การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังและกากตะกอนเยื่อกระดาษ

Screening of effective bacteria in cassava waste and paper sludge degradation

ชณัฐ วงษ์ซีวะสกุล [1] และ สิรินภา ช่วงโอภาส [1*]

Chanat Wongsiwasaku [1] and Sirinapa Chungopast [1*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลังจากอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลและกากตะกอนเยื่อกระดาษจากอุตสาหกรรมกระดาษ โดยการคัดแยกแบคทีเรียในอาหารที่จำเพาะ ทดสอบอัตราส่วนความกว้างของโซนใสต่อความกว้างของโคโลนี ศึกษากิจกรรมการย่อยโดยเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายและการจัดจำแนกแบคทีเรีย ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียรหัส CE1 มีค่าความกว้างของโซนใสต่อความกว้างของโคโลนีสูงสุดเท่ากับ 4.83 และมีค่าการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 689.74 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่มีกากตะกอน ETP2A เป็น substrate ในขณะที่แบคทีเรียรหัส SS4 มีค่าการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดคือ 745.80 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่มีกากตะกอน ETP2 เป็น substrate แบคทีเรียเหล่านี้ถูกจัดจำแนกได้เป็น *Staphylococcus kloosii* และ *Bacillus megaterium* ตามลำดับ งานวิจัยนี้ชี้ชัดว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ สามารถใช้ในการทำปุ๋ยหมักจากกากตะกอนเยื่อกระดาษและพัฒนาไปสู่การผลิตหัวเชื้อได้

Abstract

The aim of this research was to screen bacteria that can be able to degrading cassava waste from ethanol industry and paper sludge from paper industry in specific medium. The ratio of clear zone width per colony width and the degradation activities by amylase and cellulase had been tested. The result showed that bacterium CE1 had given the highest ratio of clear zone width per colony width at 4.83. The reducing-sugar production was 689.740 µmol/ml in medium that using ETP2A paper sludge

คำสำคัญ: กากตะกอนเยื่อกระดาษ, กากมันสำปะหลัง, แบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส, แบคทีเรียย่อยแป้ง

[1] ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Department of Soil science, Faculty of agriculture at Kamphaeng saen, Kasetsart University, Kamphaeng saen campus, Nakhon Pathom 73140

[*] Corresponding author: agrsrnp@ku.ac.th

as substrate. While bacterium SS4 had given the highest reducing-sugar production at 745.79 µmol/ml in medium that using ETP2 paper sludge as substrate. These bacteria had been identified as *Staphylococcus kloosii* and *Bacillus megaterium*, respectively. This result indicated that isolated bacteria be able to make compost from paper sludge and developing those bacteria to produce inoculum.

บทนำ

ปัจจุบันธุรกิจภาคอุตสาหกรรมได้ขยายตัวอย่างรวดเร็วในแต่ละปี จึงมีวัสดุเหลือทิ้งจากภาคอุตสาหกรรมดังกล่าวจำนวนมาก โรงงานอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่มีวัสดุเหลือทิ้ง เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตเป็นจำนวนมาก เช่น เปลือกไม้ ขี้เถ้าลอย (fly ash) และกากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสีย ทั้งนี้พบว่าวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวมีการนำกลับไปใช้ประโยชน์ได้ไม่เต็มที่ จึงมักจะถูกทิ้งไว้ในแหล่งผลิต ซึ่งอาจจะทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมาภายหลังได้ (Thongjoo และคณะ, 2005) โดยเฉพาะอุตสาหกรรมกระดาษซึ่งมีปริมาณกากของเสียหรือกากตะกอนกว่า 1,500 ตันต่อปีต่อโรง (น้ำหนักเปียก) ซึ่งโรงงานอุตสาหกรรมต้องรับภาระค่าใช้จ่ายในการจัดการกากของเสียเหล่านี้ (ปราณี และคณะ, 2548) ดังนั้นหากสามารถหาวิธีแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม จะเป็นวิธีการหนึ่งในการลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นได้ วัตถุประสงค์การทดลองเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเสียที่ถูกปฏิเสธจากกระบวนการผลิตเอทานอลและกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ได้มาจากระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมที่ทำจากบริษัทเดียวกัน เพื่อนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อและสามารถประยุกต์ใช้ในการทำปุ๋ยหมักจากกากตะกอนต่อไป

สำหรับประเทศไทยนั้นมีโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ โรงงานผลิตกระดาษและโรงงานที่ผลิตทั้งเยื่อกระดาษและกระดาษ ทั้งโรงงานขนาดเล็กและขนาดใหญ่ประมาณ 100 โรงงาน (TPPIA, 1997) นอกจากนี้ สุภาวินี (2550) รายงานว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตมีความหลากหลาย ได้แก่ ไผ่ ยูคาลิปตัส กากชานอ้อย กระดาษที่ใช้แล้ว เป็นต้น นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมกระดาษยังใช้กาวจากแป้งช่วยทำให้กระดาษเหนียวยิ่งขึ้น จึงมีการใช้แป้งจากมันสำปะหลัง การผลิตแป้งมันสำปะหลังที่ทำจากหัวมัน 100 ตันต่อวัน จะมีของเหลือจากกระบวนการผลิต 47 ตัน ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมเมื่อทิ้งไว้ในบริเวณใกล้เคียงโรงงานแปรรูปหรือนำไปทิ้งอย่างไม่ระมัดระวัง (Aro และคณะ, 2010) ปริมาณกากตะกอนที่เกิดขึ้นของอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษยังไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์ 44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการใช้เป็นเชื้อเพลิงภายในโรงงาน และวัสดุปรับปรุงดินอย่างละ 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือนำไปถมที่และมีผู้ซื้อไปใช้ประโยชน์ มีความเป็นไปได้ที่จะนำกากตะกอนมาใช้ทำปุ๋ยหมักโดยใช้แบคทีเรียเร่งการย่อยสลายกากตะกอนเหล่านี้ แบคทีเรียที่น่าสนใจสำหรับการทำหัวเชื้อ ได้แก่ แบคทีเรียย่อยสลายแป้งในกากมัน

Key words : paper sludge, cassava waste, cellulose degrading bacteria, starch degrading bacteria

สำปะหลัง ซึ่งแบคทีเรียนี้จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสและแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสในกากตะกอนเยื่อกระดาษ ซึ่งแบคทีเรียนี้จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลส Choubane และคณะ (2016) ได้ศึกษาความหลากหลายและคัดเลือกแบคทีเรียบริเวณเขตอิทธิพลรอบรากพืชที่ผลิต อะไมเลสในบางพื้นที่ของแอฟริกาเหนือ ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรีย *Carotonia ciliqua* และ *Ficus carica* ที่ได้จาก *Argania spinose* และ *Pistacia lentiscus* มีการผลิตอะไมเลสมากที่สุด Vaidya และ Rathore (2015) ได้ทำการคัดเลือกและจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตอะไมเลสจากดินที่ปลูกมันฝรั่ง ได้ทำการใช้สารละลายไอโอดีน (Iodine solution) เพื่อทดสอบโซนใส และได้ใช้ DNS เพื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ผลพบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้มากที่สุดที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนการศึกษาแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส Yuan และคณะ (2012) ได้คัดเลือกและระบุสายพันธุ์ของ *Fusarium oxysporum* ที่สร้างเซลลูเลสโดยการทดสอบความกว้างโซนใสจากการใช้อาหาร Sodium-Carboxymethyl cellulose (Na-CMC) และทำการทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้วิธีดีเอ็นเอส (DNS method) จากผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียรหัส H57-1 มีการผลิตเซลลูเลสมากที่สุดคือ 1.43 IU/mL มีค่า pH 4.5-5.5 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60-65 องศาเซลเซียส Pathak และ Navneet (2016) ได้ทำการคัดเลือกและอธิบายลักษณะของแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากการกำจัดของเสีย โดยใช้อาหาร CMC ในการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าแบคทีเรียรหัส V1 หรือ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยเซลลูโลสได้มากที่สุด จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าทั้งแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลสสามารถช่วยย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการใช้แบคทีเรียเหล่านี้มาช่วยเร่งการย่อยสลาย น่าจะช่วยลดระยะเวลาในการหมักปุ๋ยและลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นในกระบวนการอุตสาหกรรมได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

กากมันสำปะหลังและกากตะกอนเยื่อกระดาษ อุปกรณ์เครื่องแก้ว ไมโครปิเปต เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ ตู้บ่มเชื้อ ตู้อบแห้ง ตู้เขี่ยเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องวัดพีเอช ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เครื่องผสมสาร สีย้อมแบคทีเรีย เครื่องเขย่า เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เครื่องปั่นเหวี่ยง อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ nutrient agar (NA), starch agar (SA), carboxymethyl cellulose medium (CMC) และ nutrient broth (NB)

การคัดแยกแบคทีเรียจากกากมันสำปะหลังและตะกอนเยื่อกระดาษ

เก็บตัวอย่างกากมันสำปะหลัง (Decanter E85 ที่ผ่านขั้นตอนการรีดน้ำออก และ AS E85 ที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการรีดน้ำออก) จากอุตสาหกรรมเอทานอล และกากตะกอนเยื่อกระดาษ (ETP2 ที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการรีดน้ำออก และ ETP2A ที่ผ่านการรีดน้ำออก) จากโรงงานกระดาษที่จังหวัดปราจีนบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง ใช้ตัวอย่าง 10 กรัม แยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลัง และย่อยเซลลูโลสในกาก

ตะกอนเยื่อกระดาษ โดยวิธีการคล้ายคลึงกับการเจือจางสารละลายดิน (ธงชัย และคณะ, 2551) ซึ่งมีระดับการเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} นำไปกระจาย (spread plate) บนอาหาร SA และ CMC แต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มีลักษณะแตกต่างกัน

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งและเซลลูโลสของแบคทีเรีย

ทดสอบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้ง และแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร SA และ CMC ขีดเส้นแบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็น 4 ส่วน จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อที่เป็นโคโลนีมาจุดลงบนอาหารแต่ละส่วน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บผลการย่อยสลายแป้งโดยนำสารละลายไอโอดีนมาหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ท่วมตามวิธีของ Vaidya และ Rathore (2015) ส่วนผลการย่อยสลายเซลลูโลสเก็บผลโดยนำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ congo red มาหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 2-3 ครั้ง จนเห็นโซนใส ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรียตามวิธีของ Pathak and Navneet (2016) จากนั้นวัดความกว้างโคโลนีของแบคทีเรียและความกว้างโซนใส อัตราส่วนระหว่างความกว้างโซนใสต่อความกว้างโคโลนี

การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย

เตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยงในอาหาร NB เขี่ยเชื้อ 1 loop แล้วนำไปใส่เครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 วัน เมื่อได้เชื้อที่เลี้ยงไว้แล้วให้นำไปปรับค่าความขุ่น (OD) ด้วยน้ำกลั่น โดยการวัดค่าด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้เซลล์มีความขุ่นเท่ากับ 0.6 (OD600 = 0.6) นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้แต่ละชนิด และแบคทีเรียไอโซเลต SS4 ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการซึ่งคัดแยกได้จากกากตะกอนไบโอแก๊ส (เนตรนภา, 2552) ใส่ลงในอาหาร CMC ที่ใส่กากมันสำปะหลังและกากตะกอนเยื่อกระดาษแทน carboxymethyl cellulose เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ตามลำดับ โดยเตรียมในขวดรูปชมพู่ 100 มิลลิลิตร ทำเชื้อละ 3 ซ้ำ เลี้ยงแบคทีเรียโดยการใช้เครื่องเขย่า เป็นเวลา 7 วัน นำมากรอง และปิเปต 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม dinitrosalicylic acid (DNS) 3 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในหน่วยไมโครโมลของกลูโคสต่อมิลลิลิตร ดัดแปลงจากวิธีของ (Behera และคณะ, 2014)

การจัดจำแนกแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยการย้อมสีแบบแกรม การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด NucleoSpin tissue (Macherey-Nagel, Germany) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้ยีน 16S rRNA ซึ่งมีไพรเมอร์ 2 คู่ คือ 785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3' และ 907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3' กับ 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' และ 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำตามวิธีของ Marogen Inc, Korea

วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS โดยวิธีวิเคราะห์ของ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ผลและวิจารณ์

ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากกากมันสำปะหลังและกากตะกอนเยื่อกระดาษ

การคัดแยกแบคทีเรียจากกากมันสำปะหลัง (Decanter E85 และ AS E85) พบความแตกต่างของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหาร SA ทั้งหมด 3 ไอโซเลต ได้แก่แบคทีเรียรหัส SD1 SD2 และ SA1 ส่วนการคัดแยกแบคทีเรียจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ (ETP2 และ ETP2A) พบความแตกต่างของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหาร CMC ทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียรหัส CE1 และ CE2 ซึ่งจะนำมาเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย SS4 ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายแป้งและเซลลูโลสของแบคทีเรีย

จาก Table 1 ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียรหัส SD2 มีค่าความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย 0.2 ซม. และค่าความกว้างโซนใสเฉลี่ย 1.3 ซม. ซึ่งทำให้มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโซนใสต่อความกว้างโคโลนีเฉลี่ยสูงสุดมีค่า 5.7 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จาก Table 3 แบคทีเรียรหัส CE1 มีความกว้างของโคโลนีเฉลี่ย 0.1 ซม. และความกว้างโซนใสเฉลี่ย 0.6 ซม. ซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโซนใสต่อความกว้างโคโลนีเฉลี่ยสูงมีค่า 4.8 แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ งานวิจัยของศิริณา (2558) พบว่าแบคทีเรียที่มีอัตราส่วนระหว่างความกว้างโซนใสต่อความกว้างโคโลนีมาก จะมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์และส่งผลทำให้การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มากตามไปด้วย แต่ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบกับแบคทีเรียรหัส SS4 ซึ่งมีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ

Table 1 The diameter of colony width, clear zone width and ratio of clear zone width per colony width on starch agar

Treatment	Colony (cm.)	Clear zone (cm.)	Ratio
SD1	0.4[b]	1.1[b]	3.0[b]
SD2	0.2[b]	1.3[b]	5.7[a]
SA1	1.6[a]	2.7[a]	1.7[b]
F-test	**	**	*
CV (%)	18.741	15.809	33.124

statistically significant differences indicated with *p<0.05, **p<0.01 by Duncan's new multiple range test. ns: non-significant

Table 2 The diameter of colony width, clear zone width and ratio of clear zone width per colony width on CMC medium

Treatment	Colony (cm.)	Clear zone (cm.)	Ratio
CE1	0.1[b]	0.6[b]	4.8
CE2	1.2[a]	3.7[a]	3.2
F-test	**	**	ns
CV (%)	17.765	5.371	35.872

statistically significant differences indicated with *p<0.05, **p<0.01 by Duncan's new multiple range test. ns: non-significant

ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียย่อยสลายแป้ง และเซลลูโลส

จากผลการทดลอง Figure 1a และ 1b ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายแป้ง รหัส SD2 มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในอาหารที่มี Decantor E85 และ AS E85 เป็นสับสเตรต มีค่า 678.23 และ 636.20 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมคิดเป็น 47.76 และ 34.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียรหัส SD2 มีการปลดปล่อยเอนไซม์อะไมเลส สามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลัง Decanter E85 มีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Aransiola และ Fagade (2015) มีการย่อยสลายเปลือกมันสำปะหลังผสมฟางข้าว โดย *Pseudomonas* sp. มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 28.70, 45.11 และ 14.00 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 14 วัน ซึ่งมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่า อย่างไรก็ตาม ในตำรับควบคุมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ อาจเนื่องมาจากสีของสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS

จากผลการทดลอง Figure 1c และ 1d ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายเซลลูโลสรหัส CE1 มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงที่สุดในอาหารที่มี ETP2 และ ETP2A เป็นสับสเตรต มีค่า 657.21 และ 689.74 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมคิดเป็น 40.86 และ 49.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของศิริณา (2558) พบว่าในระยะเวลา 7 วัน แบคทีเรีย CS ย่อยสลายซังข้าวโพด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 320.17 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการย่อยสลายกากตะกอน ETP2A โดยแบคทีเรียรหัส CE1 แบคทีเรียรหัส SS4 ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการได้จากการคัดแยกจากกากตะกอนไบโอแก๊ส (เนตรนภา, 2552) มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงในอาหารที่มี ETP2 เป็นสับสเตรตเท่ากับ 745.80 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร แต่มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่มี ETP2A เป็น substrate ต่ำกว่า เท่ากับ 667.72 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียรหัส CE1

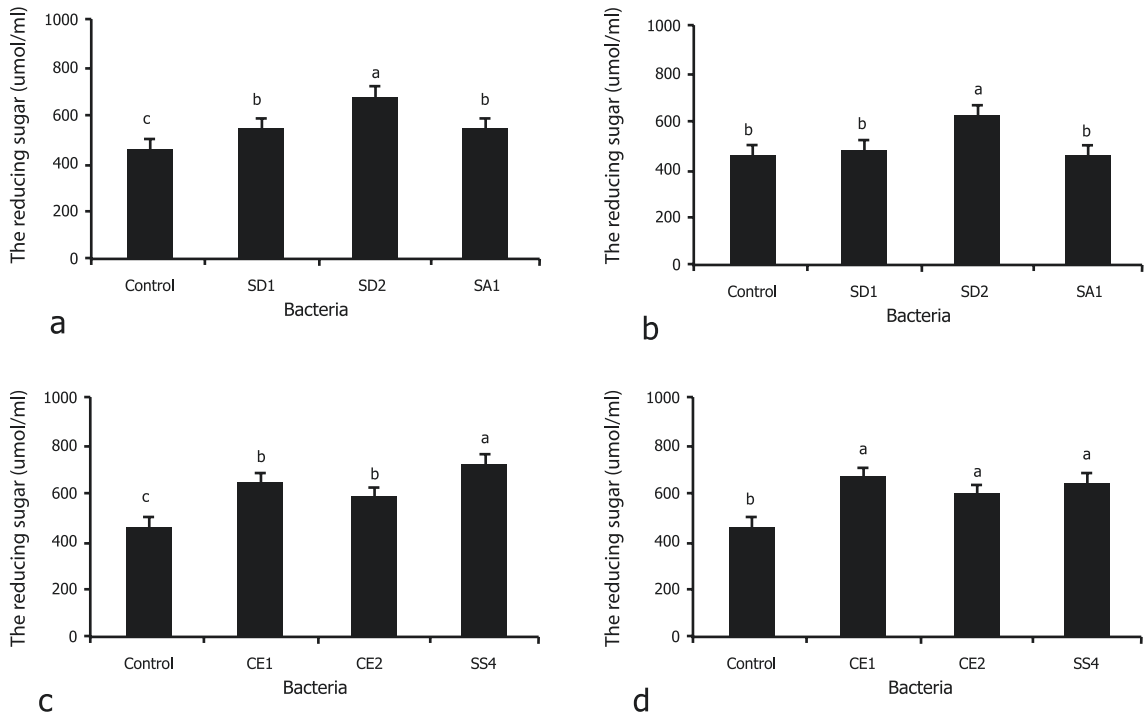

Figure 1 Reducing sugar releasing in CMC medium, a using Decanter E85 as substrate, b using AS E85 as substrate, c using ETP2 as substrate, d using ETP2A as substrate

อย่างไรก็ตาม ในตำรับควบคุมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ อาจเนื่องมาจากสีของสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS

ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียย่อยสลายกากมันสำปะหลัง และแบคทีเรียย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยการย้อมสีแบบแกรมพบว่าแบคทีเรียรหัส SD2 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน แบคทีเรียรหัส CE1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม และแบคทีเรียรหัส SS4 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน จาก Table 3 เมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังและกากตะกอนเยื่อกระดาษ มีเปอร์เซ็นต์การจัดจำแนกความคล้ายคลึงเท่ากับ 99% พบว่าแบคทีเรียรหัส SD2 คือ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคปอดอักเสบ (สมชาย และกาญจนา, 2532), CE1 คือ *Staphylococcus kloosii* ไม่มีรายงานสาเหตุของการก่อโรคซึ่งมีรายงานการพบแบคทีเรียอยู่ในจีนัส Acinetobacter, Pseudomonas และ Staphylococcus ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในลำไส้ปลวก (Pourramezan และคณะ, 2012) ส่วนแบคทีเรียรหัส SS4 คือ *Bacillus megaterium* ไม่มีรายงานสาเหตุการก่อโรค และพบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส สอดคล้องกับ Shakoor และคณะ, 2013 ที่พบว่า *Bacillus megaterium* S3 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ghribi และคณะ, 2016 ที่พบแบคทีเรียสกุล Klebsiella และ Bacillus จาก

ของเสียในโรงงานกระดาษ และมีรายงานว่าแบคทีเรีย *Staphylococcus kloosii* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 6-46 องศาเซลเซียส และสามารถทนความร้อนได้ถึง 60 องศาเซลเซียส (นิธิยา, 2545) ส่วน *Bacillus megaterium* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 31-76 องศาเซลเซียส และสามารถทนความร้อนได้ถึง 90 องศาเซลเซียส (Warth, 1978) โดยเมื่อนำไปทำปุ๋ยหมัก กองปุ๋ยหมักจะมีอุณหภูมิสูงถึง 40-50 องศาเซลเซียส (สมศักดิ์, 2521) ซึ่ง *Staphylococcus kloosii* และ *Bacillus megaterium* สามารถเจริญอยู่ได้ ส่วน *Klebsiella pneumoniae* ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-42 องศาเซลเซียส (Tsuji และคณะ, 1982) จะไม่สามารถเจริญอยู่ได้ในกองปุ๋ยหมัก

Table 3 Identification of bacteria degraded cassava waste and paper sludge

Bacteria	Species	Identification (%)
SD2	*Klebsiella pneumonia**	99
CE1	*Staphylococcus Kloosii*	99
SS4	*Bacillus megaterium*	99

* เชื้อสาเหตุโรคคน (สมชาย และกาญจนา, 2532)

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังและกากตะกอนเยื่อกระดาษ โดยการคัดแยกแบคทีเรียในอาหาร SA และ CMC ตามลำดับ พบแบคทีเรียรหัส SD2 มีอัตราส่วนความกว้างของโซนใสต่อความกว้างของโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 5.7 มีค่าการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 678.23 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และสามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลังจัดจำแนกได้เป็น *Klebsiella pneumoniae* แต่ไม่เหมาะจะนำไปผลิตหัวเชื้อสำหรับทำปุ๋ยหมัก เนื่องจากเป็นเชื้อก่อโรค ส่วนแบคทีเรียรหัส CE1 มีค่าความกว้างของโซนใสต่อความกว้างของโคโลนีเฉลี่ยและมีค่าการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 4.8 และ 689.74 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ ซึ่งจัดจำแนกได้เป็น *Staphylococcus kloosii* ส่วนแบคทีเรียรหัส SS4 จัดจำแนกได้เป็น *Bacillus megaterium* มีค่าการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 745.80 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ซึ่งทั้งแบคทีเรียรหัส CE1 และ SS4 เหมาะจะนำมาผลิตหัวเชื้อได้ โดยอาจใช้เป็นหัวเชื้อผสมสำหรับทำปุ๋ยหมักจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโปรแกรมสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรม (Innovation and Technology Assistance Program; ITAP) และบริษัท ดี.เอ รีเซิร์ช เซ็นเตอร์ จำกัด ที่สนับสนุนเงินทุนและตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ธงชัย มาลา, สิรินภา ช่วงโอภาส, ชวลิต ฮงประยูร และวันทนีย์ พึ่งแสง. 2551. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม. 143 หน้า

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2545. เคมีอาหาร. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ, 487 หน้า

เนตรนภา ปรีเปรม. 2552. การคัดแยกแบคทีเรียที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์จากกากตะกอนไบโอแก๊ส. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน. 35 หน้า

ปราณี เลิศสุทธิวงค์, ศรีไฉล ขุนทน, กฤษณา ศิรเลิศมุกุล และสุวลี จันทร์กระจ่าง. 2548. ผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากกากของเสียในโรงงานกระดาษและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร. รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์, ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. 56 หน้า

ศิริณา ทองดอนน้อย. 2558. การย่อยสลายซังข้าวโพดและผักตบชวาโดยแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการใช้เซลลูโลส. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน. 35 หน้า

สุภาวินี นิลเขต. 2550. การใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกลูโคสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในปฏิกรณ์กึ่งต่อเนื่อง ขนาดระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 102 หน้า

สมชาย สุพันธุ์วณิช และกาญจนา สุพันธุ์วณิช. 2532. การควบคุมและป้องกันโรค. 176-186 หน้า

สมศักดิ์ วังใน. 2521. ปุ๋ยอินทรีย์. ห้างหุ้นส่วนจำกัดพับลิชชั่นเซนเตอร์. 45-60 หน้า

Aransiola M.N. and O.E. Fagade. 2015. Studies on the biodegradation of cassava peels (Manihot Esculenta) and rice straw (*Oryza Sativa*) by some selected microorganisms. Int. J. Plant Sci. Eco. 1(4): 124-130

Aro, S.O., V.A. Aletor, O.O. Tewe and J.O. Agbede. 2010. Nutritional potentials of cassava tuber wastes: A case study of a cassava starch processing factory in south-western Nigeria. Livest. Res. Rural Dev., 22 (11)

Behera, B.C., S. Parida, S.K. Dutta and H.N. Thatoi. 2014. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of mahanadi river delta and their cellulase production ability. Am. J. Microbiol. Res. 2 (1): 41-46.

Choubane, S., B. Cheba, and A. Benourrad. 2016. Screening and phenotypic diversity of amylase producing rhizospheric bacteria from some North African plant. Procedia Tech. 22: 1197-1204.

Ghribi, M., F. Mouelhi and M. Beauregard. 2016. Microbial diversity in various types of paper mill sludge: identification of enzyme activities with potential industrial application. SpringerPlus. 1492 p.

Pathak, V. and A. Navneet. 2016. Screening and characterization of cellulose degrading bacterial isolation of waste disposal site. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 5(6): 898-907.

Pourramezan Z., G.R. Ghezelbash, B. Romani, S. Ziaei and A. Hedayatkhah. 2012. Screening and identification of newly

isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagous termite *Microcerotermes diversus* (Silvestri). Mikrobiologiia. 81(6): 796-802.

Shakoor, S., S. Aftab and A. Rehman. 2013. Characterization of cellulose degrading bacterium, *Bacillus megaterium* S3, isolated from indigenous environment. Pakistan J. Zool. 45(6): 1655-1662.

The Thai Pulp and Paper Industries Association (TPPIA). 1997. Directory the Thai pulp and paper industries association. Bangkok.

Thongjoo, C., S. Miyagawa and N. Kawakubo. 2005. Effect of soil moisture and temperature on decomposition rates of some waste material from agriculture and agro-industry. Plant Prod Sci. 8(4): 475-481.

Tsuji, A., Y. Kaneko, M. Ogawa and S. Goto. 1982. The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods. Microbiol. Immunol. 26(1): 15-24.

Vaidya S. and P. Rathore. 2015. Isolation, screening and characterization of amylase producing bacteria from soil of potato dump site from different regions of Madhya Pradesh. Int. J. Pharma. Bio. Sci. 24-29

Warth, A.D. 1978. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of Bacillus species. J. Bacteriol. 134(3): 699-706.

Yuan, L., W. Wang, Y. Pei and F. Lu. 2012. Screening and identification of cellulose-producing strain of *Fusarium Oxysporum*. Procedia Environ. Sci. 12: 1213-1219.