารถทำได้โดยใช้จุลินทรีย์เริ่มต้นหรือหัวเชื้อในกระบวนการหมัก ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มแลกโตบาซิลลัส ซึ่งสามารถสร้างสารโปรไบโอติกได้ มีผลดีต่อสุขภาพ เพราะผลิตกรดแลกติกและแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ช่วยทำลายเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นที่ยอมรับและรู้จักกันดีในวงการอาหารในปัจจุบัน เช่น การผลิตน้ำเปรี้ยว และโยเกิร์ต สามารถเจริญและยึดเกาะผนังลำไส้ได้ป้องกันการเจริญและลงเกาะของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค สามารถปรับตัวเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบลำไส้ของผู้บริโภคได้ ป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งตับ ช่วยลดระดับคลอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ทำให้ระบบภูมิต้านทานโรคของร่างกายดีขึ้น ในระหว่างการเจริญเติบโตในน้ำหมักชีวภาพจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะผลิตกรดไขมัน กรดอะมิโน และวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นในกระบวนการหมักยังสกัดสารจากพืชที่เป็นวัตถุดิบในการหมักซึ่งสารที่ได้เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไปด้วยในตัว ป้องกันการเกิดโรคหลายชนิดโดยเฉพาะโรคมะเร็งติดอันดับแรกที่เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในปัจจุบัน

จุลินทรีย์ที่มีในน้ำหมักชีวภาพ

ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพปกติจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดทำงานร่วมกัน กล่าวได้ว่าเป็นการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ แบคทีเรีย และเชื้อรา ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ และผลิตเอนไซม์สำหรับเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ (อานัฐ ต้นโช) จำแนกเป็น

แบคทีเรีย มีบทบาทในการย่อยสลายวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ เป็นสารประกอบอินทรีย์จากสิ่งที่มีชีวิตทั้งจากพืชและสัตว์ แบคทีเรียย่อยสลายกลุ่มก้อนของสารประกอบอินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็ก หรือเปลี่ยนรูปสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้ได้สารประกอบอินทรีย์ตัวใหม่ที่มีขนาดเล็กลง เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียเอง หรือส่งต่อให้จุลินทรีย์อื่นใช้ในการย่อยสลายต่อไป รวมทั้งปลดปล่อยธาตุอาหารต่างๆ (N, P, K) ออกมาในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ แบคทีเรียที่พบและมีบทบาทมากในน้ำหมักชีวภาพดังนี้

แบคทีเรียสกุลบาซิลัส (*Bacillus* sp.) จุลินทรีย์สกุลนี้จัดเป็น Ammonifiers มีบทบาทในการแปรสภาพอินทรีย์ไนโตรเจนให้เป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักส่วนใหญ่อยู่ในรูปแอมโมเนีย สามารถผลิตเอนไซม์โพรติเอส (Protease) ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง โดยน้ำเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Hydrolysis) ย่อยสลายโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เป็นโพลีเปบไทด์ (Phlypeptides) และย่อยสลายโอลิโกเปบไทด์ (Oligopeptides) ให้เป็นกรดอะมิโน (Amino acids) การย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์ในสภาพที่มีออกซิเจน (Aerobic Proteolysis) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย คือ คาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนีย ซัลเฟต และน้ำ แต่ถ้าการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย คือ แอมโมเนีย อะมีน คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์ Indole Skatole Mercaptans และไฮโดรเจนซัลไฟล์ สารประกอบที่ได้จากการย่อยสลายจะทำให้สภาพของน้ำเลี้ยงแบคทีเรียมีกลิ่นเหม็น (Foul Smelling) โดยเฉพาะสารประกอบไฮโดรเจนซัลไฟล์ แบคทีเรียในสกุลนี้สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโตไคนิน ได้

แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติหลายแหล่งโดยเฉพาะแหล่งที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ สามารถใช้สารประกอบน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนสำหรับเซลล์ ได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายน้ำตาลเมื่อเจริญเติบโตในสภาวะไม่มีออกซิเจน เซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีลักษณะรูปแท่ง (Rod-Shaped) ผนังเซลล์มีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก (Gram Phositive) ไม่สร้างสปอร์ (Endospore) จัดเป็น Asporogenous bacteria ใน Family Lactobacillaceae ในสกุล *Lactobacillus* sp. ใช้สารประกอบอินทรีย์มีโครงสร้างซับซ้อนเป็นแหล่งของพลังงานและคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้สารประกอบน้ำตาลได้หลายชนิดเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ สามารถสร้างกรดแลคติก กรดฟอร์มิค เอททิลแอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ ในกระบวนย่อยสลายที่มีสารประกอบน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในกระบวนการหมักหรือในสภาวะที่ไม่ออกซิเจน แต่จะเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีกว่าเมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ในกระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะมีส่วนเกี่ยวข้องอย่างมากในการผลิต เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพส่วนใหญ่มีน้ำตาลหรือสารประกอบอินทรีย์ที่ให้ความหวานเป็นองค์ประกอบ หรือมีการเติมน้ำตาลหรือกากน้ำตาลลงในน้ำหมักกรณีที่วัตถุดิบไม่มีน้ำตาลหรือสารประกอบอินทรีย์ที่ให้ความหวานในปริมาณน้อยเป็นส่วนประกอบ

ปฏิกิริยาการสร้างกรดแลคติกโดยรวมของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกเมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน คือ

$$\underset{\text{กลูโคส}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{กรดแลคติก}}{2CH_3 . CHOH . COOH}$$

- แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1) Homofermentative ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะเป็นกรดแลคติก (Lactic Acid) เท่านั้น

2) Heterofermentative ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กลีเซอรอล แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์

โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะพบได้ในสภาพธรรมชาติทั้งในพืชผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์นม มีความสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดี ทนต่อสภาพความเป็นกรดสูง กรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหารหลายชนิด เช่น การผลิตผักดองต่างๆ ผลิตภัณฑ์อาหารนม และการทำเนยแข็ง เนื่องจากกรดที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมีผลทำให้มีสภาวะความเป็นกรดสูงซึ่งมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือกำจัดกลุ่มจุลินทรีย์อื่นที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร

<u>แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก</u> (Acetic Acid Bacteria) เซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะทางสันฐานวิทยาของแบคทีเรียเป็น รูปแท่ง (Rod) และทรงกลม (Cocci) ผนังเซลล์มีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมลบ (Gram negative) จัดอยู่ใน Family Pseudomonadaceae สกุล *Acetobacter* sp.รูปร่างของเซลล์อาจพบในลักษณะที่เป็นแท่งแต่มีลักษณะเป็นรูปทรงรีหรือแท่งโค้ง ที่ส่วนปลายของแท่งมี Flagella ทำให้เซลล์มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ เจริญได้เฉพาะที่มีออกซิเจน (Aerobic Bacteria) ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายต่ำกว่า 5.0 ทนทานต่อสภาพความเป็นกรดได้ดี และทนอยู่ได้ในที่ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำที่ 3.0-3.5 ได้ สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยา Oxidation ในสภาวะที่มีออกซิเจน เปลี่ยนเอททิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล (Ethanol) ไปเป็นกรดอะซิติก

ปฏิกิริยาการสร้างกรดอะซิติกโดยรวมของแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกในสภาวะที่มีออกซิเจน คือ

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3 . COOH + H_2O$$

เอททิลแอลกอฮอล์ ออกซิเจน กรดอะซิติก น้ำ

ยีสต์และรา ในกระบวนการหมักในน้ำหมักชีวภาพส่วนใหญ่มักพบการเจริญของยีสต์และรา

<u>ยีสต์</u> (Yeasts) ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลมหรือรี สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (Budding) จัดอยู่ใน Family Saccharomycetaceae ในช่วงระยะที่เซลล์ของยีสต์ยังมีอายุยังน้อยเซลล์จะมีรูปร่างค่อนข้างกลม แต่เมื่ออายุมากเซลล์จะมีรูปร่างยาวเรียว สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดสูง ยีสต์ในธรรมชาติในน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนในการเจริญเติบโต สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่มีออกซิเจนยีสต์จะเจริญเติบโตเพิ่ม

จำนวนเซลล์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำตาลจะเป็น คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนยีสต์จะทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอททิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ และถ้าในสภาวะในกระบวนการหมักไม่เหมาะสมต่อการเจริญเซลล์ของยีสต์จะมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ Ascospores ในลักษณะและรูปแบบที่แตกต่างจากการสร้างสปอร์ของรา ยีสต์ที่มีบทบาทสามารถพบได้ในน้ำหมักชีวภาพโดยทั่วไป ได้แก่ สกุล *Saccharomyces* sp. และ *Candida* sp. เนื่องจากยีสต์มีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลได้ดี ดังนั้นในกระบวนการหมักผักและผลไม้หรือปลาสดผสมกับน้ำตาล ยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หลังจากการหมักวัสดุอินทรีย์ด้วยน้ำตาล

ปฏิกิริยาการสร้างเอททิลแอลกอฮอล์โดยรวมของยีสต์เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน คือ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

กลูโคส เอททิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ ออกมาได้ด้วยแต่จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย ได้แก่ Glyceral, Acetic Acid, Organic Acid, Amino Acid, Purines, Pyrimidines วิตามินและฮอร์โมนในระหว่างกระบวนการหมักด้วย ซึ่งน่าจะเป็นสารที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์เอง

ในกระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพยีสต์จะทำงานร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่นเร่งให้เกิดปฏิกิริยาเคมีอยู่ด้วยซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ เมื่อมีกรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นสะสมภายในน้ำหมักจำนวนมาก ทำให้น้ำหมักมีความเป็นกรดสูง ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักมีค่าต่ำมาก ซึ่งยีสต์เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 4.0-6.5 แต่ยังคงทนอยู่ได้ในสภาพที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักระหว่าง 1.5-3.5 ซึ่งการที่น้ำหมักมีสภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าต่ำ และขณะเดียวกันแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลดีต่อคุณภาพของน้ำหมักซึ่งเป็นผลดีต่อทั้งกระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพในด้านการควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต และเป็นผลดีต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อคนและสัตว์ได้โดยปริยายหากต้องการใช้ประโยชน์น้ำหมักในการอุปโภคหรือบริโภค

<u>รา</u> เป็นจุลินทรีย์พวกที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต ดังนั้นระหว่างกระบวนการหมักโดยทั่วไปจะพบราในปริมาณน้อยมาก เจริญอยู่บริเวณผิวด้านบนของน้ำหมักชีวภาพ โดยปกติในลักษณะของการผลิตน้ำหมักชีวภาพในระบบการหมักจะมีออกซิเจนอยู่น้อยหรือแทบไม่มีเลย ซึ่งสภาวะดังกล่าวไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของรา จึงมักพบอยู่บนบริเวณผิวหน้าของน้ำหมักชีวภาพบริเวณพื้นผิวภาชนะที่มีสารละลายน้ำตาลและสารอินทรีย์ติดอยู่ ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Phycomycetes สกุล Mucor และอื่นๆ ราบทบาทในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพในแง่การย่อยสลายตามลักษณะการเจริญของรา และเป็นที่

ยอมรับว่าราเป็นแหล่งของเอนไซม์ ฮอร์โมน และสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อคนและสัตว์ด้วย

การผลิตน้ำหมักชีวภาพเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของวัตถุดิบด้วยจุลินทรีย์ โดยมีกากน้ำตาลหรือสารให้ความหวานอื่น และน้ำตาลจากสารอินทรีย์ของวัตถุดิบ เป็นแหล่งพลังงาน แบ่งระยะการหมักออกเป็น 2 ระยะ คือ

1. การหมักแบบต้องการออกซิเจน เป็นการหมักด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโตและเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์ เพื่อดูดซึมไปใช้เป็นสารอาหารและ สร้างเป็นพลังงานให้แก่เซลล์ ลักษณะการหมักในช่วงนี้มักเกิดเพียงระยะสั้นๆ ในช่วงแรกของการหมักในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ เมื่อออกซิเจนในน้ำ และอากาศถูกใช้หมดไป จุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ออกซิเจนจะลดลง และหมดไป ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้ในระยะการหมักนี้คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ เอนไซม์ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นกระบวนการหมักจะเข้าสู่ระยะที่ 2 ของการหมักโดยจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน

2. การหมักแบบไม่ต้องการออกซิเจน เป็นการหมักด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโตและเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์ เพื่อสร้างเป็นพลังงาน และอาหารให้แก่เซลล์ ลักษณะการหมักในช่วงนี้จะเกิดต่อจากช่วงแรกและเป็นช่วงที่ยาวนานกว่าในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ คาร์บอนไดออกไซด์ สารประกอบกลุ่มแอลกอฮอล์ กรดน้ำส้ม กรดแลคติก กรดอินทรีย์ระเหยง่ายต่างๆ ก๊าซซัลไฟด์และมีเทน เป็นต้น เนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดได้ไม่สมบูรณ์ เอนไซม์ใช้สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในการเกิดปฏิกิริยาแทนออกซิเจน

โดยลักษณะการหมักแล้วน้ำหมักชีวภาพสามารถจัดให้เป็นปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยอินทรีย์ได้ ตามความหมายเดียวกัน คือ เป็นสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการหมักแศษพืช หรือสัตว์ ย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ มีธาตุอาหารพืชในน้ำหมักเกิดจากกระบวนการสลายตัวของอินทรีย์วัตถุจากพืช และสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในารทำน้ำหมัก ปริมาณแร่ธาตุอาหารต่างๆ ที่มีขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาหมัก ในปัจจุบันน้ำหมักชีวภาพได้รับความนิยมนำมาใช้ประโยชน์ในภาคการเกษตรมากขึ้น เนื่องจากประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่างๆ หลายชนิด เช่น เอนไซม์ ฮอร์โมน และแร่ธาตุต่างๆ ที่พืชใช้เป็นอาหารได้ สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยและป้องกันกำจัดศัตรูพืช แทนปุ๋ยเคมีและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้ ทั้งๆ ที่ธาตุอาหารพืชที่ได้จากกระบวนการหมักมีน้อยมาก (ชวนพิศ อรุณรังสิกุล และคณะ, 2547) ไม่น่าที่จะเพียงพอที่จะทำให้พืชเจริญเติบโตและให้ผลผลิตสูงได้ถ้าไม่มีการใส่ปุ๋ยในรูปอื่นเพิ่มเติม ซึ่งน้ำหมักชีวภาพจากการหมักที่เข้มข้นปกติจะมีธาตุอาหารพืชในปริมาณต่ำ แต่การนำไปใช้งานจริงต้องทำการทำให้เจือจาง 1 ส่วนต่อ 100 ส่วน หรือ 1 ส่วนต่อ 1000 ส่วน เพื่อลดความเป็นกรดที่จะเป็นพิษต่อพืชลง ซึ่งจะยิ่งทำให้ปริมาณธาตุอาหารที่พืชจะได้รับน้อยลงไปอีก แต่จากผลการใช้งานจริงในภาคเกษตรพบว่าให้ผลดีต่อพืช พืชมีการเจริญเติบโตดี ผักใบและยอดมีการแตกยอดงอกงาม ไม้ผลมีการแตกช่อมากขึ้นและให้เปอร์เซ็นต์การติดผลมากขึ้น

โรคและแมลงรบกวนน้อยลง โดยที่ไม่ต้องทำอะไรเพิ่มเติม เพียงดูแลตามปกติ รดน้ำพรวนดิน และกำจัดวัชพืช เป็นต้น ดังนั้นควรพิจารณาในแง่อื่นรวมด้วย เช่น การนำน้ำหมักชีวภาพมาใช้เป็นสิ่งแปลกใหม่ในภาคการเกษตร กระตุ้นความอยากรู้อยากลองของมนุษย์ตามหลักจิตวิทยา ทำให้เกษตรกรตื่นตัวทำการปฏิบัติเบื้องต้น เช่น การพรวนดิน กำจัดวัชพืช และให้น้ำกับพืชดีมากขึ้น จึงมีผลดีต่อพืชที่ปลูกมากขึ้นกว่าการเพาะปลูกที่ผ่านๆ มา การทำเกษตรกรรมก่อนหน้านี้มีการปลูกผักและผลไม้โดยการใส่ปุ๋ยในปริมาณที่สูงมาก่อน จึงทำให้ดินในบริเวณที่ทำการเพาะปลูกมีธาตุอาหารพืชสะสมอยู่มาก เมื่อใช้น้ำหมักชีวภาพที่มีธาตุอาหารปริมาณน้อยที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชถึงจะมีแร่ธาตุในปริมาณน้อยแต่มีครบทุกธาตุรวมกับธาตุอาหารต่างๆ ที่มีอยู่แล้วในดินจึงทำให้ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืชที่ทำการเพาะปลูก หรืออาจเป็นเพราะในดินมีแร่ธาตุอาหารพืชอยู่ในปริมาณที่มากพอแล้วแต่อยู่ในรูปที่พืชนำมาใช้ได้น้อย ในน้ำหมักชีวภาพมีจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่จะไปย่อยสลายและเปลี่ยนรูปแร่ธาตุที่อยู่ในดินไปเป็นรูปที่เหมาะสมต่อการดูดซึมของพืชไปใช้ในการเจริญเติบโตได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับความจริงที่ว่าเกษตรกรจะนำน้ำหมักชีวภาพไปใช้ร่วมกับปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยอินทรีย์อื่นๆ ด้วย เนื่องจากมีผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืชที่ทำการเพาะปลูก (ประสงค์ วงค์ชนะภัยและคณะ, 2547) รวมทั้งน้ำหมักชีวภาพอาจมีฮอร์โมนและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชอยู่ เอนไซม์บางชนิดทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรียให้เป็นอาหารของพืชและจุลินทรีย์ ฮอร์โมนหลายชนิดที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตก็เป็นประโยชน์ต่อพืชแต่ควรมีความเข้มข้นต่ำหรือปริมาณเพียงเล็กน้อย เพราะถ้ามีปริมาณมากหรือความเข้มข้นสูงอาจเป็นพิษกับพืชได้ ที่ต้องคำนึงถึงเป็นหลักคือปริมาณกรดในน้ำหมักชีวภาพ ดังนั้นโดยหลักการในการนำน้ำหมักชีวภาพไปใช้ประโยชน์ในแง่ปุ๋ยน้ำสำหรับพืชจำเป็นต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม สารอินทรีย์บางชนิดในน้ำหมักชีวภาพเป็นสารเพิ่มความต้านทานให้แก่พืชมีความต้านทานต่อโรคและแมลง ทั้งที่ไม่พบว่าผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพดังกล่าวมีสารอะไรที่ยับยั้ง ต่อต้าน กำจัดหรือเป็นพิษต่อแมลง หรือต่อกระบวนการดำรงชีวิตของแมลงและโรคพืชได้ แต่เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของน้ำหมักชีวภาพส่วนใหญ่ประกอบด้วย แอลกอฮอล์ กรดน้ำส้ม และกรดแลคติก ซึ่งแอลกอฮอล์และกรดดังกล่าว อาจมีผลในการไล่แมลง เช่น กลิ่นจากกรดอินทรีย์ระเหยง่ายบางชนิดในน้ำหมักชีวภาพไปรบกวนการหายใจของแมลงหรือเป็นกลิ่นแมลงไม่ชอบ น้ำหมักชีวภาพมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นโรคพืชได้ทั้งนี้อาจเป็นเพราะน้ำหมักชีวภาพอยู่ในรูปของน้ำหมักจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ในน้ำหมักอาจไปเจริญเติบโตคุมพื้นที่ไว้เป็นส่วนใหญ่แล้วเมื่อมีจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคกับพืชปนเปื้อนลงสู่พื้นที่เพาะปลูกก็จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ ต้องแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่คุมพื้นที่อยู่ก่อนในระดับหนึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณให้มากพอที่จะทำให้พืชเกิดโรคได้ ส่วนที่พืชมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหันได้มากขึ้นนั้นอาจกล่าวอ้างได้ว่าเมื่อปัจจัยต่างๆ เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชมากขึ้น ส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ต้น ใบ ดอกและผล มีความแข็งแรงมากขึ้น การต้านทานต่อการเกิดโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ดีขึ้นด้วย

ประโยชน์ของน้ำหมักชีวภาพ

ด้านการเกษตร

– ช่วยปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ในดิน และน้ำ
– ช่วยปรับสภาพโครงสร้างของดิน ทำให้ร่วนซุย อุ้มน้ำได้ดี
– ช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดิน และน้ำ
– ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน และน้ำ
– เร่งการเกิดราก และการเจริญเติบโตของพืช
– เป็นฮอร์โมนพืช กระตุ้นการเกิดราก และการเจริญเติบโต ทำให้ผลผลิต
– ช่วยลด และต้านแมลงศัตรูพืช

ด้านปศุสัตว์

– ฉีดพ่นพื้นฟาร์มเพื่อลดกลิ่นเหม็นของมูลสัตว์ ซากพืช ซากสัตว์
– กำจัดน้ำเสีย
– ฉีดพ่นตัวสัตว์เพื่อป้องกัน และลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรค
– ป้องกันการเจริญเติบโตของหนอนแมลงต่างๆ
– ผสมในหญ้าอาหารสัตว์สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ด้านการประมง มักใช้น้ำหมักชีวภาพเติมในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อประโยชน์ในต่างๆ คือ

– เพื่อปรับความเป็นกรด-ด่าง
– บำบัดของเสีย ย่อยสลายของเสียบริเวณก้นบ่อ
– ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

ด้านสิ่งแวดล้อม

– ใช้เติมในระบบบำบัดน้ำเสีย
– ย่อยสลายขยะ และลดกลิ่นเหม็น
– ปรับสภาพของเสียจากครัวเรือน เพื่อใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประสงค์ วงศ์ชนะภัย และคณะ (2547) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพที่เกษตรกรผลิตและใช้โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 กรมวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร พบว่า น้ำสกัดชีวภาพจากพืชผักและผลไม้ มีธาตุอาหาร N 0.05-1.65 %, P_2O_5 0.01-0.59 %, K_2O 0.02-1.89 %, Ca 0.08-0.95 %, Mg 0.001-0.22 %, S 0.006-0.58 % ธาตุอาหารเสริม Fe, Mn, Cu, Zn, B และ Cl ในปริมาณน้อย พบฮอร์โมนพืช (plant hormones) ได้แก่ ออกซิน จิบเบอเรลลิน และไซโทไคนิน น้ำสกัดชีวภาพจากสมุนไพรพบสารออกฤทธิ์กลุ่มแอลกอฮอล์ เบนซีนไดออล ฟีนอล และเอสเทอร์ พบธาตุอาหาร N 0.28-2.00 %, P_2O_5 %, K_2O 0.04-1.72 %, Ca 0.03-2.26 %, Mg

0.01-0.84 %, S 0.01-0.35 % และพบธาตุอาหารเสริมได้แก่ Fe, Mn, Cu, Zn, B และ Cl ส่วนฮอร์โมนพบในปริมาณน้อยกว่าที่พบในน้ำสกัดชีวภาพจากพืช การนำน้ำหมักชีวภาพไปใช้การเพาะปลูกพบว่าได้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อให้ร่วมกับปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยอินทรีย์อื่นๆ

สุบิน สีทน และสายสมร ลำลอง (2555) ศึกษาผลของสารจับตัวน้ำยางต่อสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกลของแผ่นยาง ของ กรดฟอร์มิก น้ำหมักชีวภาพแตงโมและน้ำหมักชีวภาพมะม่วงดิบ ปริมาณสารจับตัวน้ำยางที่เหมาะสมต่อน้ำยางสด 200 กรัม ต่อ กรดฟอร์มิก น้ำหมักชีวภาพแตงโม และน้ำหมักชีวภาพมะม่วงดิบ เท่ากับ 10 , 20 และ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ สีของยางแผ่นดิบที่จับตัวด้วยน้ำหมักชีวภาพมีสีเข้มกว่าที่จับตัวด้วย กรดฟอร์มิก เนื้อของก้อนยาง มีความแข็ง ทนต่อแรงดึงที่ระยะยืด 100 % และ 300% มีสมบัติแตกต่างกันเล็กน้อย โดยที่ยางแผ่นดิบที่เตรียมจากน้ำหมักชีวภาพแตงโมมีสมบัติดีกว่าที่เตรียมจากรดฟอร์มิก และน้ำหมักชีวภาพมะม่วงดิบ แต่การเสียรูปจากการกดของยางเตรียมจากกรดฟอร์มิก มีสมบัติดีที่สุด

สมหมาย ปัตตาลี (2551) ศึกษาการนำผลมะหลอดมาแปรรูปเป็นน้ำหมักชีวภาพเพื่อเสริมสุขภาพ โดยกระบวนการหมัก 4 สูตร คือ สูตรที่1 ผลมะหลอดไม่ผ่านการลวก ผสมกับน้ำตาลทรายแดงและน้ำ สูตรที่ 2 ผลมะหลอดไม่ผ่านการลวก ผสมกับน้ำตาลอ้อย และน้ำสูตรที่ 3 ผลมะหลอดที่ผ่านการลวก ผสมกับน้ำตาลทรายแดง และน้ำ และสูตรที่ 4 ผลมะหลอดที่ผ่านการลวก ผสมกับน้ำตาลอ้อยและน้ำ โดยใช้ผลมะหลอดต่อน้ำตาลต่อน้ำในอัตราส่วน 3:1:10 ตามลำดับ หมักนาน 3 เดือน ซึ่งจะศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักที่ระยะ เวลา 0, 30, 60 และ 90 วัน พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 238.65–4087.37 ไมโครกรัม/กรัม ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 32.97–79.91 ปริมาณกรด 0.41–12.67 g/L ปริมาณเอนานอล 2.86–6.18 g/L ปริมาณจุลินทรีย์รวม 0.1–10 CFU/ml น้ำหมักชีวภาพจากผลมะหลอดมีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นแอลกอฮอล์ มีรสเปรี้ยว น้ำหมักชีวภาพจากผลมะหลอดเปรียบเทียบกับน้ำลูกยอด้วยอาสาสมัคร พบว่า มีลักษณะเป็นที่ยอมรับใกล้เคียงกัน

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ (2557) คัดแยกแบคทีเรียแลคติก 327 สายพันธุ์จากน้ำหมักชีวภาพจากพืช 25 ตัวอย่าง จากทั้งหมดที่นำมาคัดแยก 81 ตัวอย่าง จำแนกได้ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ SK-15 และ SS-2 ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถใช้กากน้ำตาลและโปรตีนในสูตรอาหารได้ดี การเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีการทำแห้งแบบอบแห้งสุญญากาศและแบบแช่เยือกแข็ง พบอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ SK-15 และ SS-2 มีประสิทธิภาพที่ดี ตามลำดับ

สิทธิชัย ธีระสุนทรไท (2541) ผลิตน้ำหมักชีวภาพโดย เศษอาหาร 70% เศษกระดูกหมูที่เหลือจากการต้มสกัดน้ำซุป 10% เปลือกผลไม้ผสม 20% โดยแปรผันกากน้ำตาล 2 ความเข้มข้นคือ 15 และ 25 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมเศษอาหาร เมื่อหมักได้ 10 วัน จะได้ของเหลวข้น สีน้ำตาลอมแดง กลิ่นเปรี้ยวคล้ายแหนม เมื่อหมักต่อไปจนถึง 20 และ 30 วัน น้ำหมักชีวภาพมีลักษณะใสขึ้น มีกลิ่นเช่นเดิม สีออกน้ำตาลเข้มมากขึ้น เมื่อครบ 10 วัน มีค่า pH 3 เหมือนกัน แต่เมื่อหมักนานกว่า 10 วัน EM25 จะมี pH

สูงขึ้นมากกว่า EM15 ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS + $CaCO_3$ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะพบแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ (สังเกตจากบริเวณใสรอบโคโลนี ซึ่งเกิดจากกรดทำให้ $CaCO_3$ ละลาย) $\mathbf{10^6}$ CFU/ml และพบยีสต์ $\mathbf{10^3}$ CFU/ml โดยพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ใน EM25 มีมากกว่า EM15 และพบจำนวนจุลินทรีย์มากที่สุดในช่วง 10 วันแรกของการหมัก หลักจากนั้นจำนวนของจุลินทรีย์จะค่อยๆ ลดลง น้ำหมักชีวภาพทั้ง EM15 และ EM25 สามารถบำบัดน้ำเสียได้ดีกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติม EM

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล และคณะ (2547) ศึกษาองค์ประกอบทางกายภาพ เคมี และชีวเคมี ของน้ำหมักชีวภาพโดยใช้เศษวัสดุ 3 ชนิด คือ หัว พุงและเกล็ดของปลานิล และเศษผักผลไม้หลายชนิด เปรียบเทียบการหมักด้วยการเติมหัวเชื้อสับปะรด และหัวเชื้อจากแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Lactobacillus plantarum* และ *L. caseii* ในปริมาณเท่าๆ กัน พบว่าองค์ประกอบต่างๆระหว่างการหมักที่ระยะเวลา 30 45 60 และ 90 วัน มีความแปรปรวน คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ สีของน้ำหมักเป็นสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ มีค่า pH และค่า EC ที่สูงขึ้น คุณสมบัติทางเคมีพบ ธาตุอาหารหลัก (N, P และ K) และธาตุอาหารรองของพืช (Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Zn และ Cu) มีน้อยมาก องค์ประกอบของกรดลดลง องค์ประกอบทางชีวเคมี มีน้ำตาลหลายชนิดปริมาณลดลงจนถึงระดับคงที่ น่าจะเป็นดัชนีชี้บอกจุดสิ้นสุดกระบวนการหมัก และสารคล้ายฮอร์โมน GA_3 เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

คัดเลือกพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างตะกอนดิน

คัดเลือกบริเวณที่ทำการเก็บน้ำและดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีกิจกรรมหรือการสะสมของเสียในปริมาณมาก เช่น สะพานปลา สถานประกอบการ โรงแรม ร้านอาหาร ชุมชนชายฝั่งทะเล ฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการหมักในสภาพน้ำเค็ม

คัดเลือกจุลินทรีย์ทะเลเพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้นในการผลิตน้ำหมักชีวภาพในสภาวะน้ำเค็ม โดยใช้ตะกอนดินเป็นหัวเชื้อเติมลงในสารละลายกากน้ำตาล บ่มไว้นาน 30 วัน (นับเป็นรอบที่ 1) จากนั้นนำน้ำหมักรอบที่ 1 เป็นหัวเชื้อเติมลงในสารละลายกากน้ำตาล บ่มไว้นาน 30 วัน (นับเป็นรอบที่ 2) และนำน้ำหมักรอบที่ 2 เป็นหัวเชื้อเติมลงในสารละลายกากน้ำตาล บ่มไว้นาน 30 วัน (นับเป็นรอบที่ 3) เพื่อคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่สามารถเจริญได้ในสารละลายกากน้ำตาล โดยมีรายละเอียดขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมสารละลายกากน้ำตาลด้วยน้ำเค็ม อัตราส่วนกากน้ำตาล 1 ส่วนต่อน้ำเค็ม 10 ส่วน (ใช้น้ำทะเลที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
2) ชั่งตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน 38 กรัม ใส่ลงในขวดพลาสติกขนาด 380 มิลลิลิตร
3) เตรียมน้ำหมักโดยเติมลารละลายกากน้ำตาลจากข้อ 1 จนได้ปริมาตรรวม 380 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ)
4) ปิดฝาให้สนิท เขย่าให้เข้ากันนาน 2 นาที
5) ดูดน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร Tryptic Soy agar : TSA (The Difco manual, 1997) ที่เตรียมโดยใช้น้ำทะเลที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจนับความหนาแน่นของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
6) ปิดฝาขวดน้ำหมักให้สนิท ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน
7) ทำการเขย่าทุก 24 ชั่วโมง นาน 2 นาที ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้น (สังเกตจากลักษณะการบวมของขวดที่บรรจุ) จากการหมักทำการคายเกลียวฝาขวดไล่แก๊สและปิดฝาให้สนิทเหมือนเดิม
8) เมื่อครบ 30 วัน นำน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร TSA (ที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน) บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจวัดความเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
9) ใช้น้ำหมักที่ตรววจพบการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 38 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดพลาสติกขนาด 380 มิลลิลิตร
10) เติมลารละลายกากน้ำตาลจากข้อ 1 จนได้ปริมาตรรวม 380 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน

11) ทำการทดลองเหมือนในข้อ 7 และข้อ 8

12) ใช้น้ำหมักที่ตรวจพบการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 38 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดพลาสติกขนาด 380 มิลลิลิตร

13) ทำการทดลองเหมือนในข้อ 7 และข้อ 8

14) นำจุลินทรีย์ที่ตรวจพบเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปคัดแยกจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำ

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำ

1) นำโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ได้จากการหมักรอบที่ 3 ในขั้นตอนก่อนหน้านี้มาทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะ ขนาด และสี แตกต่างกัน

2) เลี้ยงบนอาหาร TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์

3) นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เขี่ยลงบนอาหาร Thiosulfate citrate bile sucrose agar : TCBS agar (The Difco manual, 1997 และ Merck microbiology manual, 1996**)** เพื่อคัดแยกเชื้อวิบริโอ

4) นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หากเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เจริญบนอาหาร TCBS agar จะคัดเชื้อนั้นออกไม่นำมาใช้ในการทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเสีย

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเสีย โดยในการทดลองให้ความสำคัญของของเสียประเภทน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งใช้ในการปรุงอาหารเป็นส่วนใหญ่ในปัจจุบัน ซึ่งโครงสร้างของน้ำมันพืชจะย่อยสลายได้ยากกว่าของเสียจำพวกแป้งและโปรตีน มีการสะสมเป็นคราบเหนียวในบริเวณต่างๆ ได้ง่าย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ลงเลี้ยงในอาหาร Yeast extract-peptone broth (ส่วนประกอบแสดงในภาคผนวก) ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง

2. นำหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 1 เติมลงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1 ส่วนต่อ 10 ส่วน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของชั้นน้ำมันถั่วเหลืองทุก 24 ชั่งโมง เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อ

3. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองได้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำน้ำหมักชีวภาพ

เลี้ยงเพิ่มปริมาณในรูปแบบน้ำหมักชีวภาพและการเก็บรักษา

1. นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ลงเลี้ยงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง

2. หัวเชื้อที่ได้เติมลงในสารละลายกากน้ำตาล ปริมาตร 1.5 ลิตร ในอัตราส่วน 1 ส่วนต่อ 10 ส่วน บรรจุในขวดจนเกือบเต็ม ปิดฝาให้สนิท

3. ตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทุก 7 วันของการหมัก

การนำไปใช้งาน

1. ทดสอบประสิทธิภาพารย่อยสลายของเสียของน้ำหมักและความหนาแน่นของจุลินทรีย์

2. ทดลองนำไปใช้งานจริงบริเวณที่กิจกรรมเกี่ยวข้องกับน้ำทะเล เช่น สะพานปลา เป็นต้น

ในขั้นตอนนี้ทำการเปรียบเทียบกับน้ำหมักชีวภาพที่ทำการหมักในสภาวะน้ำจืดโดยใช้หัวเชื้อที่มีจำหน่ายตามร้านเคมีการเกษตรโดยทั่วไป

ผลและวิจารณ์ผล

คัดเลือกพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างตะกอนดิน

จากการสำรวจพื้นที่บริเวณชายฝั่งทะเลในเขตจังหวัดชลบุรีและใกล้เคียงที่มีกิจกรรมหรือการสะสมของเสียปริมาณมาก เช่น สะพานปลา สถานประกอบการ โรงแรม ร้านอาหาร ชุมชนชายฝั่งทะเล ฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม พบว่ามีพื้นที่ที่มีความเหมาะสมในการเก็บตัวอย่างตะกอนดิน มีกิจกรรมตามที่กำหนดและสามารถเข้าถึงได้ไม่ยากจนเกินไป รวมตัวอย่างน้ำและตะกอนดินที่เก็บตัวอย่าง 350 ตัวอย่าง ได้แก่

1) บริเวณเชิงสะพานบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

2) ชายฝั่งทะเลปากคลองตำหรุ ตำบลบางทราย อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 30 ตัวอย่าง

3) บริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแครง หน้าตัวอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

4) บริเวณสะพานปลาอ่างศิลา ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

5) บริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแมงภู่อ่างศิลา ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 30 ตัวอย่าง

6) บริเวณแหลมแท่น ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 30 ตัวอย่าง

7) บริเวณสะพานปลาหาดวอนนภา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

8) บริเวณป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

9) ชายฝั่งทะเลชุมชนบางพระ ตำบลบางพระ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

10) บริเวณโดยรอบเกาะลอยศรีราชา อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

11) ป่าชายเลนชุมชนบ้านแหลมฉบัง ตำบลแหลมฉบัง อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

12) บริเวณโบสถ์กลางน้ำวัดจิตตภาวันวิทยาลัย อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

13) บริเวณชายฝั่งพัทยาเหนือ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

14) บริเวณชายฝั่งพัทยากลาง อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

15) บริเวณชายฝั่งพัทยาใต้ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

16) บริเวณชายฝั่งนาจอมเทียน อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจำนวน 20 ตัวอย่าง

ตัวอย่างดินตะกอนมีสีเทาถึงเทาเข้มจนเกือบดำ สามารถแยกตามลักษณะได้ในแบบต่างๆ ดังนี้

1) เนื้อละเอียดเหนียว ได้แก่ตัวอย่างตะกอนดินจากเชิงสะพานบางปะกง และป่าชายเลนชุมชนบ้านแหลมฉบัง

2) เนื้อละเอียดไม่เหนียว ได้แก่ตัวอย่างตะกอนดินจากบริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแครง ฟาร์มเลี้ยงหอยแมงภู่อ่างศิลา และป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น

3) เนื้อละเอียดปนทราย ได้แก่ตัวอย่างตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งทะเลปากคลองตำหรุ สะพานปลาอ่างศิลา แหลมแท่น สะพานปลาหาดวอนนภา โดยรอบเกาะลอยศรีราชา และโบสถ์กลางน้ำวัดจิตตภาวันวิทยาลัย

4) ทรายปนตะกอนละเอียด ได้แก่ตัวอย่างตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งทะเลบริเวณชุมชนบางพระ ชายฝั่งพัทยาเหนือ-กลาง-ใต้-จอมเทียน

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการหมักในสภาพน้ำเค็ม

คัดเลือกจุลินทรีย์ทะเลเพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้นในการผลิตน้ำหมักชีวภาพในสภาวะน้ำเค็ม โดยมีรูปแบบแนวทางของการทดลอง คือ 1) สามารถเจริญได้ในสารละลายกากน้ำตาล 2) ไม่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำ และ 3) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเสีย

เมื่อนำน้ำหมักที่เตรียมจากตะกอนดิน 38 กรัม ผสมกับสารละลายกากน้ำตาลปลอดเชื้อ (กากน้ำตาล 1 ส่วนต่อน้ำเค็ม 10 ส่วน ; ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร TSA (ใช้น้ำทะเลที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน) บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบการเจริญของแบคทีเรียที่เความหนาแน่นต่างๆ กัน ของน้ำหมักที่เตรียมจากแต่ละตัวอย่างดินตะกอน (ตารางที่ 1.1-1.15) ยกเว้นน้ำหมักที่เตรียมด้วยดินตะกอนทั้ง 20 ตัวอย่าง จากเชิงสะพานบางปะกงไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เมื่อทำการเตรียมน้ำหมักใหม่และทำการตรวจวัดซ้ำ รวมทั้งทิ้งระยะเวลาในวันที่ 3 ของการหมักก็ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียในดินตะกอนบริเวณนี้เคยชินกับสภาพน้ำจืดหรือน้ำกร่อยมากกว่า เมื่อนำมาเลี้ยงในสภาพน้ำ

ทะเลที่มีความเค็มจึงไม่สามารถปรับความเข้มข้นภายในเซลให้เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลได้ จึงไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาพความเค็มที่ทำการทดลอง

เมื่อนำน้ำหมักของรอบที่ 1 ที่ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร TSA บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำหมักที่เตรียมจากดินตะกอนจากบริเวณต่างๆ บางบริเวณไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเลยทุกตัวอย่างของบริเวณนั้น ได้แก่ ชายฝั่งทะเลปากคลองตำหรุ ชายฝั่งทะเลชุมชนบางพระ บริเวณโบสถ์กลางน้ำวัดจิตตภาวันวิทยาลัย บริเวณชายฝั่งพัทยาเหนือ-กลาง-ใต้-นาจอมเทียน และพบว่าน้ำหมักที่เตรียมจากตะกอนดินจากบริเวณอื่นก็มีหลายๆ ตัวอย่างที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 1.1-1.15) ได้แก่

- บริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแครง จำนวน 7 จาก 20 ตัวอย่าง
- บริเวณสะพานปลาอ่างศิลา จำนวน 4 จาก 20 ตัวอย่าง
- บริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแมงภู่อ่างศิลา จำนวน 11 จาก 30 ตัวอย่าง
- บริเวณแหลมแท่น จำนวน 18 จาก 30 ตัวอย่าง
- บริเวณสะพานปลาหาดวอนนภา จำนวน 11 จาก 20 ตัวอย่าง
- บริเวณป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น จำนวน 9 จาก 20 ตัวอย่าง
- บริเวณโดยรอบเกาะลอยศรีราชา จำนวน 12 จาก 20 ตัวอย่าง
- ป่าชายเลนชุมชนบ้านแหลมฉบัง จำนวน 11 จาก 20 ตัวอย่าง

ทั้งนี้ การที่จุลินทรีย์หรือแบคทีเรียจากน้ำหมักไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่มีการตรวจพบแบคทีเรียในวันแรกที่เริ่มทำการหมัก น่าจะมีผลมาจากปัจจัยหลัก 2 ประการ คือ

1) ไม่สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งของสารอาหารในการเจริญเติบโตได้ เนื่องจากแบคทีเรียที่มีอยู่ไม่มีเอนไซม์ในการย่อยสลายกากน้ำตาลเพื่อให้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แบคทีเรียใช้อาหารภายในเซล ในตะกอนดินที่เติมเป็นหัวเชื้อ จนหมด จากนั้นจึงลดจำนวนลงจนหมดไป หรือมีสารบางอย่างในกากน้ำตาลที่มีผลต่อเซลของแบคทีเรียหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซล

2) จุลินทรีย์ในตะกอนดินส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่เจริญในภาวะใช้อากาศเมื่อมาอยู่ระบบหมักที่ปิดฝาภาชนะสนิททำให้อากาศถ่ายเทไม่ได้ จุลินทรีย์ใช้อากาศภายในน้ำหมักจนหมด จุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้อากาศจึงเริ่มลดจำนวนลงจนไม่สามารถตรวจพบการเจริญได้

อาจเป็นเหตผลอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองประการร่วมกัน และอาจมีปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น ความเข้มข้นของสารละลายกากน้ำตาลที่ใช้อาจมีผลต่อการแพร่ของน้ำและสารต่างๆ เข้าหรือออกผ่านผนังเซลในระดับที่ผิดปกติไปทำให้ไม่สามารถดำรงสภาพความเป็นเซลของแบคทีเรียอยู่ได้

เนื่องจากเป้าประสงค์ในขั้นตอนนี้ของการทดลองต้องการคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญได้ในสารละลายกากน้ำตาล ดังนั้น จึงพิจารณาใช้น้ำหมักที่ตรวจพบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นหัวเชื้อเติมลงในสารละลายกากน้ำตาล เพื่อทำการหมักในรอบที่ 2 ต่อไป

ตารางที่ 1.1 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากชายฝั่งทะเลปากคลองตำหรุ

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	1.03×10^2	*
2	1.37×10^2	*
3	1.77×10^2	*
4	2.29×10^2	*
5	2.70×10^2	*
6	1.21×10^2	*
7	1.73×10^2	*
8	1.23×10^2	*
9	1.85×10^2	*
10	1.57×10^2	*
11	1.97×10^2	*
12	1.59×10^2	*
13	1.71×10^2	*
14	1.22×10^2	*
15	1.82×10^2	*
16	1.12×10^2	*
17	1.54×10^2	*
18	1.83×10^2	*
19	1.04×10^2	*
20	1.26×10^2	*
21	1.52×10^2	*
22	1.85×10^2	*
23	1.18×10^2	*
24	1.41×10^2	*
25	1.74×10^2	*
26	1.97×10^2	*
27	1.19×10^2	*
28	1.21×10^2	*
29	1.25×10^2	*
30	1.10×10^2	*

หมายเหตุ * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.2 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแครง

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	2.10×10^{2}	1.37×10^{4}
2	1.22×10^{2}	1.23×10^{4}
3	1.33×10^{2}	1.98×10^{3}
4	1.43×10^{2}	*
5	65	3.52×10^{4}
6	1.27×10^{2}	*
7	1.33×10^{2}	4.36×10^{4}
8	1.72×10^{2}	1.78×10^{4}
9	1.77×10^{2}	4.33×10^{4}
10	1.97×10^{2}	1.66×10^{4}
11	2.08×10^{2}	3.65×10^{4}
12	2.15×10^{2}	*
13	2.31×10^{2}	1.12×10^{5}
14	2.37×10^{2}	1.68×10^{3}
15	2.54×10^{2}	*
16	2.77×10^{2}	*
17	2.79×10^{2}	*
18	2.92×10^{2}	1.58×10^{3}
19	2.98×10^{2}	2.92×10^{4}
20	80	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.3 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	1.55×10^{2}	1.33×10^{3}
2	1.21×10^{2}	8.48×10^{3}
3	82	*
4	1.43×10^{2}	1.91×10^{4}
5	1.24×10^{2}	9.22×10^{3}
6	1.44×10^{2}	1.88×10^{3}
7	1.73×10^{2}	3.56×10^{3}

ตารางที่ 1.3 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
8	2.29×10^2	3.52×10^3
9	2.70×10^2	1.89×10^3
10	2.21×10^2	2.75×10^4
11	1.73×10^2	*
12	1.23×10^2	*
13	1.85×10^2	*
14	1.57×10^2	1.85×10^5
15	1.97×10^2	7.57×10^4
16	1.59×10^2	2.57×10^3
17	1.71×10^2	3.95×10^4
18	1.22×10^2	4.78×10^4
19	1.82×10^2	2.17×10^3
20	1.54×10^2	9.13×10^3

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.4 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแมงภู่

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	2.60×10^2	4.12×10^4
2	60	*
3	2.35×10^2	2.23×10^3
4	3.10×10^2	2.35×10^3
5	4.50×10^2	*
6	1.15×10^2	3.23×10^4
7	3.25×10^2	5.35×10^4
8	2.90×10^2	*
9	1.90×10^2	2.07×10^3
10	1.05×10^2	1.71×10^3
11	1.70×10^2	1.04×10^4
12	1.20×10^2	*
13	45	8.65×10^3

ตารางที่ 1.4 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
14	3.90×10^2	*
15	1.80×10^2	6.14×10^3
16	2.81×10^2	1.27×10^4
17	2.10×10^2	5.50×10^4
18	1.51×10^2	*
19	1.68×10^2	*
20	1.89×10^2	*
21	1.62×10^2	8.50×10^4
22	1.80×10^2	4.57×10^4
23	1.24×10^2	3.72×10^4
24	1.90×10^2	7.31×10^4
25	1.21×10^2	*
26	1.27×10^2	4.22×10^3
27	1.22×10^2	1.24×10^4
28	1.75×10^2	2.23×10^4
29	1.23×10^2	*
30	1.25×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.5 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณแหลมแท่น

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	1.87×10^2	*
2	2.47×10^2	*
3	2.67×10^2	*
4	1.29×10^2	5.25×10^3
5	2.58×10^2	1.33×10^3
6	1.29×10^2	*
7	2.07×10^2	*
8	1.13×10^2	*
9	1.62×10^2	*

ตารางที่ 1.5 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
10	1.40×10^2	*
11	2.00×10^2	*
12	1.07×10^2	2.44×10^4
13	2.67×10^2	7.34×10^5
14	1.40×10^2	2.10×10^3
15	3.87×10^2	*
16	2.05×10^2	*
17	3.69×10^2	*
18	1.03×10^2	3.33×10^3
19	2.85×10^2	5.29×10^4
20	3.56×10^2	*
21	1.01×10^2	7.04×10^4
22	91	2.07×10^3
23	74	1.32×10^3
24	60	*
25	1.44×10^2	*
26	1.98×10^2	*
27	2.99×10^2	6.55×10^3
28	2.78×10^2	4.25×10^3
29	2.18×10^2	*
30	2.16×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.6 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณสะพานปลาหาดวอนนภา

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	1.52×10^2	*
2	1.27×10^2	*
3	5.15×10^2	3.11×10^3
4	1.81×10^2	9.14×10^3
5	1.36×10^2	2.23×10^3

ตารางที่ 1.6 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
6	96	*
7	1.99×10^2	*
8	2.06×10^2	1.11×10^3
9	2.80×10^2	*
10	1.51×10^2	*
11	1.33×10^2	*
12	1.11×10^2	*
13	1.27×10^2	7.25×10^3
14	1.31×10^2	2.85×10^3
15	1.39×10^2	6.65×10^3
16	1.25×10^2	*
17	5.01×10^2	2.45×10^3
18	2.74×10^2	*
19	1.65×10^2	*
20	1.23×10^2	1.12×10^3

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.7 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	1.97×10^2	7.93×10^3
2	1.92×10^2	1.25×10^3
3	1.86×10^2	*
4	3.45×10^2	*
5	3.52×10^2	*
6	1.89×10^2	3.52×10^3
7	3.54×10^2	1.96×10^3
8	2.04×10^2	*
9	2.97×10^2	4.02×10^3
10	4.12×10^2	3.99×10^3
11	3.94×10^2	2.95×10^3

ตารางที่ 1.7 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
12	4.04×10^2	*
13	8.93×10^2	*
14	8.26×10^2	*
15	6.13×10^2	3.98×10^3
16	1.03×10^2	8.01×10^3
17	4.05×10^2	*
18	1.43×10^2	3.66×10^3
19	1.42×10^2	*
20	2.23×10^2	5.32×10^4

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.8 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากชายฝั่งทะเลชุมชนบางพระ

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	1.82×10^2	*
2	1.94×10^2	*
3	1.42×10^2	*
4	$3..60 \times 10^2$	*
5	3.28×10^2	*
6	5.85×10^2	*
7	1.61×10^2	*
8	1.16×10^2	*
9	2.29×10^2	*
10	1.91×10^2	*
11	3.21×10^2	*
12	2.44×10^2	*
13	2.65×10^2	*
14	4.54×10^2	*
15	9.18×10^2	*
16	1.91×10^2	*
17	3.21×10^2	*

ตารางที่ 1.8 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
18	4.44×10^2	*
19	1.48×10^2	*
20	4.20×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.9 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินโดยรอบเกาะลอยศรีราชา

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	1.50×10^2	*
2	8.19×10^2	*
3	1.23×10^2	*
4	1.54×10^2	1.21×10^5
5	2.17×10^2	1.52×10^3
6	1.87×10^2	*
7	2.51×10^2	5.44×10^3
8	2.67×10^2	1.40×10^3
9	4.20×10^2	*
10	4.05×10^2	7.82×10^3
11	3.12×10^2	3.21×10^4
12	3.02×10^2	*
13	4.10×10^2	2.47×10^3
14	4.42×10^2	1.45×10^3
15	4.72×10^2	*
16	4.17×10^2	*
17	1.07×10^2	*
18	8.66×10^2	*
19	7.80×10^2	*
20	1.40×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.10 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากป่าชายเลนชุมชนบ้านแหลมฉบัง

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	2.88×10^2	3.78×10^3
2	7.80×10^2	*
3	1.40×10^2	3.43×10^3
4	8.15×10^2	6.51×10^3
5	3.44×10^2	*
6	1.26×10^2	7.21×10^3
7	2.05×10^2	*
8	8.73×10^2	*
9	1.06×10^2	*
10	1.36×10^2	*
11	2.17×10^2	6.50×10^3
12	3.01×10^2	9.25×10^3
13	2.09×10^2	*
14	5.37×10^2	*
15	1.36×10^2	4.20×10^3
16	4.80×10^2	*
17	3.16×10^2	5.50×10^3
18	2.55×10^2	1.54×10^3
19	4.64×10^2	*
20	4.54×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.11 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณโบสถ์กลางน้ำวัดจิตตภาวันวิทยาลัย

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	4.53×10^2	*
2	3.74×10^2	*
3	6.21×10^2	*
4	1.62×10^2	*
5	3.40×10^2	*

ตารางที่ 1.11 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
6	5.32×10^2	*
7	1.20×10^2	*
8	1.55×10^2	*
9	1.89×10^2	*
10	7.67×10^2	*
11	1.21×10^2	*
12	2.91×10^2	*
13	96	*
14	3.11×10^2	*
15	60	*
16	2.90×10^2	*
17	2.15×10^2	*
18	70	*
19	6.49×10^2	*
20	3.23×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.12 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งพัทยาเหนือ

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	3.10×10^2	*
2	5.47×10^2	*
3	6.71×10^2	*
4	4.34×10^2	*
5	2.47×10^2	*
6	1.95×10^2	*
7	1.85×10^2	*
8	2.25×10^2	*
9	1.70×10^2	*
10	2.70×10^2	*
11	70	*

ตารางที่ 1.12 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
12	1.74×10^2	*
13	1.94×10^2	*
14	3.30×10^2	*
15	6.21×10^2	*
16	4.85×10^2	*
17	5.74×10^2	*
18	5.83×10^2	*
19	1.16×10^2	*
20	1.78×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.13 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งพัทยากลาง

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	1.50×10^2	*
2	3.50×10^2	*
3	3.00×10^2	*
4	3.90×10^2	*
5	2.05×10^2	*
6	4.50×10^2	*
7	3.50×10^2	*
8	2.95×10^2	*
9	2.50×10^2	*
10	1.80×10^2	*
11	2.00×10^2	*
12	2.50×10^2	*
13	2.90×10^2	*
14	5.00×10^2	*
15	2.70×10^2	*
16	4.00×10^2	*
17	1.70×10^2	*

ตารางที่ 1.13 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
18	2.95×10^2	*
19	2.50×10^2	*
20	1.80×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.14 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งพัทยาใต้

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	2.31×10^2	*
2	2.11×10^2	*
3	1.90×10^2	*
4	1.74×10^2	*
5	2.78×10^2	*
6	3.17×10^2	*
7	2.72×10^2	*
8	1.94×10^2	*
9	7.77×10^2	*
10	2.13×10^2	*
11	7.77×10^2	*
12	3.69×10^2	*
13	3.89×10^2	*
14	3.60×10^2	*
15	4.40×10^2	*
16	3.80×10^2	*
17	4.20×10^2	*
18	1.74×10^2	*
19	3.88×10^2	*
20	2.94×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.15 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เตรียมด้วยตะกอนดินจากบริเวณชายฝั่งนาจอมเทียน

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก (cfu/mL)	
	วันที่ 0	วันที่ 30
1	2.21×10^2	*
2	3.58×10^2	*
3	3.18×10^2	*
4	1.36×10^2	*
5	1.84×10^2	*
6	2.26×10^2	*
7	2.53×10^2	*
8	88	*
9	3.31×10^2	*
10	4.09×10^2	*
11	70	*
12	1.50×10^2	*
13	2.44×10^2	*
14	1.13×10^2	*
15	1.90×10^2	*
16	3.52×10^2	*
17	1.80×10^2	*
18	1.68×10^2	*
19	3.20×10^2	*
20	2.00×10^2	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อใช้น้ำหมักของรอบที่ 1 เติมลงในสารละลายกากน้ำตาล ทำการบ่มรอบที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร TSA บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่ายังมีน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยดินตะกอนจากบริเวณต่างๆ ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ บริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแครง บริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแมงภู่อ่างศิลา บริเวณสะพานปลาหาดวอนนภา โดยรอบเกาะลอยศรีราชา และป่าชายเลนชุมชนบ้านแหลมฉบัง ส่วนของสะพานปลาอ่างศิลา แหลมแท่น และป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น นั้น แม้ว่าจะยังพบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเชื้ออยู่แต่จำนวนตัวอย่างก็ลดน้อยลงจากการหมักในรอบที่ 1 (ตารางที่ 2.1-2.3) จากผลการทดลองดังกล่าวพอจะเป็นการชี้ให้เห็นได้ว่าแบคทีเรียที่ตรวจพบในรอบที่ 1 แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในการหมักรอบที่ 2 นั้น ใช้กากน้ำตาลได้ในขณะที่มีตะกอนดินที่เติมเป็นหัวเชื้อประกอบอยู่ในน้ำหมัก

ด้วย จุลินทรีย์อาจได้รับสารบ้างอย่างที่ต้องการในปริมาณน้อยๆ แต่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (Growth factor) จากตะกอนดิน จึงทำให้แบคทีเรียดังกล่าวใช้กากน้ำตาลและเจริญเติบโตอยู่ได้ เมื่อดูดน้ำหมักเติมลงในการหมักรอบที่ 2 ไม่มีส่วนของตะกอนดินหรือสารที่ละลายออกมาจากตะกอนดินติดมาด้วย หรือติดมาน้อยมากไม่พอเพียงต่อความต้องการในการเจริญเติบโตของเซล จึงทำให้ไม่สามารถเจริญในกากน้ำตาล ในการหมักรอบที่ 2 นี้ เป็นการคัดกรองอย่างดีเพื่อให้ได้แบคทีเรียที่เจริญได้จริงๆ ในกากน้ำตาล ดังนั้น จึงพิจารณาใช้น้ำหมักในรอบที่ 2 ที่ตรวจพบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นหัวเชื้อเติมลงในสารละลายกากน้ำตาล เพื่อทำการหมักในรอบที่ 3 ต่อไป

ตารางที่ 2.1 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/mL)
1	*
2	2.58×10^3
4	*
5	*
6	*
7	5.55×10^3
8	4.23×10^3
9	1.25×10^4
10	*
14	*
15	*
16	*
17	1.35×10^3
18	7.25×10^5
19	1.72×10^3
20	2.98×10^3

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 2.2 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากบริเวณแหลมแท่น

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/mL)
4	*
5	*
12	4.41×10^3
13	1.24×10^3
14	8.60×10^3

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/mL)
18	1.28×10^4
19	*
21	*
22	2.18×10^4
23	*
27	*
28	*

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 2.3 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/mL)
1	*
2	6.11×10^3
6	1.86×10^3
7	*
9	*
10	2.05×10^3
11	9.33×10^3
15	*
16	*
18	*
20	2.62×10^3

หมายเหต * = ไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อใช้น้ำหมักของรอบที่ 2 เติมลงในสารละลายกากน้ำตาล ทำการบ่มรอบที่ 3 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร TSA บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่ามีความชัดเจนมากขึ้น น้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยดินตะกอนจากบริเวณต่างๆ ที่ตรวจพบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงในรอบที่ 2 ยังคงตรวจพบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงในรอบที่ 3 ได้เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3.1-3.3) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่เจริญต่อเนื่องในการหมักรอบที่ 2 และ 3 สามารถเจริญได้ในสารละลายกากน้ำตาล จึงพิจารณานำโคโลนีที่ตรวจพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการทดสอบว่าเป็นแบคทีเรียวิบรีโอซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำหรือไม่ให้ขึ้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.1 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/mL)
2	1.81×10^4
7	9.32×10^5
8	7.66×10^3
9	6.18×10^2
17	4.16×10^5
18	3.35×10^3
19	2.55×10^3
20	3.04×10^4

ตารางที่ 3.2 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากบริเวณแหลมแท่น

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/mL)
12	5.52×10^3
13	4.54×10^3
14	5.65×10^2
18	1.25×10^3
22	2.45×10^3

ตารางที่ 3.3 จำนวนแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น

ตัวอย่างที่	โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/mL)
2	4.27×10^3
6	5.32×10^3
10	1.18×10^2
11	9.51×10^2
20	1.11×10^3

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำ

เมื่อนำโคโลนีของแบคทีเรียของน้ำหมักที่ได้จากตัวอย่างตะกอนดิน 3 แหล่ง คือ ชายทะเลบริเวณแหลมแท่น บริเวณสะพานปลาอ่างศิลา และป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น ที่ผ่านการเลี้ยงจากขั้นตอนก่อนหน้านี้มาทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะ ขนาด และสี ที่แตกต่างกัน เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำ โดยพบว่า

น้ำหมักจากดินตะกอนบริเวณแหลมแท่นมีการเจริญของแบคทีเรียในลักษณะโคโลนีต่างๆ กัน คือ 1) กลมนูน สีขาวขุ่น ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร 2) กลมแบนราบ สีขาวขุ่น ผิวเรียบด้าน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร 3) กลมนูน ใส ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร

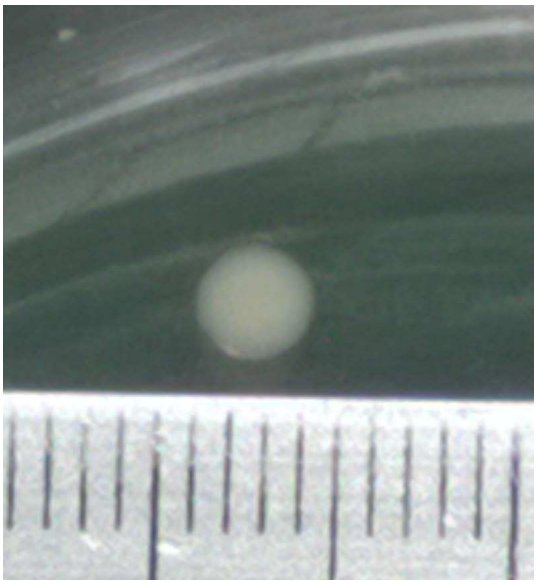
และ 4) กลมแบนราบ สีขาวขุ่น ผิวหยักด้าน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้มาทำการเขี่ยลงบนอาหาร TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ กำหนดให้ใช้รหัส คือ ท.1 ท.2 ท.3 และ ท.4 ตามลำดับ (รูปที่ 1.1-1.4)

น้ำหมักจากดินตะกอนบริเวณสะพานปลาอ่างศิลามีการเจริญของแบคทีเรียในลักษณะโคโลนีต่างๆ กัน คือ 1) กลมแบนราบ สีขาวทึบ ผิวหยัก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเริ่มต้น 2 มิลลิเมตร แต่สามารถขยายออกด้านข้างได้เห็นรอยต่อของส่วนที่ขยายได้ชัดเจน 2) กลมแบนราบ ใส ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร 3) กลมนูน ใส ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร 4) ลักษณะโคโลนีไม่แน่ชัด สีขาวปนเหลือง ผิวเรียบมัน ขนาดไม่สามารถระบุได้เพราะเจริญขยายจนเต็มผิวอาหารแข็ง และ 5) กลมแบนราบ สีขาวกึ่งใส ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้มาทำการเขี่ยลงบนอาหาร TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ กำหนดให้ใช้รหัส คือ อ.1 อ.2 อ.3 อ.4 และ อ.5 ตามลำดับ (รูปที่ 2.1-2.5)

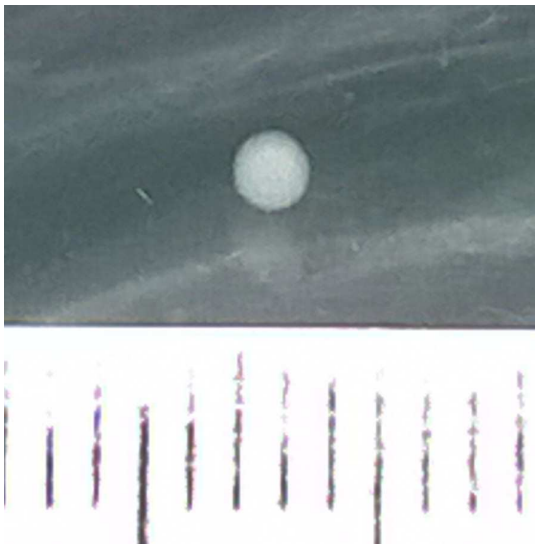
น้ำหมักจากดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็นมีการเจริญของแบคทีเรียในลักษณะโคโลนีต่างๆ กัน คือ 1) กลมนูน ใสกึ่งขุ่น ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร 2) กลม ใส ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร 3) กลมแบนราบ ใสกึ่งขุ่น ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร 4) กลมนูน สีขาวขุ่น ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร 5) กลมแบนราบ ใสกึ่งขุ่น ความขุ่นของโคโลนีไล่จากส่วนกลางออกไปจนจางลง ที่ขอบโคโลนีเมีขอบเหมือนวงแหวนล้อมรอบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร และ 6) กลมนูน ใส ผิวเรียบมัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้มาทำการเขี่ยลงบนอาหาร TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ กำหนดให้ใช้รหัส คือ ม.1 ม.2 ม.3 ม.4 ม.5 และ ม.6 ตามลำดับ (รูปที่ 3.1-3.6)

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์แต่ละตัวที่ได้เขี่ยลงบนอาหาร TCBS agar ที่เตรียมโดยใช้น้ำทะเลที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

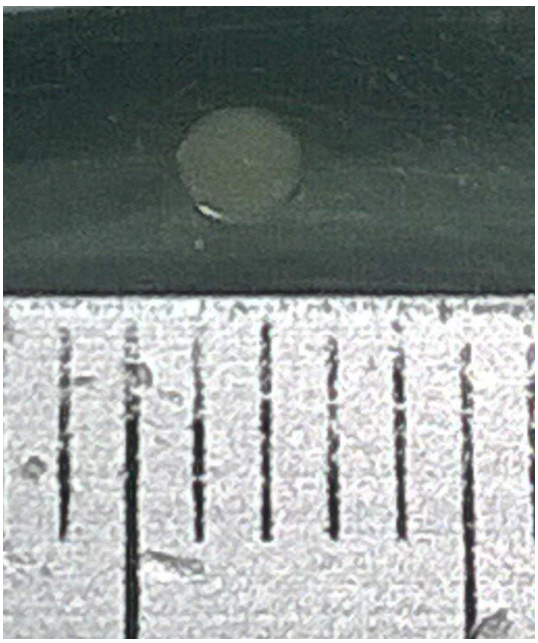
จากการทดสอบเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไม่เจริญบนอาหาร TCBS agar แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่ใช่แบคทีเรียวิบรีโอ ทั้งนี้ให้ความสำคัญอย่างมากว่าเป็นแบคทีเรียวิบริโอหรือไม่ เพราะเป็นตัวหลักของการเกิดโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม และเป็นเกณฑ์มาตรฐานที่จะต้องไม่พบแบคทีเรียวิบรีโอในการตรวจวิเคราะห์ก่อนส่งอาหารทะเลออกจำหน่ายร่วมกับการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียบ่งชี้ตัวอื่น เพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหารและการแพร่ระบาดของเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงพิจารณานำแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป



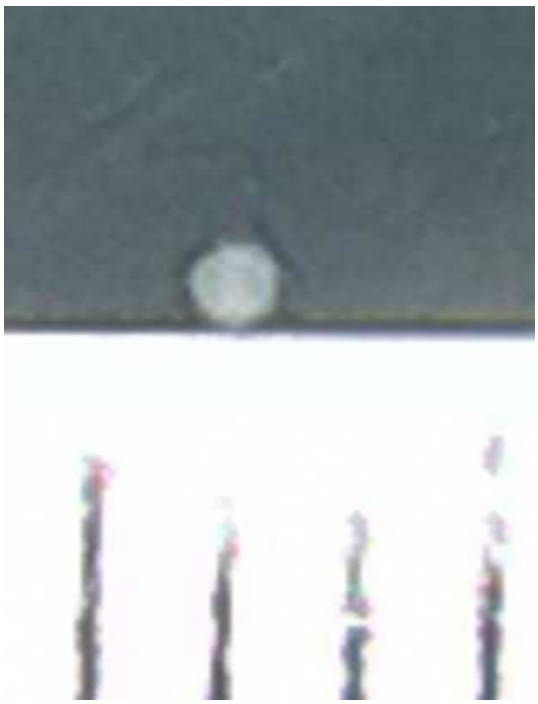
รูปที่ 1.1 ลักษณะโคโลนีของ ท.1



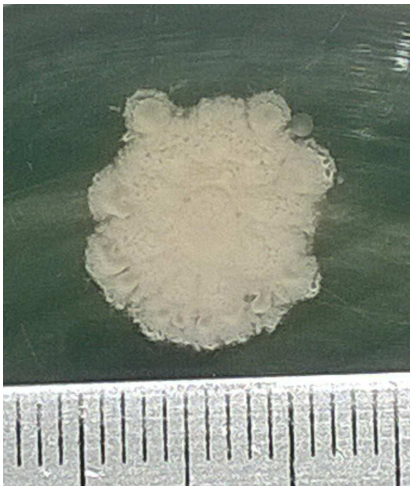
รูปที่ 1.2 ลักษณะโคโลนีของ ท.2



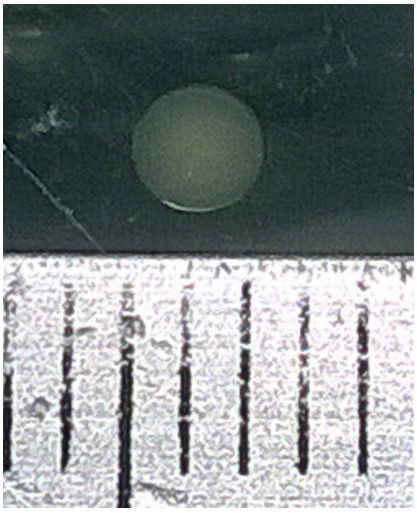
รูปที่ 1.3 ลักษณะโคโลนีของ ท.3



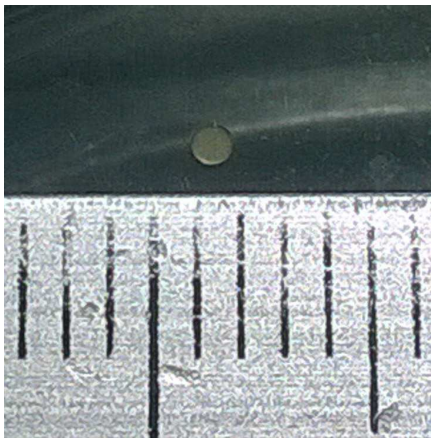
รูปที่ 1.4 ลักษณะโคโลนีของ ท.4



รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีของ อ.1

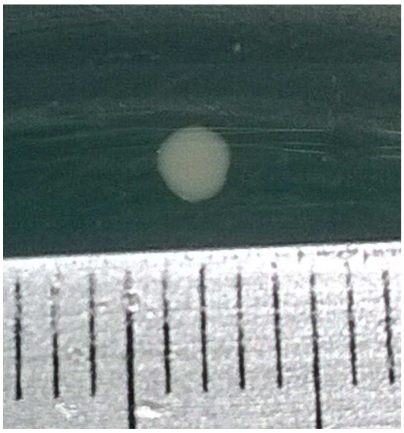


รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของ อ.2

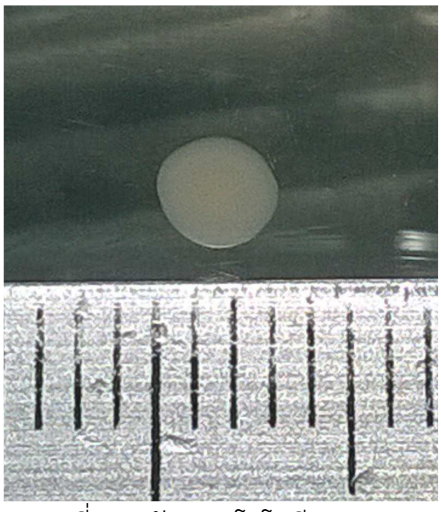


รูปที่ 2.3 ลักษณะโคโลนีของ อ.3

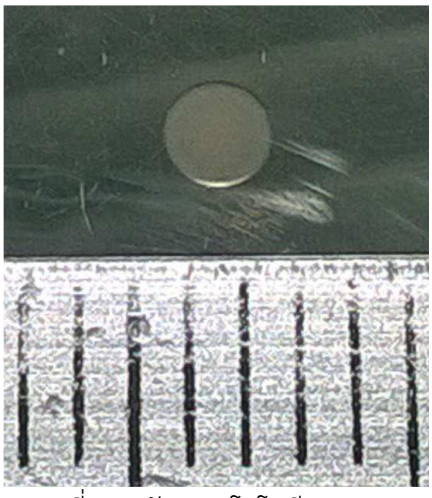
รูปที่ 2.4 ลักษณะโคโลนีของ อ.4



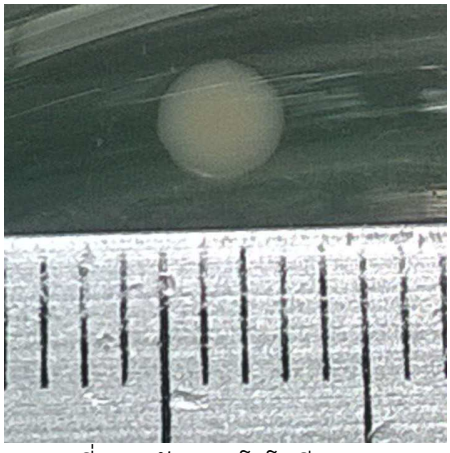
รูปที่ 2.5 ลักษณะโคโลนีของ อ.5



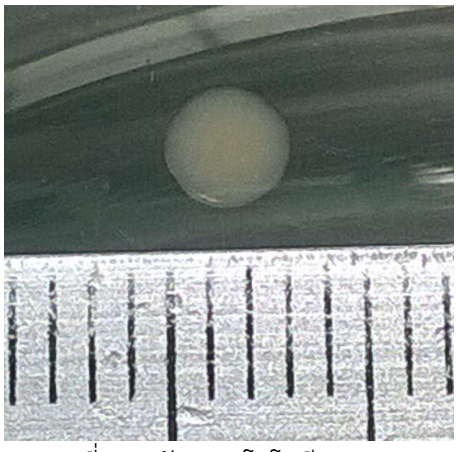
รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของ ม.1



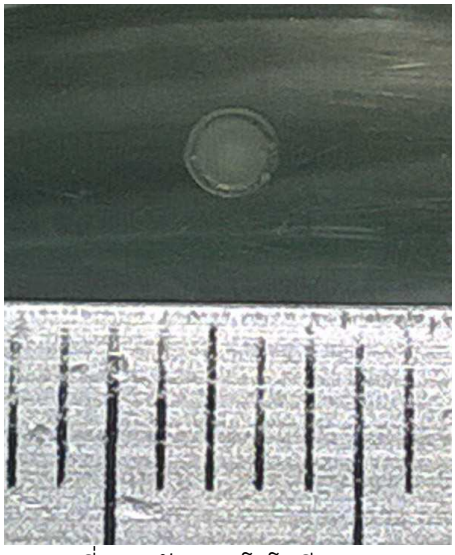
รูปที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีของ ม.2



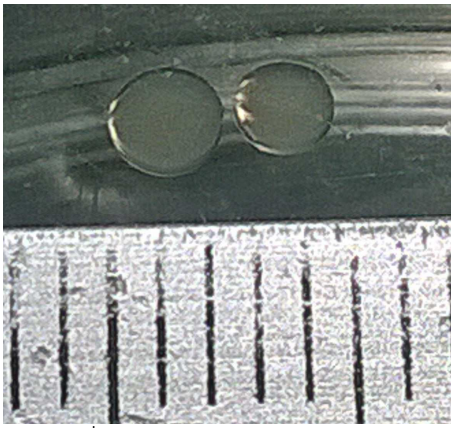
รูปที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีของ ม.3



รูปที่ 3.4 ลักษณะโคโลนีของ ม.4



รูปที่ 3.5 ลักษณะโคโลนีของ ม.5



รูปที่ 3.6 ลักษณะโคโลนีของ ม.6

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเสีย

เมื่อนำแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มด้วยตะกอนดินบริเวณแหลมแท่น สะพานปลาอ่างศิลา และป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น ที่คัดเลือกได้ลงเลี้ยงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ จากนั้นเติมหัวเชื้อที่ได้ลงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1 ส่วนต่อ 10 ส่วน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อ ในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าชั้นน้ำมันถั่วเหลืองที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มด้วยตะกอนดินบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา คือ อ.2 มีการกระจายตัวเป็นปุยขาวด้านล่างของชั้นน้ำมันพืชลักษณะเหมือนจะละลายลงไปในชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ และในวันต่อๆ มา ปุยสีขาวของชั้นน้ำมันมีลักษณะฟูมากขึ้น ในวันที่ 7 ของการทดลองสังเกตุเห็นมีชิ้นของปุยสีขาวเล็กๆ หลุดลอยอยู่ในชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ และชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขาวขุ่นมากขึ้นตามลำดับ (รูปที่ 4) ส่วนชุดการทดลองอื่นที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรียของน้ำหมักที่เริ่มด้วยตะกอนดินจากตัวอย่างอื่นๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของชั้นน้ำมันถั่วเหลืองมีลักษณะเช่นเดียวกับชุดควบคุม

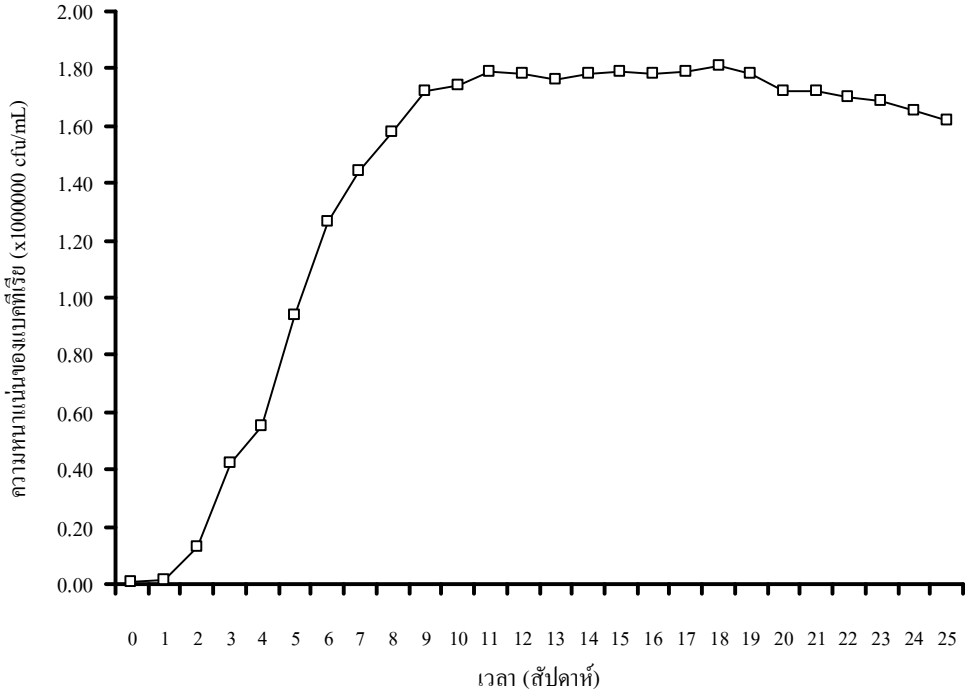
จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเสียของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรียรหัส อ.2 ของน้ำหมักที่เริ่มด้วยตะกอนดินบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา สามารถทำให้เกิดการย่อยสลายของน้ำมันถั่วเหลืองจนอยู่ในสภาพที่สามารถละลายได้ในชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงพิจารณาคัดเลือกแบคทีเรียรหัส อ.2 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักน้ำหมักชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 4 ลักษณะการย่อยสลายของชั้นน้ำมันถั่วเหลือง

เลี้ยงเพิ่มปริมาณในรูปแบบน้ำหมักชีวภาพและการเก็บรักษา

เมื่อนำแบคทีเรียรหัส อ.2 ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ลงเลี้ยงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ จากนั้นเติมหัวเชื้อที่ได้ลงในสารละลายกากน้ำตาล ปริมาตร 1.5 ลิตร ในอัตราส่วน 1 ส่วนต่อ 10 ส่วน บรรจุในขวดจนเกือบเต็ม ปิดฝาให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจวัดปริมาณความหนาแน่นของแบคทีเรียทุก 7 วันของการหมัก พบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ในสัปดาห์ที่ 5 ของการหมัก ลักษณะการหมักผิดปกติจากที่เคยเป็น ไม่ผลิตแก๊สในช่วงของการหมัก โดยปกติจะดันขวดพลาสติกจนมีลักษณะบวม ต้องคายเกลียวไล่แก๊สเป็นระยะ

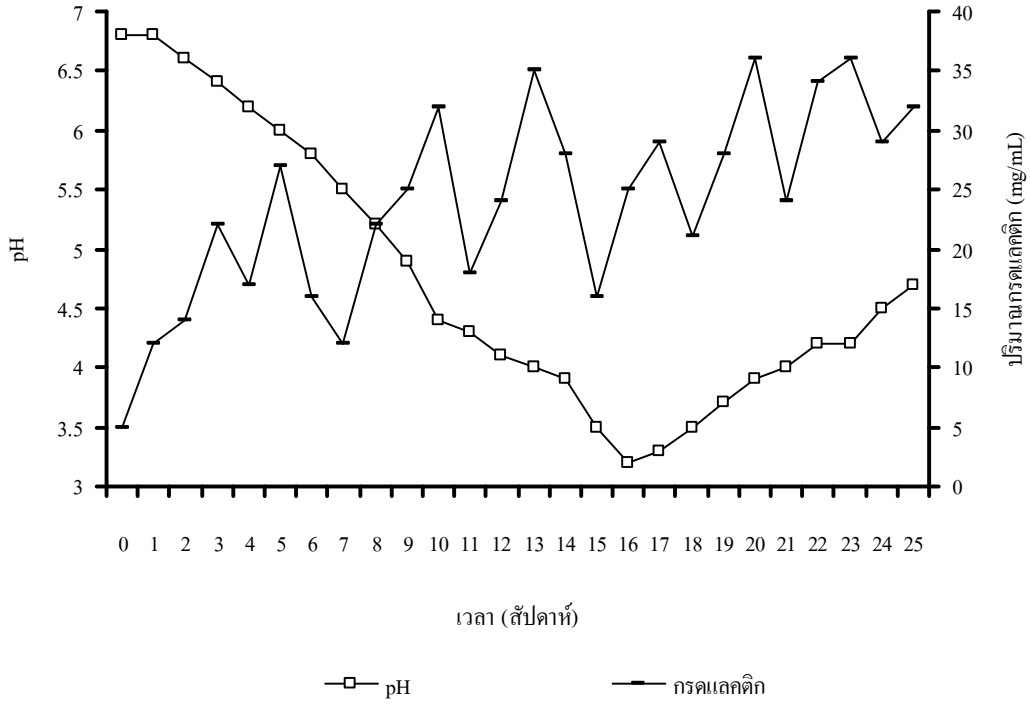
จากผลการทดลองแสดงว่าแบคทีเรียรหัส อ.2 ไม่สามารถเจริญได้ในสารละลายกากน้ำตาล ซึ่งขัดกับผลการทดลองในขั้นต้นที่สามารถแยกเชื้อได้จากการหมักในรอบต่างๆ และเมื่อนำน้ำหมักที่ยังเก็บไว้มาทดสอบแยกเชื้อซ้ำ ก็ยังพบการเจริญของแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแบบเดียวกับแบคทีเรียรหัส อ.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการค้นคว้าไม่พบการหมักน้ำชีวภาพที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวๆ ในการหมัก อาจเป็นเพราะการเจริญในสารละลายกากน้ำตาล ต้องมีย่อยสลายและผลิตสารต่างๆ ส่งต่อกันระหว่างจุลินทรีย์ที่เจริญในน้ำหมัก ปกติในน้ำหมักชีวภาพจะสามารถตรวจพบได้ทั้งแบคทีเรียและยีสต์ (สิทธิชัย ธีระสุนทรไท , 2541) ดังนั้นจึงพิจารณาหมักสารละลายกากน้ำตาลโดยใช้แบคทีเรียรหัส อ.2 ร่วมกับแบคทีเรียรหัสอื่นๆ ที่เจริญอยู่ในน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยตะกอนดินจากสะพานปลาอ่างศิลา โดยเลี้ยงแบคทีเรียรหัส อ.1 อ.2 อ.3 อ.4 และ อ.5 แต่ละตัวในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ จากนั้นเติมหัวเชื้อที่ได้ลงในสารละลายกากน้ำตาล ปริมาตร 1.5 ลิตร ในอัตราส่วนตัวละ 0.2 ส่วนต่อ 10 ส่วน ทั้ง 5 ตัวๆ ละ 30 มิลลิลิตร รวมเป็น 1 ส่วนต่อ 10 ส่วน บรรจุในขวดจนเกือบเต็ม ปิดฝาให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิห้อง พบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตลอดช่วงระยะเวลา 10 สัปดาห์ของการหมัก เริ่มคงตัวจากสัปดาห์ที่ 10-19 ของการหมัก ในช่วง 1.74×10^{6}-1.81×10^{6} โคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก สัปดาห์ที่ 20-25 เริ่มลดลงตามลำดับ (รูปที่ 5 และตารางผนวกที่ 1) และพบว่าเริ่มมีการผลิตแก๊สในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของการหมักจนเข้าสู่สัปดาห์ที่ 12 ของการหมักจึงลดลงไม่ต้องคายเกลียวไล่แก๊ส



รูปที่ 5 ความหนาแน่นของแบคทีเรียในน้ำหมัก

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย อ.2 สามารถเจริญได้ในสารละลายกากน้ำตาลร่วมกับแบคทีเรียตัวอื่นที่แยกได้จากน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยดินตะกอนบริเวณสะพานปลาอ่างศิลา เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญของแบคทีเรียในน้ำหมักพบว่ามีรูปแบบตามมาตรฐานของจุลินทรีย์โดยทั่วไป คือ การเจริญช่วงปรับสภาพ (lag phase) ในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการหมัก การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (log phase) ในช่วงสัปดาห์ที่ 2-10 ของการหมัก การเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ในช่วงสัปดาห์ที่ 10-19 ของการหมัก และการเจริญเติบโตลดลง (dead phase) หลังจากสัปดาห์ที่ 19 ของของการหมัก ดังนั้นจึงพิจารณาใช้น้ำหมักที่อายุการหมัก 9-10 สัปดาห์ (ประมาณ 2 เดือน) เป็นหัวเชื้อเติมลงในสารละลายกากน้ำตาลในการหมักครั้งต่อไป เพราะยังเป็นช่วงที่แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตที่ดี

ค่า pH ของน้ำหมักลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดช่วง 16 สัปดาห์แรกของการหมักมีค่าเท่ากับ 3.2 จากนั้นเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 25 มีค่าเท่ากับ 4.7 พบปริมาณกรดแลคติกในน้ำหมักเปลี่ยนแปลงขึ้นลงตลอดช่วงการทดลอง ระหว่าง 5 ถึง 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 6 และตารางผนวกที่ 2)



รูปที่ 6 ค่า pH และปริมาณกรดแลคติกของน้ำหมักชีวภาพ

จากการทดลองจะเห็นว่าปริมาณกรดแลคติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับค่า pH ที่ลดลงในช่วง 16 สัปดาห์แรกของการทดลอง หลังจากนั้นถึงแม้ว่าปริมาณกรดแลคติกจะเพิ่มขึ้นแต่ค่า pH ก็มีแนวโน้มกลับสูงขึ้นจนสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 25 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในน้ำหมักอาจผลิตกรดตัวอื่นด้วย นอกจากกรดแลคติก ในน้ำหมักชีวภาพอาจตรวจพบทั้งสารประกอบฟีนอลิก กรดอินทรีย์ และแอลกอฮอล (สมหมาย ปัตตาลี, 2551) ค่า pH ได้อิทธิพลจากปริมาณกรดโดยรวมที่แบคทีเรียผลิตขึ้นในน้ำหมักในช่วง 16 สัปดาห์แรก และเมื่อมีการเปลี่ยนรูปจากกรดไปเป็นแอลกอฮอร์หรือสารอื่นโดยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียที่เจริญเติบโตร่วมกันอยู่ในน้ำหมัก (พิมพร, 2557) เมื่อกรดโดยรวมลดลงจึงทำให้ค่า pH ของน้ำหมักมีแนวโน้มกลับสูงขึ้น ในส่วนนี้ควรทำการศึกษาให้ชัดเจนยิ่งขึ้นถึงชนิดและปริมาณกรดทั้งหมดที่ผลิตขึ้นในน้ำหมัก รวมทั้งศึกษาถึงสภาพเสถียรหรือบัฟเฟอร์ของน้ำหมักด้วย ซึ่งจะทำให้สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงได้อย่างถูกต้องและชัดเจนยิ่งขึ้น

การนำไปใช้งาน

เมื่อนำน้ำหมักชีวภาพที่มีอายุการหมัก 9 สัปดาห์ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ เป็นหัวเชื้อเติมลงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1 ส่วนต่อ 10 ส่วน บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาพน้ำจืดโดยใช้หัวเชื้อที่มีจำหน่ายตามร้านการเกษตรทั่วไป (รูปที่ 7) ทำการทดลองโดยใช้ความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน พบว่าด้านล่างของชั้นน้ำมันถั่วเหลืองของชุด

ทดสอบเริ่มมีการกระจายตัวเป็นปุยสีขาวเมื่อครบ 24 ชั่วโมงของการทดลอง และละลายปนกับชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อได้หมดภายใน 11 วันของทดลอง เมื่อทิ้งไว้นาน 30 วัน พบว่าสีขาวขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองกระจายปนอยู่มีความขาวขุ่นลดลงอย่างเห็นได้ชัด ส่วนชุดควบคุมที่ใช้น้ำหมักชีวภาพในสภาพน้ำจืดพบการกระจายตัวด้านล่างของชั้นน้ำมันถั่วเหลืองที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดลองเช่นกัน แต่การกระจายตัวน้อยมากมีลักษณะเป็นเพียงชั้นสีขาวบางๆ ด้านล่างเท่านั้น ไม่พบการกระจายตัวปนในชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำน้ำเลี้ยงของชุดทดสอบไปเกลี่ยบนอาหาร TSA (ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน) พบว่ามีความหนาแน่นของแบคทีเรียในช่วง 1.25×10^4 – 1.55×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ส่วนของชุดควบคุมที่นำไปเกลี่ยบนอาหาร TSA (น้ำกลั่น) ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 7 หัวเชื้อน้ำหมักชีวภาพสำหรับการหมักในสภาพน้ำจืด

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยแบคทีเรียจากตะกอนดินสะพานปลาอ่างศิลาสามารถทำการย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีการเจริญของแบคทีเรียอย่างต่อเนื่อง ส่วนน้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาพน้ำจืดเมื่อนำมาใช้ในน้ำที่มีความเค็ม เอ็นไซม์หรือสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นไม่สามารถทำงานได้ดี จึงไม่ทำให้เกิดการย่อยสลายของชั้นน้ำมันถั่วเหลือง อาจมีประสิทธิภาพบ้างเล็กน้อยเพราะพบเพียงชั้นสีขาวบางๆ ของชั้นน้ำมันถั่วเหลือง และมีความชัดเจนในส่วนของตัวเซลจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์น้ำจืด เมื่อมาอยู่ในน้ำเค็มก็ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมและดำรงชีวิตอยู่ได้ จึงไม่สามารถตรวจพบได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

เมื่อนำน้ำหมักชีวภาพที่เริ่มต้นด้วยแบคทีเรียจากตะกอนดินสะพานปลาอ่างศิลาเจือจางด้วยน้ำทะเล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100 ส่วน และน้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาพน้ำจืดเจือจางด้วยน้ำประปาที่เปิดใส่ภาชนะทิ้งไว้นาน 48 ชั่วโมง (ไล่คลอรีน) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100 ส่วน เช่นเดียวกัน ไปทดลองฉีดพ่นบริเวณใต้สะพานปลาหาดวอนนภาในส่วนที่มีการสะสมของตะกอนเลน ตั้งแต่เวลาที่น้ำทะเลลดระดับลงใหม่ๆ เพื่อให้ได้ระยะเวลานานในการทำงานของน้ำหมักชีวภาพ ก่อนที่น้ำทะเลจะขึ้นสูงอีกครั้ง โดยแบ่ง

พื้นที่แบบสุ่มได้ว่า ซีกด้านขวาฉีดพ่นด้วยน้ำหมักชีวภาพที่เริ่มต้นด้วยแบคทีเรียจากตะกอนดินสะพานปลาอ่างศิลา ซีกด้านซ้ายฉีดพ่นด้วยน้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาพน้ำจืด มีความกว้างยาวของแต่ละพื้นที่ด้านละ 2 เมตร เว้นระยะห่างระยะพื้นที่ทั้งสอง 5 เมตร ปล่อยทิ้งไว้จนน้ำทะเลขึ้น กลับมาทำการสังเกตความเปลี่ยนแปลงในเวลาน้ำลงของวันรุ่งขึ้น และทำการฉีดพ่นซ้ำในพื้นที่เดิม ทำการฉีดพ่นเช่นนี้อยู่ 3 วัน จึงสามารถสังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลงได้ คือ บริเวณที่ฉีดพ่นด้วยน้ำหมักชีวภาพที่เริ่มต้นด้วยแบคทีเรียจากตะกอนดินสะพานปลาอ่างศิลา ตะกอนเลนมีสีอ่อนลงจากสีดำเข้มเป็นสีเทา ตะกอนเลนมีกลิ่นเหม็นคาวน้อยลง ส่วนบริเวณที่ฉีดพ่นด้วยน้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาพน้ำจืด สีของตะกอนเลนยังคงมีสีดำเข้มและมีกลิ่นเหม็นคาวเหมือนเดิมเช่นเดียวกับบริเวณอื่นที่ไม่ได้ทำการฉีดพ่นน้ำหมักชีวภาพ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำหมักที่เริ่มต้นด้วยแบคทีเรียจากตะกอนดินสะพานปลาอ่างศิลาสามารถปรับสภาพตะกอนเลนบริเวณใต้สะพานปลาหาดวอนนภาได้ แบคทีเรียในน้ำหมักอาจช่วยย่อยสลายหรือส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายของเสียในตะกอนเลนได้ ซึ่งในส่วนนี้อาจต้องทำการทดสอบในหลายๆ ด้านให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น แต่จากประสิทธิภาพของแบคทีเรียและน้ำหมักชีวภาพที่สามารถย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองได้ น่าจะสามารถนำไปใช้ในการบำบัดหรือย่อยสลายของเสียที่มีโครงสร้างในทำนองเดียวกันได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงการยอมรับของครัวเรือนและชุมชนที่จะนำไปใช้ด้วย เนื่องจากยังพบว่ามีปัญหาและอุปสรรคในการทำน้ำหมักชีวภาพและการนำไปใช้ เนื่องจากวัตถุดิบและอุปกรณ์สำหรับใช้หมักหาซื้อได้ยากและมีราคาสูง ขั้นตอนการหมักยุ่งยาก มีกลิ่นเหม็น ไม่มีพื้นที่ในการจัดวางอุปกรณ์และถังหมัก และประชาชนยังไม่มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับน้ำหมักชีวภาพ (รัตนจิตต์ อัตราชีวะ , 2551)

รูปที่ 8 น้ำหมักชีวภาพที่เริ่มต้นด้วยแบคทีเรียจากตะกอนดินสะพานปลาอ่างศิลา

สรุปผลการวิจัย

จากการสำรวจพื้นที่บริเวณชายฝั่งทะเลในเขตจังหวัดชลบุรีและใกล้เคียงที่มีกิจกรรมหรือการสะสมของเสียปริมาณมาก เช่น สะพานปลา สถานประกอบการ โรงแรม ร้านอาหาร ชุมชนชายฝั่งทะเล ฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม พบพื้นที่ที่มีกิจกรรมตามที่กำหนดและสามารถเข้าถึงได้ไม่ยากจนเกินไป ได้แก่ บริเวณเชิงสะพานบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ชายฝั่งทะเลปากคลองตำหรุ ตำบลบางทราย บริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแครง หน้าตัวอำเภอเมืองชลบุรี บริเวณสะพานปลาอ่างศิลา บริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแมงภู่อ่างศิลา บริเวณแหลมแท่น บริเวณสะพานปลาหาดวอนนภา บริเวณป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น ชายฝั่งทะเลชุมชนบางพระ บริเวณโดยรอบเกาะลอยศรีราชา ป่าชายเลนชุมชนบ้านแหลมฉบัง บริเวณโบสถ์กลางน้ำวัดจิตตภาวันวิทยาลัย บริเวณชายฝั่งพัทยาเหนือ พัทยากลาง พัทยาใต้ นาจอมเทียน รวมตัวอย่างน้ำและตะกอนดินที่เก็บตัวอย่าง 350 ตัวอย่าง เพื่อนำมาคัดเลือกแบคทีเรียน้ำเค็มในการผลิตน้ำหมักชีวภาพในสภาวะน้ำเค็ม โดยมีแนวทางการทดลอง คือ 1) สามารถเจริญได้ในสารละลายกากน้ำตาล 2) ไม่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำ และ 3) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเสีย

เมื่อนำน้ำหมักที่เตรียมจากตะกอนดินผสมกับสารละลายกากน้ำตาลปลอดเชื้อ เกลี่ยบนอาหาร TSA พบการเจริญของแบคทีเรียของน้ำหมักที่ได้จากตัวอย่างตะกอนดิน 3 แหล่ง คือ ชายทะเลบริเวณแหลมแท่น กำหนดใช้รหัส คือ ท.1 ท.2 ท.3 และ ท.4 ตามลำดับ บริเวณสะพานปลาอ่างศิลา กำหนดใช้รหัส คือ อ.1 อ.2 อ.3 อ.4 และ อ.5 ตามลำดับ และป่าชายเลนปากคลองน้ำเหม็น กำหนดใช้รหัส คือ ม.1 ม.2 ม.3 ม.4 ม.5 และ ม.6 ตามลำดับ แบคทีเรียแต่ละตัวที่ได้ไม่เจริญบนอาหาร TCBS agar

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ลงเลี้ยงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมหัวเชื้อที่ได้ลงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที พบว่าชั้นน้ำมันถั่วเหลืองที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย อ.2 มีการกระจายตัวเป็นปุยขาวด้านล่างของชั้นน้ำมันในวันที่ 3 ของการทดลอง และมีลักษณะฟูมากขึ้น มีชิ้นของปุยสีขาวเล็กๆ หลุดลอยอยู่ในชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขาวขุ่นมากขึ้นตามลำดับในวันต่อๆ มา

เมื่อนำแบคทีเรียรหัส อ.2 ที่คัดเลือกได้เติมลงในสารละลายกากน้ำตาล พบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ในสัปดาห์ที่ 5 ของการหมัก และไม่ผลิตแก๊ส แต่เมื่อใช้แบคทีเรียรหัส อ.2 ร่วมกับแบคทีเรียรหัส อ.1 อ.3 อ.4 และ อ.5 เติมลงในสารละลายกากน้ำตาล พบความหนาแน่นของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตลอดช่วง 10 สัปดาห์ของการหมัก เริ่มคงตัวจากสัปดาห์ที่ 10-19 ของการหมัก ในช่วง 1.74×10^{6}-1.81×10^{6} โคโลนีต่อมิลลิลิตรของน้ำหมัก สัปดาห์ที่ 20-25 เริ่มลดลงตามลำดับ ผลิตแก๊สในช่วงสัปดาห์ที่ 2-12 ของการหมัก ค่า pH ของน้ำหมักลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดช่วง 16 สัปดาห์แรกของการหมัก มีค่า 3.2 จากนั้นเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 4.7 ในสัปดาห์ที่ 25 พบความเข้มข้นของกรดแลคติกในน้ำหมักระหว่าง 5-34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำน้ำหมักชีวภาพที่มีอายุการหมัก 9 สัปดาห์เติมลงในอาหาร Yeast extract-peptone broth ที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ในอัตราส่วน 1 ส่วนต่อ 10 ส่วน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้น้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาพน้ำจืด พบว่าด้านล่างของชั้นน้ำมันถั่วเหลืองของชุดทดสอบเริ่มมีการกระจายตัวเป็นปุยสีขาวที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดลอง และละลายปนกับชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อได้หมดภายใน 11 วันของทดลอง สีขาวขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองกระจายปนอยู่มีความขาวขุ่นลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อทิ้งไว้นาน 30 วัน ส่วนชุดควบคุมด้านล่างของชั้นน้ำมันถั่วเหลืองมีลักษณะเป็นเพียงชั้นสีขาวบางๆ เท่านั้น ไม่พบการกระจายตัวปนในชั้นน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำน้ำเลี้ยงไปเกลี่ยบนอาหาร TSA (ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน) พบความหนาแน่นของแบคทีเรียในช่วง 1.25×10^4 – 1.55×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ส่วนของชุดควบคุมที่นำไปเกลี่ยบนอาหาร TSA (น้ำกลั่น) ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำน้ำหมักชีวภาพที่เริ่มต้นด้วยแบคทีเรียจากตะกอนดินสะพานปลาอ่างศิลาเจือจางด้วยน้ำทะเล และน้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาพน้ำจืดเจือจางด้วยน้ำประปา ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100 ส่วนเช่นเดียวกัน ไปทดลองฉีดพ่นบริเวณใต้สะพานปลาหาดวอนนภาในส่วนที่มีการสะสมของตะกอนเลนตั้งแต่เวลาที่น้ำทะเลลดระดับลงใหม่ๆ ปล่อยทิ้งไว้จนน้ำทะเลขึ้น กลับมาทำการสังเกตความเปลี่ยนแปลงในเวลาน้ำลงของวันรุ่งขึ้น และทำการฉีดพ่นซ้ำในพื้นที่เดิม ทำการฉีดพ่นเช่นนี้อยู่ 3 วัน สามารถสังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลง คือ บริเวณที่ฉีดพ่นด้วยน้ำหมักชีวภาพที่เริ่มต้นด้วยแบคทีเรียจากตะกอนดินสะพานปลาอ่างศิลา ตะกอนเลนมีสีอ่อนลงจากสีดำเข้มเป็นสีเทา ตะกอนเลนมีกลิ่นเหม็นคาวน้อยลง ส่วนบริเวณที่ฉีดพ่นด้วยน้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาพน้ำจืด สีของตะกอนเลนยังคงมีสีดำเข้มและมีกลิ่นเหม็นคาวเหมือนเดิมเช่นเดียวกับบริเวณอื่นที่ไม่ได้ทำการฉีดพ่นน้ำหมักชีวภาพ

ข้อเสนอแนะ

ในการนำไปใช้งานจริงในภาพสนามอาจต้องทำการทดสอบซ้ำพร้อมตรวจวัดค่าต่างๆ อย่างละเอียดต่อไปอีกลำดับหนึ่ง เพื่อให้ได้ความชัดเจนมากยิ่งขึ้น

แบคทีเรียและน้ำหมักชีวภาพมีประสิทธิภาพสามารถย่อยสลายน้ำมันถั่วเหลืองได้ น่าจะสามารถนำไปใช้ในการบำบัดหรือย่อยสลายของเสียที่มีโครงสร้างในทำนองเดียวกันในลำดับต่อไป

น้ำหมักชีวภาพที่ใช้แบคทีเรียจากน้ำเค็มในการหมักมีความเหมาะสมในการใช้งานในพื้นที่ที่มีการใช้น้ำทะเลหรือความเค็มมากกว่าน้ำหมักชีวภาพที่หมักในสภาพน้ำจืด ทั้งในแง่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเสียและความคงตัวของจุลินทรีย์เมื่อนำมาใช้ในน้ำที่มีความเค็ม ทั้งนี้อาจเพราะเป็นจุลินทรีย์น้ำจืดไม่สามารถดำเนินกิจกรรมและดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่อมาอยู่ในน้ำเค็ม

บรรณานุกรม

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร 680 ม. 11 ถ.นิตโย ต.ธาตเชิงชุม อ.เมือง จ.สกลนคร, การใช้ประโยชน์น้ำหมักชีวภาพ, 29 เมษายน 2552

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล รุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล ธีรนุต ร่มโพธิ์ภักดิ์, (2547), คุณภาพน้ำหมักชีวภาพ และองค์ประกอบ, การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42, 3-6 กุมภาพันธ์ 2547, น.481-488.

ชีววิถี. จาก http://www.chivavithee.net/

ไชยวัฒน์ ไชยสุต. 2550. น้ำหมักชีวภาพเทคโนโลยีเพื่อความพอเพียง. งานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อชนบทและชุมชน ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพมหานคร

น้ำหมักชีวภาพ, http://www.school.net.th/schoolnet/article/articles_read.php?article_id=175, 25 มกราคม 2557

ประสงค์ วงศ์ชนะภัย อุดม วงศ์ชนะภัย และพูลสวัสดิ์ อาจละกะ, 2547, การขยายผลโดยใช้น้ำหมักชีวภาพในกลุ่มเกษตรกรรายย่อย ภาคตะวันออก กรณีศึกษาจังหวัดสระแก้ว. ใน: รายงานการสัมมนาระบบเกษตรแห่งชาติ ครั้งที่ 3 : สู่ระบบการผลิตอาหารที่ปลอดภัย สร้างมูลค่าเพิ่ม และใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืน, ระหว่างวันที่ 9-11 พฤศจิกายน 2547 ณ โรงแรมปางสวนแก้ว จ. เชียงใหม่, น.119-134.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2557, เครื่องสำอางจากน้ำหมักชีวภาพ, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เผยแพร่โดยผ่ายชุมชนและผู้ด้อยโอกาส ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อสังคม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, www.nstda.or.th/rural

รัตนจิตต์ อัตราชีวะ, 2551, ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการนำผ้าหมักชีวภาพไปใช้ในครัวเรือน กรณีศึกษาชุมชนวัดตึก เขตวังทองหลาง กรุงเทพมหานคร, คณะพัฒนาสังคมและสิ่งแวดล้อม สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. 2537. การศึกษาคุณภาพน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี. 165 น.

สมหมาย ปัตตาลี. 2551. การศึกษาคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากผลมะหลอด. สารนิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ. 84 น.

สุบิน สีทน และสายสมร ลำลอง. 2555. การใช้น้ำหมักชีวภาพมะม่วงดิบและน้ำหมักชีวภาพแตงโมเป็นสารจับตัวยางต่อสมบัติของยางดิบและยางวัลคาไนซ์. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. น. 25-33.

สิทธิชัย ธีระสุนทรไท, 2541, การศึกษาจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพ และประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสีย, โรงเรียนราชวินิตบางแก้ว. http://www.vcharkarn.com/project/261, 27 กรกฎาคม 2558

อานัฐ ต้นโช, 2557, แนวคิด หลักการ เทคนิคปฏิบัติในประเทศไทย เกษตรธรรมชาติประยุกต์ (http://www.maejonaturalfarming.org) 8 ธันวาคม 2556

Barker, S.B. and Summerson, W.H., 1941, “The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material,” Journal of Biological Chemistry, Vol. 178, No. 2, pp. 535-554.

Merck microbiology manual, 1996, Merck KGaA, Laboratory Products Division, Germany, 250-251

The Difco manual, 1997, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA., 478-480, 525-527, 571

ภาคผนวก

อาหาร Yeast extract-peptone broth (YPB-medium) : ต่อลิตร (The Difco manual, 1997)

yeast extract	10	กรัม
peptone	20	กรัม
แหล่งคาร์บอน	20	กรัม

การทดสอบหากรดแลคติคในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี Barker and Summerson Method, 1941

<u>สารเคมี</u>

$Ca(OH)_2$

$CuSO_4 .5 H_2O$ - 20 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (20 % $CuSO_4 .5 H_2O$)

- 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (4 % $CuSO_4 .5 H_2O$)

H_2SO_4 เข้มข้น

p-hydroxy-bi-phynyl 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร NaOH เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

Zinc lactate

<u>ขั้นตอนการทดสอบ</u>

1. สารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร

เติม - $Ca(OH)_2$ 1 กรัม

- $CuSO_4 .5 H_2O$ 20 % 1 มิลลิลิตร

ปรับให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที

3 .แยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

4. สารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร

เติม - $CuSO_4 .5 H_2O$ 20 % 0.05 มิลลิลิตร

- H_2SO_4 เข้มข้น 6 มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากัน ปรับให้มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำเย็น

5. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที และทำให้เย็นทันที

6. เติม p-hydroxy-bi-phynyl 0.1 มิลลิลิตร

7. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

8. แช่ในน้ำเดือด 90 วินาที

9. วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 560 นาโนเมตร

ใช้เกลือแลคเตทที่ความเข้มข้น 0, 4, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำรูปกราฟมาตรฐาน โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับตัวอย่าง

ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คิดเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของเกลือแลคเตท โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้

$$\text{Lactate} \xrightarrow[Cu^{2+}]{\text{cone } H_2SO_4 \text{ , ต้ม}} CH_3CHO$$

$$CH_3CHO + C_6H_5C_6H_5OH \longrightarrow \text{สีม่วงแดงเข้ม (purple)}$$

ดูดกลืนคลื่นแสงที่ 560 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของเกลือแลคเตทที่ทำการทดสอบ อยู่ในช่วง 4 - 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นสูงสุดที่พอแสดงค่าได้ เท่ากับ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 560 นาโนเมตร ประมาณ 2.0)

ตารางผนวกที่ 1 ความหนาแน่นของแบคทีเรียในน้ำหมักชีวภาพ

สัปดาห์ที่	Cfu/mL
0	4.20×10^{3}
1	1.60×10^{4}
2	1.26×10^{5}
3	4.22×10^{5}
4	5.51×10^{5}
5	9.42×10^{5}
6	1.27×10^{6}
7	1.44×10^{6}
8	1.58×10^{6}
9	1.72×10^{6}
10	1.74×10^{6}
11	1.79×10^{6}
12	1.78×10^{6}
13	1.76×10^{6}
14	1.78×10^{6}
15	1.79×10^{6}
16	1.78×10^{6}
17	1.79×10^{6}
18	1.81×10^{6}
19	1.78×10^{6}
20	1.72×10^{6}
21	1.72×10^{6}
22	1.70×10^{6}
23	1.69×10^{6}
24	1.65×10^{6}
25	1.62×10^{6}

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณกรดแลคติกและค่า pH ของน้ำหมักชีวภาพ

สัปดาห์ที่	pH	กรดแลคติก
0	6.8	5
1	6.8	12
2	6.6	14
3	6.4	22
4	6.2	17
5	6.0	27
6	5.8	16
7	5.5	12
8	5.2	22
9	4.9	25
10	4.4	32
11	4.3	18
12	4.1	24
13	4.0	35
14	3.9	28
15	3.5	16
16	3.2	25
17	3.3	29
18	3.5	21
19	3.7	28
20	3.9	36
21	4.0	24
22	4.2	34
23	4.2	36
24	4.5	29
25	4.7	32