วารสารวิทยาการสิ่งแวดล้อมไทย ปีที่ 2(4), 2562 : 1 - 9
ISSN 2651-0782

การคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อการใช้ประโยชน์เชิงเกษตรชีวภาพ

สุธีรา สุนทรารักษ์[1] , เทพอัปสร แสนสุข[1]
[1] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ 31000

สุธีรา สุนทรารักษ์, เทพอัปสร แสนสุข. (2562). การคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อการใช้ประโยชน์เชิงเกษตรชีวภาพ. วารสารวิทยาการสิ่งแวดล้อมไทย ปีที่ 2(4), 2562 : 1 - 9.

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินตัวอย่างในเขตพื้นที่ของวนอุทยานภูเขาไฟกระโดง และทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่คัดแยกได้จากเชื้อราซึ่งมีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสได้สูงที่สุดสำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในเชิงการเกษตรเพื่อการผลิตปุ๋ยหมักอินทรีย์คุณภาพสูงจากกากมันสำปะหลัง เหลือทิ้งในเขตพื้นที่เกษตรกรรม สู่การนำไปพัฒนาชุมชนท้องถิ่นเพื่อสร้างความเข้มแข็งให้เกิดการพึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืนและเพื่อคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น พบว่าเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด มีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท M, P และ S ซึ่งมีค่า Hydrolysis capacity (HC value) เท่ากับ 2.32 , 2.25 และ 2.23 ตามลำดับ และจากการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยอาศัยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราและการจัดจำแนกทางด้านอณูชีววิทยา โดยใช้วิธีเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ Beta-tubulin พบว่า เชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุดคือเชื้อราไอโซเลท M เปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับเชื้อรา *Aspergillus allahabadii* เท่ากับ 98.84 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท M พบว่า โคโลนีเจริญเร็วปานกลาง ขนาด 2-3.5 เซนติเมตร หลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร Czapek's Agar เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีขาวถึงขาวครีม เส้นใยเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ ฟู (aerial hyphae) ด้านหลังโคโลนีมีสีเหลืองถึงสีน้ำตาลอ่อน จึงได้นำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ย ชีวภาพ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อไป

คำสำคัญ : เอนไซม์เซลลูเลส เชื้อรา เกษตรชีวภาพ

ผู้ดำเนินการหลัก : สุธีรา สุนทรารักษ์ ; อีเมล : tangmay-Jaa@hotmail.com

Thai Journal of Environmental Studies Vol. 2(4), 2019 : 1 - 9
ISSN 2651-0782

Screening and selection of the fungi producing cellulose for utilization of agricultural biotechnology

Suteera Suntararak[1], Tepupsorn Saensuk[1]
[1] Faculty of Science, Rajabhat Buriram University
Ni Mueang Sub-District, Mueang District, Buriram Province 31000

Suteera Suntararak, Tepupsorn Saensuk. (2019). Screening and selection of the fungi producing cellulose for utilization of agricultural biotechnology. Thai Journal of Environmental Studies Vol. 2(4), 2019 : 1 - 9.

Abstract

The screening and selection of 22 isolate the fungi producing cellulose from the natural forests of soil samples at Khao Kra-dong volcano forest park on samed sub district, muang district, Buriram province. The research found that 3 isolates of fungus degraded carboxy methyl cellulose on CMC agar. The hydrolysis of carboxy methyl cellulose (CMC) was tested on the agar plate. The highest hydrolysis capacity (HC value) was found in isolates M, P and S as 2.32, 2.25 and 2.23 respectively. The most efficiency fungi on cellulose congo red agar selected from M. Therefore, it is classified by Beta-tubulin nucleic acid sequence comparisons were M had the same percentage as Aspergillus allahabadii, 98.84 percent. Compared with the morphological characterization of isolates M, it was found that the medium grew 2-3.5 cm in size after culture on Czapek's Agar for 2 weeks at room temperature. The fungus is white to cream white and the aerial hyphae are yellow to light brown in color. Hence, *Aspergillus allahabadii* M was selected to investigate the efficiency of cassava residue digestion in the field. It could be summarised that Aspergillus sp. M was more effective in decomposition of cassava residue than microbial activator super LLD.1. The compost from cassava residue showed pH, the percentage of organic materials, and C/N ratio which were acceptable following Department of Agriculture and food standards.

Keywords : Cellulase enzyme, Fungi, Agricultural biotechnology

Coressponding Author: Suteera Suntararak **; E-mail address:** tangmay-Jaa@hotmail.com

1. บทนำ

เซลลูโลสเป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิค พบในสารประกอบอินทรีย์หลายชนิด เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสจะเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิค หากการย่อยสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายเซลลูโลส จุลินทรีย์หลายชนิด มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillu sp.*, *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.*, *Polyporus sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Sporotrichum sp.* และ *Zygorhynchus sp.* เป็นต้น แบคทีเรีย เช่น *Cellulomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Sporocytophaga sp.* และ *Vibrio sp.* เป็นต้น และแอคติโนมัยสิท เช่น Streptomyces sp., Micromonospora sp., และ Streptosporangium sp. เป็นต้น (พรเทพ, 2537) ส่วนใหญ่ถูกสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโดยสิ่งแวดล้อม เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ จากนั้นจึงดูดซึมเข้า สู่ภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป (Alexander, 1967) การใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ใช้เวลาในกระบวนการผลิตเอนไซม์ที่สั้น และมีศักยภาพที่ดี โดยจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาอย่างมาก ได้แก่เชื้อรา เช่น *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.* เป็นต้น (Dashtban *et al.*, 2009)

วนอุทยานภูเขาไฟกระโดงครอบคลุมพื้นที่ท้องถิ่นของจังหวัดบุรีรัมย์ถึง 3 ตำบล ได้แก่ ตำบลเสม็ด ตำบลอิสาน และตำบลสวายจีก และมีเนื้อที่ประมาณ 1,450 ไร่ ซึ่งนอกจากมีสถานะภาพเป็นวนอุทยานแล้ว พื้นที่ดังกล่าวได้ถูกประกาศให้เป็นเขตห้ามล่าสัตว์ป่า สภาพพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ราบสูงและเนินเขา สภาพป่าเป็นป่าแดงหรือป่าเต็งรัง มีเนินเขาขนาดเล็ก 2 ลูกติดกัน สูงจากพื้นที่โดยรอบประมาณ 60 เมตร เนินเขาด้านทิศใต้เรียกว่า "เขาใหญ่" ส่วนเนินเขาด้านทิศเหนือ เรียกว่า "เขากระโดง" และเนื่องจากในบริเวณนั้นตั้งอยู่ใกล้แหล่งน้ำจึงค่อนข้างเป็นป่าที่อุดมสมบรูณ์ ชาวบ้านจึงได้ใช้ประโยชน์จากผืนป่านี้ไม่ว่าจะเป็นของป่าหรือยาสมุนไพร ทั้งนี้จากผลของการรวบรวมองค์ความรู้จากแหล่งข้อมูลชีวภาพแห่งความหลากหลายของพืชพรรณในเขตพื้นที่วนอุทยานภูเขาไฟกระโดงจะพบว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพสูงโดยเฉพาะจุลินทรีย์ การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ป่าไม้เป็นที่น่าสนใจของนักวิจัยหลายท่านอาทิเช่น กฤษณา และคณะ (2547) ได้ทำการสำรวจความหลากหลายของชนิดเชื้อราไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศ ป่าไม้ในพื้นที่ลุ่มน้ำปิงตอนบน และวัชรินทร์ (2545) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราในป่าชายเลน ณ พื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง เป็นต้น โดยวัตถุประสงค์หลักในการสำรวจและศึกษาความหลากหลายก็เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะทางการเกษตร จุลินทรีย์จึงมีบทบาทต่อสิ่งมีชีวิตและระบบนิเวศ โดยจุลินทรีย์ทำหน้าที่ในการย่อยสลายอินทรียวัตถุ ซากพืชและซากสัตว์ อีกทั้งจุลินทรีย์ยังเป็นแหล่งที่ผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่มาก และมีการเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ปัจจุบันจึงมีการนำเอนไซม์หลายชนิดมาใช้เพื่อช่วยในการลดระยะเวลาในการย่อยสลายเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในการทำปุ๋ยหมักอินทรีย์

ปัจจุบันกระแสการบริโภคสินค้าเกษตรอินทรีย์และสินค้าเกษตรที่มีกระบวนการผลิตเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความต้องการปุ๋ยอินทรีย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งการแก้ไขปัญหาดังกล่าว รัฐบาลได้ดำเนินการอบรมและเผยแพร่ความรู้เพื่อให้เกษตรกรสามารถผลิตปุ๋ยอินทรีย์ขึ้นใช้เองจากวัสดุในไร่นา รวมทั้งเลือกชนิดของปุ๋ยอินทรีย์ที่จะใช้ให้เหมาะสมกับพืชและดินในแต่ละพื้นที่ ข้อดีของปุ๋ยอินทรีย์ช่วยปรับปรุงดินให้ดีขึ้น โดยเฉพาะคุณสมบัติทางกายภาพของดิน เช่น ความโปร่ง ความร่วนซุย ความสามารถในการอุ้มน้ำและการปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่างของดินอยู่ในดินได้นานและค่อยๆ ปลดปล่อยธาตุ

อาหารพืชอย่างช้าๆ จึงมีโอกาสสูญเสียน้อยกว่าปุ๋ยเคมี มีธาตุอาหารรองอยู่เกือบครบถ้วน ตามความต้องการของพืช ส่งเสริมให้จุลชีพในดินโดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่มีประโยชน์ต่อการบำรุงดินให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (ปุ๋ยอินทรีย์, 2550) แม้ว่าความต้องการใช้ปุ๋ยมีปริมาณสูงมากแต่ก็ ยังไม่เพียงพอกับความต้องการและมีราคาแพงและปุ๋ยที่เป็นทางเลือก คือ ปุ๋ยอินทรีย์ แต่การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ก็ยังไม่เป็นที่แพร่หลายทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องการใช้ปุ๋ย รวมทั้งปัญหาคุณภาพปุ๋ย การขาดความรู้ในกระบวนการผลิตที่มีคุณภาพ ทำให้เกิดความไม่เชื่อมั่นในการใช้ปุ๋ย (เชาว์วัช, 2551) หากเกษตรกรมีความรู้เกี่ยวกับการผลิตปุ๋ยอินทรีย์สามารถผลิตปุ๋ยใช้เอง ทราบคุณภาพปุ๋ยที่ผลิตขึ้น ก็น่าจะเป็นทางเลือกในการแก้ปัญหาให้กับเกษตรกรอีกทางหนึ่ง และที่สำคัญการใช้ประโยชน์จากปุ๋ยอินทรีย์ก็จัดได้ว่าเป็นแนวทางหลักในการทำเกษตรชีวภาพ ซึ่งเป็นการทำเกษตรเพื่ออนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมเพื่ออนุชนรุ่นหลัง โดยการพัฒนาปลูกพืชหรือเลี้ยงสัตว์เพื่อการผลิตอาหารที่ปลอดภัยจากสารพิษ โดยการหยุดใช้สารเคมีที่เป็นพิษทางการเกษตร เช่น ยาปราบศัตรูพืชและปุ๋ยเคมี เป็นต้น ดังนั้น เพื่อสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืนและเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพตลอดจนการช่วยจัดการและแก้ปัญหาชุมชนท้องถิ่นเพื่อคุณภาพชีวิต คณะวิจัยจึงเห็นคุณค่าในการนำประโยชน์ที่ได้จากป่าอันได้แก่เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสสู่การประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มมูลค่าในรูปแบบของการสร้างนวัตกรรมในอุตสาหกรรมเป้าหมายเชิงเกษตรชีวภาพด้วยปุ๋ยอินทรีย์คุณภาพสูงจากกากมันสำปะหลังเหลือทิ้งในเขตพื้นที่เกษตรกรรม สู่การนำไปพัฒนาชุมชนท้องถิ่นเพื่อสร้างความเข้มแข็งให้เกิดการพึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืนและเพื่อคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่คัดแยกได้จากดินตัวอย่างในเขตพื้นที่ของวนอุทยานภูเขาไฟกระโดงซึ่งมีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสได้สูง สำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในเชิงการเกษตร

2.2 เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene sequencing

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พื้นที่ทำการวิจัย

1) การทดลองระดับห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีววิทยาและวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

2) การทดลองระดับภาคสนาม วนอุทยานภูเขาไฟกระโดง ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

1) ประชากร ได้แก่ ตัวอย่างดินภายในเขตพื้นที่ของวนอุทยานภูเขาไฟกระโดง โดยทำการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive sampling) บริเวณรากพืชและต้นไม้ที่ผุ ที่ความลึก 0-10 เซนติเมตร โดยในเก็บตัวอย่างจะทำการจดบันทึกข้อมูลจุดพิกัดบริเวณที่เก็บตัวอย่างด้วย

2) กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างดินภายในเขตพื้นที่ของวนอุทยานภูเขาไฟกระโดง 30 ตัวอย่างแบ่งเป็นดินใต้กล้วยไม้ 5 ตัวอย่าง, ดินจอมปลวก 5 ตัวอย่าง, ดินใต้ต้นไม้ 5 ตัวอย่าง และดินบริเวณเห็ดเจริญ 15 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณผิวดินลึกลงไปประมาณ 5 เซนติเมตร เก็บดินตัวอย่างละ 100 กรัม นำมาคัดแยกเชื้อราในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.3 ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรต้น ได้แก่ บ่งชี้เอกลักษณ์และจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่ทำการคัดแยกได้

ตัวแปรตาม ได้แก่ ศึกษาคุณสมบัติของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ดี และมีความเหมาะสมในการนาไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ยต่อไป

3.4 ระยะเวลาในการวิจัย

ทำการวิจัยระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2561

3.5 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1) ออกสำรวจพื้นที่ ทำการสำรวจพื้นที่วนอุทยานภูเขาไฟกระโดงและเก็บตัวอย่างดิน 30 ตัวอย่างแบ่งเป็น ดินใต้กล้วยไม้ 5 ตัวอย่าง, ดินจอมปลวก 5 ตัวอย่าง, ดินใต้ต้นไม้ 5 ตัวอย่าง และดินบริเวณเห็ดเจริญ 15 ตัวอย่างนำมาคัดแยกเชื้อราและวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของดินตัวอย่าง ในห้องปฏิบัติการ

2) ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งตามวิธีการของ Kasana *et al*. (2008) และ Abu Bakar *et al*. (2010) และการทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ทั้งนี้ทำการคัดเลือกเชื้อราที่ให้ผล specific activity สูงสุดจะถูกนำไปทำการจัดจำแนกเพื่อระบุเชื้อรา

3) จัดจำแนกสายพันธ์ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรม (BIOTEC) โดยใช้วิธีเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ Beta-tubulin และศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

3.6 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

วิเคราะห์ทางสถิติ One-Way ANOVA จากข้อมูลค่าเฉลี่ยของค่า Hydrolysis capacity ของเชื้อราในการย่อยสลาย Carboxy methyl cellulose (CMC) โดยข้อมูลในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยวิธี Tukey HSD test. ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

4. สรุปผลการวิจัย

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่คัดแยกได้จากเชื้อราในดินตัวอย่างของเขตพื้นที่วนอุทยานภูเขาไฟกระโดง ซึ่งมีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสได้สูง

จากการเก็บตัวอย่างดินจำนวน 30 ตัวอย่างจากบริเวณเขตวนอุทยานภูเขาไฟกระโดง เพื่อมาทำการคัดแยกในห้องปฏิบัติการนั้นสามารถคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมดจำนวน 22 ไอโซเลท ตามแหล่งที่เก็บตัวอย่างได้ดังนี้ คือ ดินใต้กล้วยไม้ จำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท A และ B ดินจอมปลวก จำนวน 8 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท C, D, E, F, G, H, I และ J ดินใต้ต้นไม้ จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท K ดินบริเวณเห็ดเจริญ จำนวน 11 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U และ V ซึ่งจากการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Carboxy methyl cellulose agar สามารถแสดงถึงประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา พบว่า เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด มีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท M, P และ S ซึ่งมีค่า Hydrolysis capacity (HC value) เท่ากับ 2.32 , 2.25 และ 2.23 ตามลำดับ

4.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene sequencing

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ที่มีค่าเฉลี่ยโซนใสในระดับวงกว้าง แสดงดังตารางที่ 2 ทั้งนี้สามารถแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ดังนี้

1) สกุล *Aspergillus sp*. เป็นเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตค่อนข้างรวดเร็ว ระยะแรกจะมีสีขาว หลังจากนั้นจะค่อยๆ มีสีซึ่งอาจจะมีสีเขียว เขียวขี้ม้า เขียวขี้ม้าอมเหลือง น้ำตาล หรือดำ ขึ้นอยู่กับสปีซีส์ของรา สีที่เห็นเป็นสีของโคนิเดียที่แก่แล้ว ด้านล่างของโคโลนีอาจมีสีขาว เหลือง เหลืองอมเขียว เทาอมเหลือง หรือเขียวอมเทา ผิวของโคโลนีเป็นผงหรือคล้ายกำมะหยี่ ขอบโคโลนีไม่เรียบ โคโลนีมีลักษณะเป็นวงโดยทีมีสีเข้มอยู่กลางโคโลนีและสลับกับสีอ่อนๆ เมื่อถึงขอโคโลนี

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นเชื้อราที่มีผนังกั้น ชนิดเส้นใยที่ไม่มีสี ส่วนก้านชู (conidiophore) ไม่มีแขนงงอกตรงจากเส้นใย ตำแหน่งที่ก้านชู้งอกเรียกว่า foot cell ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าเส้นใยและมีขอบเขตที่จำกัด ก้านชู้ไม่มีผนังกั้น ปลายก้านชูโป่งออกเป็นกระเปาะ (visicle) ซึ่งมีลักษณะกลมหรือครึ่งวงกลมหรือยาว บนกระเปาะมีสเตอริกมา (sterigma) 1 ชั้น หรือ 2 ชั้น ลักษณะคล้ายขวด ส่วนปลายของสเตอริกมามีโคนิเดียติดอยู่มีเซลล์เดี่ยว ส่วนมากมักกลม โคนิเดียอ่อนจะอยู่ปลายสเตอริกมา เมื่อโคนิเดียอ่อนเกิดจะดันโคนิเดียแก่ให้หลุดออกไป เป็นสายผิวของโคนิเดียอาจเรียบหรือขุขระ

2) สกุล *Penicillium sp.* เป็นเชื้อราที่เจริญได้รวดเร็ว เริ่มแรกมีเส้นใยสีขาวบางกระจ่ายมากต่อมาจะเปลี่ยนสี ซึ่งอาจมีสีค่อนข้างเขียว เขียวอ่อน ขาวออกเทา เหลือง เขียวอมเทา หรือเขียวอมน้ำตาล ขึ้นกับสปีซีส์ โดยสีที่เห็นเป็นสีของโคนิเดียที่เกิดขึ้น ด้านล่างของโคโลนีอาจมีสีขาวครีม ขาวอมเทา เหลืองอมยกเขียว หรือน้ำตาลแดง ผิวของโคโลนีอาจเป็นผง หรือคล้ากำมะหยี่ ซึ่งเกิดจากปริมาณของโคนิเดียซึ่งสร้างขึ้นมามากมาย บางครั้งอาจมีหยดน้ำที่ผิวหน้าของโคโลนี และเมื่อดูด้านล่างอาจพบรอยนูนขึ้นด้วย

ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นเชื้อราที่มีผนังกั้น เส้นใยไม่มีสี ก้านชูมีลักษณะคล้ายแปรงหรือไม้กวาดซึ่งเกิดจากก้านชูแตกแขนงออกไป ก้านชูเกิดตั้งฉากกับเส้นใย และก้านชูมีผนังกั้นเรียกว่า septate conidiophores ตรงส่วนปลายสุดมีหลายแขนงเรียกว่าไฟอะลายด์ (phialide) ลักษณะคล้ายขวดเป็นส่วนที่สร้างโคนิเดีย โดยโคนิเดียอ่อนจะอยู่ปลาไฟอะลายด์ ส่วนโคนิเดียแก่จะอยู่ปลายสุด และต่อกันเป็นสายเช่นเดี่ยวกันกับเชื้อสกุล Aspergillus แต่เซลล์ของโคนิเดียมีลักษณะกลมหรือกลมรี ผิวอาจเรียบหรือขรุขระ

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุด คือ เชื้อราไอโซเลท M ส่งไปจัดจำแนกทางด้านอณูชีววิทยา และ ทางด้านสัณฐานวิทยา โดยการจัดจำแนกทางด้านอณูชีววิทยาโดยใช้วิธีเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ Beta-tubulin (จากคู่ไพร์เมอร์ Bt2a/Bt2b,5′TGGTAACCCAAAATCGGTGCCTGCTTTCTTGGTATGTCTAGATTTGATCCTGGGGAGGACTGGCCCCTTGGAGGGATGCAGAGTCTGACCGGGCACGCGTCCTCCGGGGCTGGGTAAGGGTTCTGTGGTGGCGTCGACGCTGACAACTGTACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGATGGCTCTGGTATGTAAGTACCACCGACACCCTTTCGATGGGGTTCCAATGCTAGAGGACCACAACGATGGACGATTCTGATGGACGAATAGCTTCAATGGCTCCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTCTGAATGTCTACTTCAACGAGGTACGCCCACTCCCATCCCCAGAAATCCAAAGACGTCGACCTGATTCCCATTCTCCCCGTAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTTCCTCGTGCTGTCCTGGTTGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAACTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTGTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT-3′) พบว่า ลำดับความเหมือนกันของเบส นิวคลีโอไทด์ Beta-tubulin ของเชื้อไอโซเลท M เมื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูลสากล CBS (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับเชื้อรา *Aspergillus allahabadii* เท่ากับ 98.84 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท M พบว่าโคโลนีเจริญเร็วปานกลาง ขนาด 2-3.5 เซนติเมตร หลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร Czapek's Agar เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีขาวถึงขาวครีม เส้นใยเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ ฟู (aerial hyphae) ด้านหลังโคโลนีมีสีเหลืองถึงสีน้ำตาลอ่อน

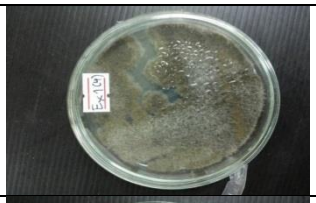
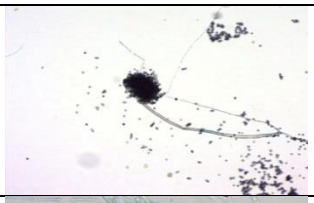
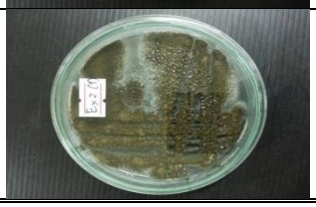
Conidial heads จะเป็นรูปทรงกลมในระยะแรก เมื่อแก่จะมีลักษณะเป็นลำ (columnar) ก้านชูสปอร์ (conidiophores) ผนังเรียบใสไม่มีสี ความยาวก้านชูสปอร์พบได้ตั้งแต่ 180 นาโนเมตร จนถึง 1.5 มิลลิเมตร กว้าง 3.5 – 6.0 ไมโครเมตร vesicle รูปไข่ (ovoid) บน vesicle มี sterigmata สองชั้น สปอร์รูปร่างกลมผนังเรียบ ใสไม่มีสี

ดังนั้น จากผลการจัดจำแนกเชื้อราทางด้านอณูชีววิทยาและสัณฐานวิทยา ให้ผลที่สอดคล้องกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเชื้อราไอโซเลท M คือเชื้อ *Aspergillus allahaba*

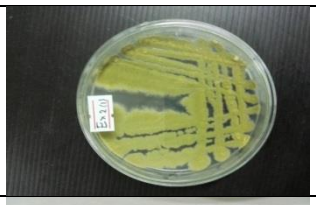
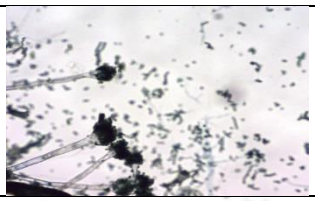
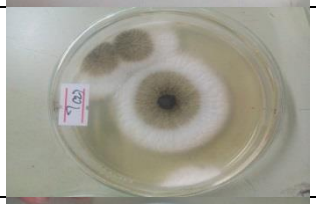
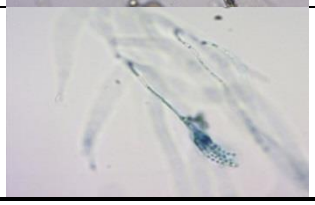
ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการย่อยสลาย Carboxy Methyl Cellulose (CMC)

ไอโซเลท	Hydrolysis capacity (HC value)	ไอโซเลท	Hydrolysis capacity (HC value)
A	1.50±0.00bc	L	1.10±0.00d
B	2.11±0.07ab	M	2.32±0.00a
C	1.32±0.01c	N	1.33±0.02c
D	1.88±0.00b	O	1.24±0.00c
E	1.79±0.02b	P	2.25±0.01a
F	1.50±0.00bc	Q	1.24±0.01c
G	1.48±0.01bc	R	1.02±0.00d
H	1.10±0.02d	S	2.23±0.01a
I	2.12±0.00ab	T	1.49±0.01bc
J	1.50±0.00bc	U	1.47±0.03bc
K	1.62±0.00b	V	1.36±0.01c

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้

ชนิดของเชื้อรา	ลักษณะโคโลนี	ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์
A *Aspergillus sp.*		
D *Trichoderma* sp.		
E *Aspergillus* sp.		
F *Aspergillus* sp.		

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกได้ (ต่อ)

ชนิดของเชื้อรา	ลักษณะโคโลนี	ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์
G *Aspergillus* sp.		
I *Aspergillus* sp.		
K *Penicillium* sp.		
L *Aspergillus* sp.		
M *Aspergillus* sp.		
O *Penicillium* sp.		

5. อภิปรายผล

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากดินตัวอย่างในเขตพื้นที่วนอุทยานภูเขาไฟกระโดง ในงานวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้ง 22 ไอโซเลท คือ เชื้อแบคทีเรีย เชื้อแอคติโนมัยซีท และเชื้อรา ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายปุ๋ยหมัก (Dindal, 1978) ทั้งนี้จากการศึกษาพบเชื้อราที่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลท M, P และ S ซึ่งมีค่า Hydrolysis capacity (HC value) เท่ากับ 2.32, 2.25 และ 2.23 ตามลำดับ โดยจากผลการย่อยสลาย พบว่า เชื้อไอโซเลท M สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์แบบเดี่ยวในกระบวนการหมักปุ๋ยได้ในอนาคต และจากการจัดจำแนกเชื้อพบว่าเชื้อไอโซเลท M คือ เชื้อรา *Aspergillus allahaba* ซึ่งพบว่ามีค่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ดีกว่างานวิจัยของทิพย์นภา วงษ์คูณ และคณะ (2556) ที่ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว และข้าวโพดหวาน โดยจากการศึกษาวิจัยพบว่าเชื้อราที่มีค่า HC value สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 1.02 จึงได้นำเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสที่ดีที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ยในขั้นตอนต่อไป

ทั้งนี้การศึกษาเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลส มีความสำคัญมากต่อการทำปุ๋ยหมักที่ใช้เซลลูโลสเป็นวัสดุหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น เร่งการงอกของรากเมล็ดพืชในรูปหัวเชื้อปุ๋ยหมัก หรืออาจช่วยให้ระยะเวลาในการทำปุ๋ยหมักสั้นลง ทั้งนี้ลักษณะของเศษวัสดุจากพืชแต่ละชนิดเมื่อนำมาหมักเพื่อย่อยสลายเป็นปุ๋ยหมัก เนื้อปุ๋ยหมักและปริมาณธาตุอาหารต่างๆ ในปุ๋ยหมักย่อมแตกต่างกัน ดังรายงานของสุธีรา สุนทรารักษ์ (2553) ที่วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลักในปุ๋ยหมักจากเศษอาหารร่วมกับเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เศษผัก ฟางข้าว ผักตบชวา และเศษใบไม้ (ใบจามจุรี) พบว่า ปุ๋ยหมักจากเศษอาหารร่วมกับเศษใบจามจุรีมีคุณภาพดีกว่าปุ๋ยหมักในทุกกรรมวิธีทั้งในด้านลักษณะภายนอก และปริมาณธาตุอาหารหลัก เนื้อปุ๋ยหมักมีลักษณะอ่อนนุ่ม และมีการย่อยสลายได้ดีกว่าทุกกรรมวิธี

6. ข้อเสนอแนะ

หน่วยงานด้านการเกษตรที่เกี่ยวข้อง ควรมีการรณรงค์ ส่งเสริม และให้ความรู้อย่าง สม่ำเสมอเป็นระยะๆ เกี่ยวกับการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย เปลือกสับปะรดหรือข้าวโพดที่ปล่อยทิ้งมาใช้ประโยชน์ด้วยการผลิตเป็นปุ๋ยหมักเพื่อบำรุงดิน ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุน การผลิต และลดมลพิษให้แก่สิ่งแวดล้อม

7. เอกสารอ้างอิง

ทิพย์นภา วงษ์คูณ, โสภณ บุญลือ และนันทวัน 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 และวิพร พรรณ์ เนื่องเม็ก. (2557). การศึกษาปริมาณธาตุอาหารพืชจากปุ๋ยหมักผักตบชวาที่ย่อยสลาย โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท UPPY19. *แก่นเกษตร*, 42. ฉบับพิเศษ 1 : 671–676.

ศศิธร ไกรฤทธิชัย. (2552). *การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่ สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อยสลายใบไม้.* วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขา ชีววิทยา. 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.