

การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสและประสิทธิภาพของการย่อยสลาย ซังข้าวโพดและผักตบชวาที่ใช้เป็นซับสเตรต

Isolation of cellulose-degrading bacteria and effective of corncob and water hyacinth decomposition using as substrates

ปรีชา ยอดยิ่ง¹, สิริณา ทองดอนน้อย¹ และ สิริณา ช่งโอภาส^{1*}

Preecha Yodying¹, Sirina Thongdonnoi¹ and Sirinapa Chungopast^{1*}

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยสังเกตจากโซนใสที่เกิดขึ้นในอาหาร CMC ประเมินกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ซังข้าวโพดและผักตบชวาเป็นซับสเตรต การวิเคราะห์หัตถมูล วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิสูง อัตราส่วนของโซนใสต่อความกว้างของโคโลนีแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ และทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยใช้บริเวณ 16S rRNA ได้เป็น *Bacillus* sp. strain BDHGL04, *Bacillus* sp. strain ST-R7 และ *Alcaligenes* sp. BZC5 ที่ระดับความคล้ายคลึง 99, 99 และ 98% ตามลำดับ จากการทดสอบการย่อยสลายซังข้าวโพดและผักตบชวาพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าตัวควบคุม โดยเฉพาะ การใช้ซังข้าวโพดหรือผักตบชวาเป็นซับสเตรตร่วมกับ *Bacillus* sp. strain BDHGL04 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 132.44 และ 138.37 มก./มล. ตามลำดับเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และแบคทีเรียมีความหนาแน่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.49 คิดเป็นแบคทีเรียจำนวน 10^8 ซีเอฟยู/มล. นำแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสทั้งสองชนิดมาผลิตเป็นผงเชื้อผสมและศึกษาอัตราการย่อยสลายของปุ๋ยหมัก พบว่ามีอัตราการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 27.22 มก./วัน ในสัปดาห์ที่ 2 จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีศักยภาพในการนำไปใช้เร่งการย่อยสลายของปุ๋ยหมักประเภทซังข้าวโพดและผักตบชวา

คำสำคัญ: แบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส ปุ๋ยหมัก ซังข้าวโพด ผักตบชวา

ABSTRACT: The object of this research was to isolate cellulose-degrading bacteria. The experimental design was completely randomized design of three replications. The effective cellulase production was studied observing clear zone on CMC medium. The cellulase activity at 30 and 50°C was estimated using corncob and water hyacinth as substrates. The data analysis was measured by reducing-sugar assay. The results showed that the selected bacteria can produce cellulase at high temperature. The ratio of clear zone width per colony width was significantly difference. The bacteria were identified by 16S rRNA gene as *Bacillus* sp. strain BDHGL04, *Bacillus* sp. strain

Received May 30, 2018

Accepted September 17, 2018

¹ ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author: agrsrmp@ku.ac.th

ST-R7 and *Alcaligenes* sp. BZC5 were 99, 99 and 98% of similarity, respectively. From the test of corncob and the water hyacinth decomposition, the cellulase activity was higher than that of control. Especially, the use of corncob or water hyacinth with *Bacillus* sp. strain BDHGL04 were 132.44 and 138.37 mg/ml respectively at 50°C. The optical density of bacteria was 0.49 at 600 nm, representing 10^8 CFU/ml. The both cellulose-degrading bacteria were used to produce an inoculum for accelerated compost decomposition and it was found that the highest decomposition rate of up to 27.22 mg/day at 2 weeks. Hence, the selected bacteria is possible to produce inoculum for decomposition accelerator of the compost that contains corncob and water hyacinth.

Keywords: cellulose-degrading bacteria, compost, corncob, water hyacinth

บทนำ

ประเทศไทยประชาชนมากกว่าร้อยละ 50 ประกอบอาชีพเกษตรกรรม หลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตรทำให้มีวัสดุเหลือใช้ต่างๆ เช่น ฟางข้าว ใบอ้อย ใบมันสำปะหลัง และซังข้าวโพด เป็นต้น มีปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมากถึง 43 ล้านตันต่อปี (สุทธธนา และดาวัลย์, 2557) โดยเฉพาะการผลิตข้าวโพดทั่วโลกสำหรับปี 2012/2013 มีผลผลิตข้าวโพดรวม 868.80 ล้านตัน โดยผลผลิตข้าวโพดทุกๆ 1 ตัน จะได้ซังข้าวโพดปริมาณ 160-180 กิโลกรัม ดังนั้นจะมีซังข้าวโพดปริมาณกว่า 139-156.38 ล้านตันทั่วโลก (USDA, 2014; Zhang et al., 2013) ขณะที่ผลผลิตข้าวโพดในประเทศไทยที่น้ำหนัก 100 กิโลกรัม จะได้เมล็ดข้าวโพด 82% และเป็นซังข้าวโพด 18% (เจษฎา และ ชีรพงษ์, 2554) จากข้อมูลผลผลิตทางการเกษตรของกรมส่งเสริมการเกษตร ในปี 2549 – 2550 มีปริมาณซังข้าวโพดเท่ากับ 0.84 ล้านตัน โดยทั่วไปเกษตรกรไม่ได้ใช้ประโยชน์จากซังข้าวโพด บางรายทิ้งให้ย่อยสลายไปเอง หรือเผาทิ้งเพื่อเตรียมพื้นที่ปลูกในฤดูกาลถัดไป ซึ่งการเผาทำลายจะส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพอากาศ ปัจจุบันจึงมีแนวความคิดที่จะนำซังข้าวโพดมาทำปุ๋ยหมักเพื่อกำจัดเศษวัสดุเหลือใช้นี้ ส่วนผักตบชวาเป็นวัชพืชน้ำล้มลุก ซึ่งแพร่กระจายไปมากกว่า 50 ประเทศใน 5 ทวีป รวมทั้งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อัตราการขยายพันธุ์ที่รวดเร็วส่งผลต่อการปรับตัวของระบบนิเวศ สภาพแวดล้อม สุขภาพของมนุษย์ และการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (Sharma et al., 2016) จากผลการสำรวจของกรมโยธาธิการและผังเมือง ผักตบชวามีปริมาณ 6.2 ล้านตัน ทั่วประเทศไทยเป็นเหตุให้น้ำเน่าเสีย และขวางทางเดินเรือ มีรายงานว่า การจัดการผักตบชวาประสบผลสำเร็จใน

การนำมาทำปุ๋ยหมัก และไม่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของผักตบชวา เพราะเมล็ดของผักตบชวาจะไม่สามารถมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส (Montoya et al., 2013) จากที่กล่าวมาข้างต้น การทำปุ๋ยหมักจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือวัสดุอินทรีย์จากวัชพืชน้ำ จะสามารถช่วยแก้ปัญหาเรื่องสิ่งแวดล้อม โดยลดปริมาณวัสดุเหล่านี้ และนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด องค์ประกอบบางส่วนของวัสดุอินทรีย์ที่ได้จากพืชน้ำย่อยสลายได้ยาก ในซังข้าวโพดพบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลส 32.3-45.6% เฮมิเซลลูโลส 39.8% และลิกนิน 6.7-13.9% ในขณะที่ผักตบชวามีเซลลูโลส 18.2-22.1% และเฮมิเซลลูโลส 48.7-50.1% และลิกนิน 3.5-5.4% (Kumar et al., 2009; Aswathy et al., 2010) เซลลูโลสเป็นสายโพลีแซคคาไรด์ของน้ำตาล D-glucose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 10,000 หน่วย กระบวนการย่อยเซลลูโลสเสร็จสมบูรณ์แล้วจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส (สุภาวดี, 2557) ซึ่งสามารถทำได้โดยจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส รายงานของ ธงชัย (2550) จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายเศษพืชประกอบด้วยจุลินทรีย์ 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีต ได้แก่ *Bacillus* sp., *Cellulomonas* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Nocardia* sp., และ *Streptomyces* sp. เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้จะขับเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ออกมาย่อยสลายเศษพืชได้สารต่างๆ มากมาย การใช้แบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสเร่งการย่อยสลายในกองปุ๋ยหมักจากซังข้าวโพดและผักตบชวา ทำให้ได้ปุ๋ยหมักที่ย่อยสลายสมบูรณ์เร็วขึ้น เกิดประโยชน์ทางการเกษตร โดยลดต้นทุน สร้างรายได้ให้กับชุมชน และลดปัญหาเรื่องสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม ยังมีความต้องการแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถทำกิจกรรมได้ที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากในกระบวนการหมัก

จะเกิดความร้อนสูง ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายลดจำนวนลง (Nakasaki and Hirai, 2017) งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียสเพื่อนำมาใช้ในการย่อยสลายซังข้าวโพด และผักตบชวา โดยตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และเตรียมผงเชื้อ เพื่อใช้ศึกษาอัตราการย่อยสลายของปุ๋ยหมัก

วิธีการศึกษา

การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส

คัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสจากตัวอย่างดิน (CS) เศษใบไม้ (CL) และขอนไม้ (CW) โดยใช้ตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มล. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 10^{-1} - 10^{-6} และปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มล. ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร carboxymethyl cellulose (CMC) agar ซึ่งเป็นอาหารจำเพาะสำหรับคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส ประกอบด้วย CMC 10 กรัม, tryptone 2 กรัม, HK_2PO_4 4 กรัม, Na_2HPO_4 4 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัม, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001 กรัม, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004 กรัม น้ำ 15 กรัม และปรับ pH = 7 (ดัดแปลงจาก Apun et al., 2000) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชม. คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่แตกต่างกันไว้ทำการทดลองต่อไป

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสที่คัดแยกได้

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ กับแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งมีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน ได้แก่ แบคทีเรีย SS4 ที่คัดแยกได้จากกากตะกอนไบโอแก๊ส และแบคทีเรีย W4 ที่แยกได้จากดิน ทำการ cross streak แบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหาร CMC บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อที่เป็นโคโลนีเดียวมาจุดลงบนอาหาร CMC ตรงกลางจานเพาะเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบไซโนสโดยย้อมสีด้วย 0.3%

congo red เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วย 1M NaCl 2-3 ครั้ง คำนวณอัตราส่วนของความกว้างของไซโนสต่อความกว้างของโคโลนี (Z/C) หน่วยเป็น ซม.

กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ซังข้าวโพด และผักตบชวาเป็นซับสเตรต

การวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ดัดแปลงจาก Behera et al. (2014) ใช้อาหารเหลว CMC 90 มล. แต่นำซังข้าวโพด และผักตบชวาสับละเอียดใส่ขวดรูปชมพู่ ขวดละปริมาณ 10 กรัม เป็นซับสเตรตแทน 1% สารละลาย CMC ใน 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) กำหนดค่าความขุ่นของผงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (OD_{600}) เท่ากับ 0.6 ปิเปตสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมได้ในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ 10 มล. เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที บ่มเป็นเวลา 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มล. เติม 3 มล. ของสารละลาย DNS นำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์คือ 1 มก.ของกลูโคส/มล.

การจัดจำแนกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากชุดสกัด NucleoSpin tissue (Macherey-Nagel, Germany) แอมพลีฟิเคชัน 16S rRNA โดยใช้ PCR ไพรมเมอร์ที่ใช้คือ universal primers 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' และ 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' ที่สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 3 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที (Reinsensbach et al., 2000) จากนั้นตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1% agarose gel และนำผลิตรหัสที่ได้จาก PCR ทำ DNA sequencing โดยใช้ไพรมเมอร์ 785F 5' (GGA TTA GAT ACC TGG TA) 3' และ 907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3' (Marogen Inc, Korea) วิเคราะห์ลำดับเบสกับ BLASTN และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นกับจำนวนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว

เตรียมผงเชื้อโดยเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) 100 มิลลิลิตร ใช้ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความชื้นของผงเชื้อเท่ากับ 0.4, 0.8 และ 1.0 ที่ OD₆₀₀ นำผงเชื้อที่มีค่าความชื้นต่างๆ ไปเจือจางให้อยู่ในช่วง 10^{-6} - 10^{-9} แล้วเปิดสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพื่อ spread plate บนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียและบันทึกผล ทำการเปรียบเทียบค่าความชื้นกับจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ เพื่อให้ได้ค่าความชื้นที่มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 10^8 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร เตรียมผงเชื้อใหม่อีกครั้งโดยปรับค่าความชื้นตามค่าที่ได้จากกราฟและเปิดมาผสมกับฟีดกำหนดให้มีจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 10^8 ซีเอฟยู/ฟีด 1 กรัม และทำให้มีความชื้นอยู่ประมาณ 40% จากนั้นบรรจุใส่ถุง ถุงละ 100 กรัม ปิดให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปใช้เป็นผงเชื้อสำหรับการย่อยสลายปุ๋ยหมักจากซังข้าวโพด และผักตบชวาได้

อัตราการย่อยสลายของปุ๋ยหมักจากซังข้าวโพดและผักตบชวา

ศึกษาอัตราการย่อยสลายของปุ๋ยหมักดัดแปลงวิธี litter bag method (Fioretto et al., 1998) โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 การทดลอง คือ ไม่ใส่และใส่ผงเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส โดยใช้ถุงตาข่ายขนาด 12×12 ซม. บรรจุปุ๋ยหมัก 35 กรัม ประกอบด้วย ซังข้าวโพด ผักตบชวา แกลบ และขุยมะพร้าว อัตราส่วน 5: 3: 1: 1 (ดัดแปลงจาก สมศักดิ์, 2521) สำหรับกองปุ๋ยหมักที่มีการใส่ผงเชื้อใช้อัตรา 100 กรัม ต่อปุ๋ยหมัก 1 ตัน ผสมกับน้ำแล้วรดที่ปุ๋ยหมักโดยให้ความชื้น 60% จากนั้นนำไปฝังดินใต้ต้นไม้ที่มีความลึก 10 ซม. ระยะห่างแต่ละหลุม 30 ซม. ปล่อยให้ย่อยสลายตามธรรมชาติ ติดตามอัตราการย่อยสลายของปุ๋ยหมักทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 เดือน โดยชั่งน้ำหนักของปุ๋ยหมักในถุงตาข่าย คำนวณหาอัตราการย่อยสลายตามสมการ exponential decay model (Olson, 1963): $\ln(X_t/X_0) = -kt$ โดยที่ X_t = น้ำหนักของปุ๋ยหมักที่เหลือจากการย่อยสลายในเวลา t (กรัม),

X_0 = น้ำหนักแห้งของปุ๋ยหมักส่วนเริ่มต้น (กรัม), k = อัตราการย่อยสลาย และ t = ช่วงเวลาที่ศึกษา

การวิเคราะห์ผลของข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส

เก็บตัวอย่างขอนไม้ ใบไม้และดิน จากไร่สุทธิแลนด์ ที่อยู่ หมู่บ้านบ้านทอน ตำบลท่าศาล อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย พิกัด N17.408871 E101.432435 ผลการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลต จากขอนไม้ ใบไม้ และดิน จำนวน 1 (CW) , 3 (CL, CL1 , CL2) และ 2 (CS และ CS1) ไอโซเลต ตามลำดับ โดยการทดลองจะทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับตัวอย่างของแบคทีเรียที่คัดแยกก่อนหน้านี้จาก ห้องปฏิบัติการอีก 2 ไอโซเลต คือ SS4 และ W4

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสที่คัดแยกได้

ผลการทดลองในตารางที่ 1 แบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตที่คัดเลือกมานั้น พบว่าแบคทีเรีย CS มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของโซนใสต่อความกว้างของโคโลนี (Z/C) สูงสุดทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 1.22 และ 2.80 ซม. ตามลำดับ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากตามรายงานของ ชนวิฐ และสิรินภา (2560) การคัดแยกแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสจากกากตะกอนเยื่อกระดาษ แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนระหว่างความกว้างโซนใสต่อความกว้างโคโลนีสูงจะสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่สูง ส่วนแบคทีเรีย W4 มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน Z/C รองลงมาเท่ากับ 1.69 และ 2.33 ซม. ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส และแบคทีเรีย CL1 มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน Z/C เท่ากับ 1.28 และ 2.33 ซม. ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรีย SS4 มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน Z/C ต่ำที่สุดทั้งสองอุณหภูมิ

โดยแบคทีเรียทุกไอโซเลตมีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน Z/C แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบางไอโซเลตไม่สามารถแสดงกิจกรรมการย่อยสลายเซลลูโลสและไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทั้งนี้แบคทีเรีย

ที่มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน Z/C สูงและสามารถเกิดกิจกรรมได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส คือแบคทีเรีย CS, CL1 และ W4 จึงเป็นแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสที่เหมาะสมที่จะคัดเลือกไปทดสอบประสิทธิภาพของการย่อยสลายซึ่งข้าวโพดและผักตบชวา

Table 1 The average of clear zone width per colony width ratio of selected bacteria 8 isolates at 30 and 50°C

No.	Bacteria	The average of clear zone width per colony width ratio (Z/C)	
		Temperature at 30°C	Temperature at 50°C
1	SS4	0.70 ^{bc}	0.00 ^b
2	W4	1.96 ^a	2.33 ^{ab}
3	CL1	1.28 ^{ab}	2.33 ^{ab}
4	CS1	0.22 ^c	0.14 ^b
5	CW	0.62 ^{bc}	0.55 ^{ab}
6	CL2	0.21 ^c	0.33 ^b
7	CS	1.22 ^{ab}	2.80 ^a
8	CL	0.78 ^{bc}	0.97 ^{ab}
F-test		**	**
(%) cv		40.96	78.31

The mean values followed by different letters indicate significant differences (** p < 0.01) between treatments according to a Duncan's new multiple range test.

การศึกษาประสิทธิภาพของการย่อยสลายซึ่งข้าวโพดและผักตบชวา

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC โดยสังเกตจากโซนใส่นั้นเป็นการตรวจสอบเบื้องต้น จึงมีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเหลวที่มีซึ่งข้าวโพดหรือผักตบชวาเป็นซับสเตรต พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยแบคทีเรียที่สร้างโซนใบบนอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถย่อยสลายซับสเตรตทั้งสองชนิดได้ จากภาพที่ 1a จะเห็นได้ว่าในตำรับที่มีการใช้ซึ่งข้าวโพดร่วมกับแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสนั้น มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าตำรับควบคุม ซึ่งทำให้เกิดความแตกต่างทางสถิติ ในตำรับที่ 3 ซึ่งเป็นการใช้แบคทีเรีย CS ร่วมกับซึ่งข้าวโพดนั้นมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด เท่ากับ 57.63 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาคือตำรับที่ 2

การใช้แบคทีเรีย CL1 ร่วมกับซึ่งข้าวโพด และตำรับที่ 4 การใช้แบคทีเรีย W4 ร่วมกับซึ่งข้าวโพด มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 57.62 และ 50.22 มก./มล. ตามลำดับ ทุกตำรับการทดลองมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าตำรับควบคุมที่ไม่มีการใช้แบคทีเรียร่วมกับซึ่งข้าวโพด จากภาพที่ 1b จะเห็นได้ว่าตำรับที่มีการใช้ผักตบชวาร่วมกับแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสนั้น มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าตำรับควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ตำรับที่ 4 ซึ่งเป็นการใช้แบคทีเรีย W4 ร่วมกับผักตบชวาซึ่งมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 55.40 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาคือตำรับที่ 2 การใช้แบคทีเรีย CL1 ร่วมกับผักตบชวา, ตำรับที่ 3 การใช้แบคทีเรีย CS ร่วมกับผักตบชวา และตำรับที่ 1 คือตำรับควบคุมที่ไม่มีการใช้แบคทีเรียร่วมกับผักตบชวามีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 53.18, 40.59 และ 8.00 มก./มล.ตามลำดับ

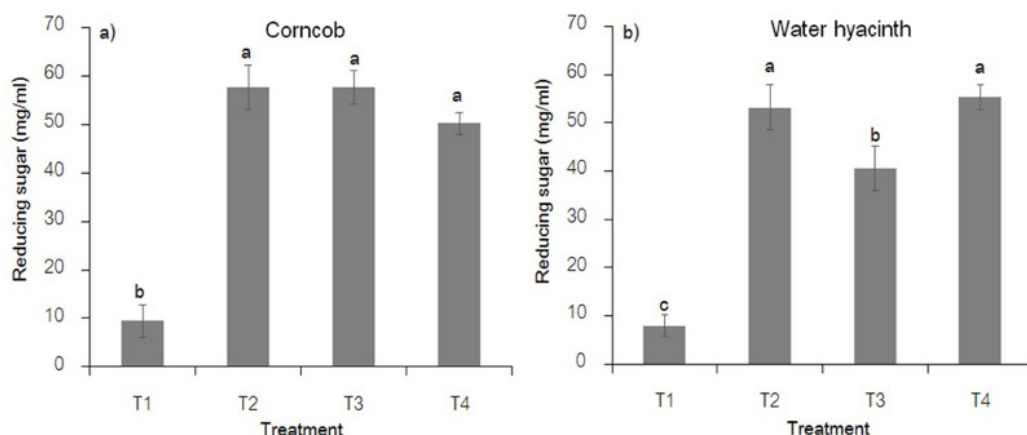


Figure 1 The cellulase activity in each treatment by using a) corncobs and b) water hyacinth substrate at 30°C, the mean values followed by different letters indicate significant differences ($p < 0.01$) between treatments according to a Duncan's new multiple range test. T1: control, T2: CL1, T3: CS, T4: W4

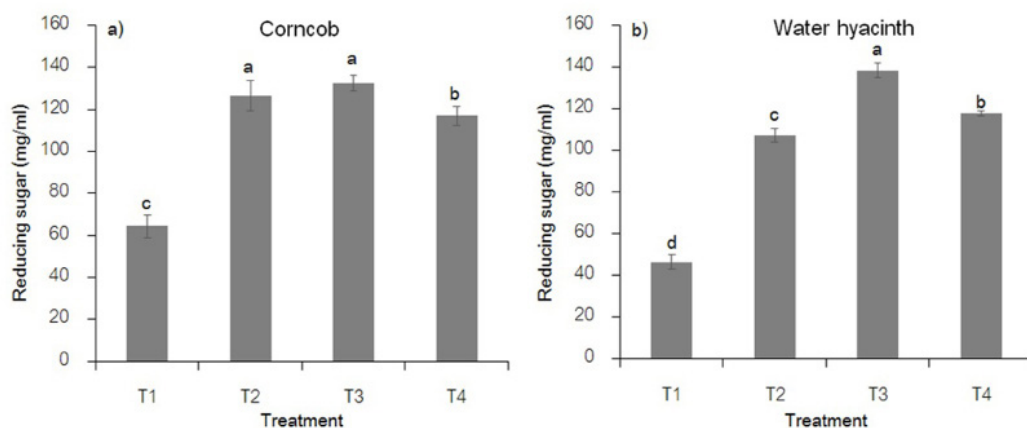


Figure 2 The cellulase activity in each treatment by using a) corncobs and b) water hyacinth substrate at 50°C, the mean values followed by different letters indicate significant differences ($p < 0.01$) between treatments according to a Duncan's new multiple range test, T1: control, T2: CL1, T3: CS, T4: W4

ภาพที่ 2a จะเห็นได้ว่าในตำรับที่มีการใช้ ชั่งข้าวโพดร่วมกับแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าตำรับควบคุมซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้ตำรับที่ 3 ซึ่งเป็นการใช้แบคทีเรีย CS ร่วมกับชั่งข้าวโพดนั้นมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด เท่ากับ 132.44 มก./มล. ที่

อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส รองลงมาคือตำรับที่ 2 การใช้แบคทีเรีย CL1 ร่วมกับชั่งข้าวโพด และตำรับที่ 4 การใช้แบคทีเรีย W4 ร่วมกับชั่งข้าวโพด มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 126.52 และ 116.88 มก./มล. ตามลำดับ และมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับตำรับควบคุมจากภาพที่ 2b จะเห็นได้ว่าในตำรับที่มีการใช้ผักตบชวา

ร่วมกับแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสนั้น มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าค่ารับควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยดำรับที่ 3 เป็นการให้แบคทีเรีย CS ร่วมกับผักตบชวามีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 138.37 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส รองลงมาคือดำรับที่ 4 การใช้แบคทีเรีย W4 ร่วมกับผักตบชวา และดำรับที่ 2 การใช้แบคทีเรีย CL1 ร่วมกับผักตบชวา มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 117.63 และ 107.26 มก./มล. ตามลำดับ โดยมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับค่ารับควบคุม

จากภาพที่ 1 และ 2 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อเสตรตทั้งสองชนิดพบว่าซึ่งข้าวโพดถูกย่อยสลายและปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าผักตบชวา เนื่องจากสารอินทรีย์แต่ละชนิดมีระยะเวลาในการย่อยสลายในดินต่างกันขึ้นอยู่กับคุณภาพหรือองค์ประกอบทางเคมี (ภาณุเดชา และคณะ, 2557) โดยซึ่งข้าวโพดมีเปอร์เซ็นต์ของเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบมากกว่าผักตบชวา (Kumar et al., 2009; Aswathy et al., 2010) และอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 50-55 องศาเซลเซียส (Sheng et al., 2015) ยกเว้นในดำรับที่ 3 ทั้งนี้การย่อยสลายข้อเสตรตขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียอีกด้วย พบว่าแบคทีเรีย CL1 และ CS มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายซึ่งข้าวโพดได้ดีและใกล้เคียงกันทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส แต่แบคทีเรีย CL1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายผักตบชวาได้ดี ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และแบคทีเรีย CS มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายผักตบชวาได้ดี ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการย่อยสลายข้อเสตรตทดลองในห้องปฏิบัติการ หากใช้ในสภาพจริงจะต้องมีการทดสอบเพิ่มเติม เพราะไม่สามารถควบคุมปัจจัยภายนอกได้

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 3 ไอโซเลตสามารถสร้างโซนใสบนอาหาร CMC และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายซึ่งข้าวโพดและผักตบชวาที่ใช้เป็นข้อเสตรต ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน 16S rRNA ได้คือ แบคทีเรีย CS เป็น *Bacillus* sp. strain

BDHGL04 มีความคล้ายคลึง 99% แบคทีเรีย CL1 เป็น *Bacillus* sp. strain ST-R7 มีความคล้ายคลึง 99% โดยทั้งสองไอโซเลตจัดอยู่ในอาณาจักร Bacteria ตระกูล Bacillaceae จีนัส *Bacillus* ติดส์แกรมบวกรูปร่างเป็นท่อน เป็นไปได้ที่จะใช้แบคทีเรีย CS และ CL1 เป็นผงเชื้อเร่งการย่อยสลายปุ๋ยหมักจากซึ่งข้าวโพดและผักตบชวา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Abdel-Rahman et al. (2016) ที่ใช้แบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส 2 ไอโซเลต (*Bacillus licheniformis* 1-1v และ *Bacillus sonorensis* 7-1v) ซึ่งสามารถเจริญในอาหาร CMC ที่ 50 องศาเซลเซียส มาใช้ในการย่อยสลายปุ๋ยหมักจากฟางข้าว ส่วนแบคทีเรีย W4 จำแนกได้เป็น *Alcaligenes* sp. BZC5 มีความคล้ายคลึง 98% มีรายงานว่าแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. ที่แยกได้จากปุ๋ยหมักมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส (Gunathilake et al., 2013) แต่พบว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคเห็ดแวมชักในโคนม และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (อาหมิณี และคณะ, 2558; Kaliaperumal et al., 2006) จึงไม่ควรนำแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นกับจำนวนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว

นำผงเชื้อที่มีค่าความชื้นต่างๆ ไปนับจำนวนแบคทีเรีย โดยแบคทีเรีย CS คือ *Bacillus* sp. strain BDHGL04 และแบคทีเรีย CL1 คือ *Bacillus* sp. strain ST-R7 พบมีความสัมพันธ์กันโดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9988 และ 0.9946 ตามลำดับ จากภาพที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำค่า Log 8 หรือเท่ากับ 10^8 ซีเอฟยู ไปแทนค่าในสมการเพื่อหาค่าความชื้นของเซลล์จะมีค่าความชื้นเท่ากับ 0.49 และ 0.47 สำหรับแบคทีเรีย CS และ CL1 ตามลำดับ ซึ่งจะทำให้มีปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียเท่ากับ 10^8 ซีเอฟยู/มล. รายงานปริมาณแบคทีเรียโดยทั่วไปที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ควรเตรียมผงเชื้อหรือผงเชื้อที่มีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 10^8 - 10^9 CFU/ml สำหรับใส่ลงดิน (Martinez-Viveros et al., 2010) นำค่าความชื้นนี้ไปกำหนดแบคทีเรียแต่ละชนิด ปีเปตอย่างละ 500 มล. เพื่อผสมกับพีต 1,000 กรัม ทำให้ความชื้นเป็น 40% โดยทำให้แห้งด้วยลมบรรจุถุง ถุงละ 100 กรัม ใช้เป็นผงเชื้อต่อไป

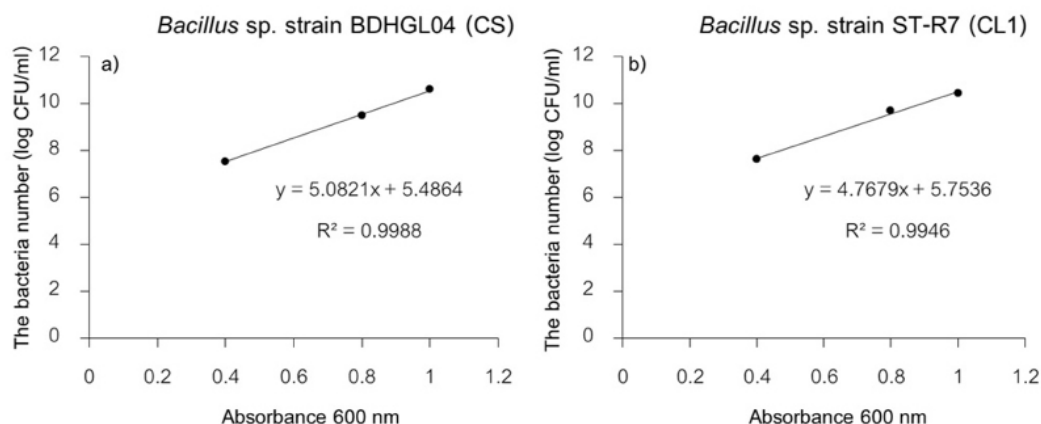


Figure 3 The bacteria number of a) *Bacillus* sp. strain BDHGL04 (CS) and b) *Bacillus* sp. strain ST-R7 (CL1) related optical density of 0.4, 0.8 and 1.0 at 600 nm

อัตราการย่อยสลายของปุ๋ยหมักจากขังข้าวโพด และผักตบชวา

การศึกษ้อัตราการย่อยสลายของปุ๋ยหมัก โดยดัดแปลงวิธี litter bag method เมื่อเปรียบเทียบกับ อัตราการย่อยสลายระหว่างปุ๋ยหมักที่ไม่ใส่และ ใส่ผงเชื้อผสมแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส ตารางที่ 2 พบว่าปุ๋ยหมักที่ใส่ผงเชื้อผสมมีอัตราการย่อยสลาย สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีอัตราการย่อยสลาย สูงสุดเท่ากับ 27.22 มก./วัน เมื่อเทียบกับตัวรับ ควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 21.16 มก./วัน สอดคล้องกับ บัทมา และคณะ (2556) ที่ศึกษาการสลายตัวของ

สารอินทรีย์ต่างๆ และสามารถแยกอัตราการสลายตัว ออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรก (1-4 สัปดาห์) และช่วงหลัง (8-52 สัปดาห์) พบว่าสารอินทรีย์ทุกชนิดมีอัตรา การสลายตัวอย่างรวดเร็วในช่วงแรก หลังจากนั้น อัตราการย่อยสลายมีแนวโน้มลดลง ในสัปดาห์ที่ 6 อัตราการย่อยสลายไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ และแม้ว่าอัตราการย่อยสลายจะลดลง จนถึงช่วงท้ายของการทดลองในสัปดาห์ที่ 12 มีค่า เท่ากับ 13.20 มก./วัน แต่ยังคงสูงกว่าตัวรับควบคุม อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

Table 2 The decomposition rate of compost from corncob and water hyacinth by litter bag method

Treatment	Average of decomposition rate (mg/day)						
	Week						
	0	2	4	6	8	10	12
T1	0.00	21.16 ^b	13.89 ^b	14.51	11.12 ^b	9.45 ^b	8.92 ^b
T2	0.00	27.22 ^a	20.39 ^a	15.63	13.20 ^a	12.84 ^a	13.20 ^a
F-test	ns	**	**	ns	*	*	**
CV (%)	0	4.28	5.98	8.37	6.01	10.20	7.08

The mean values followed by different letters indicate significant differences (** p< 0.01 and * p<0.05) between treatments according to a Duncan's new multiple range test. T1 = uninoculation (control) T2 = inoculation

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่มีอยู่ในองค์ประกอบของขี้ข้าวโพดและผักตบชวาได้ มี 2 ไอโซเลต ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โดยผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และย่อยสลายซัสเตรตที่ต้องการได้ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสำหรับสภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในกองปุ๋ยหมักที่อุณหภูมิจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในสภาพการหมักจริง และลดลงเมื่อการหมักเสร็จสมบูรณ์ การทดสอบการย่อยสลายในถุงตาข่ายพบว่าการใส่ผงเชื้อผสมมีอัตราการย่อยสลายของปุ๋ยหมักสูงกว่าปุ๋ยหมักที่ไม่ได้ใส่ผงเชื้อ ดังนั้นจึงสามารถผลิตผงเชื้อผสมจากแบคทีเรียเหล่านี้เพื่อเร่งการย่อยสลายกองปุ๋ยหมักจากขี้ข้าวโพดและผักตบชวา ผลจากงานวิจัยนี้ทำให้สามารถลดมลภาวะทางน้ำเนื่องจากผักตบชวาและใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างขี้ข้าวโพดให้เกิดประโยชน์ในการเกษตร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนวิจัยสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.)

เอกสารอ้างอิง

เจษฎา มังกะโรทัย และธีรพงษ์ ไชยเฉลิมวงศ์. 2554. การศึกษาผลกระทบของการเติมผงถ่านจากขี้ข้าวโพดในเส้นใยพอลิโพรพิลีนต่อสมบัติเชิงกล. น. 1081-1086. ใน: การประชุมวิชาการข่ายงานวิศวกรรมอุตสาหกรรม ประจำปี 2554. คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, ปทุมธานี.

ชนัฐ วงษ์ชีวะสกุล และ สิริมา ช่างโสภาส. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังและกากตะกอนเยื่อกระดาษ. การประชุมวิชาการดินและปุ๋ยแห่งชาติ ครั้งที่ 5 วันที่ 1 - 2 สิงหาคม 2560. กรุงเทพมหานคร ราชอาณาจักรไทย

ธงชัย มาลา. 2550. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปัทมา วิทยากร, อรรณพ พุทธิโส, สมชาย บุตรนันท์, ภาณุเดช กมลมานิตย์, เบญจพร กุลนิตย์ และ รติกร แสงท้าว. 2556. การปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดินทรายโดยใช้สารอินทรีย์: การศึกษาเชิงกระบวนการ. เกษตร 41 ฉบับพิเศษ 2 : 1-12.

ภาณุเดช กมลมานิตย์, ปัทมา วิทยากร, วรณวิภา แก้วประดิษฐ์ และจอร์จ คาคิซ. 2557. กิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างคุณภาพที่ใส่ในดินทรายเป็นระยะเวลา 14 ปี. เกษตร 42: 531-538.

ศศิธร ไกรฤทธิชัย. 2550. การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อยสลายใบไม้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมศักดิ์ วงษ์โน. 2521. ปุ๋ยอินทรีย์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด พับลิเคชั่นเซนเตอร์, กรุงเทพฯ.

สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557. การปรับปรุงสภาพวัตถุชีวพวกกลไกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22: 641-649.

สุฤทธา แต่งแก้ว และดาวัลย์ วิวรรณเดช. 2557 การศึกษาแหล่งผลิตและศักยภาพผลผลิตชีวมวลจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์. ปีที่ 6 ฉบับ 3, กันยายน-ธันวาคม

อามีนี เจ๊ะลี, สมพงศ์ โอทอง และศุภชัย นิธิพันธ์. 2558. การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวในอ้อยในโคกนวมด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเชื้อ การดื้อยา และเทคนิคทางชีวโมเลกุล. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 18: 17-24.

Abdel-Rahman, M.A., M.N. El-Din, B.M. Refaat, E.H. Abdel-Shakour, E.E.-D. Ewais and H.M.A. Alrefaey. 2016. Biotechnological application of thermotolerant cellulose-decomposing bacteria in composting of rice straw. Ann. Agric. Sci. 61: 135-143.

Apun, K., B.C. Jong and M.A. Salleh. 2000. Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. J. Gen. Appl. Microbiol. 46: 263-267.

- Aswathy, U.S., R.K. Sukumaran, G.L. Devi, K.P. Rajasree, R.R. Singhania and A. Pandey. 2010. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresour. Technol.* 101: 905-930.
- Behera, B.C., S. Parida, S.K. Dutta and i H.N. Thato. 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: 41-46.
- Fioretto, A., G. Musacchino, A. Andolfi and V.D. Santo. 1988. Decomposition dynamics of litters of various pine species in a Corsican pine forest. *Soil Biol. Biochem.* 30: 721-727.
- Gunathilake, K.M.D., R.R. Ratnayake, S.A. Kulasooriya and D.N. Karunaratne. 2013. Evaluation of cellulose degrading efficiency of some fungi and bacteria and their biofilms. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka.* 41: 155-163.
- Kaliaperumal, S., R. Srinivasan, A. Gupta and S.C. Parija. 2006. Postoperative endophthalmitis due to an unusual pathogen: *Alcaligenes faecalis*. *Eye.* 20: 968-969.
- Kumar, P., D.M. Barret, M.J. Delwiche and P. Stroeve. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48: 3713-3729.
- Martinez-Viveros, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo, and M.L. Mora. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 10: 293-319.
- Montoya, J.E., T.M. Waliczek and M.L. Abbott. 2013. Large scale composting as a means of managing water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Invasive Plant Sci. Manag.* 6: 243-249.
- Nakasaki, K. and H. Hirai. 2017. Temperature control strategy to enhance the activity of yeast inoculated into compost raw material for accelerated composting. *Waste Management.* 65: 29-36.
- Olson, J. 1963. Energy storage and balance of producers and decomposers in ecological systems. *Ecology.* 44: 322-331.
- Prasertsan. P., H. A. Kittikul and B. Chitmanee. 1992. Isolation and selection of cellulolytic fungi from palm oil mill effluent. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 614-617.
- Reinsenbach, A.L, K. Longnecker, J. Kirshtein. 2000. Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3798-3806.
- Sharma, A., N.K. Aggarwal, A. Saini and A. Yadav. 2016. Beyond biocontrol: water hyacinth-opportunities and challenges. *J. Environ. Sci. Technol.* 9: 26-48.
- Sheng, T., L. Gao, L. Zhao, W. Liu and A. Wang. 2015. Direct hydrogen production from lignocellulose by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain DD32. *RSC Adv.* 5: 99781-99788.
- USDA. 2014. World agricultural supply and demand estimates, WASDE-529. United States Department of Agriculture, Washington.
- Zhang, C., Z. Geng, M. Cai, J. Zhang, X. Liu, H. Xin and J. Ma. 2013. Microstructure regulation of super activated carbon from biomass source corncob with enhanced hydrogen uptake. *Int. J. Hydrog. Energy.* 38: 9243-9250.