ว.วิทย. มข. 44(4) 759-769 (2559) KKU Sci. J. 44(4) 759-769 (2016)

การคัดแยกเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ

Isolation of the cellulase enzyme-producing fungi for utilizing in biofertilization

ปริญญา ไกรวุฒินันท์[1*] และ ลินดา ใจปิง[1]

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ อำเภอเมือง จังหวัดอุตรดิตถ์ 53000

*Corresponding Author, E-mail: Parinya_k25@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากตัวอย่างดินบริเวณต่างๆ ในจังหวัดอุตรดิตถ์ พบเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxy methyl cellulose agar ทั้งหมด 15 ไอโซเลท โดยพบเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท B, D และ E ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (HC value) เท่ากับ 2.11, 1.88 และ 1.79 ตามลำดับ และได้นำเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท B, D และ E ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งทำการศึกษาทั้งหมด 6 สูตร โดยใช้ระยะเวลาในการหมักปุ๋ยทั้งหมด 20 วัน เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักปุ๋ย พบว่า ปุ๋ยชีวภาพ ทั้ง 6 สูตร มีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) อยู่ในช่วง 7.9 - 8.5 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) จะอยู่ในช่วง 1.01 - 1.14 % ค่าปริมาณอินทรียวัตถุ (OM) อยู่ในช่วง 18.83 - 33.62 % และ ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) อยู่ในช่วง 10.26 - 17.30 จากการเปรียบเทียบสูตรปุ๋ยทั้ง 6 สูตร พบว่าสูตรปุ๋ยที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดีที่สุด คือ สูตรที่ 6 สูตรเชื้อ B, D และ E รองลงมาคือ สูตรที่ 3 สูตรเชื้อ B และได้นำเชื้อไอโซเลท B ไปจัดจำแนกพบว่าคือเชื้อ *Aspergillus allahaba*

ABSTRACT

The purpose of this study to isolate the cellulase enzyme-producing fungi from soil samples collected from different areas in Uttaradit Province. A total of 15 cellulase enzyme-producing isolates were found on Carboxy methyl cellulose agar. Among these isolates, three of

them including isolates B, D and E produced the highest number of cellulase enzyme (HC value) at 2.11, 1.88 and 1.79, respectively. These three isolates were then applied in six formulas of biofertilization and used for 20 days to test for the agricultural waste degradation efficiency. At the end, all of formulas had pH ranging 7.9 - 8.5. Total nitrogen (TKN) was varied between 1.01 and 1.14%. Organic matter (OM) number was varied ranging from 18.83 - 33.62%. The carbon-nitrogen ratio (C/N ratio) had ranged between 10.26 and 17.30. Among six fertilizer formulas, formula-6 (isolates B, D and E) is the best one in terms of degradation efficiency followed by formula-3 (isolate B). Isolate B was identified as *Aspergillus allahaba*.

คำสำคัญ: เอนไซม์เซลลูเลส เชื้อรา ปุ๋ยชีวภาพ
Keywords: Cellulase enzyme, Fungi, Biofertilizer

บทนำ

เซลลูโลสจัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช ซึ่งในน้ำหนักแห้งของพืชจะมีปริมาณของเซลลูโลสอยู่ประมาณ 35 – 50 % มีเฮมิเซลลูโลสอยู่ที่ประมาณ 20 – 35 % และมีลิกนินเป็นองค์ประกอบอยู่ที่ 5 – 30 % (Lynd et al., 1999) โดยองค์ประกอบของเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose) จำนวน 1,000 + 10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลีเมอร์ (polymer) โดยเชื่อมกันด้วยพันธะ β 1-4 glycosidic bond (ศศิธร, 2552) จากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวทำให้กระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อนำกลูโคสมาใช้ประโยชน์จึงทำได้ยาก (Lai et al., 2011) ส่งผลให้ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสจึงจำกัดอยู่ที่การใช้เป็นเชื้อเพลิง อาหารสัตว์ ปุ๋ย และอุตสาหกรรมกระดาษ แต่อย่างไรก็ตามก็ได้มีความพยายามใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสด้วยการใช้ กรด-เบส และไอน้ำในกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลส แต่กระบวนการดังกล่าวก็ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมตามมาเช่นกัน (Hendriks and Zeeman, 2009)

การใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ใช้เวลาในกระบวนการผลิตเอนไซม์ที่สั้น และมีศักยภาพที่ดี โดยจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาอย่างมาก ได้แก่ เชื้อรา เช่น *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. เป็นต้น (Dashtban et al., 2009) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อหาเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ดี และมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณต่าง ๆ ในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ คือ ริมสระน้ำบริเวณพื้นที่ลำรางทุ่งกะโล่ นาข้าวอินทรีย์ บ่อปุ๋ยหมักชีวภาพภายในมหาวิทยาลัยอุตรดิตถ์ สวนลองกอง ถ้ำจัน และ ป่าไผ่ในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณที่มีเศษใบไม้และขอนไม้ผุทับถมอยู่ โดยเก็บตัวอย่างดินที่อยู่ลึกลงไปจากผิวดิน 1-5 เซนติเมตร แล้วนำตัวอย่างส่งเข้าห้องปฏิบัติการทันที เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้

การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลาย carboxy methyl cellulose (CMC)

นำตัวอย่างดินที่เก็บได้ปริมาณ 10 กรัม มาทำเจือจางด้วย Serial dilution method ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3} – 10^{-5} นำตัวอย่างที่ 10^{-3} – 10^{-5} มาทำการ Spread plate ลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่ผสม Rose Bengal ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญบนจานอาหารทำการแยกเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดิน มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นทำการเก็บรักษาเชื้อราที่คัดแยกได้เพื่อรอการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาทำการเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี spot inoculation ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxy methyl cellulose agar (carboxy methyl cellulose 0.1 กรัม, polypeptone 0.5 กรัม, yeast extract 0.1 กรัม, K_2HPO_4 0.4 กรัม, KCl 0.02 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัม, น้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อครบระยะเวลาทำการย้อมด้วยสี Congo red เข้มข้น 0.1 % ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นเทออกและเทสารละลาย Sodium chloride ความเข้มข้น 1 N จนท่วมจานอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเทออก จากนั้นสังเกตบริเวณโซนใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อรา ทำการวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นและนำไปคำนวณค่า Hydrolysis capacity (HC value) คือเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (George et al., 2001)

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ

คัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ดีที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท มาทดสอบในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพเพื่อดูกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเปรียบเทียบกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสกับสารเร่งซุปเปอร์ พด.1 ของกรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ซึ่งส่วนผสมของปุ๋ยชีวภาพที่ศึกษามีจำนวน 6 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 สูตรควบคุม (ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์), สูตรที่ 2 สูตรเชื้อ พด.1, สูตรที่ 3, 4, 5 คือสูตรเชื้อราที่แยกได้ และสูตรที่ 6 คือเชื้อราที่รวมทั้ง 3 ไอโซเลท โดยในการศึกษาจะใช้อัตราส่วนของฟางข้าว มูลสัตว์ รำละเอียด และเชื้อราในอัตราส่วน 1 : 3 : 1 : 20 (กิโลกรัม/กิโลกรัม/กิโลกรัม/กรัม) (น้ำหนักรวมของปุ๋ยหมักแต่ละสูตรคือ 30 กิโลกรัม) โดยส่วนของเชื้อราจะทำการเลี้ยงโดยใช้เมล็ดข้าวสาร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปใส่ในปุ๋ยชีวภาพแต่ละสูตร และเก็บตัวอย่างปุ๋ยเพื่อทดสอบคุณสมบัติของเชื้อราในกระบวนการย่อยสลาย ที่ช่วงเวลา 0, 4, 7 และ 20 วัน ทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ ปริมาณอินทรียวัตถุ (OM) (Walkley-Black Method) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) (Kjeldahl Method) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) และปริมาณเชื้อราในปุ๋ยหมัก (Serial dilution method)

การจัดจำแนกเชื้อรา

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ดีที่สุด ส่งไปจัดจำแนกสายพันธ์ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรม (BIOTEC) โดยใช้วิธีเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta-

tubulin และศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดิน

คัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมดจำนวน 15 ไอโซเลท ตามแหล่งที่เก็บตัวอย่างได้ดังนี้ คือ บ่อปุ๋ยหมัก จำนวน 6 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท A, B, C, D, E และ F นาข้าวอินทรีย์ จำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท G และ H บ่อปุ๋ยหมักชีวภาพ จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท J สวนลองกอง จำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท L และ N ถ้ำจัน จำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท P และ Q และป่าไผ่ จำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท R และ S

ซึ่งจากการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Carboxy methyl cellulose agar สามารถแสดงถึงประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา พบว่าเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด มีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท B, D และ E ซึ่งมีค่า Hydrolysis capacity (HC value) เท่ากับ 2.11 , 1.88 และ 1.79 ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ดีกว่างานวิจัยของ ทิพย์นภา วงษ์คูณ และคณะ (2556) ที่ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว และข้าวโพดหวาน โดยจากการศึกษาวิจัยพบว่าเชื้อราที่มีค่า HC value สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 1.02 แสดงดังตารางที่ 1 จากผลการทดสอบดังกล่าว จึงได้นำเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ยในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการย่อยสลาย Carboxy Methyl Cellulose (CMC)

ไอโซเลท	Hydrolysis capacity (HC value)
A	1.50±0.00[d]
B	2.11±0.07[a]
C	1.32±0.01[e]
D	1.88±0.00[b]
E	1.79±0.02[c]
F	1.50±0.00[d]
G	1.48±0.01[d]
H	1.10±0.02[g]
J	1.50±0.00[d]
L	1.10±0.00[g]
N	1.33±0.02[e]
P	1.49±0.01[d]
Q	1.47±0.03[d]
R	1.36±0.01[e]
S	1.24±0.01[f]
One-way ANOVA	***

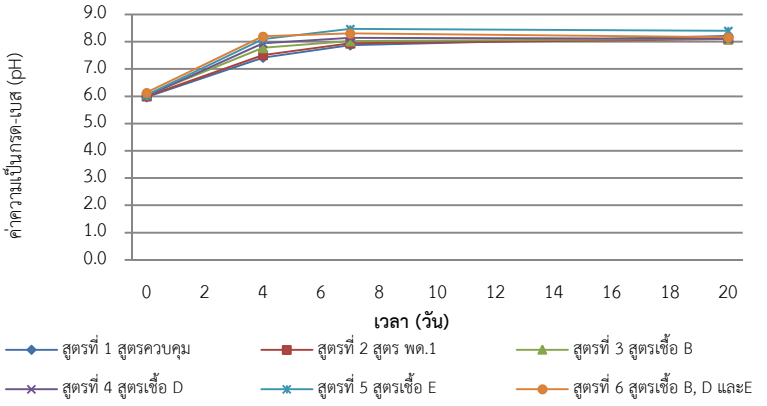
ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ One-Way ANOVA แสดงนัยสำคัญ (Significant) ที่ * P ≤ 0.10, ** P ≤ 0.05 และ *** P ≤ 0.01 จากข้อมูลค่าเฉลี่ยของค่า Hydrolysis capacity ของเชื้อราในการย่อยสลาย Carboxy methyl cellulose (CMC) โดยข้อมูลในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญโดยวิธี Tukey HSD test. ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุดจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท B, D และ E มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ย เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยมีระยะเวลาในการหมักปุ๋ย 20 วัน และทำการเก็บตัวอย่างปุ๋ยหมักที่ได้ เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ในช่วงระยะเวลาที่ 0, 4, 7 และ 20 วัน ของกระบวนการหมัก โดยทำการทดสอบดังนี้ คือ ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) อุณหภูมิ (°C) ค่าปริมาณอินทรียวัตถุ (OM) ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) และปริมาณเชื้อรา (CFU/g) จากผลการทดลองการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ในระยะเวลา 20 วัน แสดงผลได้ดังนี้

ค่าความเป็นกรด-เบส (pH)

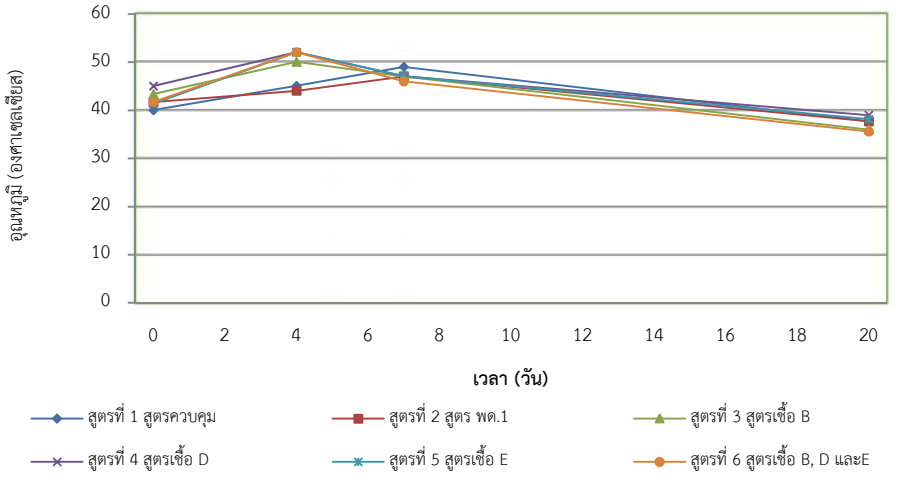
พบว่าในระยะเวลาการหมักปุ๋ย 20 วัน ค่า pH เริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.9 – 6.1 โดยมีค่าความเป็นกรดเล็กน้อย แต่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ปริมาณค่า pH อยู่ในช่วง 7.9 – 8.5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hartz (2007) พบว่ากระบวนการของการทำปุ๋ยหมักในขั้นเริ่มต้นของการหมัก pH จะต่ำกว่า 7 และ เพิ่มขึ้นไปเกือบ 8 หรือมากกว่า ซึ่งค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมของวัสดุทำปุ๋ยหมักจะอยู่ในช่วง 6 – 8 (ดังกราฟที่ 1 และตารางที่ 2)



กราฟที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-เบสในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

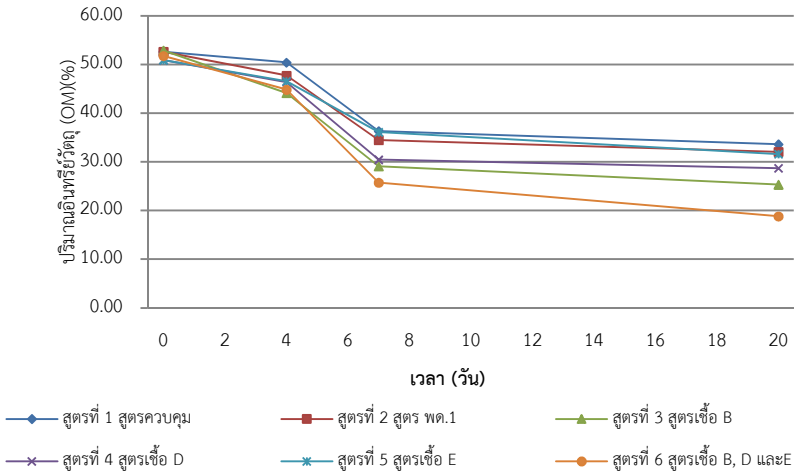
อุณหภูมิเมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักอยู่ในช่วง 40–45 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วอยู่ในช่วง 44–52 องศาเซลเซียส เนื่องจากพลังงานความร้อนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากกระบวนการย่อยสลาย และหลังจากที่อุณหภูมิขึ้นสูงสุดแล้วจะค่อยๆ ลดลง เป็นช่วงที่อัตราการย่อยสลายลดลง และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักปุ๋ย 20 วัน อุณหภูมิอยู่ในช่วง 36-39 องศาเซลเซียส (ดังกราฟที่ 2 และตารางที่ 2)



กราฟที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ

ปริมาณอินทรียวัตถุ (OM)

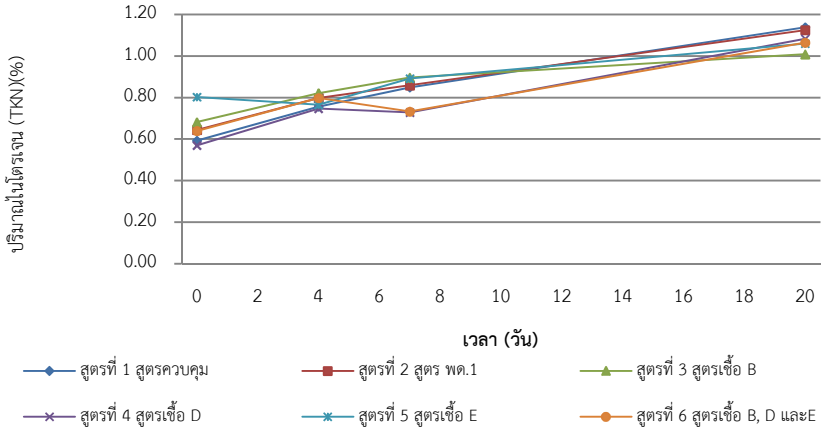
ปริมาณอินทรียวัตถุเริ่มต้นอยู่ในช่วง 50.90-52.91 % และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักปริมาณอินทรียวัตถุจะลดลงอย่างรวดเร็ว อยู่ในช่วง 18.83-33.62 % โดยสูตรที่มีปริมาณอินทรียวัตถุลดลงมากสุด คือ สูตรที่ 6 โดยมีค่าอินทรียวัตถุเท่ากับ 18.83 % รองลงมาคือสูตรที่ 3 และสูตรที่ 4 โดยมีค่าอินทรียวัตถุเท่ากับ 25.35 และ 28.71 % ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เฉลิมชัย แพะคำ และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาปริมาณธาตุอาหารพืชจากปุ๋ยหมักผักตบชวาที่ย่อยสลายโดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. พบว่าช่วงเวลาการหมักปุ๋ยที่ 20 วันค่าอินทรียวัตถุอยู่ในช่วง 24.32 - 52.73 % (ดังกราฟที่ 3 และตารางที่ 2)



กราฟที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณอินทรีย์วัตถุในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN)

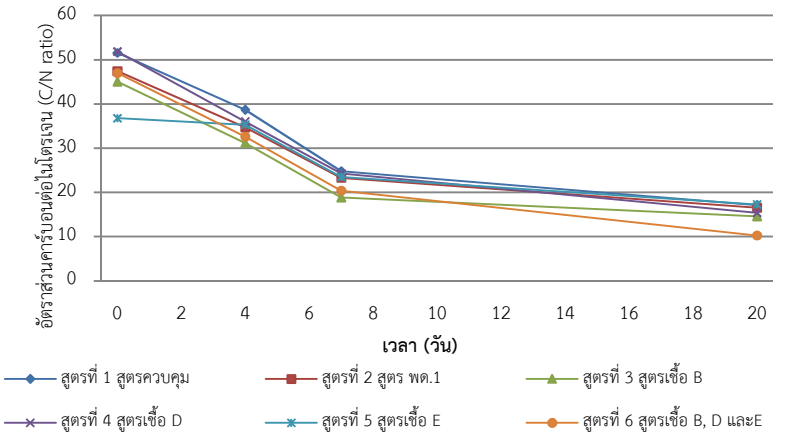
พบว่าในระยะเวลาการหมักปุ๋ยชีวภาพ 20 วัน ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นอยู่ในช่วง 0.57 - 0.80 % และจะเห็นได้ว่าค่าไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากนั้นเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักปุ๋ย 20 วัน ค่าไนโตรเจนของทุกสูตรจะอยู่ในช่วง 1.01 - 1.14 % พบว่าสูตรที่มีค่าไนโตรเจนมากสุดคือ สูตรที่ 1, 2, 4, 5, 6 และ 3 โดยมีค่าไนโตรเจน เท่ากับ 1.14, 1.12, 1.08, 1.06, 1.06 และ 1.01 % ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อใช้เวลาการหมักปุ๋ยนานขึ้น (ดังกราฟที่ 4 และตารางที่ 2)



กราฟที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) จากการประยุกต์ใช้เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในกระบวนการหมักปุ๋ย

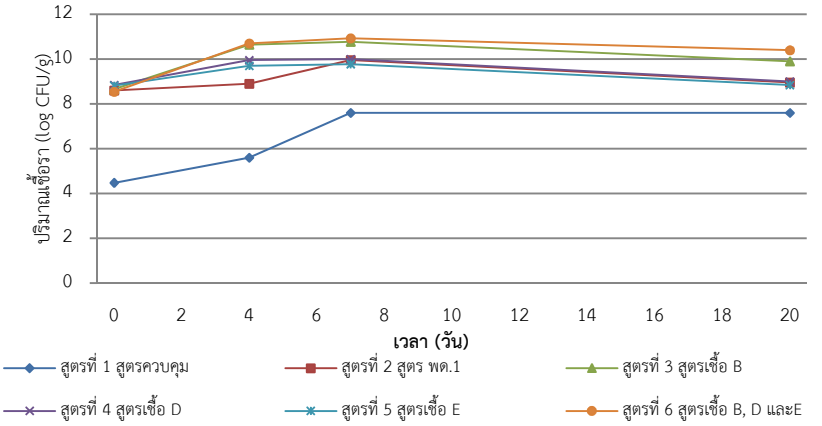
พบว่าในระยะเวลาการหมักปุ๋ย 20 วัน ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) เริ่มต้นอยู่ในช่วง 36.79-51.53 จากนั้นเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักปุ๋ย 20 วัน ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนจะอยู่ในช่วง 10.26-17.30 จากการผลการศึกษา พบว่าสูตรที่มีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนน้อยสุด คือ สูตรที่ 6 รองลงมา คือ สูตรที่ 3, 4, 2, 1 และ สูตรที่ 5 โดยมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 10.26, 14.58, 15.38, 16.54, 17.12 และ 17.30 ตามลำดับ โดยอัตราส่วนของ คาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ลดลงจะบอกถึงการย่อยสลายของปุ๋ย ยิ่งมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่น้อย แสดงว่ามีอัตราการย่อยสลายที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เฉลิมชัย แพะคำ (2557) ได้ทำการศึกษาปริมาณธาตุอาหารพืชจากปุ๋ยหมักผักตบชวาที่ย่อยสลายโดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ได้ทำการศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนจะลดลง โดยพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำสุดเท่ากับ 13.32 โดยลดลงจากอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 99.1



กราฟที่ 5 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ

ปริมาณเชื้อราในกระบวนการหมักปุ๋ย

จากกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ พบว่าปริมาณเชื้อราในปุ๋ยชีวภาพ ทั้ง 6 สูตร มีปริมาณเชื้อราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยมีปริมาณเชื้อราสูงที่สุดที่เวลา 7 วัน หลังจากการหมักได้ดำเนินไปปริมาณเชื้อราค่อนข้างคงที่ และมีเพียงบางสูตรที่มีการลดจำนวนลงบ้างเล็กน้อย โดยจากการศึกษาพบว่าสูตรที่ 6 ซึ่งมีเชื้ออยู่จำนวน 3 ไอโซเลท คือ B, D และ E มีปริมาณเชื้อรามากที่สุด โดยมีปริมาณเชื้อราอยู่ที่ 10.40 Log CFU/g รองลงมาคือสูตรที่ 3 ซึ่งเป็นสูตรเชื้อ B โดยมีปริมาณเชื้อราอยู่ที่ 9.90 Log CFU/g ซึ่งสอดคล้องกับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน แสดงให้เห็นว่าอัตราการย่อยสลายของปุ๋ยชีวภาพมีความสอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา



กราฟที่ 6 การเจริญเติบโตของเชื้อราในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ

ตารางที่ 2 สมบัติทางเคมีและจำนวนเชื้อราของตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตได้ที่ระยะเวลาการหมัก 20 วัน

สูตรปุ๋ยชีวภาพ	pH	T (°C)	OM (%)	TKN (%)	C/N ratio	จำนวนเชื้อรา (Log CFU/g)
สูตรควบคุม	8.2[a]	38[a]	33.62[a]	1.14[a]	17.12[d]	7.60[b]
สูตร พด. 1	8.1[a]	38[a]	32.07[a]	1.12[a]	16.54[c]	8.95[a]
สูตรเชื้อ B	8.1[a]	36[a]	25.35[b]	1.08[a]	14.58[b]	9.90[a]
สูตรเชื้อ D	8.1[a]	39[a]	28.71[b]	1.06[a]	15.38[c]	9.00[a]
สูตรเชื้อ E	8.4[b]	38[a]	31.60[a]	1.06[a]	17.30[d]	8.85[a]
สูตรเชื้อ D, D และ E	8.2[a]	36[a]	18.83[c]	1.01[a]	10.26[a]	10.40[a]
F-test	NS	NS	**	NS	**	*

หมายเหตุ : NS หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 90%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมันัยยะสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

*** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมันัยยะสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

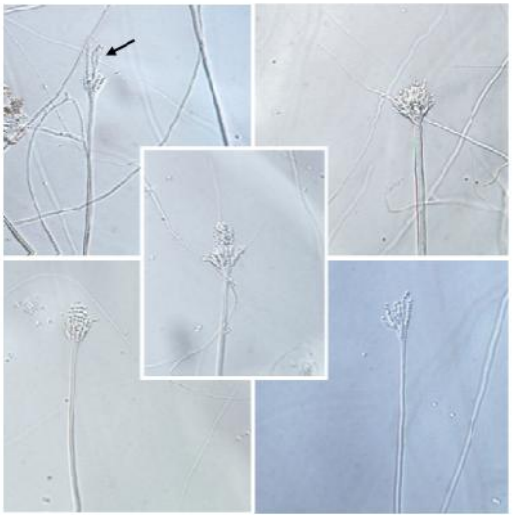
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

การจัดจำแนกเชื้อรา

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุดคือเชื้อราไอโซเลท B ส่งไปจัดจำแนกทางด้านอณูชีววิทยา และ ทางด้านสัณฐานวิทยา โดยการจัดจำแนกทางด้านอณูชีววิทยา โดยเพิ่มขยายยีน Beta-tubulin ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพร์เมอร์ Bt2a/Bt2b นำยีนไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ พบว่ายีนดังกล่าวมีลำดับเบสคือ 5′-TGGTAACCCAAAATCGGTGCCTGCTTTCTTGGTATGTCTAGATTTGATCCTGGGGAGGACTGGCCCCTTGGAGGGATGCAGAGTCTGACCGGGCACGCGTCCTCCGGGGCTGGGTAAGGGTTCTGTGGTGGCGTCGACGCTGACAACTGTACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGATGGCTCTGGTATGTAAGTACCACCGACACCCTTTCGATGGGGTTCCAATGCTAGAGGACCACAACGATGGACGATTCTGATGGACGAATAGCTTCAATGGCTCCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTCTGAATGTCTACTTCAACGAGGTACGCCCACTCCCATCCCCAGAAATCCAAAGACGTCGACCTGATTCCCATTCTCCCCGTAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTTCCTCGTGCTGTCCTGGTTGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAACTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTGTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT-3′ จากนั้นเปรียบเทียบลำดับความเหมือนกันของลำดับเบสของยีน Beta-tubulin ของเชื้อไอโซเลท B กับฐานข้อมูลสากล CBS (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre) พบว่ามี%ความเหมือนกับเชื้อรา *Aspergillus allahabadii* เท่ากับ 98.84 % และเมื่อเทียบกับการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท B พบว่าโคโลนีเจริญเร็วปานกลาง ขนาด 2-3.5 เซนติเมตร หลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร Czapek’s Agar เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีขาวถึงขาวครีม เส้นใยเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ ฟู (aerial hyphae) ด้านหลังโคโลนีมีสีเหลืองถึงสีน้ำตาลอ่อน

Conidial heads จะเป็นรูปทรงกลมในระยะแรก เมื่อแก่จะมีลักษณะเป็นลำ (columnar) ก้านชูสปอร์ (conidiophores) ผนังเรียบใสไม่มีสี ความยาวก้านชูสปอร์พบได้ตั้งแต่ 180 นาโนเมตร จนถึง 1.5 มิลลิเมตร กว้าง 3.5 – 6.0 ไมโครเมตร vesicle รูปไข่ (ovoid) บน vesicle มี sterigmata สองชั้น สปอร์ รูปร่างกลมผนังเรียบ ใสไม่มีสี

ดังนั้นจากผลการจัดจำแนกเชื้อราทางด้านอณูชีววิทยาและสัณฐานวิทยา ให้ผลที่สอดคล้องกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเชื้อราไอโซเลท B คือเชื้อ *Aspergillus allahabadii*



รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Aspergillus allahabadii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ซึ่งในบางครั้งจะพบการงอก ยืด และขยายตัวได้ของ sterigmata (ลูกศรชี้)

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากตัวอย่างดินในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ ได้แก่ ริมสระน้ำบริเวณพื้นที่ลำรางทุ่งกะโล่ นาข้าวอินทรีย์ บ่อปุ๋ยหมักชีวภาพ สวนลองกองถ้ำจัน และ ป่าไผ่ พบเชื้อราทั้งหมด 15 ไอโซเลท โดยพบเชื้อราที่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท คือ เชื้อราไอโซเลท B, D และ E โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (HC value) เท่ากับ 2.11, 1.88 และ 1.79 ตามลำดับ

ได้นำเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท B, D และ E ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ย เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งมีทั้งหมด 6 สูตร คือ สูตรที่ 1 สูตรควบคุม สูตรที่ 2 สูตร พด.1 สูตรที่ 3 สูตรเชื้อ B สูตรที่ 4 สูตรเชื้อ D สูตรที่ 5 สูตรเชื้อ E และ สูตรที่ 6 สูตรเชื้อ B, D และ E โดยมีระยะเวลาในการหมักปุ๋ย 20 วัน ในช่วงระยะเวลาที่ 0, 4, 7 และ 20 วัน เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักปุ๋ย พบว่า ปุ๋ยชีวภาพ จำนวน 6 สูตร โดยมีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) อยู่ในช่วง 7.9 - 8.5 อุณหภูมิอยู่ในช่วง 36 - 39 องศาเซลเซียส ค่าปริมาณอินทรียวัตถุ (OM) อยู่ในช่วง 18.83 - 33.62 % และค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) อยู่ในช่วง 10.26 - 17.30 จากการเปรียบเทียบสูตรปุ๋ยทั้ง

6 สูตร พบว่าสูตรปุ๋ยที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดีที่สุด คือ สูตรที่ 6 สูตรเชื้อ B, D และ E ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์หลายๆ ชนิดจะช่วยให้เกิดกระบวนการย่อยสลายได้ดีขึ้น รองลงมาคือ เชื้อสูตรที่ 3 (ไอโซเลท B) จัดเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพรองลงมาจากสูตรที่ 6 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ และจากผลการย่อยสลายพบว่าเชื้อไอโซเลท B สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์แบบเดี่ยวในกระบวนการหมักปุ๋ยได้ในอนาคต และจากการจัดจำแนกเชื้อพบว่าเชื้อไอโซเลท B คือเชื้อรา *Aspergillus allahaba*

เอกสารอ้างอิง

ทิพย์นภา วงษ์คูณ, โสภณ บุญลือ และ นันทวัน ฤทธิ์เดช (2556). การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวโพดหวาน (*Zea mays* L. var. saccharata). วารสารวิทยาศาสตร์ มข. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 41(4): 954-966.

เฉลิมชัย แพะคำ, บุญร่วม คิดค้า, มนัส ทิตย์วรรณ และ วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก (2557) การศึกษาปริมาณธาตุอาหารพืชจากปุ๋ยหมักผักตบชวาที่ย่อยสลาย โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท UPPY19. แก่นเกษตร 42. ฉบับพิเศษ 1: 671 – 676.

ศศิธร ไกรฤทธิชัย. (2552). การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อยสลายใบไม้. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาชีววิทยา. ภาควิชาจุชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Dashtban, M., Schraft, H., and Qin, W. (2009). Fungal Bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspective. Int. J. Biol. Sci. 5: 578-595.

George, S.P., Ahmad, A and Rao, M.B. (2001). Studies on carboxy methyl cellulose produced by an Alkalothermophilic actinomycete. Updated; cited 2010 feb 25. Available from http://www.sciencedirect.com.

Hartz, T. K. (2007). Assessing compost maturity and suitability for agricultural uses. Available: http://p2pay.org/ref /11/10513.htm. 2007. Accessed Feb. 9, 2013.

Hendriks, ATWM. and Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol 100: 10–8.

Lai, D., Deng, L., Li, J., Liao, B., Guo, Q. X., and Fu, Y. (2011). Hydrolysis of cellulose into glucose bymagnetic solid acid. ChemSusChem 4: 55–8.

Lynd, L.R., Wyman, C.E., and Gerngross, T.U. (1999). Biocommodity engineering. Biotechnol Prog 15: 777–93.

❑❑❑❑❑