การคัดแยกและคุณลักษณะของเชื้อราจากดินป่าชายเลนที่ผลิตเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลสเพื่อการควบคุมทางชีวภาพ

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LIGNOCELLULOLYTIC ENZYME PRODUCING FUNGI ISOLATED FROM MANGROVE SOIL FOR BIOCONTROL

ชนาภรณ์ จาดตานิม

CHANAPHON JADTANIM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2568

KMITL-2025-SC-M-020-013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LIGNOCELLULOLYTIC ENZYME PRODUCING FUNGI ISOLATED FROM MANGROVE SOIL FOR BIOCONTROL

CHANAPHON JADTANIM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2025

KMITL-2025-SC-M-020-013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2025

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT’S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและคุณลักษณะของเชื้อราจากดินป่าชายเลนที่ผลิตเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลสเพื่อการควบคุมทางชีวภาพ Isolation and characterization of lignocellulolytic enzyme producing fungi isolated from mangrove soil for biocontrol
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชนาภรณ์ จาดตานิม
รหัสประจำตัว	64605028
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2568
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อราจากดินป่าชายเลนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลน 42 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลต โดยมีเชื้อรา 48 ไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารผักกาดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคสบนอาหารวุ้น คัดเลือกเชื้อราที่ให้ค่าดัชนีเอนไซม์ที่ดี 10 ไอโซเลต ระบุสายพันธุ์โดยวิธีการทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ระบุสายพันธ์เชื้อราได้ 10 สายพันธุ์ได้แก่ *Pyricularia grisea* SL1-01, *Cyphellophora fusarioides* SL2-01, *Ramichloridium punctatum* SL2-02, *Anteaglonium parvulum* SL2-04, *Pseudolagarobasidium acaciicola* SL3-03, *Leptosphaerulina* sp. SL3-04 , *Trichoderma capillare* VP2-03, *Halorosellinia rhizophorae* VP3-02, *Hypocreales* sp. VP5-02 และ *Sarocladium terricola* PT2-04 เมื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า *A. parvulum* SL2-04 เป็นเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสดีที่สุด *P. acaciicola* SL3-03 เป็นเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสดีที่สุด และ *T. capillare* VP2-03 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม ไม่มีเชื้อราสายพันธุ์ใดมีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม จากความสามารถในการผลิตเอนไซม์และการยับยั้งการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช จึงคัดเลือก *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 ไปทำหัวเชื้อ พบว่าวิธีการทำหัวเชื้อราโดยใช้วัสดุรองรับหัวเชื้อจากแป้งมันสำปะหลังเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุด จากนั้นหัวเชื้อราไปหมักเป็นปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร (ปุ๋ยชุดควบคุม ปุ๋ย F1 ปุ๋ย F2 และปุ๋ย F3) โดยปุ๋ย F2 และปุ๋ย F3 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีดีที่สุด การศึกษาคุณลักษณะของ *P. acaciicola* SL3-03 พบว่าสร้างกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 อีกทั้งค่าความเข้มข้นของ NaCl ที่ 1.5 และ 3.5 M ยังช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสให้เพิ่มมากขึ้น ในขณะเดียวกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 และหยุดกิจกรรมเอนไซม์เมื่อค่าความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 3.5 M ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเชื้อราเหล่านี้ในการผลิตเอนไซม์และการพัฒนาปุ๋ยอินทรีย์

คำสำคัญ: เชื้อราจากดินป่าชายเลน เซลลูเลส ไซลาเนส ปุ๋ยอินทรีย์ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช แลคเคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title Isolation and characterization of lignocellulolytic enzyme producing fungi isolated from mangrove soil for biocontrol

Student Name Chanaphon Jadtanim

Student ID 64605028

Degree Master of Science (Biotechnology)

Department Biology

Year 2025

Thesis Advisor Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

This study aimed to isolate and characterize fungi from mangrove soil with the potential to produce cellulase, xylanase, and laccase enzymes, solubilize phosphorus and potassium and inhibit plant pathogenic fungi. Forty-two mangrove soil samples were collected, isolating 64 fungal strains, 48 exhibiting mycelial growth at 45°C on Lettuce agar. Screening for enzyme production on agar media identified the top 10 isolates with the highest enzyme indices. Morphological and molecular identification based on ITS region sequencing revealed ten fungal species: *Pyricularia grisea* SL1-01, *Cyphellophora fusarioides* SL2-01, *Ramichloridium punctatum* SL2-02, *Anteaglonium parvulum* SL2-04, *Pseudolagarobasidium acaciicola* SL3-03, *Leptosphaerulina* sp. SL3-04, *Trichoderma capillare* VP2-03, *Halorosellinia rhizophorae* VP3-02, *Hypocreales* sp. VP5-02, and *Sarocladium terricola* PT2-04. Enzyme activity assays showed that *A. parvulum* SL2-04 exhibited the highest cellulase and xylanase activities, *P. acaciicola* SL3-03 showed the highest laccase activity, and *T. capillare* VP2-03 demonstrated the best antagonistic activity against five plant pathogens fungi. However, none of the ten isolates exhibited phosphorus or potassium solubilization ability. Based on their enzymatic and antifungal potential, *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03, and *T. capillare* VP2-03 were selected for fungal inoculum production, with cassava starch proving to be the most effective

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

preservation medium. The fungal inocula was applied to ferment four organic fertilizer formulations (control, F1, F2, and F3) were developed. Fertilizers F2 and F3 exhibited the best physical and chemical properties. Further characterization of *P. acaciicola* SL3-03 revealed optimal cellulase activity at 50°C and pH 5.5, while xylanase activity peaked at 50°C and pH 4.8. NaCl concentrations of 1.5 M and 3.5 M enhanced cellulase and xylanase activities. Laccase activity was optimal at 55°C and pH 5 but was inhibited entirely at 3.5 M NaCl. These findings highlight the potential application of these fungal isolates in enzyme production and organic fertilizer development.

Keywords: Mangrove soil fungi, cellulase, xylanase, organic fertilizer, inhibition of plant pathogenic fungi, laccase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2567 สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์และการช่วยเหลือ ผู้จัดทำต้องขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ สนับสนุนงบประมาณและติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการศึกษาวิจัยวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ จากภายนอกสถาบันฯ และรองศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการอาจารย์บัณฑิตประจำ ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เพื่อให้เล่มวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ทุนผู้ช่วยวิจัยและทุนผู้ช่วยสอน (ระดับปริญญาโท) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตามสัญญาเลขที่ RA/TA-2564-M-016 ประจำปีการศึกษา 2564 และนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ในการทดลอง และสิ่งอำนวยความสะดวกทางวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นต่อการศึกษาวิจัยวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณ แผนกเคมีวิเคราะห์ กรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ ที่ให้การอนุเคราะห์ด้านการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ทำให้ผลลัพธ์การศึกษาสำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้ความสนับสนุนทุนทรัพย์ในการศึกษา ให้กำลังใจและเป็นแรงผลักดันในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมไปถึงขอบคุณเพื่อนพี่น้อง นักศึกษาระดับปริญญาตรี ปริญญาโท และปริญญาเอกของห้องปฏิบัติการเซลล์สัตว์ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำรวมทั้งถ่ายทอดความรู้ที่เป็นประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้

นางสาวชนาภรณ์ จาดตานิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน	4
2.2 เอนไซม์ที่เชื้อราสามารถผลิตได้	5
2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส	7
2.3.1 เอนไซม์เซลลูเลส	7
2.3.1.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลส	7
2.3.1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลส	7
2.3.2 เอนไซม์ไซลาเนส	8
2.3.2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์ไซลาเนส	8
2.3.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์ไซลาเนส	8
2.3.3 เอนไซม์แลคเคส	9
2.3.3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์แลคเคส	9
2.3.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์แลคเคส	9
2.4 เชื้อราที่มีความสามารถละลายแร่ธาตุในดิน	10
2.4.1 เชื้อราที่มีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส (Phosphorus)	10
2.4.2 เชื้อราที่มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียม (Potassium)	11
2.5 เชื้อราที่มีความสามารถในการต่อต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช	12
2.5.1 *Fusarium oxysporum*	13
2.5.2 *Colletotrichum musae*	13
2.5.3 *Colletotrichum gloeosporioides*	14
2.5.4 *Phytophthora palmivora*	15
2.5.5 *Pythium splendens*	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 16
3.1 แหล่งที่มาของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 16
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 17
3.3 สารเคมี 17
3.3.1 อาหารคัดแยก เพาะเลี้ยง และทดสอบเอนไซม์สำหรับเชื้อรา 17
3.3.2 สารเคมีสำหรับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 18
3.3.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา 18
3.3.4 สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) 18
3.3.5 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 19
3.3.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 19
3.4 วิธีการทดลอง 19
3.4.1 การเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลน 19
3.4.2 การคัดแยกเชื้อราจากดินป่าชายเลน 20
3.4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 22
3.4.3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส 22
3.4.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์แลคเคส 22
3.4.4 การระบุเชื้อโดยวิธีการทางสัณฐานวิทยา 23
3.4.5 การระบุเชื้อราโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 23
3.4.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ 23
3.4.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 23
3.4.6 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 25
3.4.6.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส 25
3.4.6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์แลคเคส 26
3.4.7 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม 27
3.4.7.1 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส 27
3.4.7.2 การทดสอบความสามารถในการละลายโพแทสเซียม 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.8 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 28
3.4.8.1 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมี 28
3.4.8.2 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ 29
3.4.9 การเตรียมการหมักปุ๋ยอินทรีย์ 30
3.4.9.1 วิธีการเตรียมหัวเชื้อรา 30
3.4.9.2 วิธีการหมักปุ๋ยอินทรีย์และสัดส่วนวัสดุหมัก 31
3.4.10 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ 32
3.4.10.1 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ระหว่างการหมัก 32
3.4.10.2 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์ 32
3.4.10.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของปุ๋ยอินทรีย์เปรียบเทียบกับมาตรฐานปุ๋ย 32
3.4.11 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อราสาเหตุโรคพืชของปุ๋ยอินทรีย์ 33
3.4.12 การวิเคราะห์คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 33
3.4.12.1 การทดสอบผลกระทบของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 34
3.4.12.2 การทดสอบผลกระทบของค่าความเป็นกรดด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 34
3.4.12.3 การทดสอบผลกระทบของความเข้มข้นของ NaCl ต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 35
3.4.13 โปรแกรมที่ใช้ในกระบวนการทางสถิติ 35
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 36
4.1 คุณลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดินป่าชายเลน 36
4.2 ผลการคัดแยกเชื้อราจากดินป่าชายเลน 38
4.3 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 40
4.4 ผลการระบุสายพันธุ์ของเชื้อรา 44
4.4.1 การระบุสายพันธุ์โดยวิธีการทางสัณฐานวิทยา 44
4.4.2 การระบุสายพันธุ์โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 64
4.5 ผลการทดสอบการวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลของความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม 81
4.7 ผลของความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 82
4.8 ผลการหมักปุ๋ยอินทรีย์ 88
4.8.1 ผลการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อรา 88
4.8.2 ผลผลิตปุ๋ยอินทรีย์ 90
4.8.3 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของปุ๋ยอินทรีย์ 91
4.8.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ระหว่างการหมักปุ๋ย 91
4.8.3.2 ผลการย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์ 96
4.8.3.3 คุณสมบัติทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ 97
4.8.3.4 ผลการตรวจพิสูจน์ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 100
4.8.4 ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 101
4.8.4.1 ผลกระทบของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 102
4.8.4.2 ผลกระทบของความเข้มข้นของ NaCl ต่อคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส 103
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 106
5.1 สรุปผลการวิจัย 106
5.2 ข้อเสนอแนะ 108
เอกสารอ้างอิง 109
ภาคผนวก 123
ภาคผนวก ก 124
ภาคผนวก ข 127
ภาคผนวก ค 131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)	19
3.2	วันที่เก็บ สถานที่ และชื่อรหัสของตัวอย่างดินป่าชายเลน	21
3.3	ส่วนประกอบในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR)	24
3.4	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4	24
3.5	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4	25
3.6	อัตราส่วนของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตร	31
4.1	ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเป็นกรดด่าง ค่าการนำไฟฟ้า และความเค็ม จากตัวอย่างดิน 7 สถานที่	37
4.2	การจำแนกประเภทของดินเค็มโดยใช้ค่าการนำไฟฟ้ามาตรฐานและค่าความเค็มมาตรฐานเป็นเกณฑ์	38
4.3	จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินป่าชายเลนและสกุลของเชื้อราที่สามารถระบุได้ผ่านการสังเกตเบื้องต้น	39
4.4	ผลการระบุสายพันธุ์เชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank	77
4.5	ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์	84
4.6	ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์	85
4.7	ผลการทดสอบทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตร เปรียบเทียบกับค่าคุณสมบัติปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐาน	99
4.8	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของปุ๋ยจำนวน 4 สูตร กับเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์	101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
3.1	ตำแหน่งการวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา (ก) บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน (ข)	29
4.1	ตัวอย่างบริเวณใสบนอาหาร CMC agar และ Xylan agar และบริเวณสีม่วงหรือดำบนอาหาร 1 – naphthol agar ของเชื้อไอโซเลต VP2-03 และ SL3-03 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวก	41
4.2	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของดัชนีเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส จากเชื้อรา 48 ไอโซเลต	43
4.3	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pyricularia* SL1-01 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีแบบแตกแขนง (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) เส้นใยมีขนาดใหญ่และสีเข้ม (จ) Conidiophore (ฉ) Conidia (ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร	45
4.4	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Cyphellophora* SL2-01 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) เส้นใยมีลักษณะโค้งวนเป็นวงลูปกลม (จ) Conidia (ฉ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร	47
4.5	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Ramichloridium* SL2-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiophore (จ-ฉ) Conidia (ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร	49
4.6	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Anteaglonium* SL2-04 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiogenous cells (จ-ฉ) Conidia (ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร	51
4.7	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pseudolagarobasidium* SL3-03 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Gloeocystidia (จ) Arthroconidia (ฉ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Leptosphaerulin* SL3-04 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบแตกแขนง (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) เส้นใยสร้างสปอร์ (จ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร 55

4.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* VP2-03 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบแตกแขนง (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiophore (จ) Conidia (ฉ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร 57

4.10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต *Halorosellinia* VP3-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Germinated ascospore (จ) Gloeocystidia (ฉ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร 59

4.11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Hypocreales* VP5-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiophore (จ-ฉ) Conidia (ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร 61

4.12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Sarocladium* PT2-04 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiophore (จ) Conidia (ฉ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร 63

4.13 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 ของเชื้อราทั้งหมด 3 ไอโซเลต (SL2-04, SL3-03 และ VP3-02) 65

4.14 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS 5 และ ITS 4 ของเชื้อราทั้งหมด 7 ไอโซเลต (SL1-01, SL2-01, SL2-02, SL3-04, VP2-03, VP5-02 และ PT2-04) 65

4.15 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL1-01 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.16 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL2-01 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 68
4.17 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL2-02 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 69
4.18 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL2-04 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 70
4.19 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL3-03 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 71
4.20 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL3-04 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 72
4.21 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต VP2-03 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 73
4.22 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต VP3-02 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 74
4.23 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต VP5-05 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 75
4.24 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต PT2-04 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก 76
4.25 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราจำนวน 10 สายพันธุ์ 79
4.26 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราจำนวน 10 สายพันธุ์ 80
4.27 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของเชื้อราจำนวน 10 สายพันธุ์ 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.28 ผลการทดสอบความสามารถการละลายฟอสฟอรัสของเชื้อราจากดินป่าชายเลน 10 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Pikovskaya agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยมี *A. niger* เป็นชุดควบคุมเชิงบวก 81

4.29 ผลการทดสอบความสามารถการละลายโพแทสเซียมของเชื้อราจากดินป่าชายเลน 10 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Alekandrov agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยมี *A. niger* เป็นชุดควบคุมเชิงบวก 82

4.30 การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน ระหว่าง *T. capillare* VP2-03 กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 สายพันธุ์ 86

4.31 การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน ระหว่าง *P. acaciicola* SL3-03 กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 สายพันธุ์ 87

4.32 การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน ระหว่าง *P. grisea* SL1-01 กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 สายพันธุ์ 88

4.33 ตัวอย่างหัวเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04 จากวิธีที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้เส้นใยเชื้อราบดเป็นผง (ก) วิธีที่ 2 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัสดุรองรับ (ข) และวิธีที่ 3 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้ข้าวสุกเป็นวัสดุรองรับ (ค) 90

4.34 ลักษณะจากการสังเกตด้วยสายตาของปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร หลังผ่านการหมักเป็นเวลา 56 วัน 90

4.35 กราฟแสดงระดับความสูงของการยุบตัวของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตรในระยะเวลา 56 วัน โดยเก็บผลทุก 7 วัน 92

4.36 กราฟแสดงค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรในระยะเวลา 56 วัน โดยเก็บผลทุก 7 วัน 93

4.37 กราฟแสดงอุณหภูมิของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรในระยะเวลา 56 วัน โดยเก็บผลทุก 7 วัน 94

4.38 กราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรในระยะเวลา 56 วัน โดยเก็บผลทุก 7 วัน 95

4.39 กราฟแสดงค่าการนำไฟฟ้า (EC) ของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรในระยะเวลา 56 วัน โดยเก็บผลทุก 7 วัน 96

4.40 กราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตร เปรียบเทียบระหว่างระยะเวลา 28 วัน และ 56 วัน 97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.41 ตัวอย่างการงอกของเมล็ดพืชที่เจริญบนกระดาษทิชชูชุบน้ำสะอาด (ก) และชุบสารละลายปุ๋ย F1 (ข) ในวันที่ 5 97
4.42 ลักษณะการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA ที่ผ่านการ Spread ด้วยปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 วัน 100
4.43 ผลกระทบของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส (ก, ง) ไซลาเนส (ข, จ) และแลคเคส (ค, ฉ) ที่ผลิตโดย *P. acaciicola* SL3-03 103
4.44 ผลกระทบขอความเข้มข้นของ NaCl ต่อคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ที่ผลิตโดย *P. acaciicola* SL3-03 104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปุ๋ยอินทรีย์ คือสารหรือสิ่งที่เพิ่มลงในดินเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติของดิน เกิดจากการนำวัสดุอินทรีย์หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเช่น เศษผัก เศษผลไม้ วัชพืช แหน และมูลสัตว์ มาทำการหมักร่วมกันโดยใช้ความสามารถในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในสภาวะที่เหมาะสมทำให้ส่วนผสมทั้งหมดถูกย่อยสลายเป็นเนื้อเดียว แบ่งเป็นกลุ่มหลักๆ ได้แก่ ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสด และปุ๋ยหมัก (ปริญญา และคณะ, 2550; วีณา, 2563) โดยวัสดุอินทรีย์ที่นำมาหมักเป็นปุ๋ยนั้น ส่วนใหญ่ได้มาจากพืชซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มของลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) อันประกอบไปด้วยเซลลูโลส (Cellulose) ประมาณ 40-50% เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ประมาณ 20-35% และลิกนิน (Lignin) ประมาณ 20-35% ในธรรมชาติสารประกอบดังกล่าวมีอัตราในการย่อยสลายช้าเนื่องจากความซับซ้อนทางโครงสร้างและแรงยึดเหนี่ยวของพันธะระหว่างโมเลกุล (Mikkonen, 2020) ดังนั้นการจะย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ให้กลายเป็นปุ๋ยจึงจำเป็นต้องคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้ให้กลายเป็นสารอินทรีย์คาร์บอน (Organic carbon) ซึ่งช่วยปรับสภาพและโครงสร้างของดินทำให้มีความโปร่งร่วนซุย ระบายน้ำ และถ่ายเทอากาศได้ดี (วีณา, 2563) โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นผู้ผลิตเอนไซม์นอกเซลล์ที่สามารถย่อยสลายสารกลุ่มลิกโนเซลลูโลส อีกทั้งยังให้เอนไซม์ในปริมาณมากและง่ายต่อการนำมาใช้ (Chukwuma และคณะ, 2020) นอกจากคุณสมบัติในการย่อยสลายแล้วเชื้อราบางชนิดยังสามารถผลิตสารเคมี สารชีวโมเลกุล และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ยกตัวอย่าง เช่น *Sagenomella diversispora, Penicillium waksmanii* และ *P. brevicompactum* ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มฟอสฟาเตสเพื่อละลายสารประกอบฟอสเฟต (Phosphate) ให้อยู่ในรูปฟอสฟอรัส (Phosphorus) (Arias และคณะ, 2023) หรือ *Aspergillus niger* และ *A. terreus* ที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์บางชนิดเพื่อย่อยสลายแร่เฟลด์สปาร์ (Feldspar) ให้อยู่ในรูปโพแทสเซียม (Potassium) (Ashrafi-Saiedlou และคณะ, 2024) โดยสารเคมีและสารชีวโมเลกุลเหล่านี้จะทำหน้าที่แปรสภาพสารโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กและง่ายสำหรับพืชในการดึงไปใช้งาน นอกจากนี้เชื้อราบางชนิดยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น *Trichoderma viride* และ *T. harzianum* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhizoctonia solani, Pythium ultimum, Fusarium oxysporum, Sclerotinia sclerotiorum, Botrytis cinerea, Pseudocercospora* spp. และ *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชที่พบได้บ่อยครั้ง (Yao และคณะ, 2023) แต่ทั้งนี้ทั้งนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถานที่ที่เชื้อราแต่ละชนิดอาศัยอยู่ยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งเสริมให้เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนซึ่งเป็นระบบนิเวศที่สำคัญสำหรับเชื้อรา เนื่องจากมีความเค็มสูง มีออกซิเจนแทรกอยู่ในปริมาณน้อย และมีอุณหภูมิโดยเฉลี่ยที่สูงกว่าปกติ (Thatoi และคณะ, 2013) ทำให้เชื้อราที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศดินป่าชายเลนมีความหลากหลาย อีกทั้งยังมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมโดยการสร้างสารเคมี สารชีวโมเลกุล และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณลักษณะจำเพาะ (Jia และคณะ, 2020) โดยในงานวิจัยของ Ameen และ Al-Homaidan (2021) ได้ศึกษาเชื้อราที่คัดแยกจากดินบริเวณป่าชายเลนเพื่อนำไปใช้ในการทำปุ๋ยชีวภาพพบว่า *P. vinaceum* และ *Eupenicillium hirayamae* มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) และเอนไซม์แลคเคส (Laccase) อีกทั้งเชื้อราทั้งสองยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *F. oxysporum, F. solani, A. flavus, A. niger* และ *Bipolaris oryzae* นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Elfiati และคณะ (2021) ได้คัดแยกเชื้อราจากดินป่าชายเลนจังหวัดสุมาตราเหนือ ประเทศอินโดนีเซีย พบว่าเชื้อรา 12 ไอโซเลตที่ละลายฟอสเฟตทั้งหมดอยู่ในสกุล *Aspergillus* ซึ่งจากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นสามารถนำมาประกอบเหตุผลในการศึกษาเชื้อราที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยของประเทศไทย เพื่อนำมาพัฒนาเป็นปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติย่อยสลายอินทรีย์วัตถุให้กลายเป็นสารอาหารที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืช และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช

โดยการศึกษาและพัฒนาปุ๋ยอินทรีย์ในครั้งนี้ สอดคล้องได้กับรูปแบบการพัฒนาเศรษฐกิจโดยอาศัยความหลากหลายทางชีวภาพ อ้างอิงจากโมเดลเศรษฐกิจอย่าง BCG Model ซึ่งเป็นการพัฒนาเศรษฐกิจ 3 ด้าน คือ เศรษฐกิจชีวภาพ (Bioeconomy) เศรษฐกิจหมุนเวียน (Circular economy) และเศรษฐกิจสีเขียว (Green economy) (กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม, 2562) ซึ่งมีจุดมุ่งหมายในการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของเชื้อราภายในประเทศ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ให้เกิดเป็นประโยชน์สูงสุดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 คัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์ไซลาเนส และเอนไซม์แลคเคส จากดินบริเวณป่าชายเลน

1.2.2 คัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช

1.2.3 คัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม

1.2.4 พัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอินทรียวัตถุให้กลายเป็นสารอาหารของพืชและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 คัดแยกเชื้อราจากดินป่าชายเลนในบริเวณอ่าวไทยจำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ ชลบุรี สมุทรปราการ ระยอง จันทบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

1.3.2 ศึกษาความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์ไซลาเนส และเอนไซม์แลคเคส โดยการวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของเอนไซม์โดยใช้ Spectrophotometer

1.3.3 ศึกษาความสามารถของเชื้อราในการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Fusarium oxysporum, Colletotrichum musae, Colletotrichum gloeosporioides, Phytophthora palmivora* และ *Pythium splendens* ด้วยวิธี Dual culture

1.3.4 ศึกษาความสามารถของเชื้อราในการละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ด้วยการสังเกตบริเวณใสบนอาหาร Pikovskaya agar และ Alexandrov agar

1.3.5 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชของปุ๋ยอินทรีย์ โดยการสังเกตสี ลักษณะเนื้อปุ๋ย การยุบตัว ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความชื้น ค่าการนำไฟฟ้า เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ย ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และส่งตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบและธาตุอาหารพืชในปุ๋ยอินทรีย์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 องค์ความรู้เกี่ยวกับความสามารถของเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินของป่าชายเลน

1.4.2 พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพที่สามารถย่อยสลายอินทรียวัตถุให้กลายเป็นสารอาหารของพืช ต้านทานการเกิดโรค และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

ดินป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่สำคัญสำหรับเชื้อรา เนื่องจากมีความเค็มสูง มีออกซิเจนแทรกอยู่ในปริมาณน้อย และมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30–35 องศาเซลเซียส (Thatoi และคณะ, 2013) ทำให้เชื้อราที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศดินป่าชายเลนมีปัจจัยในการเจริญเติบโตที่แตกต่างจากเชื้อราในระบบนิเวศอื่น ส่งผลให้สายพันธุ์และคุณสมบัติของเชื้อรามีความแตกต่างกัน โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานว่าเชื้อราที่ถูกคัดแยกได้จากดินจากป่าชายเลนที่พบได้ส่วนมากอยู่ในสกุล *Aspergillus, Eurotium, Penicillium, Cladosporium, Fusarium, Nigrospora Trichophtonepidermophyte, Trichoderma, Phoma, Rhizophus, Mucor, Alternaria* และ *Pleosporaceae* ยกตัวอย่างจากในงานวิจัยของ Nayak และคณะ (2012) ที่ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินของป่าชายเลนในเมือง Goa ประเทศอินเดีย โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 2 ได้เชื้อราออกมาจำนวน 3 สกุล ดังนี้ *Aspergillus*: *A. penicillioides, A. ochraceus, A. tamarii, A. flavipes, A. terreus var terreus, A. versicolor*, *Eurotium*: *E. amstelodami, E. repens, E. amstelodami, E. repens* และ Penicillium: *P. asymmetrica* sec fasciculata, *P. corylophilum* หรือในรายงานการศึกษาของ Basiriya และคณะ (2017) ที่ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อรา 19 ไอโซเลต จากดินป่าชายเลน Pichavaram ริมอ่าวเบงกอล ในรัฐ Tamil Nadu ทางใต้ของอินเดีย โดยสามารถระบุเชื้อราออกมาได้ 11 สกุล คือ *Aspergillus, Cladosporium, Curvularia, Fusarium, Nigrospora Trichophtonepidermophyte, Trichoderma, Penicillium, Phoma, Rhizophus* และ *Mucor* อีกทั้งยังมีในรายงานการศึกษาของ Khan และคณะ (2020) ที่ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อรา Halophilic และ Halotolerant ของตัวอย่างดินจำนวน 100 ตัวอย่าง จากระบบนิเวศป่าชายเลนของ Miani-Hor Balochistan โดยคัดแยกเชื้อราออกมาได้ 14 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์เป็น ITS 1 และ ITS 2 พบว่าสามารถแยกเชื้อออกมาได้ 5 สกุล คือ *Aspergillus* (4 ไอโซเลต), *Penicillium* (4 ไอโซเลต), *Alternaria* (3 ไอโซเลต), *Fusarium* (1 ไอโซเลต) และ *Pleosporaceae* (2 ไอโซเลต) เป็นต้น

ระบบนิเวศดินป่าชายเลนนอกจากมีสายพันธุ์ของเชื้อราที่หลากหลายแล้วเชื้อราจากดินป่าชายเลนยังมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมโดยการสร้างเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีส่วนช่วยในการดำเนินชีวิตของเชื้อรา (Jia และคณะ, 2020) ยกตัวอย่างในการศึกษาของ Wu และคณะ (2018) ที่ได้ทำการศึกษายีน xynMF13A ซึ่งทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Phoma* sp. MF13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่คัดแยกมาจากดินของป่าชายเลน พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ pH เท่ากับ 5 และมีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นสูงสุดที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.5 M หรือในรายงานการศึกษาของ Nanxing และคณะ (2020) ที่ศึกษาความสามารถของเชื้อราสกุล *Penicillium* จำนวน 28 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินป่าชายเลนโดยรอบทะเลจีนใต้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *R. solani, R. cerealis, Gaeumannomyces graminis* var. *tritici, Alternaria alternate, Colletotrichum gloeosporioides, Magnaporthe grisea* และ *F. oxysporum* โดยพบว่าหลังจากคัดแยกสารด้วย Column Chromatography (CC) เชื้อราสายพันธุ์ *P. javanicum* HK1-23 และ *P. janthinellum* HK1-6 มีการผลิตสารทุติยภูมิ 2 ชนิด คือ Penicillic acid โดยที่ระดับความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถการยับยั้งเชื้อ *R. solani* และ *R. cerealis* ได้ 67.5 เปอร์เซ็นต์ และ 76 เปอร์เซ็นต์ และ Brefeldin A มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *R. cerealis* โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 56.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และรายงานในการศึกษาของของ Trianto และคณะ (2021) ที่ได้ทำการคัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างราก กิ่ง ใบ และตะกอนดิน จากแหล่งป่าชายเลน 5 แห่งในเมือง Manado ทางตอนเหนือของจังหวัด Sulawesi ในประเทศอินโดนีเซีย จากนั้นนำมาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์โปรติเอส (Proteases) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคสกุล *Vibrio* และความหลากหลายของเชื้อราที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์เป็น ITS 1 และ ITS 4 พบว่าเชื้อรา *T. viride* ที่แยกได้จากดินของป่าชายเลน มีความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรคสกุล *Vibrio* นอกจากนี้ *Diaporthe stewartia* และ *Hypocrea* sp. ที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอีกด้วย

2.2 เอนไซม์ที่เชื้อราสามารถผลิตได้

เชื้อราหลายชนิดที่แยกได้จากตะกอนดินและซากพืช ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร อุตสาหกรรม และทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย (Rukachaisirikul และคณะ, 2005) ซึ่งในด้านการเกษตร การนำเชื้อรามาใช้ในกระบวนการย่อยสลายซากพืช เพื่อให้ได้ปุ๋ยที่มีแหล่งสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช โดยการทำปุ๋ยด้วยวิธีการหมักจำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยสลาย เนื่องจากวัสดุหมักส่วนใหญ่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการย่อยสลายจำเป็นต้องมีการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลสได้ โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นผู้ผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ ให้เอนไซม์ในปริมาณมากและง่ายต่อการนำมาใช้ (Chukwuma และคณะ, 2020) นั่นทำให้เชื้อรากลายเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมในการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยเชื้อราที่ถูกค้นพบว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เคยถูกศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มักพบเป็นเชื้อราที่อยู่ในสกุล *Aspergillus* (Santosa และคณะ, 2010; Agustini และคณะ, 2012; Saroj และคณะ, 2018; Zhao และคณะ, 2021), *Cladosporium, Mucor* (Santosa และคณะ, 2010), *Rhizomucor, Fusarium* (Agustini และคณะ, 2012) และ *Trichoderma* (Trianto และคณะ, 2021) ยกตัวอย่างเช่นในการศึกษาการประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ Manganese peroxidase (MnP), Lignin peroxidase (Lip) และแลคเคส ของเชื้อราจากทะเล 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioides* CBMAI 857 และ *M. racemosus* CBMAI 847 พบว่าเชื้อรา *M. racemosus* CBMAI 847 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงที่สุดของ LiP (75376.34 ยูนิตต่อลิตร), MnP (4484.30 ยูนิตต่อลิตร) และแลคเคส (898.15 ยูนิตต่อลิตร) และถือเป็นรายงานฉบับแรกเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติก (Ligninolytic) โดยเชื้อราสายพันธุ์นี้ (Santosa และคณะ, 2010) หรือในการศึกษาการวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตเซลลูเลสและไซลาเนส จากระบบนิเวศป่าเขตร้อนที่แตกต่างกัน 5 แห่งในชวาและสุมาตรา เชื้อราจำนวน 553 ไอโซเลตที่เก็บรวบรวมจากทุ่งนาได้รับการวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อชนิดของเอนไซม์ (เช่น CMC ager และ Xylan agar) เพื่อทดสอบความสามรถของเชื้อราในการผลิตเซลลูเลสและไซลาเนส ซึ่งวิเคราะห์ผลโดยการสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อรา พบว่าเชื้อ *R. variabilis, Fusarium* sp., *F. solani* และ *A. niger* มีศักยภาพที่ดีมากในการผลิตเซลลูเลสและไซลาเนส (Agustini และคณะ, 2012) เช่นเดียวกันกับการศึกษาเชื้อราจำนวน 15 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างรากต้นโกงกางจากป่าชายเลน เมือง Muscat ประเทศ Oman โดยมุ่งเน้นไปที่คุณสมบัติในการย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยวิธีการ Culture filtrate (CF) พบว่าจาก 15 ไอโซเลต มี 1 ไอโซเลต คือ *A. fumigatus* JCM 10253 แสดงให้เห็นว่าเป็นผู้ผลิตเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ซึ่งแสดงกิจกรรมของเซลลูเลส และ β-glucosidase ที่สูงกว่าอีก 14 ไอโซเลต (Saroj และคณะ, 2018) ต่อมาในการศึกษาเชื้อรา Halophilic 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus* และ *A. penicillioides* เพื่อทดสอบความสามารถในฐานะผู้ผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase ที่มีศักยภาพ ภายใต้สภาวะการหมักในสถานะของแข็ง พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ร่วมกัน ให้ผลการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ CMase, FPase, Xylanase และ β-xylosidase สูงที่สุดภายใต้สภาวะการหมักที่ค่า pH ตั้งแต่ 9.0 ถึง 10.0 ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส และมี NaCl 15–20 เปอร์เซ็นต์ ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์นี้เป็นผู้ผลิต Hydrolase ที่มีศักยภาพ ซึ่งสามารถอำนวยความสะดวกในการแปรสภาพชีวมวลของพืช (Zhao และคณะ, 2021)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศและอุตสาหกรรมชีวภาพ โดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการแปรสภาพอินทรีย์สารให้กลายเป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลเล็กลงและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อในกระบวนการอื่นได้ เอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส เป็นเอนไซม์กลุ่มสำคัญที่มีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ เช่น ฟางข้าว เปลือกไม้ กากพืช และของเสียจากการเกษตร ทำให้สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานชีวภาพหรือปรับปรุงคุณภาพของปุ๋ยอินทรีย์ได้ (Chukwuma และคณะ, 2020)

2.3.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลส (EC 3.2.1.4) เป็นประเภทเอนไซม์ไฮโดรไลติก (Hydrolytic enzymes) ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ถูกแบ่งออกเป็นสามประเภทตามฟังก์ชันการเร่งปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เซลลูเลสประเภทเอนโดกลูคาเนส (Endoglucanases) จะทำงานแบบสุ่มโดยทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ภายในสายของโซ่เซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความยาวต่าง ๆ กัน ในขณะเดียวกันเอนไซม์เซลลูเลสประเภทเอ็กโซกลูคาเนส (Exoglucanases) จะทำหน้าที่ย่อยส่วนปลายของโซ่เซลลูโลสเกิดผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอส (Cellobiose) และสุดท้ายเอนไซม์เซลลูเลสประเภทเบต้าดีกลูโคซิเดส (β-d-glucosidases) จะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ย่อย Cellobiose, Aryl-glucopyranosides และ Cellodextrins ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส

2.3.1.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลส

การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลสนิยมใช้วิธีการสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อราหลังจากการย้อมสีอาหาร CMCA (Carboxymethylcellulose agar) ด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine) โดยสารละลายแกรมไอโอดีนสามารถเข้าจับกับโพลีแซคาไรด์ที่มีพันธะ β - 1,4 glucosidic เกิดสีน้ำตาลเข้ม ทำให้เมื่อเชื้อราสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์กับ CMC (Carboxymethylcellulose) ที่มีพันธะ β - 1,4 glucosidic สารละลายแกรมไอโอดีน จึงไม่สามารถเข้าจับได้เกิดเป็นบริเวณใส (Paula และคณะ, 2022)

2.3.1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือกลูโคสซึ่งอยู่ในกลุ่มน้ำตาลรีดิวซ์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 1 ยูนิต (Unit) ในเวลา 1 นาทีสามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ด้วยเหตุนี้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจึงได้รับความนิยมในการนำมาคำนวณหากิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลส วิธีวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สารละลาย 3, 5-Dinitrosalicylic Acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(DNSA Method) เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว หลักการของวิธีนี้อาศัยการตรวจจับการมีอยู่ของหมู่คาร์บอนิล (C=O) ในโครงสร้างน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น หมู่อัลดีไฮด์ของกลูโคสจะถูกออกซิไดซ์โดยสารละลาย 3, 5-Dinitrosalicylic Acid ซึ่งแรกเริ่มมีสีเหลือง ให้กลายเป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ซึ่งเป็นสารละลายมีสีส้มหรือแดง และสามารถนำไปคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Kamande และคณะ, 2024)

2.3.2 เอนไซม์ไซลาเนส

ไซลาเนส (EC 3.2.1.8) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) เช่นเดียวกันกับเซลลูเลส สามารถแบ่งออกตามฟังก์ชั่นการทำงานได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์กับโครงสร้างหลักของไซแลน (Xylan) และกลุ่มที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์กับส่วนกิ่งก้านของไซแลน กลุ่มที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์โครงสร้างหลักมีเอนไซม์อยู่ 3 ประเภท คือ เอ็นโดไซลาเนส (Endoxylanases) ทำงานแบบสุ่มโดยทำหน้าที่ตัดสายโซ่หลักของไซแลน เอ็กโซไซลาเนส (Exoxylanases) ทำหน้าที่ตัดส่วนปลายของโซ่หลัก และเบต้าไซโลซิเดส (β-Xylosidases) ทำหน้าที่ตัดไซแลนสายสั้นที่ผ่านการย่อยมาจากเอนไซม์ 2 ชนิดก่อนหน้านี้ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลไซโลส (Xylose) ซึ่งจัดอยู่ในหมู่น้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกันกับน้ำตาลกลูโคส และเอนไซม์ไซลาเนสกลุ่มที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ส่วนกิ่งก้านของไซแลนมีเอนไซม์อยู่ 3 ประเภทคือ ประเภทอัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (α-L-Arabinofuranosidase) ทำหน้าที่ตัดพันธะระหว่างกิ่งที่มีหมู่ α -L-arabinofuranose unit (α-Araf) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะราบิโนฟูราโนไซด์ (Arabinofuranosides) ประเภทอัลฟากลูคูโรนิเดส (α -Glucuronidase) ทำหน้าที่ตัดพันธะ α -1,3 glycosidic ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดกลูคูโรนิก (Glucuronic acid) หรือ เมทิลกลูคูโรนิก (Methylglucuronic acid) และประเภทอะเซทิลไซแลนเอสเตอเรส (Acetyl xylan esterase) ทำหน้าที่ตัดพันธะระหว่างกิ่งที่มีหมู่ Acetyl (Razeq และคณะ, 2018)

2.3.2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์ไซลาเนส

การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์ไซลาเนสสามารถทำได้โดยการสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อราหลังจากการย้อมอาหาร Xylan agar ด้วยด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน เช่นเดียวกับการวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเซลลูเลส โดยสารละลายแกรมไอโอดีนสามารถเข้าจับกับพันธะ β-1,4 glycosidic ที่อยู่ในสายโซ่หลักของไซแลน อาหารวุ้นจึงเกิดเป็นสีน้ำตาลเข้ม ทำให้เมื่อเชื้อราสร้างไซลาเนสออกมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์กับไซแลนในอาหาร Xylan agar สารละลายแกรมไอโอดีน จึงไม่สามารถเข้าจับได้เกิดเป็นบริเวณใส (Luong และคณะ, 2023)

2.3.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์ไซลาเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากไซแลนถูกไฮโดรไลซ์ด้วยไซลาเนสเกิดผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกันกับน้ำตาลกลูโคส การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNSA Method จึงสามารถนำมาใช้กับการการวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์ไซลาเนสได้เช่นกัน

2.3.3 เอนไซม์แลคเคส

แลคเคส (EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และอนุพันธ์ของอะโรมาติก เช่น Ortho- และ Para-diphenols, Aminophenols, Polyphenols, Polyamines, Lignin และ Aryl diamines โดยใช้ ทองแดง (Cu) เป็นโคแฟกเตอร์ (Co-factor) เมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารตั้งต้น แลคเคสจะดึงอะตอมของไฮโดรเจน (Hydrogen) จากสารตั้งต้นผ่านทองแดงและใช้โมเลกุลออกซิเจน (O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ (Shrestha และคณะ, 2016)

2.3.3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์แลคเคส

การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์แลคเคสสามารถทำได้โดยใช้การสังเกตบริเวณสีม่วงหรือดำที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร 1-Napthol agar เมื่อเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อราผลิตออกมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ 1-Naphthol ($C_{10}H_8O$) ที่ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Radical formation) ซึ่งสามารถรวมตัวกัน (Polymerization) เกิดสารพอลิเมอร์ของแนฟทอล (Naphthol polymerization) ที่มีสีม่วงหรือดำขึ้น (Shrestha และคณะ , 2016)

2.3.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์แลคเคส

โดยคุณสมบัติของเอนไซม์แลคเคสตามปกตินั้นไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลิกได้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นจะต้องใช้สารตัวกลางในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ในการศึกษานี้ได้นำเอาสารละลาย 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) มาใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส โดยสารละลาย ABTS จะถูกแลคเคสออกซิไดซ์ให้เป็น อนุมูล $ABTS^{+}$ (Radical cation) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งสี (Chromogenic substrate) โดยจะเปลี่ยนจากสีเขียวอมฟ้าของ ABTS เป็นสีฟ้าเข้มหรือสีน้ำเงิน ซึ่งสีที่เกิดขึ้นเมื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Bassanini และคณะ, 2021) ค่าที่ได้ออกมาสามารถนำไปคำนวณเป็นกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสได้ผ่านการเปรียบเทียบมาตราส่วน 1 ยูนิตของเอนไซม์แลคเคสสามารถออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมลของ ABTS ได้ในเวลา 1 นาที (Dias และคณะ, 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เชื้อราที่มีความสามารถละลายแร่ธาตุในดิน

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนแร่ธาตุในดิน (Biomineralization) เนื่องจากเชื้อราบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์หรือกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดอะซิติก ซิตริก ฟอร์มิก ฟูมาริก กลูโคนิก ไกลออกซิลิก และออกซาลิก ที่ทำหน้าที่สำหรับละลายและหมุนเวียนแร่ธาตุในดินให้อยู่ในรูปแบบที่สิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้งานในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) (Sterflinger, 2000) โดยเชื้อราแต่ละสายพันธุ์มักมีความสามารถในการละลายแร่ธาตุในดินที่แตกต่างกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น *A. niger* สารมาถละลายฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม ทองแดง โคบอลต์ เหล็ก แมงกานีส แมกนีเซียม สังกะสี ฟอสฟอรัส เฟลด์สปาร์ และปูนขาว (Khuna และคณะ, 2021; Vassileva และคณะ, 2022; Ashrafi-Saiedlou และคณะ, 2024) หรือ *T. harzianum* ที่สารมาถละลายแร่สังกะสี (Aishwarya และคณะ, 2020) โดยในการศึกษานี้จะมุ่งเน้นความสนใจเชื้อราที่มีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช

2.4.1 เชื้อราที่มีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัส (Phosphorus: P) เป็นธาตุอาหารหลักของพืชที่สำคัญซึ่งถูกใช้ในระหว่างกระบวนการสร้างและถ่ายโอนพลังงาน การเมแทบอลิซึมของคาร์บอน การสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ การกระตุ้นเอนไซม์ การตรึงไนโตรเจน และเป็นองค์ประกอบของชีวโมเลกุลที่สำคัญ เช่น กรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิปิด และอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) (Aziz และคณะ, 2014) ฟอสฟอรัสในธรรมชาติส่วนใหญ่มักถูกพบอยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ไม่ละลายน้ำ ทำให้พืชไม่สามารถดูดซับนำไปใช้ประโยชน์ได้ เป็นเหตุให้ต้องพึ่งความสามารถของเชื้อราในดินเพื่อละลายโครงสร้างขนาดใหญ่ของฟอสฟอรัส

การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส สามารถทำได้โดยใช้การสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร Pikovskaya agar เมื่อเชื้อราที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตเจริญเติบโตบน Pikovskaya agar จะเริ่มผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก กรดกลูโคนิก และกรดออกซาลิก ซึ่งจะช่วยเปลี่ยนไตรแคลเซียมฟอสเฟต (Tricalcium phosphate) ซึ่งเป็นโครงสร้างฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำให้แปรสภาพกลายเป็นไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPO_4^{2-}) หรือ ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($H_2PO_4^-$) ซึ่งเป็นโครงสร้างฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ เมื่อมีการละลายของฟอสฟอรัสจะทำให้รอบโคโลนีของเชื้อราเกิดบริเวณใส (Li และคณะ, 2016) มีการศึกษาการแยกเชื้อราที่มีความสามารถละลายฟอสฟอรัสโดยใช้อาหาร Pikovskaya agar เช่นกัน ยกตัวอย่างจากในงานของ Elias และคณะ (2016) ซึ่งได้ทำการศึกษา เชื้อราจำนวน 167 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรากของพืชในเมือง Jimma ประเทศเอธิโอเปีย โดยเชื้อราที่มีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสได้อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสกุล *Aspergillus, Penicillium* และ *Fusarium* โดยให้ค่าดัชนีการละลาย (Solubilization Index) อยู่ในช่วง 1.10 - 3.05 คล้ายกันกับการศึกษาของ Doilom และคณะ (2020) ที่ได้คัดแยกเชื้อรา 13 สายพันธุ์ โดยหนึ่งสายพันธุ์ได้จากอากาศ และอีก 12 สายพันธุ์ได้จากดิน วิเคราะห์ความสามารถการละลายฟอสฟอรัสโดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร Pikovskaya agar พบเชื้อราสกุล *Aspergillus, Penicillium* และ *Talaromyces* สามารถสร้างบริเวณใสได้ โดย *A. hydei* sp. nov. มีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสสูงสุด ให้ค่าดัชนีการละลายที่ 2.58 ± 0.04

2.4.2 เชื้อราที่มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียม

โพแทสเซียม (Potassium: K) เป็นธาตุอาหารที่เป็นปัจจัยพื้นฐานของกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตของพืช ปริมาณโพแทสเซียมที่เพียงพอช่วยเพิ่มกระบวนการสังเคราะห์แสง ปรับปรุงการดูดซึมสารอาหาร รักษาองศาความเอียงของใบที่เหมาะสมต่อการรับแสง และควบคุมการเปิดปิดปากใบ ทำให้มีก๊าซและการไหลของน้ำในลำต้นเพียงพอ (Sardans และ Peñuelas, 2021) แต่ในธรรมชาติโพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารที่มีอยู่ในดินน้อย ดังนั้นเพื่อให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างเหมาะสม จึงจำเป็นต้องใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียม จุลินทรีย์ที่ละลายโพแทสเซียมจะละลายโพแทสเซียมโดยการผลิตกรดอินทรีย์และลดค่า pH ของดิน (Trivedi และคณะ, 2016)

การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของความสามารถในการละลายโพแทสเซียม สามารถทำได้โดยใช้การสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร Aleksandrov agar โดยมีกระบวนการเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส นั่นคือเมื่อเชื้อราสร้างกรดอินทรีย์ที่สามารถช่วยเปลี่ยนโพแทสเซียมเฟลด์สปาร์ (K-feldspar) จากโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำให้เป็นโพแทสเซียมไอออน (K^+) ที่สามารถละลายน้ำได้จะทำให้เกิดเป็นบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อรา (Youssef และคณะ, 2023) โดยได้มีการศึกษาเชื้อราที่มีความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสโดยประยุกต์ใช้ Aleksandrov agar ในการคัดแยกเชื้อรา เช่น ในการศึกษาของ Prajapati และคณะ (2012) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อรา 4 ไอโซเลตบนอาหาร Aleksandrov ager เสริมด้วย Potassium aluminium silicate 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรา 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. niger* และ *A. terreus* มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียม โดยให้ค่าดัชนีการละลายที่ 1.87 และ 1.62 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Trivedi และคณะ (2016) ซึ่งศึกษาการคัดแยกและพัฒนาเชื้อราที่สามารถละลายโพแทสเซียมของตัวอย่างเหง้าอ้อยจากสถานที่ต่างๆ รอบภูมิภาคนาคปุระ (มหาราษฏระ) ประเทศอินเดีย ซึ่งคัดแยกเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aleksandrov ager ที่มีผง mica พบ *A. niger* KSF 05 ให้ค่าดัชนีการละลายมากที่สุดที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เชื้อราสาเหตุของโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดินจะโจมตีพืชที่อ่อนแอและทำให้เกิดเป็นโรค เช่น การเน่าของเมล็ด รากเน่า และโรคใบไหม้ (Amraoui และคณะ, 2015) โดยที่เชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินบางชนิดมีสามารถอยู่รอดได้เป็นเวลาหลายปีด้วยการคงอยู่ในรูปแบบของสปอร์ จากนั้นจึงเกิดการเจริญของเส้นใยพัฒนารูปร่างและคุณสมบัติภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เอื้ออำนวย ด้วยเหตุนั้นจึงทำให้การจัดการโรคที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุของโรคพืชในดินนั้นทำได้ยาก สารฆ่าเชื้อราและสารฉีดพ่นกำจัดจากสารเคมีสังเคราะห์เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ก็ไม่ถือว่าเป็นวิธีแก้ปัญหาสำหรับการทำการเกษตรที่ยั่งยืน (Mokhtari และคณะ, 2017) ทางเลือกหนึ่งของวิธีการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินคือการใช้วิธีการทางชีวภาพในรูปของการใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุของโรคพืช โดยจุลินทรีย์นี้จะทำหน้าที่เป็นผู้ผลิตสารควบคุมทางชีวภาพที่ไม่เพียงแต่ประหยัดกว่าสารฆ่าเชื้อราสังเคราะห์เท่านั้น สารควบคุมทางชีวภาพนี้ยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผู้ผลิตสารควบคุมทางชีวภาพอาจเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ถาวรและเกี่ยวข้องกับพืช เชื้อราเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่อาศัยในดิน มีศักยภาพเป็นผู้ย่อยสลายทางชีวภาพ การตรึงไนโตรเจน ปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน และผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของพืช (Mirsam และคณะ, 2021) โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชอยู่มากมายในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น ในงานของ Mokhtari และคณะ (2017) ได้ศึกษาเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 17 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากดินในโมร็อกโก เพื่อทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยโดยใช้วิธี dual culture กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 สายพันธุ์ คือ *F. oxyxporum, Rerticillium dahlia* และ *R. solani* พบว่าเชื้อ *Trichoderma* ที่แยกได้แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยในเชื้อ *F. oxyxporum, R. dahlia* และ *R. solani* อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมี *T. harzianum* ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมี (Percentage inhibition of radial growth, PIRG) สูงที่สุด หรือในการศึกษา ความสามารถของ *T. virens* IMI-392430, *T. pseudokoningii* IMI-392431, *T. harzianum* IMI-392432, *T. harzianum* IMI-392433 และ *T. harzianum* IMI-392434 เพื่อควบคุม *Ceratocystis Paradoxa* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคจุดไหม้ในต้นอ้อย พบว่า *T. harzianum* IMI-392432 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีสูงสุดเท่ากับ 63.80 เปอร์เซ็นต์ (Rahman และคณะ, 2009) ซึ่งผลลัพธ์คล้ายคลึงกับการศึกษาการคัดเลือกและประเมินเชื้อ *Trichoderma* spp. สำหรับการยับยั้งการเจริญของของ *Macrophomina phaseolina* เชื้อราสาเหตุของโรครากเน่าของถั่วลิสง โดย *Trichoderma* spp. 5 สายพันธุ์ คัดแยกได้จากดินบริเวณรากของพืชถั่วลิสง และประเมินด้วยใช้วิธี dual culture กับเชื้อ *M. phaseolina* พบว่าเชื้อ *T. harzianum* (T3) และ *T. viride* (T1) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. phaseolina* สูงที่สุด ที่ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติบโตในแนวรัศมีเท่ากับ 61.1 เปอร์เซ็นต์ และ 64.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Sreedevi และคณะ, 2011) โดยในการศึกษานี้ได้ให้ความสำคัญกับความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชที่พบได้บ่อยในพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. oxysporum, C. musae, C. gloeosporioides, Phytophthora palmivora* และ *Pythium splendens*

2.5.1 *Fusarium oxysporum*

*F. oxyspor*um โคโลนีมีลักษณะเป็นปุยคล้ายสำลีหรือขนสัตว์ สีของโคโลนีอาจแตกต่างกันไปตั้งแต่สีขาว เหลืองอ่อน ส้มพีช ไปจนถึงสีม่วงอ่อน บริเวณด้านล่างของจานเพาะเลี้ยงมักแสดงสีม่วงหรือสีชมพูเป็นวงเส้นใย (Hyphae) เป็นเส้นใยที่มีผนังกั้น (Septate) คอนิดิโอฟอร์ (Conidiophores) ลักษณะเป็นก้านเดี่ยวหรือแตกแขนงเล็กน้อย มาโครคอนิเดีย (Macroconidia) เป็นสปอร์ขนาดใหญ่รูปร่างโค้งคล้ายเคียว มีผนังกั้น 3-5 ช่อง ไมโครคอนิเดีย (Microconidia) มีขนาดเล็ก ไม่มีผนังกั้น หรืออาจมีเพียงหนึ่งช่อง รูปร่างกลมหรือรี (Kee และคณะ, 2020)

F. oxysporum เป็นเชื้อราก่อโรคที่สามารถทำให้พืชหลากหลายชนิดเกิดโรค ตัวอย่างอาการของโรคที่เกิดขึ้นเช่น ต้นหรือใบเหลือง ลำต้นเหี่ยวเฉา การเจริญเติบโตช้าลง รากเน่า และเนื้อเยื่อท่อลำเลียงมีสีคล้ำ ซึ่งส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อพืชเศรษฐกิจสำคัญ โดยพืชผักที่ได้รับผลกระทบ ได้แก่ มะเขือเทศ แตงกวา แตงโม กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง มันเทศ หัวหอม พริก และพืชตระกูลถั่ว (Kee และคณะ, 2020; Jackson และคณะ, 2024) การควบคุมโรคที่มีสาเหตุมาจาก *F. oxysporum* อย่างง่ายที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือวิธีทางชีวภาพ โดยการใช้เชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ยกตัวอย่างในงานของ Lone และคณะ (2012) ซึ่งได้ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *T. harzianum* โดยเพาะเลี้ยงแบบ Dual culture กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. spherospermum, A. niger* และ *F. oxysporum* เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมี พบว่า *T. harzianum* หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ pH 5.6 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีสูงสุดใน *A. niger* (75 เปอร์เซ็นต์) ตามด้วย *C. spherospermum* (72.2 เปอร์เซ็นต์) และ *F. oxysporum* (25 เปอร์เซ็นต์)

2.5.2 *Colletotrichum musae*

C. musae มีลักษณะโคโลนีที่มีสีตั้งแต่ขาวไปจนถึงส้ม และมีเส้นใย (Mycelia) ที่เจริญเติบโตได้เร็ว เป็นเส้นใยที่มีผนังกั้น Conidia ของมีลักษณะเป็นเซลล์เดียว (Unicellular) มีความโปร่งแสง (Hyaline) และมีรูปร่างจากรูปไข่ไปจนถึงทรงกระบอก โดยมีขนาดประมาณ 13.14 × 5.86 ไมโครเมตร (Zakaria และคณะ, 2009; Sakinah และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C. musae เป็นเชื้อราก่อโรคที่มีผลกระทบหลักต่อพืชตระกูลกล้วย (*Musa* spp.) โดยทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ซึ่งแสดงอาการเป็นจุดดำหรือสีน้ำตาลบนผล โดยเฉพาะในช่วงหลังการเก็บเกี่ยวและระหว่างการสุกของผลกล้วย อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถก่อโรคในพืชชนิดอื่นได้ด้วย เช่น ฝรั่ง มะม่วง แอปเปิล อะโวคาโด และพืชในสกุลถั่ว (Zakaria และคณะ, 2009) ซึ่งเคยมีการศึกษาการใช้เชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและควบคุมโรคที่เกิดจาก *C. musae* ด้วยเช่นกัน เช่นงานวิจัยของ Li และคณะ (2021) ที่นำ *A. versicolor* ที่คัดแยกได้จากเนื้อเยื่อของต้นตาเสือ (*Amoora culcullata* Roxb) โดยนำไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธี dual culture กับเชื้อก่อโรค 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. musae, C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* พบว่า *A. versicolor* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีต่อ *C. Musae* สูงที่สุด โดยมากถึง 61.9 เปอร์เซ็นต์

2.5.3 *Colletotrichum gloeosporioides*

C. gloeosporioides มีลักษณะโคโลนีเริ่มต้นเป็นสีขาวและค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้มเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ และมีลักษณะเป็นขนหรือฝุ่นเนื่องจากการเจริญของเส้นใยหนาแน่น ผิวโคโลนีอาจมีลักษณะเป็นรอยย่น และขอบของโคโลนีไม่สม่ำเสมอ เส้นใยมีผนังกั้น มีสีใสหรือสีเทาอ่อน Conidia มีลักษณะใส และมีเซลล์เดียว โดยมีรูปร่างทรงกระบอกหรือรี ขนาดของ Conidia อยู่ที่ประมาณความยาว 13 - 15 ไมโครเมตร และความกว้าง 4 - 6 ไมโครเมตร มีแอพเพรสโซเรีย (Appressoria) เป็นโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้นมีรูปร่างไม่เป็นระเบียบและมีหลายเซลล์ช่วยให้เชื้อราสามารถยึดเกาะและเจาะเข้าสู่ผิวพืชได้ (Hassan และคณะ, 2018; Qiao และคณะ, 2021)

C. gloeosporioides สามารถก่อโรคแอนแทรคโนสได้ในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในพืชที่อยู่ในตระกูลกล้วย มะเขือเทศ มะม่วง มะละกอ แอปเปิล อะโวคาโด กล้วย บลูเบอร์รี่ ส้ม ลูกพีช สตรอว์เบอร์รี่ และพริก เชื้อรานี้สามารถทำให้เกิดโรคได้ในส่วนต่างๆ ของพืช รวมถึงผล ดอก ใบ และลำต้น พืชที่ติดเชื้อจะมีอาการเป็นรอยแผลยุบลง เกิดจุดขนาดเล็กของเนื้อเยื่อตาย และผลเน่า (Khodadadi และคณะ, 2021; Qiao และคณะ, 2021) แนวคิดการควบคุมโรคที่เกิดจาก *C. gloeosporioides* นำไปสู่การศึกษาเชื้อราหลากหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชยกตัวอย่างในการศึกษา *A. flavus* Link, *A. fumigatus* Fresenius, *A. niger* van Tiegh และเชื้อรา *T. viride* Pers ที่แยกออกจากดินบริเวณรากของ *Rauwolfia serpentina* โดยประเมินเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีของเชื้อ *C. gleosporiodes* (Penz.) Sacc ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของ *R. serpentina* (L.) Benth ด้วยวิธี Dual culture โดยพบว่า *A. flavus* แสดงการยับยั้ง *C. gleosporiodes* (Penz.) Sacc, *T. viride, A. niger,* และ *A. fumigatus* ซึ่งแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีเท่ากับ 94.42, 90.90, 86.13 และ 73.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Yasmin และ Shamsi, 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 *Phytophthora palmivora*

P. palmivora จะสร้างโคโลนีที่มีลักษณะเด่น โดยโคโลนีมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันตามประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวเหมือนฝ้าย Sporangia มีลักษณะเป็นทรงหยดน้ำ (Tear-shaped) มีส่วนปลายยื่นออกเป็นติ่ง (Papillate) ซึ่งจะถูกสร้างบน Sporangiophores ที่มีลักษณะแตกแขนง สามารถสร้าง Chlamydospores ซึ่งเป็นสปอร์ที่มีผนังเซลล์หนา ใช้ในการทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและช่วยให้เชื้อสามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่ยากลำบาก (Perrine-Walker, 2020; Guo และคณะ, 2021)

P. palmivora เป็นเชื้อราที่มีสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด ได้แก่ โกโก้ ยาง ปาล์มน้ำมัน มะละกอ มะพร้าว พริกไทยดำ มะม่วง ทุเรียน และส้ม โดยตัวอย่างโรคที่เกิดขึ้นคือ โรคฝักดำ โรคใบเขียวเหี่ยว โรคลำต้นเน่า โรคผลเน่า โรคยอดเน่า และโรครากเน่า (Guo และคณะ, 2021) การศึกษาวิธีการควบคุมโรคที่เกิดจาก *P. palmivora* ปรากฏในการศึกษาเชื้อราที่คัดแยกได้จากเนื้อเยื่อพืชที่เกิดโรคสาเหตุจาก *P. palmivora* อ้างอิงจากในงานของ Simamora และคณะ (2021) ที่คัดแยกเชื้อรา 10 ไอโซเลตจากฝักของโกโก้ โดยใช้วิธีวิธี Dual culture เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีของ *P. palmivora* โดยได้คัดเลือกไอโซเลตที่ดีที่สุด 5 ไอโซเลต ได้แก่ *Fusarium*6, *Aspergillus*5, *Ramichloridium* sp., *Fusarium*5, *Gliocladium*3, และ *Aspergillus*6 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีเท่ากับ 88.83, 88.67, 87.67, 85.33, 84.00, 80.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.5.5 *Pythium splendens*

P. splendens มีรูปร่างโคโลนีซ้อนกันเป็นกลับคล้ายดอกไม้ เส้นใยมีสีขาว มีสปอร์รูปร่างกลมเหมือนไข่ ผนังเซลล์บาง ซึ่งจะงอกโดยตรงผ่านการสร้างท่อสปอร์ ไม่ปล่อยสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้นผ่านการสร้าง Oospore ที่มีผนังหนาภายใน Oogonium เส้นใยมีลักษณะโคเอนโนไซติก (coenocytic) คือไม่มีผนังกั้นภายในเส้นใย (Moorman และคณะ, 2002; Binagwa และคณะ, 2016)

P. splendens เป็นเชื้อรากลุ่มโอไมซีต (Oomycete) ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าและโรคกล้าเน่าในพืชหลายชนิด รวมถึงพืชไม้ดอก ไม้ประดับ และพืชเศรษฐกิจ เช่น เดหลี หน้าวัว ฟิโลเดนดรอน ผักกาด กล้วยไม้หวาย พืชตระกูลถั่ว มะละกอ มะเขือเทศ ทุเรียน และแตงกวา (Moorman และคณะ, 2002; Ploetz และคณะ, 2004; Fu และคณะ, 2005; Al-Sa'di และคณะ, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 แหล่งที่มาของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราสาเหตุโรค 5 สายพันธุ์จาก รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้แก่ *Fusarium oxysporum* FCSP01, *Colletotrichum musae* CMSP02, *Colletotrichum gloeosporioides* TBRC1736, *Phytophthora palmivora* CHP25-S08 และ *Pythium splendens* CHP18-N03

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 กระบอกตวง (Cylinder)

3.2.2 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

3.2.3 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope)

3.2.4 ขวดแก้วใส่สารหรือขวดดูแรน (Laboratory or Duran bottle)

3.2.5 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด (Tissue culture bottle) 6 ออนซ์

3.2.6 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

3.2.7 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

3.2.8 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)

3.2.9 เครื่องเขย่าสาร (Shaker)

3.2.10 เครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (thermomixer)

3.2.11 เครื่องชั่งสาร (Analytical Balance)

3.2.12 เครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ (Gel documentation)

3.2.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.2.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนความเร็วรอบต่ำ (Spin down)

3.2.15 เครื่องมือวัดอิเล็กทรอนิกส์อเนกประสงค์หลายฟังก์ชัน (Multimeter)

3.2.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.2.17 เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (EC meter)

3.2.18 เครื่องวัดค่าความชื้น (Soil moisture meter)

3.2.19 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.20 เครื่องวัดค่าอุณหภูมิ (Thermometer)

3.2.21 เครื่องอุ่นหลอดทดลอง (Heat box)

3.2.22 จานเพาะเลี้ยง (Petri dish)

3.2.23 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

3.2.24 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.2.25 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.2.26 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.2.27 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet)

3.2.28 ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven)

3.2.29 ถุงซิปล็อค (Zip lock bag)

3.2.30 ทิป (Tip)

3.2.31 ที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer) เบอร์ 3

3.2.32 แท่งคนสาร (Glass rod)

3.2.33 บีกเกอร์ (Beaker)

3.2.34 ปากคีบ (Forceps)

3.2.35 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.2.36 เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier caliper)

3.2.37 สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Slide and cover slit)

3.2.38 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.2.39 หลอดทดลอง (Test tube)

3.2.40 หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)

3.2.41 หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Micro Centrifuge Tube) ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร

3.2.42 อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)

3.2.43 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.3 สารเคมี

3.3.1 อาหารคัดแยก เพาะเลี้ยง และทดสอบเอนไซม์สำหรับเชื้อรา

3.3.1.1 1 – naphthol agar

3.3.1.2 Alekandrov agar

3.3.1.3 Carboxy methyl cellulose agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.4 Corn Meal agar + 3 % เกลือทะเล

3.3.1.5 Pikovskaya agar

3.3.1.6 Potato dextrose agar

3.3.1.7 Potato dextrose broth

3.3.1.8 Xylan agar

3.3.2 สารเคมีสำหรับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

3.3.2.1 แกรมไอโอดีน (Gram's Iodine)

3.3.2.2 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3.3.2.3 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

3.3.2.4 เอนไซม์ไซลาเนส (Xylanase)

3.3.2.5 เอนไซม์แลคเคส (Laccase)

3.3.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

3.3.3.1 Immersion oil

3.3.3.2 Lactophenol

3.3.3.3 Lactophenol cotton blue

3.3.3.4 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3.3.4 สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR)

3.3.4.1 10X standard *Taq* reaction buffer

3.3.4.2 Deionize water

3.3.4.3 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

3.3.4.4 Primer ตามตารางที่ 3.1

3.3.4.5 *Taq* DNA Polymerase

3.3.4.6 TE buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
ITS1	5’ TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3’	
ITS4	5’ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3’	White และคณะ, 1990
ITS5	5’ GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3’	

3.3.5 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

3.3.5.1 6X loading dye

3.3.5.2 Agarose

3.3.5.3 EDTA

3.3.5.4 Ethidium bromide

3.3.5.5 Marker VC 100 bp plus บริษัท Vivantis

3.3.5.6 TBE buffer

3.3.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

3.3.6.1 0.05M sodium citrate buffer pH 4.8

3.3.6.2 0.1M Sodium acetate buffer pH 4.5

3.3.6.3 1% Beechwood Xylan

3.3.6.4 1% Carboxymethylcellulose

3.3.6.5 1mM ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

3.3.6.6 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลน

เก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนที่ความลึก 5 – 15 เซนติเมตร จากผิวหน้าดิน (Chamekh และคณะ, 2019) ใส่ในขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนจาก 6 จังหวัด รอบอ่าวไทย ได้แก่ ชลบุรี สมุทรปราการ ระยอง จันทบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ (ตารางที่ 3.2) แต่เนื่องจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์มีรูปร่างยาวและมีอาณาเขตติดชายฝั่งทะเลอ่าวไทยเกือบทั้งจังหวัด จึงเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนเพิ่มเป็น 2 สถานที่ รวมทั้งหมดเป็น 7 สถานที่ ในแต่ละสถานที่จะเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลน 6 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างถูกเก็บห่างกัน 5 – 10 เมตร รวมเป็นตัวอย่างดินป่าชายเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งสิ้น 42 ตัวอย่าง นำตัวอย่างดินไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง (Positive potential of the Hydrogen ions ; pH) ค่าการนำไฟฟ้า (Electric Conductivity ; EC) และค่าความเค็ม (Salinity) โดยใช้เครื่องมือ pH meter, EC meter และ Salinity meter ตามลำดับ ค่าการวิเคราะห์ที่ได้จะถูกนำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีของดินก่อนจะนำตัวอย่างดินทั้ง 42 ตัวอย่าง ไปคัดแยกเชื้อราต่อไป

3.4.2 การคัดแยกเชื้อราจากดินป่าชายเลน

คัดแยกเชื้อราด้วยวิธีการ Serial dilution โดยใช้เทคนิคการ Spread plate บนอาหาร Corn Meal Agar (CMA) ที่มี 3 % เกลือทะเล เพื่อเป็นการยืนยันคุณสมบัติของเชื้อราที่อยู่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็ม (Bovio และคณะ, 2018) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 - 7 วัน เมื่อมีการเจริญเติบโตของเชื้อราตัดปลายเส้นใยย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร PDA เพื่อคัดแยกให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ สังเกตลักษณะของโคโลนีเชื้อราและลักษณะของสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อระบุเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์เดียวกันหรือไม่ โดยถ้ามีลักษณะเหมือนกันอยู่ในตัวอย่างดินที่เก็บจากสถานที่เดียวกันจะถูกรวมเป็นไอโซเลตเดียวกัน จากนั้นตัดปลายเส้นใยเชื้อราที่คัดแยกได้วางบนอาหารวุ้นซึ่งมีส่วนผสมของผงผักกาด ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของวัสดุลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยเชื้อราที่เกิดการเจริญของเส้นใยจะถูกสันนิษฐานว่าสามารถย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้ เพื่อให้มั่นใจว่าระหว่างกระบวนการหมักปุ๋ยอินทรีย์ ที่อุณหภูมิอาจสูงถึง 45 – 80 องศาเซลเซียส (Khalib และคณะ, 2020) เชื้อราเหล่านี้จะยังคงความสามารถในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตบนอาหารวุ้นซึ่งมีส่วนผสมของผงผักกาดย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อราในการระบุสกุลเบื้องต้นและเตรียมเชื้อราเริ่มต้นในการทดสอบถัดไป โดยการตั้งชื่อไอโซเลตเชื้อราที่ถูกคัดแยกออกมาจะเรียงจากตัวอักษรภาษาอังกฤษ 2 ตัวบ่งบอกถึงสถานที่เก็บตัวอย่างดิน (ชลบุรี : SM, สมุทรปราการ : SL, ระยอง : KK, จันทบุรี : PT, เพชรบุรี : LP และ ประจวบคีรีขันธ์ : VP และ SR) ตัวเลขตัวต่อมาบ่งบอกลำดับของตัวอย่างดินในแต่ละสถานที่ (เลข 1-6) ตามด้วยสัญลักษณ์ “-” และตัวเลข 2 หลักสุดท้ายซึ่งบ่งบอกถึงลำดับเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินนั้นๆ ยกตัวอย่างเช่น ไอโซเลตของเชื้อราที่คัดแยกออกมาเป็นลำดับที่ 2 จากตัวอย่างดินหมายเลข 3 ของจังหวัดชลบุรี รหัสของไอโซเลตเชื้อราที่แยกออกมาได้คือ SM3-02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 วันที่เก็บ สถานที่ และชื่อรหัสของตัวอย่างดินป่าชายเลน

วันที่เก็บตัวอย่าง	จังหวัด	สถานที่	พิกัด		ชื่อรหัส
			ละติจูด	ลองจิจูด	
29 สิงหาคม 2564	สมุทรปราการ	ชายหาดสีล้ง หมู่บ้านสีล้ง ต.คลองด่าน อ. บางบ่อ	13.480380	100.848400	SL
25 พฤศจิกายน 2564	ชลบุรี	ศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน หมู่ 3 ต. เสม็ด อ. เมือง	13.341740	100.941940	SM
27 กุมภาพันธ์ 2565	ระยอง	ทุ่งโปรงทอง ต. ปากน้ำกระแส อ.แกลง	12.706110	101.716528	PT
27 กุมภาพันธ์ 2565	จันทบุรี	อ่าวคุ้งกระเบน ต. คลองขุด อ. ท่าใหม่	12.572610	101.899500	KK
6 มีนาคม 2565	เพชรบุรี	โครงการพระราชดำริแหลมผักเบี้ย ต. แหลมผักเบี้ย อ.บ้านแหลม	13.056720	100.092889	LP
6 มีนาคม 2565	ประจวบคีรีขันธ์	ต.ปากน้ำปราณ อ.ปราณบุรี	12.394500	99.981167	VP
6 มีนาคม 2565	ประจวบคีรีขันธ์	ป่าชายเลนสิรินาถราชินี ต. ปากน้ำปราณ อ. ปราณบุรี	12.413250	99.985000	SR

3.4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

3.4.3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส ดัดแปลงมาจากวิธีของ Luong และคณะ (2023) โดยเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเจาะวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นเชื้อราวางลงบนอาหาร Carboxy methyl cellulose agar (CMCA) และ Xylan agar โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ บ่มในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน สำหรับชุดควบคุม ทำการเจาะวุ้นอาหาร CMCA และ Xylan agar นำชิ้นวุ้นออกทำให้เป็นหลุม จากนั้นใช้ไมโครปิเปตหยดสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหาร CMCA และหยดสารละลายเอนไซม์ไซลาเนสความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมอาหาร Xylan agar เพื่อเป็นชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) ในส่วนของชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยบ่มชุดควบคุมทั้งหมดในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำสารละลายแกรมไอโอดีนปริมาตร 5 มิลลิลิตร เทลงบนหน้าอาหาร CMCA และ Xylan agar ทั้งหมด เขย่าเบาๆ ให้สารละลายแกรมไอโอดีนซึมลงบนหน้าอาหารอย่างทั่วถึง ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเทสารละลายแกรมไอโอดีนทิ้ง ล้างออกด้วยการค่อยๆ เทน้ำสะอาดไหลผ่านผิวหน้าอาหาร หลังจากนั้นสังเกตการปรากฏของบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นในแนวแกน X และแกน Y บันทึกผล ทำเช่นเดียวกันกับในชุดควบคุมเชิงบวกโดยวัดขนาดหลุมที่ถูกเจาะบนอาหาร CMCA และ Xylan agar และขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น ถ่ายภาพเปรียบเทียบกันระหว่างชุดทดสอบที่มีเชื้อรา ชุดควบคุมเชิงบวก และชุดควบคุมเชิงลบ สุดท้ายนำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่บันทึกไว้มาคำนวณค่าดัชนีเอนไซม์ (Potency index ; PI) ในสมการที่ 1

$$\text{ค่าดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา}} \quad \textbf{(1)}$$

3.4.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์แลคเคส

วิธีการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสดัดแปลงมาจากวิธีของ Luong และคณะ (2025) โดยเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ทำการเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นของเชื้อราวางลงบนอาหาร 1 – naphthol agar ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน สำหรับชุดควบคุม เจาะวุ้นอาหาร 1 – naphthol agar ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำชิ้นวุ้นออกทำให้เป็นหลุม จากนั้นใช้ไมโครปิเปตหยดสารละลายเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมเพื่อเป็นชุดควบคุมเชิงบวก และใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงไปในหลุมเพื่อเป็นชุดควบคุมเชิงลบ บ่มในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นสังเกตการปรากฏของบริเวณสีม่วงหรือดำรอบๆ หลุมชุดควบคุมและโคโลนีของเชื้อรา วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณสีม่วงหรือดำและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เกิดขึ้นในแนวแกน X และแกน Y บันทึกผล และถ่ายภาพเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวกและชุดควบคุมเชิงลบ คำนวณค่าดัชนีเอนไซม์โดยใช้สมการที่ 1

3.4.4 การระบุเชื้อราโดยวิธีการทางสัณฐานวิทยา

วิธีการระบุเชื้อโดยวิธีการทางสัณฐานวิทยาดัดแปลงจากวิธีของ Tangthirasunun และ Poeaim (2022) โดยเลี้ยงเชื้อราเริ่มต้นบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเชื้อราเจริญจนมีลักษณะโคโลนีที่เด่นชัด ทำการเจาะด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นเชื้อราไปวางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน สังเกตรูปร่างลักษณะของโคโลนีเชื้อราด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ บันทึกผลที่ได้ จากนั้นศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและสปอร์ โดยใช้เข็มเขี่ยเส้นใยวางลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วยสี Lactophenol cotton ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกผลที่ได้ สุดท้ายนำผลการสังเกตไปเปรียบเทียบเบื้องต้นกับข้อมูลลักษณะสัณฐานของเชื้อราในการศึกษาอื่นๆ เพื่อระบุสกุลของเชื้อรา

3.4.5 การระบุเชื้อราโดยลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วย Thermolysis method ดัดแปลงจากวิธีของ Tangthirasunun และ Poeaim (2022) โดยตัดปลายเส้นใยของโคโลนีเชื้อราที่ถูกเลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 3-5 วัน นำไปใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 1X Tris-EDTA buffer (TE buffer) pH 8.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยการนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงสาร ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายเหนือตะกอนย้ายลงหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่และเก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ - 4 องศาเซลเซียส

3.4.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ดัดแปลงจากวิธีของ Tangthirasunun และ Poeaim (2022) นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งในแต่ละตัวอย่างจะมีปริมาตรสารในการปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ความเข้มข้นและปริมาณสารที่ใช้ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสามารถดูได้จากตารางที่ 3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะทำในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ (Primer Pair) 2 คู่ ได้แก่ ITS1/ITS4 และ ITS5/ITS4 สภาวะอุณหภูมิในการจำลองดีเอ็นเอเป็นไปดังตารางที่ 3.4 และ ตารางที่ 3.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR)

สารละลาย	**ความเข้มข้นเริ่มต้น**	**ปริมาตรต่อตัวอย่าง (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
ตัวอย่างดีเอ็นเอ		2.0	
Standard *Taq* reaction buffer	10X	2.5	1X
dNTP	1.25 mM	4.0	0.2 mM
Forward primer	20 pmol	1.0	0.8 pmol
Reverse primer	20 pmol	1.0	0.8 pmol
Taq DNA Polymerase	5,000 U/ml	0.2	1 U
Deionized water		14.3	
ปริมาตรรวมทั้งหมด		25.0	

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (Tangthirasunun และ Poeaim, 2022)

คู่ไพรเมอร์	**ขั้นตอน**	**อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)**	**เวลา (นาที)**	**จำนวนรอบ**
ITS1/ITS4	Initial denaturation	95	5.00	1
	Denaturation	95	1.30	35
	Annealing	54	2.00	
	Extension	72	3.00	
	Final extension	72	5.00	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.5 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 (Tangthirasunun และ Poeaim, 2022)

คู่ไพรเมอร์	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
ITS5/ITS4	Initial denaturation	95	1.30	1
	Denaturation	95	1.00	35
	Annealing	56	1.00	
	Extension	72	1.30	
	Final extension	72	10.00	1

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) โดย 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ใน 1X TBE buffer ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จะถูกรันในเครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที ส่องเจลและบันทึกภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet ; UV) ด้วยเครื่อง Gel document ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (DNA bands) จะถูกอ้างอิงกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (Marker VC 100 bp plus บริษัท Vivantis) จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี BTSeq ที่บริษัท U2Bio ประเทศเกาหลี นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Bioedit แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) เพื่อระบุในระดับสปีชีส์ของเชื้อรา

3.4.6 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

3.4.6.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสดัดแปลงจากวิธีของ Luong และคณะ (2025) โดยใช้ DNSA method เพื่อตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหลังจากเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส เริ่มจากการเตรียมกราฟสารละลายกลูโคส (Glucose) และไซโลส (Xylose) มาตรฐาน โดยเจือจางสารละลายกลูโคสและไซโลสให้มีความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายกลูโคสหรือไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลาย Carboxy methyl cellulose หรือ 1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลาย Xylan ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermomixer) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส รอบการเขย่า 1000 รอบต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา รอจนอุณหภูมิเย็นลง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างเป็นกราฟและสมการของสารละลายกลูโคสและไซโลสมาตรฐาน

ต่อมาคัดเลือกเชื้อราที่สร้างบริเวณใสบนอาหาร CMCA และ Xylan agar นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อราเริ่มต้นบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นเชื้อราไปเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหาร Potato dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ไมโครปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารทำปฏิกิริยาและลำดับขั้นตอนวิธีการเช่นเดียวกันกับการเตรียมกราฟสารละลายกลูโคสและไซโลสมาตรฐาน นำค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสหรือไซโลสที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาโดยใช้สมการจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่ได้มาคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยใช้สมการที่ 2

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสหรือไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) =

$$\frac{\text{มวลของสับสเตรท (มิลลิกรัม)} \times 1000 \times \text{ค่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{มวลโมเลกุลของสับสเตรท (กรัมต่อโมล)} \times \text{เวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}} \quad \textbf{(2)}$$

3.4.6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเชิงปริมาณของเอนไซม์แลคเคส

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสดัดแปลงมาจากวิธีของ Luong และคณะ (2025) โดยคัดเลือกเชื้อราที่มีการสร้างบริเวณสีม่วงหรือดำบนอาหาร 1 – naphthol agar มาเลี้ยงในอาหาร PDB ด้วยวิธีเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส บ่มเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ไมโครปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 0.05M sodium citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย 1mM ABTS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ทำการคำนวณความเข้มข้นของ $ABTS^+$ ที่ถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์แลคเคสได้จากสมการที่ 3 และคำนวณกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสได้จากสมการที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของ $ABTS^+$ ที่ถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) =

$$\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } 420 \text{ นาโนเมตร } \times 1000}{3600 \times \text{ ความสูงของปริมาตรสารทำปฏิกิริยา}} \quad (3)$$

กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที) =

$$\frac{\text{ความเข้มข้นของ } ABTS^+ \text{ (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ ปริมาตรรวม(มิลลิลิตร)} \times \text{ ค่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{เวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}} \quad (4)$$

3.4.7 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม

3.4.7.1 การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส

การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสดัดแปลงวิธีการมาจากงานของ Adibe และคณะ (2022) โดยเลี้ยงเชื้อราเริ่มต้นบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการเจาะวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นวางลงบนอาหาร Pikovskaya agar ทำการทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หากเชื้อรามีการสร้างกรดอินทรีย์ซึ่งจะช่วยเปลี่ยนไตรแคลเซียมฟอสเฟตซึ่งเป็นโครงสร้างฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายน้ำในอาหาร Pikovskaya agar ให้แปรสภาพกลายเป็นไฮโดรเจนฟอสเฟตหรือไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ซึ่งเป็นโครงสร้างฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ ทำให้ความขุ่นของสีอาหารรอบโคโลนีของเชื้อราหายไปปรากฏบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อรา ในการศึกษานี้ใช้ *A. niger* เป็นชุดควบคุมเชิงบวกเนื่องจากเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่พบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสและเมื่อเลี้ยงบน Pikovskaya agar ให้บริเวณใสที่กว้าง (Khuna และคณะ, 2021; Vassileva และคณะ, 2022) โดยชุดการทดลองทั้งหมดจะถูกวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราและบริเวณใสที่เกิดขึ้นในแนวแกน X และแกน Y บันทึกผล ถ่ายภาพ และนำค่าที่ได้มาคำนวณดัชนีการละลาย (Solubilization Index ; SI) ของฟอสฟอรัสได้จากสมการที่ 5

$$\text{ค่าดัชนีการละลาย} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา}} \quad (5)$$

3.4.7.2 การทดสอบความสามารถในการละลายโพแทสเซียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความสามารถในการละลายโพแทสเซียมดัดแปลงวิธีการมาจากงานของ Wang และคณะ (2024) เตรียมเชื้อราเริ่มต้นเหมือนการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส ต่างกันที่ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร Alexandrov agar ทำการทดสอบทั้งหมด 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หากเชื้อรามีการสร้างกรดอินทรีย์ที่สามารถช่วยเปลี่ยนโพแทสเซียมเฟลด์สปาร์ซึ่งเป็นโครงสร้างโพแทสเซียมที่ไม่ละลายน้ำใน Alexandrov agar ให้เป็นโพแทสเซียมไอออน ที่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้ความขุ่นของสีอาหารรอบโคโลนีของเชื้อราหายไป ปรากฏบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อรา ในการศึกษานี้ใช้ *A. niger* เป็นชุดควบคุมเชิงบวกเช่นเดียวกันกับการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสเนื่องจากเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่พบความสามารถในการละลายโพแทสเซียมและเมื่อเลี้ยงบน Alexandrov ให้บริเวณใสที่กว้าง (Wang และคณะ, 2024) โดยชุดการทดลองทั้งหมดจะถูกวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราและบริเวณใสที่เกิดขึ้นในแนวแกน X และแกน Y บันทึกผล ถ่ายภาพ นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าดัชนีการละลายของโพแทสเซียมได้จากสมการที่ 5

3.4.8 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

3.4.8.1 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมี

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชดัดแปลงมาจากวิธีของ Liu และคณะ (2023) เลือกเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่พบได้มากในพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยมาทำการศึกษาทั้งหมด 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Colletotrichum musae, Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium oxysporum, Phytoptera palmivora* และ *Pythium spendlens* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนและเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อราเริ่มต้น จากนั้นเจาะวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นของเชื้อราที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนและเชื้อราสาเหตุโรคพืช วางคู่กันบนอาหาร PDA โดยวางทั้งสองชิ้นวุ้นไว้ตรงข้ามกันห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยง 2 เซนติเมตร ชุดควบคุมทำโดยการว่างชิ้นวุ้นของเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่งห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยง 2 เซนติเมตร โดยทำทั้งเชื้อราที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนและเชื้อราสาเหตุโรคพืช (รูปที่ 3.1ก) การทดลองทั้งหมดทำครั้งละ 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน หลังจากเชื้อราเจริญจนเต็มจานเพาะเลี้ยงทำการวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราจากบริเวณกลางชิ้นวุ้นเริ่มต้นจนถึงปลายขอบของโคโลนี (รูปที่ 3.1ข) ถ่ายภาพ บันทึกผลความผิดปกติของเชื้อราสาเหตุโรคพืชใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และคำนวณการยับยั้งการเจริญเติบโต โดยใช้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมี (Percentage inhibition of radial growth, PIRG) จากสมการที่ 6

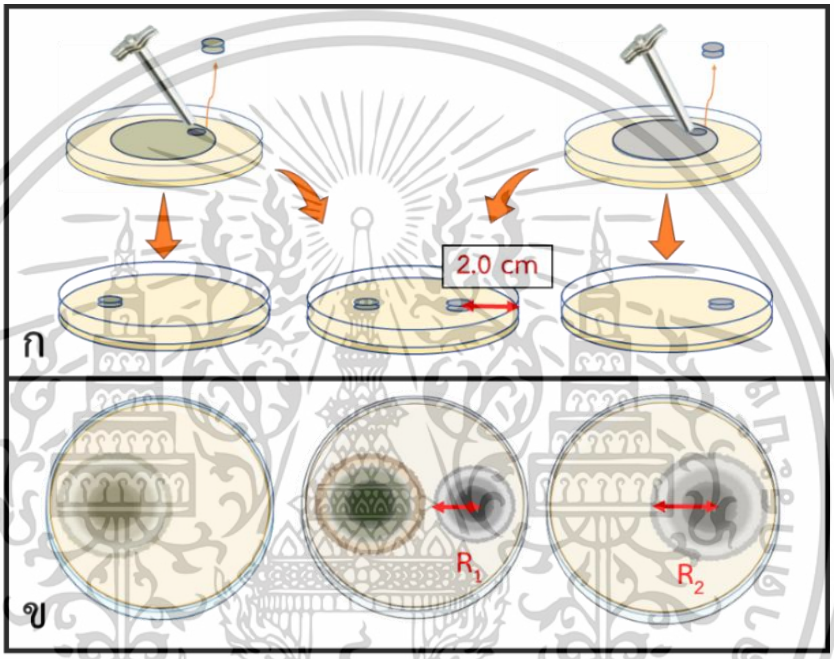
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\mathrm{PIRG} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100 \qquad (6)$$

หมายเหตุ

R_1 = รัศมีของโคโลนีเชื้อราจากชุดควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

R_2 = รัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ถูกเลี้ยงคู่กับเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งการวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา (ก) บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน (ข)

3.4.8.2 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์

หลังจากการวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อรา ปิเปตน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่เพาะเจริญคู่กับเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน ใช้กระจกสไลด์ขูดสปอร์ของเชื้อราเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออก จากนั้นดูดสารแขวนลอยสปอร์ (Spore suspension) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน Chamber ของ Hemacytometer นำไปนับจำนวนสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทำเช่นเดียวกันในชุดควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช นำจำนวนสปอร์ที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ (Spore Inhibition; SI) โดยใช้สมการที่ 7

$$\text{Spore Inhibition} = \frac{C - T}{C} \times 100 \qquad (7)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

C = จำนวนสปอร์ของชุดควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

T = จำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ถูกเลี้ยงคู่กับเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

3.4.9 การเตรียมการหมักปุ๋ยอินทรีย์

3.4.9.1 วิธีการเตรียมหัวเชื้อรา

การทำหัวเชื้อราเริ่มต้นมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน โดยการศึกษานี้ได้คัดเลือก 3 วิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดมาเปรียบเทียบว่าควรใช้วิธีไหนจึงจะเหมาะสมกับเชื้อราที่ถูกคัดเลือกมาในการศึกษานี้

วิธีที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้เส้นใยเชื้อราบดเป็นผง วิธีการนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Varitha และคณะ (2017) โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนและเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อราเริ่มต้น จากนั้นเจาะวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นของเชื้อรา 5 ชิ้น ย้ายลงไปเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร PDB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (Shaker) ที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำอาหาร PDB ไปกรองเอาเส้นใยเชื้อราออกด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำเส้นใยเชื้อราที่ติดอยู่บนผ้าจะไปวางบนถาดอะลูมิเนียมสะอาด นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดเส้นใยอบแห้งจนเป็นผงละเอียด

วิธีที่ 2 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้แป้งมันสำปะหรังเป็นวัสดุรองรับ ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sutthisa และคณะ (2024) โดยทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อราในอาหาร PDB เช่นเดียวกับวิธีก่อนหน้านี้ หลังจากปั่นเหวี่ยงที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน ปิเปตอาหาร PDB ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปคลุกเคล้ากับวัสดุเก็บรักษาหัวเชื้อราจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 90 กรัม (ประกอบไปด้วยแป้งมันสำปะหรัง 89.3 กรัม ไคโตซาน 0.5 กรัม และ CMC 0.2 กรัม) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำหัวเชื้อราที่คลุกเคล้าจนเข้ากันแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ป่นหัวเชื้อที่แห้งสนิทให้เป็นผงละเอียด

วิธีที่ 3 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้ข้าวสุกเป็นวัสดุรองรับ ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lee และคณะ (2023) โดยหลังจากเจาะวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราจากจานเพาะเชื่อราเริ่มต้น ย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น ไปเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบรรจุข้าวสุก 30 กรัม ที่หุงสุกจากการนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บ่มให้เส้นใยของเชื้อราเจริญในข้าวสุกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัน จากนั้นนำหัวเชื้อราเริ่มต้นที่มีข้าวสุกเป็นวัสดุรองรับไปเทวางบนถาดอะลูมิเนียมสะอาด อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ป่นหัวเชื้อที่แห้งสนิทให้เป็นผงละเอียด

นำผงหัวเชื้อราที่ได้ในแต่ละวิธีมาทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่สามารถเจริญได้ โดยการชั่งผงหัวเชื้อราปริมาณ 1 กรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ได้ระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-6} จากนั้นดูดสารละลายหัวเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร นำไป Spread ลงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ดูการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ทำการนับจำนวนโคโลนีและนำไปคำนวณจำนวนโคโลนีเชื้อราในหัวเชื้อรา 1 กรัม โดยใช้สมการที่ 8

$$\text{จำนวนโคโลนีเชื้อรา} \times \text{ระดับการเจือจาง} \times 10 \qquad \textbf{(8)}$$

3.4.9.2 วิธีการหมักปุ๋ยอินทรีย์และสัดส่วนวัสดุหมัก

วิธีการหมักปุ๋ยอินทรีย์ดัดแปลงจากวิธีของ Ameen และ Al-Homaidan (2021) โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เศษผัก (ผักกาด กะหล่ำ และคะน้า) เปลือกผลไม้ (กล้วย แตงโม เมล่อน อะโวคาโด้ และส้ม) แหนแดงแห้ง และมูลวัว ผสมเข้ากับหัวเชื้อราเริ่มต้นจากการทดลองก่อนหน้า โดยกำหนดอัตราส่วนเป็นไปดังในตารางที่ 3.6 ทำการหมักปุ๋ยทั้ง 4 สูตร ในเข่งพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 38 เซนติเมตร สูง 27 เซนติเมตร หลังจากนั้นเสียบยึดแท่งพลาสติกลงที่กลางเข่งปุ๋ยเพื่อใช้ขีดสัญลักษณ์วัดระดับการยุบตัวของปุ๋ย โดยเข่งปุ๋ยทั้งหมดจะถูกคลุมด้วยถุงดำเพื่อกันแสงแดดและลดการระเหยของความชื้น บ่มชุดทดลองทั้งหมดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 56 วัน โดยปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ทำการทดสอบสูตรละ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3.6 อัตราส่วนของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตร

ส่วนประกอบรวม (1000 กรัม)	ปุ๋ยชุดควบคุม (กรัม)	ปุ๋ย F1 (กรัม)	ปุ๋ย F2 (กรัม)	ปุ๋ย F3 (กรัม)
เศษผักและเปลือกผลไม้	500	500	750	500
แหน	250	250	-	250
มูลวัว	125	125	125	-
วัสดุรองรับหัวเชื้อ	125	-	125	-
หัวเชื้อรา	-	125	-	250

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.10 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์

3.4.10.1 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ระหว่างการหมัก

การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีดัดแปลงมาจากวิธีการของ Khalib และคณะ (2020) โดยระหว่างการหมักปุ๋ยในระยะเวลา 56 วัน ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของปุ๋ยทุกๆ 7 วัน โดยการวัดค่าการยุบตัวของปุ๋ย วัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิโดยใช้ Thermometer วัดการเปลี่ยนแปลงของความชื้นโดยใช้ Soil moisture meter จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างปุ๋ยใส่ขวดฆ่าเชื้อ นำไปตรวจวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และค่าการนำไฟฟ้า (EC) โดยการละลายปุ๋ยอินทรีย์แต่ละสูตรด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 10 และทำการตรวจวัดค่าโดยใช้ pH meter และ EC meter

3.4.10.2 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Khalib และคณะ (2020) การย่อยสลายของปุ๋ยวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุดคือการอ้างอิงจากค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพืช (Germination index) หากปุ๋ยอินทรีย์มีการย่อยสลายที่สมบูรณ์ พืชจะสามารถนำสารอาหารไปใช้ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น โดยเก็บตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ในวันที่ 28 และ 56 ของการหมัก ชั่งปุ๋ย 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้แร่ธาตุในปุ๋ยละลาย จากนั้นดูดสารละลายปุ๋ย 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในกล่องพลาสติกมีฝาปิดที่ปูรองด้านในด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ต่อมาจัดเรียงเมล็ดพืชลงไป 10 เมล็ด และปิดฝา ทำเช่นเดียวกันในชุดควบคุมเชิงบวกแต่เปลี่ยนจากสารละลายปุ๋ยเป็นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ สังเกตจำนวนการงอกของเมล็ดและวัดความยาวของลำต้นที่งอกออกมา คำนวณค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพืชโดยใช้สมการที่ 9

$$\text{ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพืช} = \frac{\text{ร้อยละการงอกของเมล็ดที่โตในปุ๋ย} \times \text{ความยาวของต้นที่งอกในปุ๋ย}}{\text{ร้อยละการงอกของเมล็ดที่โตในชุดควบคุม} \times \text{ความยาวของต้นที่งอกในชุดควบคุม}} \qquad \textbf{(9)}$$

3.4.10.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของปุ๋ยอินทรีย์เปรียบเทียบกับมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์

ตัวอย่างปุ๋ยชุดควบคุม ปุ๋ย F1 ปุ๋ย F2 และปุ๋ย F3 ตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และปริมาณธาตุอาหารหลักของพืชที่แผนกเคมีวิเคราะห์ กรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ โดยตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด 9 รายการ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH), ค่าการนำไฟฟ้า (EC), Organic Matter, Total Nitrogen, C/N ratio, Total phosphorus, Total Potassium, ความชื้นในปุ๋ย และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดอนุภาคของปุ๋ยโดยเฉลี่ย โดยนำผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ในการศึกษานี้ไปเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐานในราชกิจจานุเบกษาประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง กำหนดเกณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ พ.ศ. 2557 เพื่อพิจารณาคุณภาพของปุ๋ยอินทรีย์

3.4.11 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อราสาเหตุโรคพืชของปุ๋ยอินทรีย์

วิธีทดสอบคุณสมบัติการการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อราสาเหตุโรคพืชของปุ๋ยอินทรีย์ ดัดแปลงจากวิธีของ Sahana และคณะ (2018) ใช้เชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 ชนิดจากการทดลองข้อ 3.4.8 ได้แก่ *C. musae, C. gloeosporioides, F. oxysporum, P. palmivora* และ *P. spendlens* โดยชั่งตัวอย่างปุ๋ย 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เจือจางให้อยู่ในระดับ 10^{-6} นำไป Spread บนอาหาร PDA จากนั้นวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชอายุ 5 วัน ลงกลางอาหาร PDA ที่ Spread สารละลายของปุ๋ยอินทรีย์เอาไว้ ชุดควบคุมของเชื้อราที่เจริญในปุ๋ยคืออาหาร PDA ที่ Spread สารละลายของปุ๋ยอินทรีย์แต่ละสูตร และชุดควบคุมของเชื้อราสาเหตุโรคพืชคืออาหาร PDA เปล่าที่วางชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทำทั้งหมด 5 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง บันทึกข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ Spread สารละลายของปุ๋ยกับชุดควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Inhibition of growth) โดยใช้สมการที่ 10

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (\%)} = \frac{\mathrm{Dc}-\mathrm{Dt}}{\mathrm{Dt}} \times 100 \qquad \textbf{(10)}$$

หมายเหตุ

Dc = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราจากชุดควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

Dt = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ถูก Spread ด้วยสารละลายปุ๋ย

3.4.12 การวิเคราะห์คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

การวิเคราะห์คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ดัดแปลงจากวิธีของ Luong และคณะ (2025) โดยคัดเลือกเชื้อราจากข้อ 3.4.6 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคสสูง โดยคัดเลือกมา 1 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงเชื้อราเริ่มต้นบนอาหาร PDA บ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นเชื้อราไปเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหาร PDB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ไมโครปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกนำไปการวิเคราะห์คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส โดยใช้วิธี DNSA และ ABTS เช่นเดียวกันกับในข้อที่ 3.4.5 แต่ทำการปรับเปลี่ยนสภาวะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และความเข้มข้นของ NaCl

3.4.12.1 การทดสอบผลกระทบของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

การทดสอบผลกระทบของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ดัดแปลงจากวิธีของ Luong และคณะ (2025) โดยสภาวะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จะถูกทดสอบที่อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธี DNSA และ ABTS ในแต่ละอุณหภูมิทำทั้งหมด 4 ซ้ำ ค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (Relative activity) สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 11 โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมสูงสุดของการทดสอบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ทดสอบ}}{\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงสุดในการทดสอบ}} \times 100 \quad (11)$$

3.4.12.2 การทดสอบผลกระทบของค่าความเป็นกรดด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

การทดสอบผลกระทบของค่าความเป็นกรดด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ดัดแปลงจากวิธีของ Luong และคณะ (2025) สภาวะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ถูกกำหนดที่อุณหภูมิที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์มากที่สุดในข้อ 3.4.12.1 โดยสภาวะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จะถูกทดสอบที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4, 4.5, 4.8, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9 โดยใช้บัฟเฟอร์ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ต่างกัน ได้แก่ 50 mM sodium acetate buffer (pH 4), 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.5 ถึง 5.5), 50 mM phosphate buffer (pH 6 ถึง 6.5), Tris-HCl buffer (pH 7 ถึง 8.5) และ Glycine-NaOH buffer (pH 9) ทดสอบด้วยวิธี DNSA และ ABTS โดยในแต่ละค่าความเป็นกรดด่างทำทั้งหมด 4 ซ้ำ ค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัมพัทธ์ของเอนไซม์สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 11 โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

3.4.12.3 การทดสอบผลกระทบของความเข้มข้น NaCl ต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

การทดสอบผลกระทบของความเข้มข้น NaCl ต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ดัดแปลงจากวิธีของ Luong และคณะ (2025) โดยสภาวะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จะถูกกำหนดที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์มากที่สุดในข้อ 3.4.12.1 และข้อ 3.4.12.2 โดยทดสอบสภาวะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ค่าความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5,3 , 3.5, 4, 4.5 และ 5 M โดยในแต่ละค่าความเข้มข้นของ NaCl ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ ค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 11 โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

3.4.13 โปรแกรมที่ใช้ในกระบวนการทางสถิติ

โปรแกรม IBM SPSS ถูกใช้ในกระบวนการคำนวณทางสถิติ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan’s multiple range test ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 คุณลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดินป่าชายเลน

นำตัวอย่างดินป่าชายเลน 42 ตัวอย่าง จาก 7 สถานที่ ไปวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีอันได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) ค่าการนำไฟฟ้า (EC) และความเค็ม (Salinity) ซึ่งได้ผลลัพธ์เป็นดังตารางที่ 4.1 ตัวอย่างดินทั้งหมดแสดงค่าความเป็นกรดด่างเฉลี่ยอยู่ในช่วง 6.26 ± 0.33 ถึง 7.31 ± 0.17 ซึ่งอยู่ในระดับเป็นกลางถึงกรดอ่อน ค่าการนำไฟฟ้าสามารถใช้ประเมินปริมาณไอออนของแร่ธาตุในดินซึ่งสอดคล้องกับค่าความเค็มของดิน อ้างอิงจากการศึกษาของ Hammam และ Mohamed (2020) ที่ได้จำแนกประเภทของดิน โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเค็มของดินเป็นเกณฑ์ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.2 ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างดินที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มดินประเภทเค็มจัด (Strongly saline soils) (8 – 16 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร) จำนวน 2 สถานที่ คือ ตัวอย่างดินป่าชายเลนรหัส KK และ SR นอกจากนี้ตัวอย่างดินอีก 5 สถานที่ มีค่าการนำไฟฟ้าจัดอยู่ในประเภทดินที่มีความเค็มรุนแรง (Extremely saline soils) (> 16 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร) โดยตัวอย่างดินที่เค็มที่สุดคือ SM มีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยเท่ากับ 51.98 ± 3.44 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และตัวอย่างดินที่มีความเค็มน้อยที่สุดคือ SR มีค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยเท่ากับ 8.64 ± 2.28 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ผลลัพธ์ค่าการนำไฟฟ้าที่ได้มีความสอดคล้องกับค่ามาตรฐานความเค็มในหน่วยกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบตามข้อกำหนดค่าการนำไฟฟ้า 1 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร มีค่าโดยประมาณเท่ากับความเข้มข้นของเกลือ 640 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.64 กรัมต่อลิตร (Corwin และ Yemoto, 2017) โดยตัวอย่างดินที่มีค่าความเค็มมากที่สุดคือ SM มีค่าความเค็มเฉลี่ยเท่ากับ 31.76 ± 1.96 กรัมต่อลิตร ตัวอย่างดินที่มีความเค็มน้อยที่สุดคือ SR มีค่าความเค็มเฉลี่ยเท่ากับ 4.97 ± 0.83 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเป็นกรดด่าง ค่าการนำไฟฟ้า และความเค็ม จากตัวอย่างดิน 7 สถานที่

รหัสตัวอย่างดิน	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ค่าการนำไฟฟ้า (EC) (มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร)	ความเค็ม (Salinity) (กรัมต่อลิตร)
SM	$6.74^{c} \pm 0.28$	$51.98^{a} \pm 3.44$	$31.76^{a} \pm 1.96$
SL	$7.03^{abc} \pm 0.28$	$17.73^{f} \pm 0.28$	$10.80^{e} \pm 0.46$
PT	$6.96^{bc} \pm 0.14$	$17.02^{cd} \pm 2.56$	$9.94^{cd} \pm 1.45$
KK	$7.31^{a} \pm 0.17$	$14.70^{d} \pm 2.77$	$9.06^{d} \pm 1.82$
LP	$7.26^{ab} \pm 0.10$	$20.27^{bc} \pm 2.40$	$11.42^{bc} \pm 1.47$
VP	$6.73^{c} \pm 0.31$	$21.34^{b} \pm 4.06$	$11.77^{b} \pm 2.48$
SR	$6.26^{d} \pm 0.33$	$8.64^{e} \pm 2.28$	$4.97^{e} \pm 0.83$

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-f ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (p<0.05)

ตารางที่ 4.2 การจำแนกประเภทของดินเค็มโดยใช้ค่าการนำไฟฟ้ามาตรฐานและค่าความเค็มมาตรฐานเป็นเกณฑ์ (Hammam และ Mohamed, 2020)

การจำแนกประเภทดิน	**ค่าการนำไฟฟ้า (มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร)**	**ความเค็ม (กรัมต่อลิตร)**
ดินไม่เค็ม (Non-saline soils)	0 - 2	< 1.28
ดินเค็มน้อย (Slightly saline soils)	2 - 4	1.28 - 2.56
ดินเค็ม (Saline soils)	4 - 8	2.56 - 5.12
ดินเค็มจัด (Strongly saline soils)	8 - 16	5.12 - 10.24
ดินเค็มรุนแรง (Extremely saline soils)	> 16	> 10.24

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินป่าชายเลนกับผลการเก็บรวบรวมข้อมูลในงานของ Chamekh และคณะ (2019) ที่ได้ศึกษาสภาพตัวอย่างดินเค็มรอบทะเลสาบน้ำเค็มทางตะวันตกเฉียงเหนือของแอลจีเรีย จากบริเวณที่มีพืชแสดงค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง 6 - 71.5 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และบริเวณที่ไม่มีพืชซึ่งมีค่าการนำไฟฟ้า 57.5 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และในงานของ Hammam และ Mohamed (2020) ที่ตัวอย่างดินจากพื้นที่ทำเกษตรกรรมในประเทศอียิปต์มีค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง 0.09 - 123.10 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร สามารถวิเคราะห์ได้ว่าเนื่องจากสภาพแวดล้อมของตัวอย่างดินทั้งหมดแตกต่างกันซึ่งเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น สภาพการระบายน้ำ ระดับน้ำใต้ดิน การปล่อยน้ำเสียที่มีความเค็มสูง สภาพภูมิอากาศที่ส่งผลต่อกระบวนการสะสมเกลือ และกิจกรรมทางการเกษตร เป็นผลให้คุณลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดินแตกต่างกันไปด้วย ทั้งนี้คุณลักษณะทางเคมีของตัวอย่างดินมีผลโดยตรงต่อชนิดและความสามารถการเอาตัวรอดของสิ่งมีชีวิตที่อยู่อาศัยในพื้นที่ดินนั้นๆ (Hammam และ Mohamed, 2020) ซึ่งในการศึกษานี้ตัวอย่างดินป่าชายเลนทั้ง 42 ตัวอย่างจะถูกนำไปคัดแยกเชื้อราในการทดสอบลำดับถัดไป

4.2 ผลการคัดแยกเชื้อราจากดินป่าชายเลน

คัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินป่าชายเลนจำนวน 42 ตัวอย่าง เพื่อเป็นการยืนยันคุณสมบัติของเชื้อราที่อยู่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มจึงนำตัวอย่างดินไปเจือจางด้วยระดับความเจือจาง 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8} จากนั้น Spread สารละลายดินลงบนอาหาร Corn meal agar ที่ผสม 3% เกลือทะเล ซึ่งหลังจากสังเกตลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อที่คัดแยกได้ และรวมไอโซเลตที่มีลักษณะเหมือนกันคัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกได้จากดินสถานที่เดียวกัน สรุปจำนวนเชื้อราออกมาได้ 64 ไอโซเลต นำเชื้อราทั้ง 64 ไอโซเลต ไปเลี้ยงให้เจริญบนอาหารวุ้นที่มีส่วนผสมของผงผักกาด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อราที่ได้ยังสามารถย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสในสภาวะอุณหภูมิที่สูงเช่นเดียวกับสภาวะการหมักปุ๋ยอินทรีย์ได้หรือไม่ พบว่ามีเชื้อราจำนวน 48 ไอโซเลต ที่สามารถเห็นการเจริญบนอาหารวุ้นที่มีส่วนผสมของผงผักกาดได้ โดยสรุปจำนวนเชื้อราที่เจริญจากตัวอย่างดินป่าชายเลนจาก 7 สถานที่ เป็นไปดังตารางที่ 4.3

ต่อมาหลังจากการคัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินป่าชายเลน นำเชื้อราทั้ง 48 ไอโซเลต ไปวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถโดดเด่นในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส

ตารางที่ 4.3 จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินป่าชายเลนและสกุลของเชื้อราที่สามารถระบุได้ผ่านการสังเกตเบื้องต้น

รหัสตัวอย่างดินป่าชายเลน	**เชื้อราที่คัดแยกได้จากอาหาร Corn Meal agar (ไอโซเลต)**	**เชื้อราที่แสดงเจริญอาหารวุ้นที่มีส่วนผสมของผงผักกาด (ไอโซเลต)**
SL	10	10
SM	4	4
KK	6	6
PT	10	7
LP	8	3
VP	12	5
SR	14	13
รวม	64	48

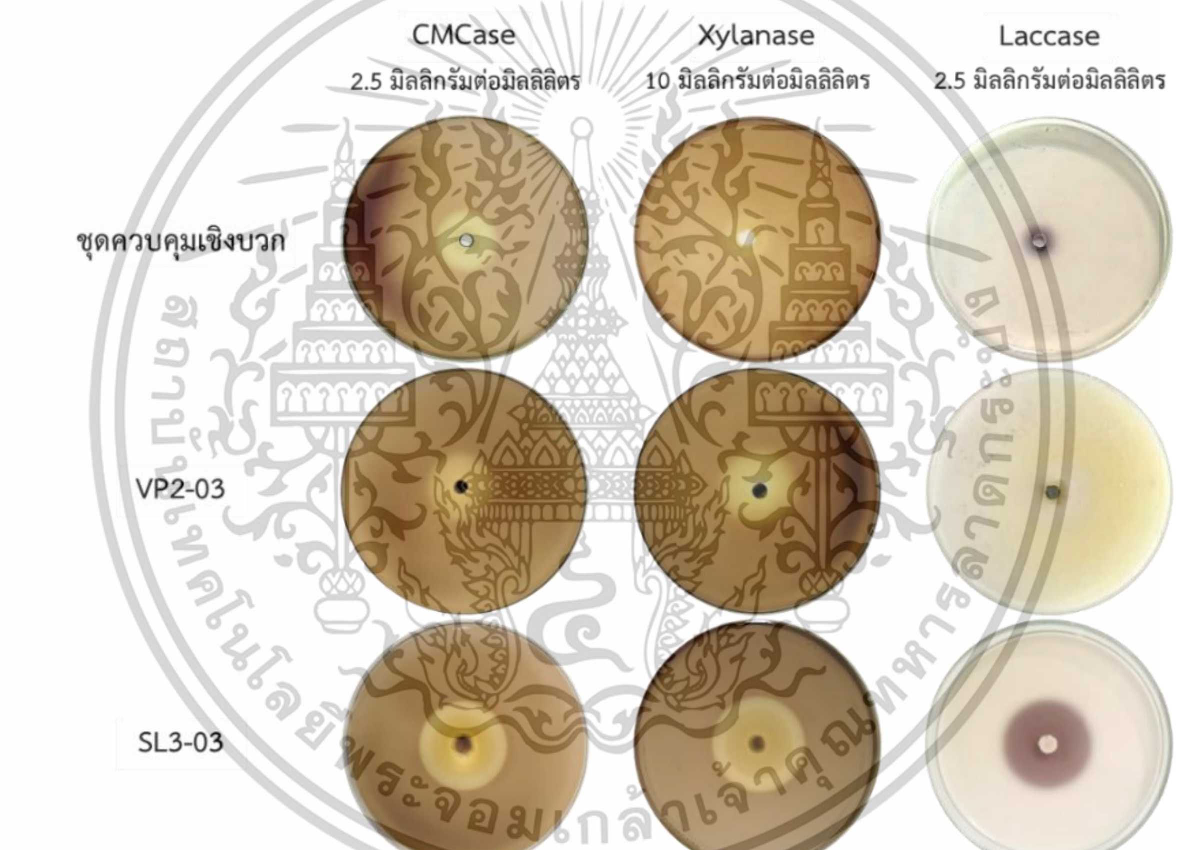
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

เชื้อราจำนวน 48 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนถูกนำไปสังเกตการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส บนอาหารทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ CMC agar, Xylan agar และ 1 – naphthol agar โดยอ่านผลจากค่าดัชนีเอนไซม์ ที่เกิดจากการเปรียบเทียบอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรากับเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสหรือบริเวณสีม่วงหรือดำที่เกิดขึ้นบนอาหารแต่ละประเภท (ดังตารางภาคผนวก ค-1) พบว่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบในเชื้อราจำนวน 44 ไอโซเลต และมีเชื้อราที่ไม่แสดงความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 4 ไอโซเลต คือ SM2-04, VP4-01, SR3-02 และ SR6-03 โดยที่ไอโซเลต VP2-03 มีค่าดัชนีเอนไซม์มากที่สุดอยู่ที่ 5.58 ± 0.08 ซึ่งพบว่ามากกว่าค่าดัชนีเอนไซม์ของชุดควบคุมเชิงบวกที่ทำการหยดเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยให้ค่าดัชนีเอนไซม์อยู่ที่ 4.68 ± 0.70 จึงสามารถวิเคราะห์ผลได้ว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อราไอโซเลต VP2-03 ผลิตอาจมีความเข้มข้นหรือกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณมากกว่าชุดควบคุมเชิงบวก ต่อมาเชื้อราที่มีความสามารถโดดเด่นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสรองลงมาอีก 5 ลำดับ คือ SL2-02, SL2-04, VP3-02, VP5-02 และ SL2-01 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.66 ± 0.23, 3.39 ± 0.50, 3.24 ± 0.32, 2.54 ± 0.25 และ 2.51 ± 0.05 ตามลำดับ โดยผลการวิเคราะห์นี้มีแนวโน้มคล้ายกับผลการวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่พบว่าเชื้อราจำนวน 43 ไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และมีเชื้อรา 5 ไอโซเลตที่ไม่แสดงความสามารถในการผลิตไซลาเนส ได้แก่ SM2-04, LP2-01, VP4-01, SR3-02 และ SR6-03 โดยที่เชื้อราไอโซเลต VP2-03 มีค่าดัชนีเอนไซม์มากที่สุดอยู่ที่ 5.86 ± 0.08 ซึ่งพบว่ามากกว่าค่าดัชนีเอนไซม์ของชุดควบคุมเชิงบวกที่ทำการหยดสารละลายเอนไซม์ไซลาเนสความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีค่าดัชนีเอนไซม์อยู่ที่ 5.54 ± 0.97 จึงสามารถวิเคราะห์ผลได้ว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่เชื้อราไอโซเลต VP2-03 ผลิตอาจมีความเข้มข้นหรือกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณมากกว่าชุดควบคุมเชิงบวก และเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสรองลงมาอีก 5 ลำดับ คือ SL02-02, SL02-04, VP03-02, SL03-05 และ SL02-01 ซึ่งแสดงค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.78 ± 0.30, 3.64 ± 0.23, 3.54 ± 0.27, 2.58 ± 0.36 และ 2.52 ± 0.11 ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์ปรากฏเชื้อราไอโซเลต LP2-01 เป็นเชื้อราไอโซเลตเดียวที่ผลิตเพียงเอนไซม์เซลลูเลสโดยมีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 1.71±0.04 แต่ไม่พบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ในขณะเดียวกันความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสสังเกตพบในเชื้อราเพียง 4 ไอโซเลต โดยมีไอโซเลต SL3-03 ที่มีค่าดัชนีเอนไซม์มากที่สุด คือ 4.38 ± 0.09 ซึ่งพบว่ามากกว่าค่าดัชนีเอนไซม์ของชุดควบคุมเชิงบวกที่ทำการหยดสารละลายเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ให้ค่าดัชนีเอนไซม์ 3.07 ± 0.57 จึงสามารถวิเคราะห์ผลได้ว่าเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อราผลิตอาจมีความเข้มข้นหรือกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณมากกว่าชุดควบคุมเชิงบวก โดยเชื้อราอีก 3 ไอโซเลตที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้คือ SL1-01, SL5-02 และ SL3-04 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 1.31 ± 0.01, 1.29 ± 0.08 และ 0.93 ± 0.03 ตามลำดับ ตัวอย่างบริเวณใสหรือบริเวณสีม่วงหรือดำของไอโซเลต VP2-03 ที่มีค่าดัชนีเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสมากที่สุด และไอโซเลต SL3-03 ที่ให้ค่าดัชนีเอนไซม์แลคเคสมากที่สุดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวกแสดงในรูปที่ 4.1 และค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดัชนีเอนไซม์ของเชื้อราทั้ง 48 ไอโซเลตแสดงเป็นกราฟเปรียบเทียบกันดังรูปที่ 4.2



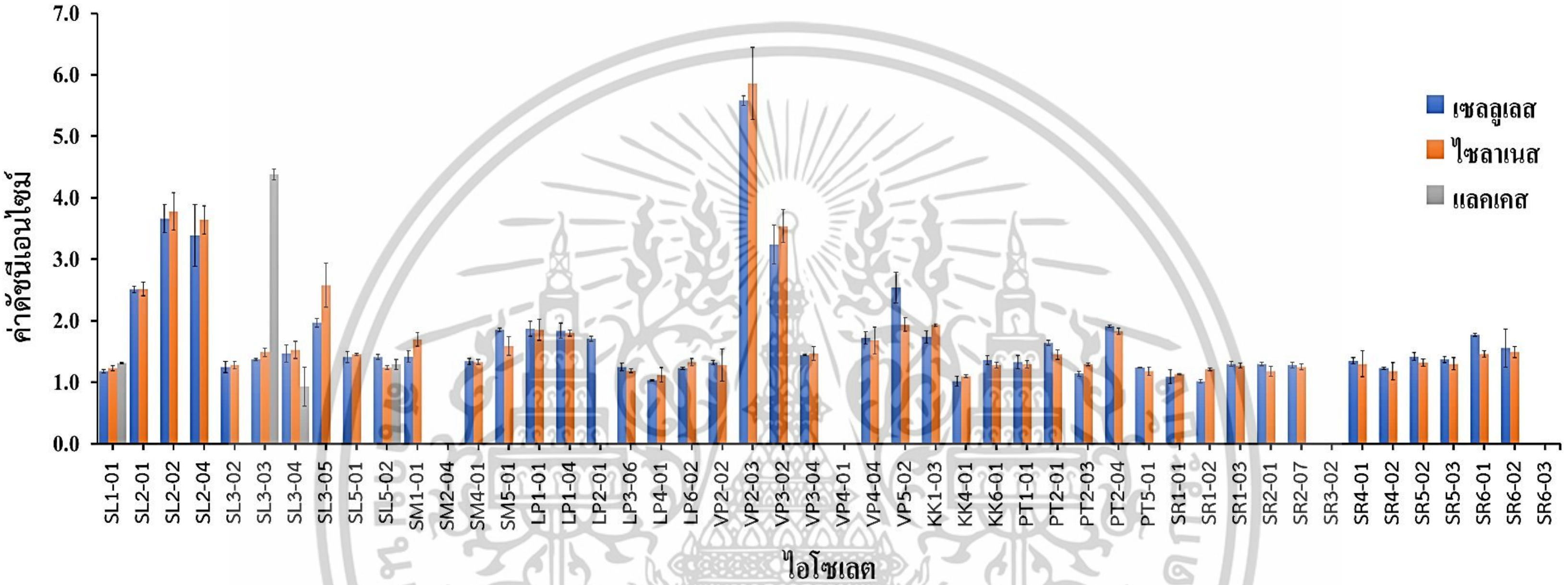
รูปที่ 4.1 ตัวอย่างบริเวณใสบนอาหาร CMC agar และ Xylan agar และบริเวณสีม่วงหรือดำบนอาหาร 1 – naphthol agar ของเชื้อราไอโซเลต VP2-03 และ SL3-03 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวก

จากผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีเอนไซม์ได้คัดเลือกเชื้อราโดยเลือกจากเชื้อราที่มีค่าดัชนีในแต่ละเอนไซม์มากกว่า 2 เพื่อไปทำการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราต่อไป ซึ่งเชื้อราที่เลือกจากค่าดัชนีเอนไซม์ของเซลลูเลส ได้แก่ VP2-03, SL2-02, SL2-04, VP3-02, VP5-02 และ SL2-01 เชื้อราที่เลือกจากค่าดัชนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ของไซลาเนส ได้แก่ VP2-03, SL02-02, SL02-04, VP03-02, SL03-05 และ SL02-01 แต่เนื่องจากเชื้อราที่ให้ค่าดัชนีเอนไซม์แลคเคสมีเพียง 4 ไอโซเลต คือ SL3-03, SL1-01, SL5-02 และ SL3-04 จึงเลือกทั้งหมดไปทดสอบ ดังนั้นเชื้อราที่จะนำไปทำการวิเคราะห์ในการทดสอบต่อไปมีทั้งหมด 10 ไอโซเลต ได้แก่ SL1-01, SL2-01, SL2-02, SL2-04, SL3-03, SL3-04, VP2-03, VP3-02, VP5-02 และ PT2-04 โดยถึงแม้ว่า SL3-05 และ SL5-02 จะถูกคัดเลือกเช่นกัน แต่ในระหว่างทำการทดลอง ไอโซเลต SL3-05 และ SL5-02 ไม่สามารถนำกลับมาเพาะเลี้ยงให้เจริญต่อได้จึงไม่ได้นำมาทดสอบต่อในลำดับถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของดัชนีเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส จากเชื้อรา 48 ไอโซเลต

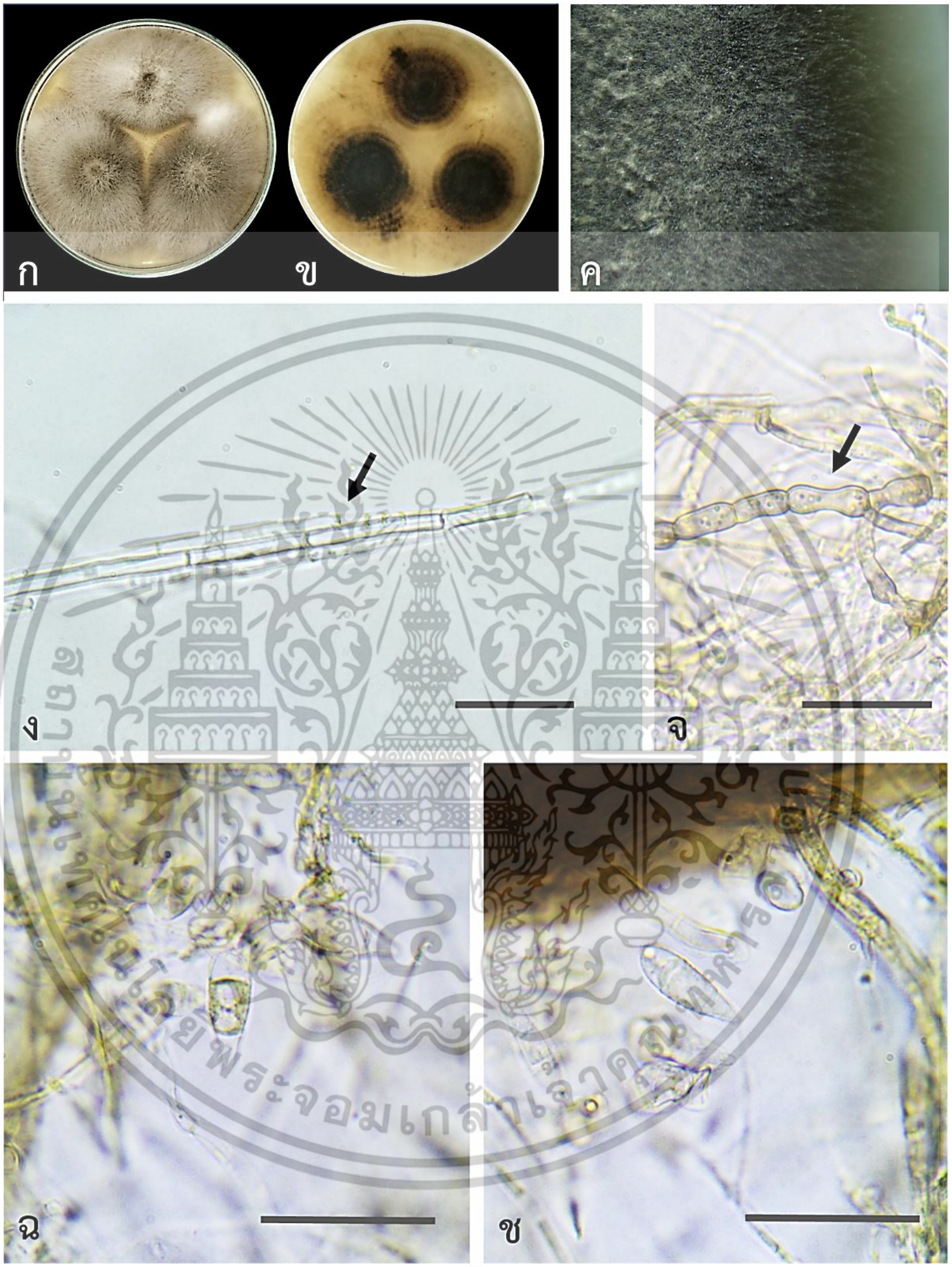
4.4 ผลการระบุสายพันธุ์ของเชื้อรา

4.4.1 การระบุสายพันธุ์โดยวิธีการทางสัณฐานวิทยา

การระบุสายพันธุ์โดยการดูลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต ได้แก่ SL1-01, SL2-01, SL2-02, SL2-04, SL3-03, SL3-04, VP2-03, VP3-02, VP5-02 และ PT2-04 พิจารณาจากรูปร่างลักษณะของโคโลนี ลักษณะของเส้นใสเชื้อรา รูปร่างและขนาดของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงได้ผลลัพธ์ดังนี้

ไอโซเลต SL1-01 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำสนิท ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม (Circular) ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะเป็นแบบวงซ้อนกันเป็นชั้น (Concentric) (รูปที่ 4.3ก-ข) โดยขอบของโคโลนีเป็นลักษณะแบบแตกแขนง (Filamentous) (รูปที่ 4.3ค) เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น (Septate Hypha) (รูปที่ 4.3ง) เส้นใยที่มีขนาดใหญ่จะมีสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 4.3จ) พบสร้าง Conidia ที่ปลายเส้นใย Conidiophore มีรูปร่างแบบหยดน้ำคว่ำ (Pyriform) (รูปที่ 4.3ฉ-ซ) และมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 6.05 - 8.53 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 7.48 ± 0.69 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ระหว่าง 16.31 - 26.38 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 23.22 ± 2.32 ไมโครเมตร สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ *Pyricularia oryzae* และ *P. grisea* ที่คัดแยกได้จากรอยดำบนใบข้าวและใบหญ้า 5 ชนิด ซึ่งมีลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลมเส้นใยมีสีขาวหรือเทา และ Conidiophore สร้าง Conidia รูปร่างหยดน้ำคว่ำซึ่งมีขนาดความกว้างอยู่ในช่วง 19.90 - 30.44 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ในช่วง 8.29 - 9.77 ไมโครเมตร (Qi และคณะ, 2019) จึงระบุเบื้องต้นว่าเชื้อราไอโซเลต SL1-01 เป็นเชื้อราในสกุล *Pyricularia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

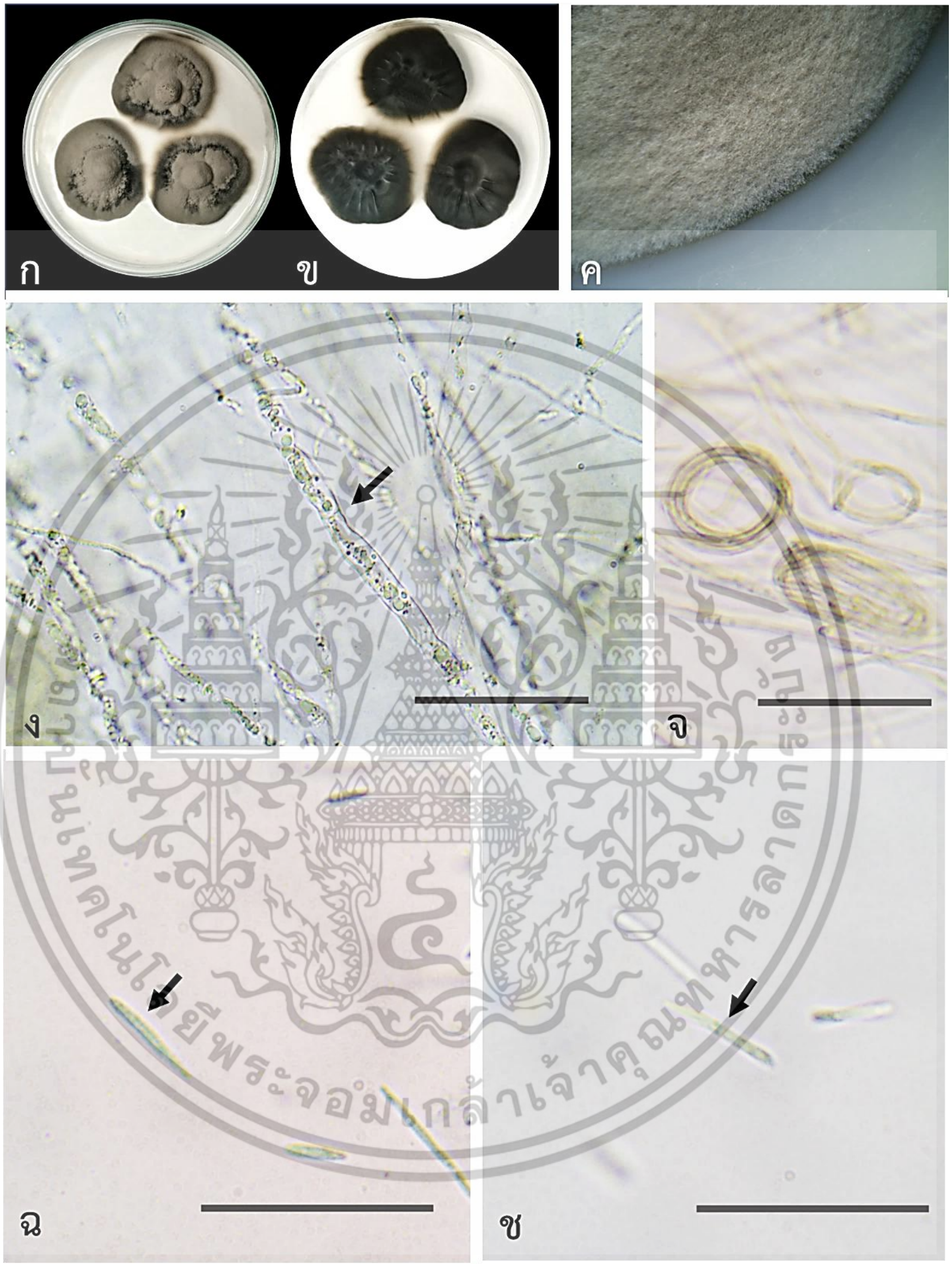


รูปที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pyricularia* SL1-01 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีแบบแตกแขนง (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) เส้นใยมีขนาดใหญ่และสีเข้ม (จ) Conidiophore (ฉ) Conidia (ช)
Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต SL2-01 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จะเห็นเส้นใยมีสีเทาจนถึงดำ ลักษณะเป็นโคโลนีแบบยุบนูนไม่สม่ำเสมอ (Irregular) พื้นผิวของโคโลนีมีลักษณะเนียนราบ (Smooth) (รูปที่ 4.4ก-ข) โดยขอบของโคโลนีเป็นรูปแบบขอบเรียบ (Entire) (รูปที่ 4.4ค) บนผิวของโคโลนีปรากฏเส้นใยเจริญเป็นลักษณะนูนเป็นเนินสูงต่ำ ที่ปลายสุดของโคโลนีเส้นใยจะเจริญใต้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเป็นพื้นที่สีดำล้อมรอบโคโลนี เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ลักษณะเส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น (รูปที่ 4.4ง) เส้นใยบางตำแหน่งมีลักษณะโค้งวนเป็นวงลูปกลม (Hyphal coil) (รูปที่ 4.4จ) Conidia มีรูปร่างเรียวยาวมีผนังกั้น 1 - 3 ช่อง ปลายทั้งสองข้างแหลม (Fusiform) (รูปที่ 4.4ฉ-ช) และมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 1.08 – 6.05 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 3.85 ± 4.52 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ระหว่าง 2.04 - 14.35 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 8.95 ± 3.24 ไมโครเมตร สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ *Cyphellophora fusarioides* ที่มีโคโลนีมีสีน้ำตาลอ่อนถึงเทาเข้ม ผิวหน้าโคโลนีแบบเรียบ เส้นใยของเชื้อรามีผนังกั้น เส้นใยบางตำแหน่งมีลักษณะโค้งวนเป็นวงลูปกลม ไม่พบโครงสร้าง Conidiophore ที่ชัดเจน Conidia ไม่มีสี (Hyaline) ผนังเรียบ รูปร่างตั้งแต่ตรงไปจนถึงโค้ง (Falcate) ลักษณะเป็นแท่งเรียวยาว (Acicular) ขนาดความกว้างอยู่ในช่วง 12 - 22 ไมโครเมตร และขนาดความยาวอยู่ในช่วง 1.5 - 2.5 ไมโครเมตร มีผนังกั้น 1 - 3 ช่อง (Ebrahimi และ Fotouhifar, 2016) จึงระบุเบื้องต้นว่าเชื้อราไอโซเลต SL2-01 เป็นเชื้อราในสกุล *Cyphellophora*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

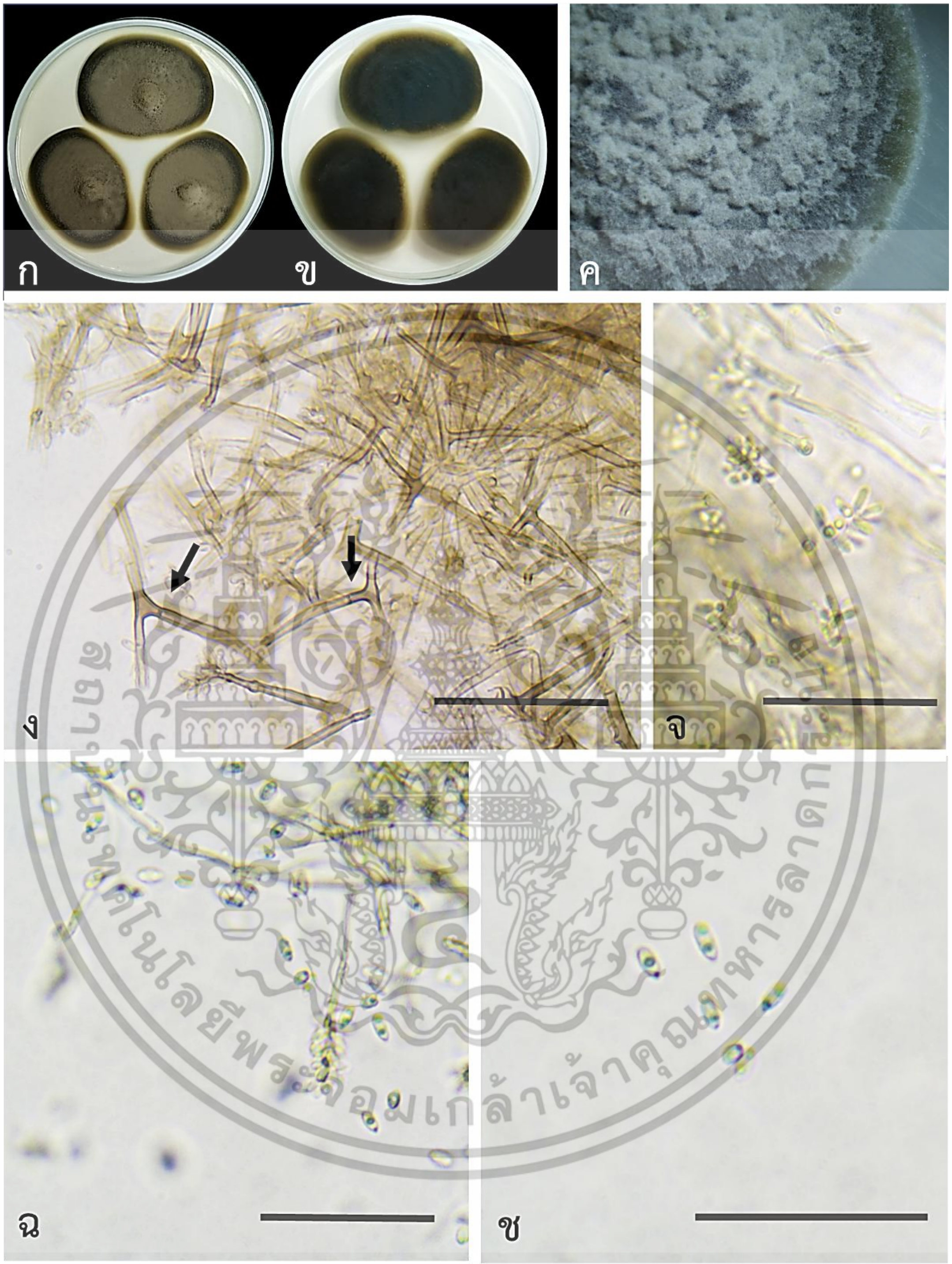


รูปที่ 4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Cyphellophora* SL2-01 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) เส้นใยมีลักษณะโค้งวนเป็นวงลูปกลม (จ) Conidia มีผนังกั้น (ฉ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลตรหัส SL2-02 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีน้ำตาลอ่อนหรือเทา ลักษณะเป็นโคโลนีแบบกลม พื้นผิวของโคโลนีมีลักษณะเนียนราบ (รูปที่ 4.5ก-ข) โดยขอบของโคโลนีเป็นรูปแบบขอบเรียบ (รูปที่ 4.5ค) บนผิวของโคโลนีปรากฏเส้นใยเจริญสูงต่ำไม่เท่ากันเกิดเป็นลักษณะคล้ายพื้นหิน ที่ปลายสุดของโคโลนีเส้นใยจะเจริญใต้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดเป็นพื้นที่สีดำล้อมรอบโคโลนี เส้นใยเมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นแบบมีผนังกั้น (รูปที่ 4.5ง) Conidiophore เป็นเส้นเดี่ยวโดยสร้างก้าน (Rachis) ยึด Conidia จำนวนมากให้เกาะอยู่รวมกัน (รูปที่ 4.5จ-ฉ) สปอร์มีรูปร่างคล้ายไข่คว่ำ (Obovoid) ถึงทรงรี (Ellipsoid) (รูปที่ 4.5ช) และมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 1.85 – 3.29 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 2.64 ± 0.46 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ระหว่าง 3.20 - 5.78 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 4.61 ± 0.73 ไมโครเมตร สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Ramichloridium* ที่คัดแยกได้จากแผลจุดดำบนพื้นผิวแอปเปิลและฟักทอง ซึ่งมีโคโลนีเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือเทา เส้นใยรามีผนังกั้น Conidiophores ตั้งตรง งอกออกมาจากเส้นใยที่อยู่บนพื้นผิว (Superficial hyphae) มีผนังกั้น 1 - 3 ช่อง Conidia มีลักษณะเดี่ยว (Solitary) ไม่มีผนังกั้น (Aseptate) เหมือนมีหยดน้ำภายใน (Guttulate) มีรูปร่างเป็นทรงกระบอง (Clavate) ถึงทรงรี ปลายมน (Apex obtuse) ฐานตัด (Base truncate) ขนาดความกว้างประมาณ 3.5 - 4.5 ไมโครเมตร ขนาดความยาวประมาณ 8 – 10 ไมโครเมตร (Li และคณะ, 2012) จึงระบุเบื้องต้นว่าเชื้อราไอโซเลต SL2-02 เป็นเชื้อราในสกุล *Ramichloridium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

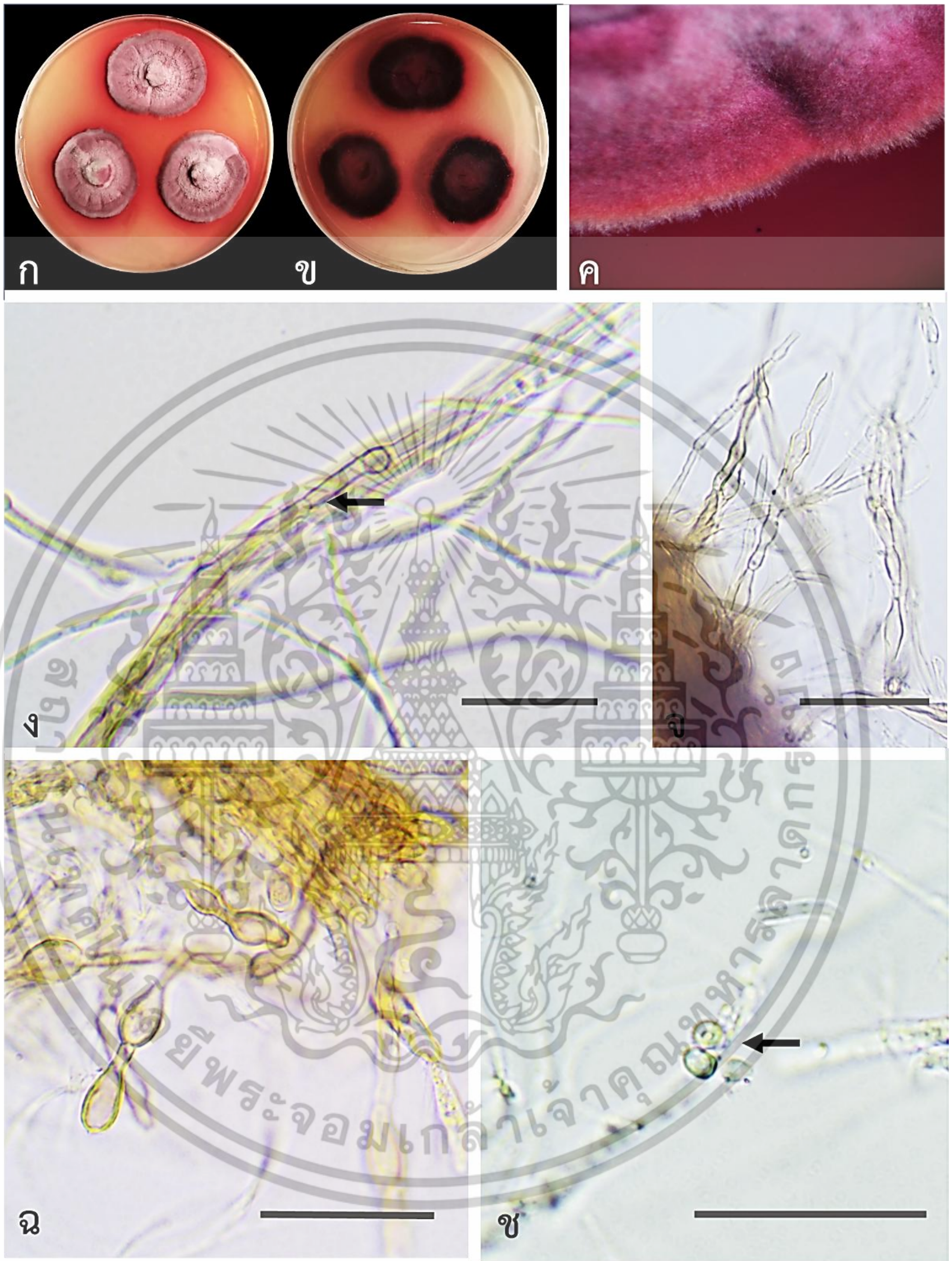


รูปที่ 4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Ramichloridium* SL2-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiophore (จ-ฉ) Conidia (ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลตรหัส SL2-04 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีชมพูอมแดง ลักษณะเป็นโคโลนีแบบกลม พื้นผิวของโคโลนีมีลักษณะมีวงซ้อนกัน (รูปที่ 4.6ก-ข) โดยขอบของโคโลนีมีลักษณะเรียบ (รูปที่ 4.6ค) ผลิตสารสีแดงใต้เส้นใย เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น (รูปที่ 4.6ง) มีการสร้าง Conidiogenous cells (รูปที่ 4.6จ-ฉ) บริเวณเส้นใยที่เจริญบนพื้นผิวซึ่งมีขนาดความกว้างและความยาวเฉลี่ยที่ 7.71 ± 1.89 และ 8.91 ± 2.68 ไมโครเมตร Conidia มีลักษณะรูปไข่ถึงทรงกลม (รูปที่ 4.6ช) และมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 4.11 – 11.36 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 7.71 ± 1.89 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ระหว่าง 4.62 – 13.15 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 8.91 ± 2.68 ไมโครเมตร สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Anteaglonium* ซึ่งมีโคโลนีมีสีส้มแดงจนถึงน้ำตาล บางสายพันธุ์มีการสร้างสารสี เส้นใยเรียงตัวกันอย่างหนาแน่น (Tightly arranged) และมีลักษณะฟูสั้น (Short aerial mycelium) Conidiogenous cells มีรูปร่างกลม (Globose) ขนาดความกว้างประมาณ 3 - 5 ไมโครเมตร ความยาวประมาณ 2 - 3 ไมโครเมตร ไม่มีสี ผนังเซลล์เรียบมีปลายมน Conidia มีรูปร่างวงรีถึงกลม (Oval to globose) ขนาดความกว้างและความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 4 และ 2.5 ไมโครเมตร (Jayasiri และคณะ, 2016) จึงระบุเบื้องต้นว่าเชื้อราไอโซเลต SL2-04 เป็นเชื้อราในสกุล *Anteaglonium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Anteaglonium* SL2-04 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiogenous cells (จ-ฉ) Conidia (ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลตรหัส SL3-03 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีขาวครีม ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม พื้นผิวของโคโลนีมีลักษณะเนียนราบ (รูปที่ 4.7ก-ข) โดยขอบของโคโลนีเป็นรูปแบบขอบเรียบ (รูปที่ 4.7ค) เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยเป็นมีผนังกั้น (รูปที่ 4.7ง) นอกจากนี้ยังพบ Gloeocystidia 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปทรงกระสวย (Spindle-shaped) ขนาดกว้าง 4 - 18 ไมโครเมตร และยาว 15 - 36 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.7จ) และรูปทรงกลม (Spherical) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 - 10 ไมโครเมตร พบ Arthroconidia โดยมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าและรูปวงรีเรียงต่อกันยาวเป็นเส้นใย (รูปที่ 4.7ฉ-ช) และมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 2.20 – 4.10 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 3.08 ± 0.51 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ระหว่าง 5.76 – 15.58 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 9.87 ± 2.84 ไมโครเมตร สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ *Pseudolagarobasidium acaciicola* ที่โคโลนีมีสีขาว ลักษณะเป็นฝ้ายบาง (Sparse cottony floccose) เส้นใยสามารถเจริญขึ้นด้านข้างของจานเพาะเลี้ยง บริเวณขอบมีลักษณะเรียบ ไม่มีกลิ่น อาหารเพาะเลี้ยงใต้เส้นใยไม่มีการเปลี่ยนสี เส้นใยมีผนังกั้น Arthroconidia มีลักษณะสี่เหลี่ยมผืนผ้า รูปทรงรียาว หรือรีกว้าง (Rectangular, Oblong to broadly ellipsoid) ขนาดความกว้างอยู่ในช่วง 2 - 5 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ในช่วง 5 - 12 ไมโครเมตร Gloeocystidia มี 2 ลักษณะคือเกิดที่ปลายเส้นใย (Terminal) หรือ อยู่ระหว่างเส้นใย (Intercalary) มีรูปทรงกระบอง (Clavate) ทรงกระบอก (Cylindrical) หรือ พองที่ฐานและเรียวไปที่ปลายทู่ ขนาดความกว้างอยู่ในช่วง 6 - 16 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ในช่วง 30 - 60 ไมโครเมตร (Wood และ Ginns, 2006) จึงระบุเบื้องต้นว่าเชื้อราไอโซเลต SL3-03 เป็นเชื้อราในสกุล *Pseudolagarobasidium*

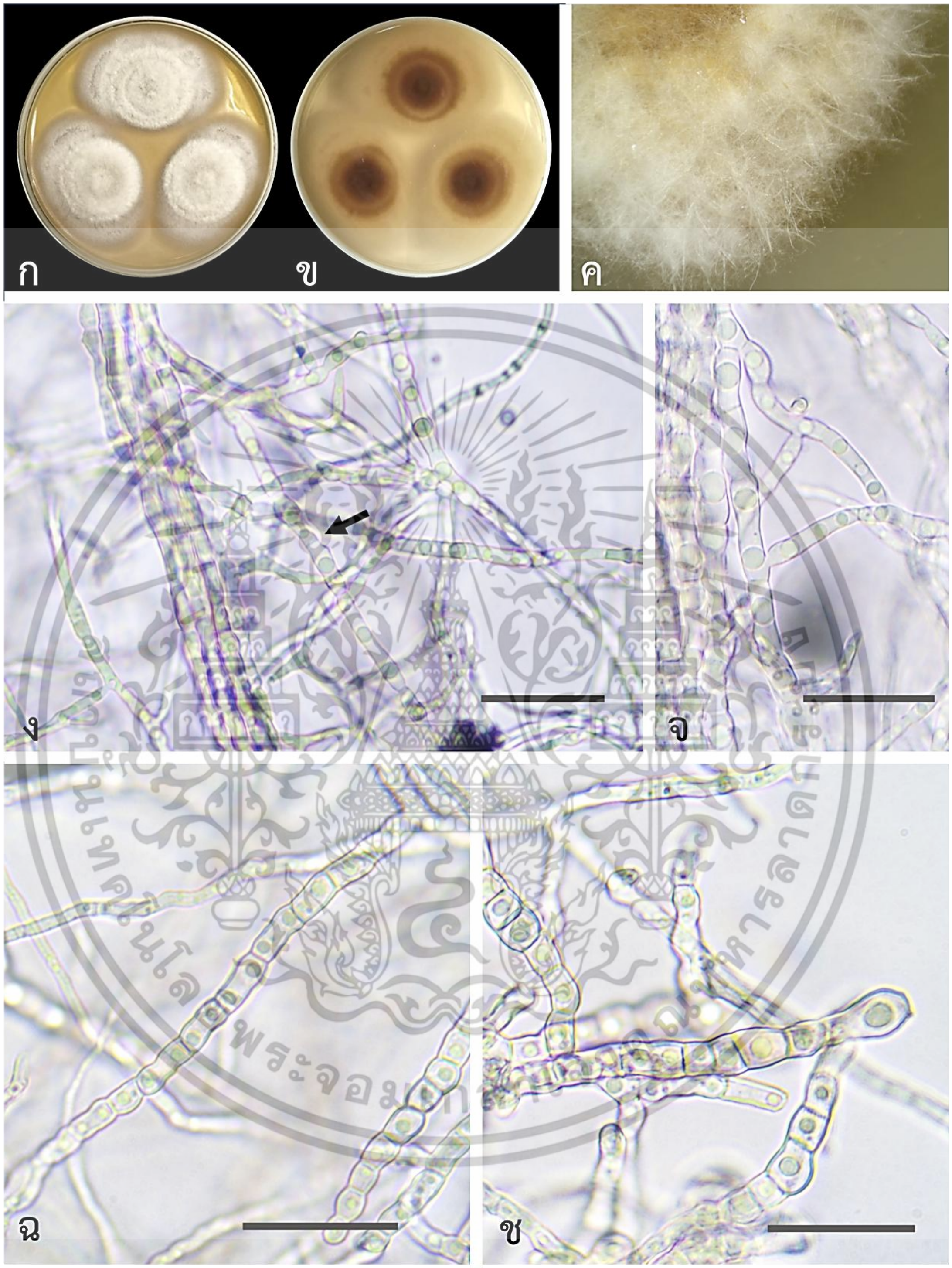
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pseudolagarobasidium* SL3-03 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Gloeocystidia (จ) Arthroconidia (ฉ-ช)
Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลตรหัส SL3-04 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีขาวครีม ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม พื้นผิวของโคโลนีมีลักษณะมีวงซ้อนกัน ด้านล้างเส้นใยมีสีน้ำตาลเข้มเป็นวงตรงกลางโคโลนี (รูปที่ 4.8ก-ข) โดยขอบของโคโลนีเป็นรูปแบบแตกแขนง (รูปที่ 4.8ค) เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยมีผนังกั้น (รูปที่ 4.8ง) มีการสร้างเส้นใยสร้างสปอร์ (Spore hypha) (รูปที่ 4.8จ-ช) และมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 1.78 – 4.65 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 3.15 ± 0.77 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ระหว่าง 1.65 – 4.77 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 3.09 ± 0.82 ไมโครเมตร สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ *Leptosphaerulina chartarum* SJTU59 ที่โคโลนีมีลักษณะแบบกำมะหยี่ (Velutinate colony) มีสีเทาถึงน้ำตาลพื้นผิวด้านหน้า และมีสีน้ำตาลอ่อนที่ด้านหลัง โคโลนีมีความหนาปานกลาง ลักษณะของเส้นใยมีการแตกแขนงและมีผนังกั้น ลักษณะของเซลล์สร้างสปอร์อยู่ที่ปลายหรือด้านข้างของเส้นใยที่สร้างสปอร์ มีขนาดความกว้างอยู่ในช่วง 2.0 - 3.0 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ในช่วง 2.7 - 13.0 ไมโครเมตร (Wu และคณะ, 2013) จึงระบุเบื้องต้นว่าเชื้อราไอโซเลต SL3-03 เป็นเชื้อราในสกุล *Leptosphaerulin*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

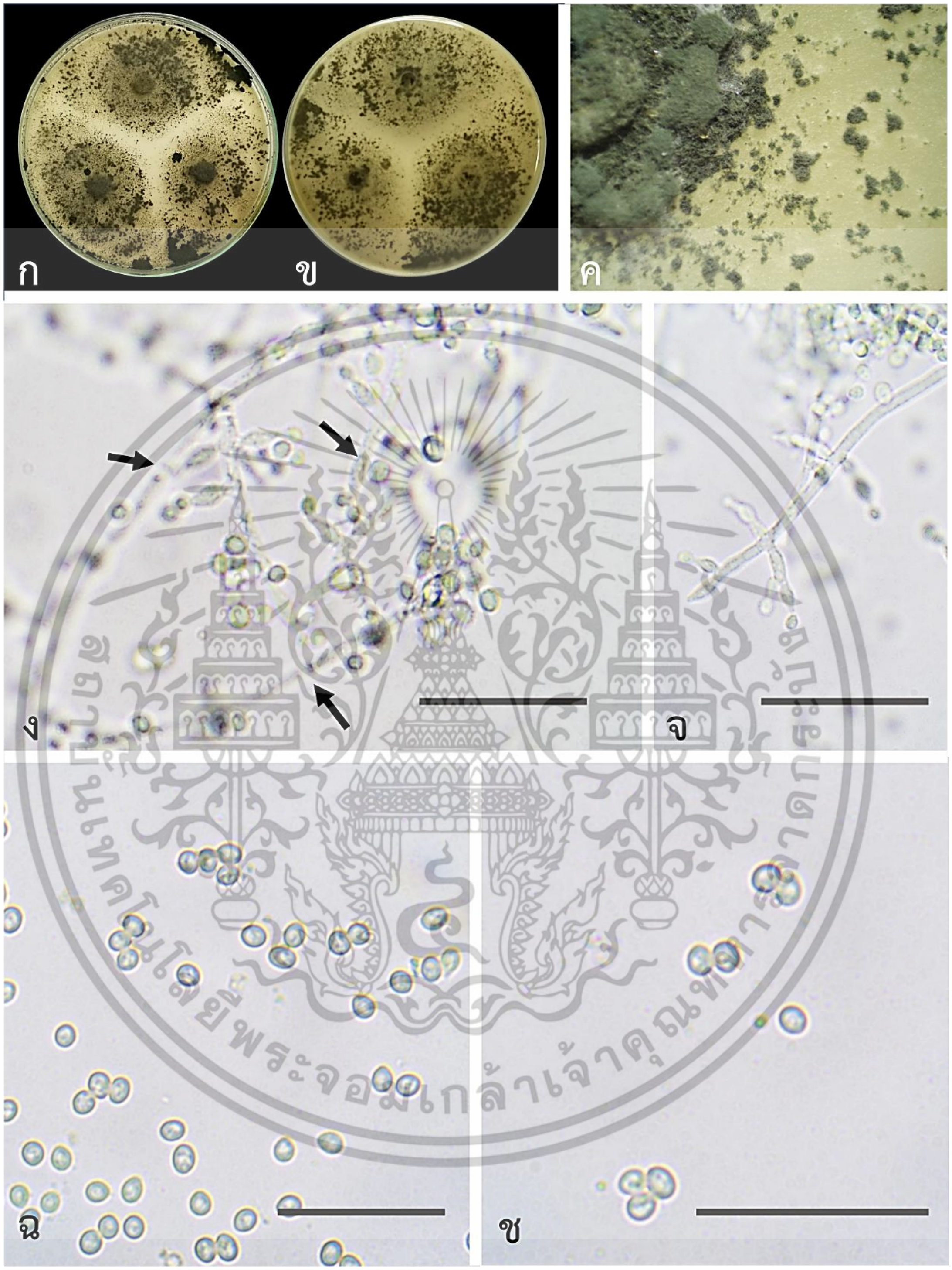


รูปที่ 4.8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Leptosphaerulin* SL3-04 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีแบบแตกแขนง (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) เส้นใยสร้างสปอร์ (จ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลตรหัส VP2-03 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีขาวเจริญเป็นชั้นบางๆ เรียบไปกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเป็นโคโลนีแบบเป็นเส้นใย (Filamentous) (รูปที่ 4.9ก-ข) โดยขอบของโคโลนีเป็นรูปแบบแตกแขนง (รูปที่ 4.9ค) หลังอายุเกิน 3 วัน เส้นใยจะเริ่มเจริญเป็นกระจุกที่ปลายปรากฏสปอร์สีเขียว กระจุกเส้นใยเหล่านี้จะอยู่กระจายกันออกไปตามผิวหน้าของโคโลนี เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น (รูปที่ 4.9ง) มีการสร้าง Conidiophore แบบกิ่งก้าน (รูปที่ 4.9จ) ที่ปลายมี Conidia รูปร่างกลมจนถึงไข่ (รูปที่ 4.9ฉ-ช)และมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 2.20 – 3.34 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 2.90 ± 0.27 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ระหว่าง 2.33 – 3.32 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 2.83 ± 0.26 ไมโครเมตร สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma capillare* ที่มีเส้นใยโคโลนีเป็นสีขาว ลักษณะเป็นกระจุกปุย (Fluffy) และมีการกระจายตัวไม่หนาแน่น Conidiophores มีรูปแบบเป็นกิ่งก้าน โดยกิ่งลำดับที่สอง (Secondary branches) มักแทรกอยู่ในกิ่ง รูปร่างคล้ายขวด (Lageniform) ส่วนใหญ่ตรง (Mostly straight) บางครั้งไม่มีรูปแบบที่แน่นอน เซลล์ของกิ่งที่มี Conidia อาจพองออก (Vesiculose) และสร้าง Phialides จำนวนมาก Conidia มีสีเขียว รูปร่างค่อนข้างกลมหรือรีกว้าง ขนาดความกว้างและความยาวโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 2 - 5 และ 1.5 - 4 ไมโครเมตร (Goh และคณะ, 2018) จึงระบุเบื้องต้นว่าไอโซเลต VP2-03 เป็นเชื้อราในสกุล *Trichoderma*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* VP2-03 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีแบบแตกแขนง (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiophore (จ) Conidia (ฉ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลตรหัส VP3-02 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จะเห็นเส้นใยมีสีขาวครีม ลักษณะเป็นโคโลนีแบบไม่แน่นอน (Irregular) (รูปที่ 4.10ก-ข) โดยขอบของโคโลนีเป็นรูปแบบเป็นคลื่น (Undulate) คล้ายดอกไม้ (รูปที่ 4.10ค) เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น (รูปที่ 4.10ง) พบ Germinated ascospore (รูปที่ 4.10จ) และมีการสร้าง Gloeocystidia ในสองรูปแบบ ได้แก่ รูปทรงกระสวยขนาดกว้างประมาณ 3 - 8 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 10 - 21 ไมโครเมตร และรูปทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 - 10 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.10ฉ-ช) แต่ไม่พบสปอร์ โดยสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Halorosellinia* ที่ถูกคัดแยกได้จากดินป่าชายเลนจังหวัดกระบี่ประเทศไทย แต่เนื่องจากข้อมูลของเชื้อรามีเพียงสัณฐานวิทยาในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual morph) และลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA เท่านั้น (Dayarathne และคณะ, 2020) จึงระบุเบื้องต้นได้เพียงว่า VP3-02 เป็นเชื้อราในสกุล *Halorosellinia* ซึ่งอาจจะอยู่ในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual morph) จึงไม่มีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต *Halorosellinia* VP3-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Germinated ascospore (จ) Gloeocystidia (ฉ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลตรหัส VP5-02 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีเขียว ลักษณะเป็นโคโลนีแบบกลม (รูปที่ 4.11ก-ข) โดยขอบของโคโลนีเป็นรูปแบบเรียบ (รูปที่ 4.11ค) มีการสร้างสีเหลืองหรือเขียวใต้โคโลนีของเชื้อรา เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น (รูปที่ 4.11ง) มีการสร้าง Conidiophore (รูปที่ 4.11จ-ฉ) ที่ปลายมี Conidia รูปร่างกลม (รูปที่ 4.11ช) เกาะกันอยู่เป็นกลุ่มและมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 2.14 – 4.05 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 3.22 ± 0.57 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ระหว่าง 1.99 – 4.66 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 3.14 ± 0.67 ไมโครเมตร สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุล *Hypocreales* โดยระบุว่าลักษณะโคโลนีมีทั้งแบบกลมและแบบแตกแขนง สีโคโลนีมีหลากหลายส่วนใหญ่พบเป็นสีขาว สีครีม สีเขียว และสีเหลืองอมเทา มีการพบการสร้างสารสี Conidiophore ที่ปลายมี Conidia ที่ส่วนปลายเส้นใยมีทั้งแบบเกาะกลุ่มเป็นพู่กลม และแบบเจริญต่อกันเป็นเส้นยาว Conidia มีหลายรูปทรง ส่วนใหญ่ที่พบเป็นรูปทรงกลม ทรงกระสวยหัวท้ายแหลม และทรงท่อนสั้นหัวท้ายมน (Thanakitpipattana และคณะ, 2020; Giraldo และคณะ, 2015) จึงระบุเบื้องต้นได้ว่าไอโซเลต VP5-02 เป็นเชื้อราในสกุล *Hypocreales*

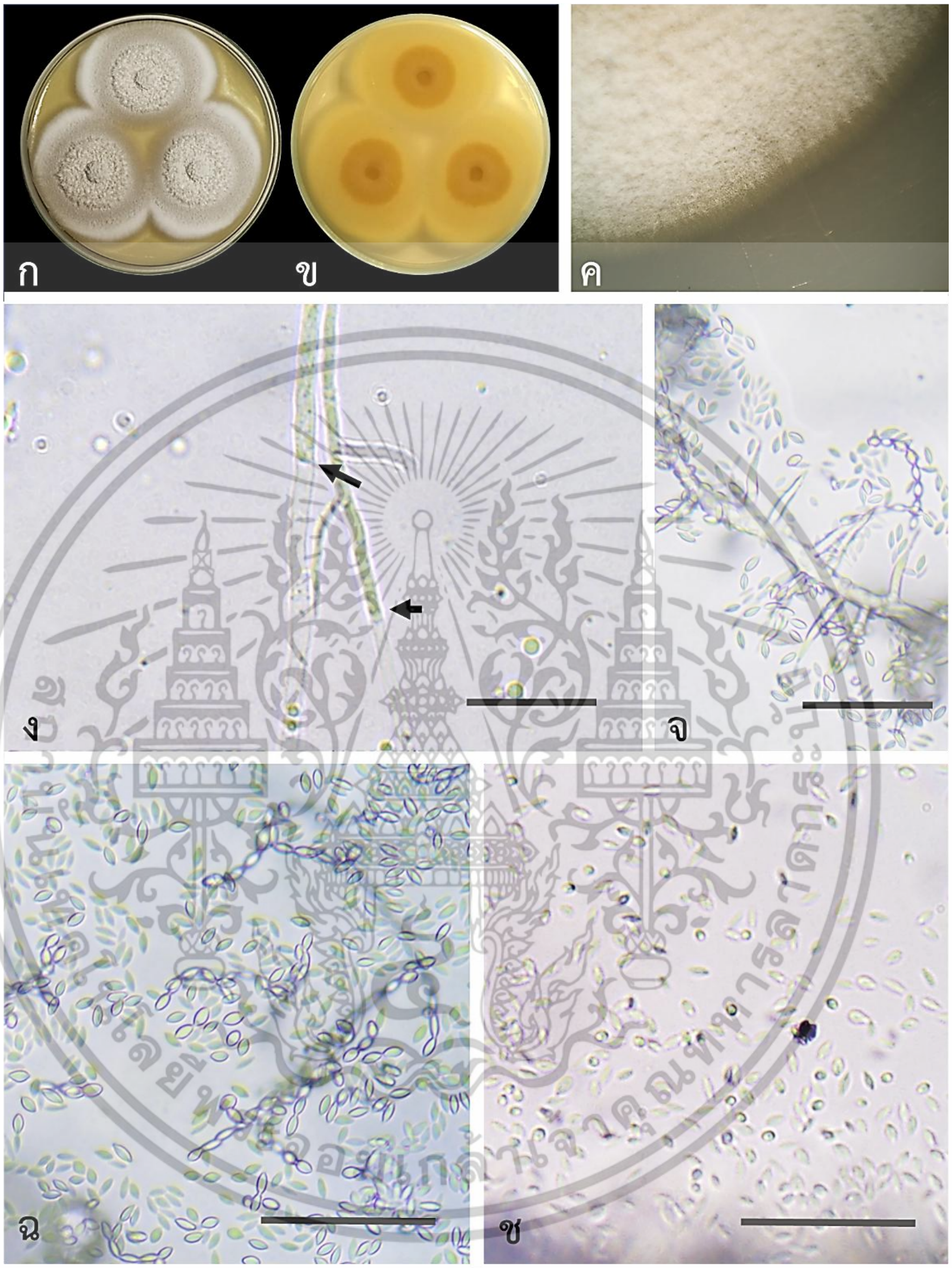
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Hypocreales* VP5-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiophore (จ-ฉ) Conidia (ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลตรหัส PT2-04 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยมีสีส้มอ่อนหรือสีชมพู ลักษณะเป็นโคโลนีแบบกลม ที่บริเวณกลางโคโลนีมีลักษณะคล้ายปุยนุ่น (รูปที่ 4.12ก-ข) โดยขอบของโคโลนีเป็นรูปแบบเรียบ (รูปที่ 4.12ค) เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น (รูปที่ 4.12ง) มีการสร้าง Conidiophore เป็นแบบกิ่งก้าน (รูปที่ 4.12จ) ที่ปลายกิ่ง มี Conidia ลักษณะเป็นท่อนสั้นปลายทั้งสองข้างแหลมและเรียว (Fusiform) เจริญต่อกันเป็นเส้นยาว (รูปที่ 4.12ฉ-ช) และมีขนาดความกว้างอยู่ระหว่าง 1.18 – 1.87 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 1.54 ± 0.21 ไมโครเมตร และความยาวอยู่ระหว่าง 2.97 – 6.10 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ย 4.70 ± 0.69 ไมโครเมตร สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Sarocladium* ที่โคโลนีมีสีขาวอมเหลือง มีลักษณะเป็นแฉกแนวรัศมีหรือเป็นหลุมมีขอบหยักในตอนแรกก่อนจะเปลี่ยนเป็นเส้นใยแบบกำมะหยี่ เส้นใยพืชเจริญแบบมีผนังกั้น Conidiophore ตั้งตรง Conidia เป็นเซลล์เดี่ยว รูปกระสวย เรียงเป็นสายขนาดความกว้างและความยาวประมาณ 1 - 2 ไมโครเมตร และ 5 - 8 ไมโครเมตร (Giraldo และคณะ, 2015) จึงระบุเบื้องต้นว่าเชื้อราไอโซเลต PT2-04 เป็นเชื้อราในสกุล *Sarocladium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Sarocladium* PT2-04 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ก) และด้านหลัง (ข) ของจานเพาะเชื้อ ขอบโคโลนีเป็นแบบเรียบ (ค) เส้นใยมีผนังกั้น (ง) Conidiophore (จ) Conidia (ฉ-ช) Scale bar = 50 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การระบุสายพันธุ์โดยลำดับนิวคลีโอไทด์

การระบุสายพันธุ์เบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถระบุได้ทั้งหมด 10 สกุล ได้แก่ *Pyricularia* sp., *Cyphellophora* sp., *Ramichloridium* sp., *Anteaglonium* sp., *Ramichloridium* sp. *Pseudolagarobasidium* sp., *Leptosphaerulina* sp., *Trichoderma* sp., *Halorosellinia* sp., *Hypocreales* sp., และ *Sarocladium* sp. เพื่อระบุสายพันธุ์เชื้อราที่แน่นอนจึงใช้วิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยโดยใช้ Thermolysis method และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ โดยในครั้งแรกใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต เนื่องจากเป็นยีนบริเวณอนุรักษ์ (Conserve sequence) ทำให้สามารถระบุสายพันธุ์เชื้อราได้อย่างแม่นยำ (Manter และ Vivanco, 2007) แต่เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซิส พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แสดงแถบดีเอ็นเอ เพียง 3 ไอโซเลต คือ SL2-04, SL3-03 และ VP3-02 (ดังรูปที่ 4.13) โดยมีขนาดประมาณ 550, 650 และ 600 คู่เบส ตามลำดับ ต่อมานำเชื้อราที่เหลือจำนวน 7 ไอโซเลตที่ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอ ได้แก่ SL1-01, SL2-01, SL2-02, SL3-04, VP2-03, VP5-02 และ PT2-04 ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS5/ITS4 ซึ่งมีบริเวณยีนกว้างกว่าคู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 เล็กน้อย หลังจากตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซิส พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แสดงแถบดีเอ็นเอ ทั้ง 7 ไอโซเลต ที่ขนาดประมาณ 550, 650, 550, 650, 650, 600 และ 600 คู่เบส ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.13 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 ของเชื้อราทั้งหมด 3 ไอโซเลต (SL2-04, SL3-03 และ VP3-02)

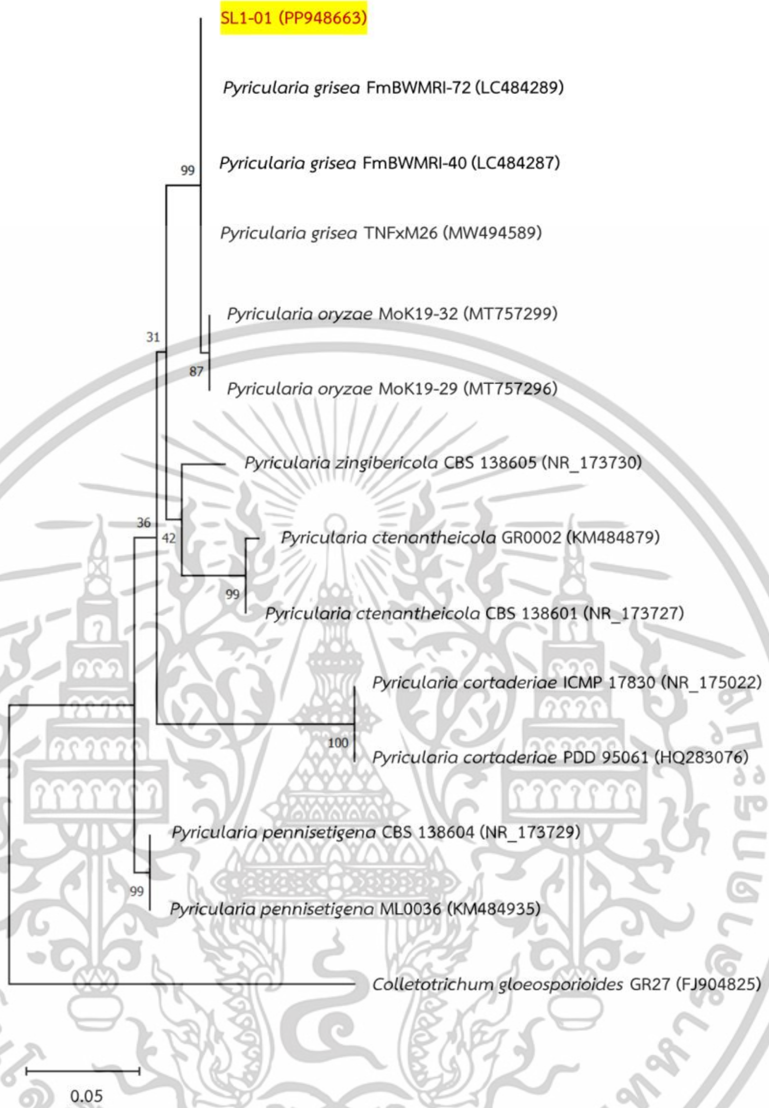
รูปที่ 4.14 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS 5 และ ITS 4 ของเชื้อราทั้งหมด 7 ไอโซเลต (SL1-01, SL2-01, SL2-02, SL3-04, VP2-03, VP5-02 และ PT2-04)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลตส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้วิธี BTseq ณ บริษัท U2Bio ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งพบว่าเชื้อราไอโซเลต SL1-01, SL2-01, SL2-02, SL2-04, SL3-03, SL3-04, VP2-03, VP3-02, VP5-02 และ PT2-04 มีขนาดแถบดีเอ็นเอ เท่ากับ 537, 620, 546, 550, 660, 614, 612, 584, 572 และ 627 คู่เบส ตามลำดับ หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เชื้อราในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) รวมทั้งรับหมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Accession number) โดยสรุปไพรเมอร์ที่ใช้ ขนาดชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Identity) เปอร์เซ็นต์ของลำดับตัวอย่างที่ตรงกับลำดับอ้างอิง (Query Coverage) ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง และการระบุสายพันธุ์ดังตารางที่ 4.4 และเมื่อนำตัวอย่างเชื้อรา (ตารางภาคผนวกที่ ค-2) มาใช้ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) จากโปรแกรม MEGA-X ด้วยวิธี Maximum Likelihood ที่ค่า bootstrap 1000 รอบ โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก โดยมีรายละเอียดแต่ละไอโซเลตดังนี้

จากผลลัพธ์ในแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เชื้อราไอโซเลต SL1-01 ถูกจัดกลุ่มอยู่กับ *P. grisea* ที่มี Accession number คือ LC484289 (รูปที่ 4.15) และมีค่า Identity มากที่สุดที่ 99.7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) ซึ่งตรงกับผลการสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ระบุว่าอยู่ในสกุล *Pyricularia* โดยมีการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *P. grisea* รายงานว่าเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคไหม้ในพืชตระกูลหญ้า เช่น ข้าว (Zhang และคณะ, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

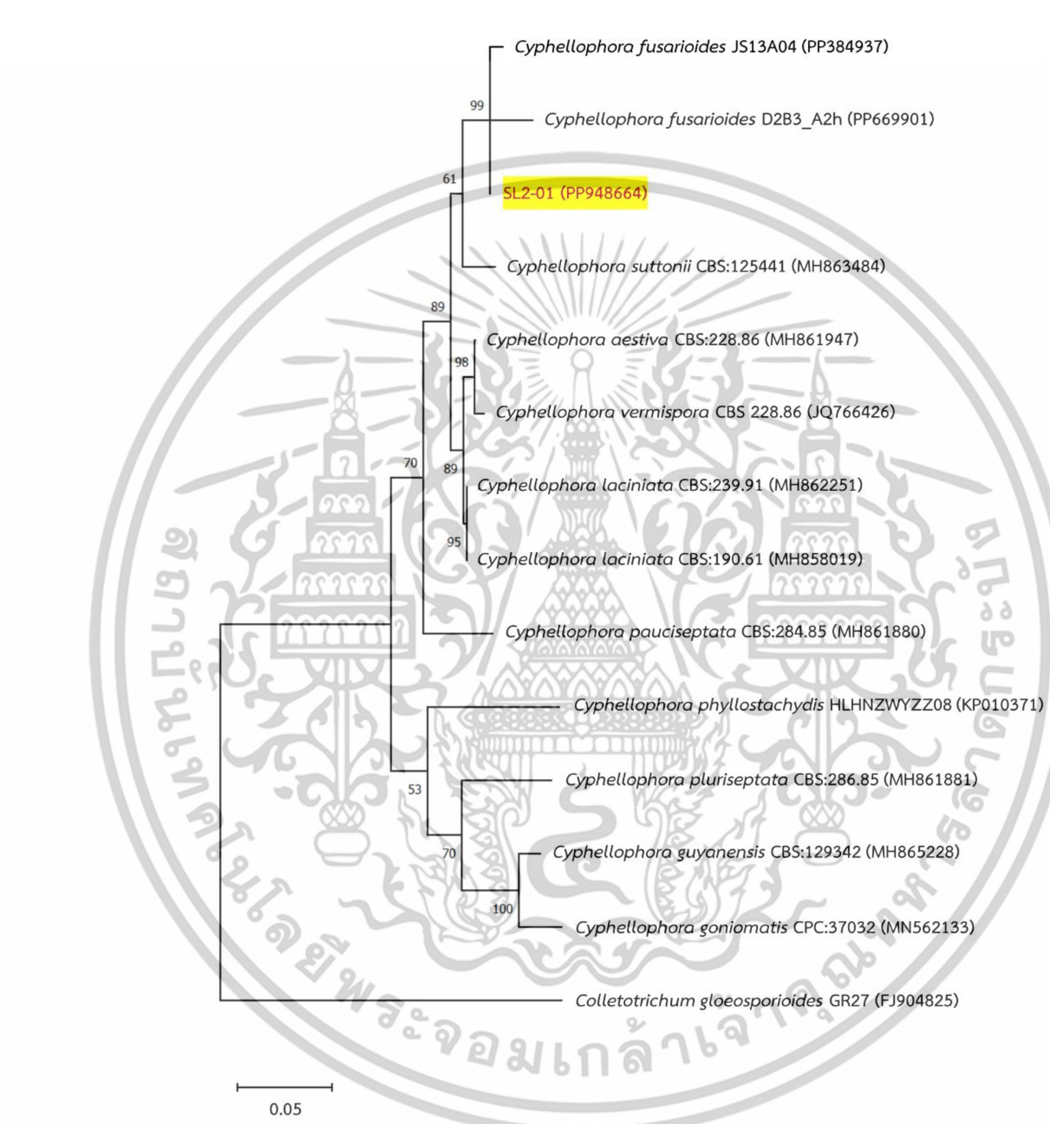


รูปที่ 4.15 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL1-01 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

ไอโซเลต SL2-01 จากผลการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในสกุล *Cyphellophora* ผลลัพธ์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แสดงการจัดกลุ่มอยู่กับ *C. fusarioides* (PP384937 และ PP669901) (รูปที่ 4.16) และมีค่า Identity มากที่สุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) โดยมีการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *C. fusarioides* รายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคใบจุดในต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pittosporum magnoliifolium และ เป็นเชื้อก่อโรคในเมล็ดโหระพา (Ebrahimi และ Fotouhifar, 2016; Sandoval, 2009)

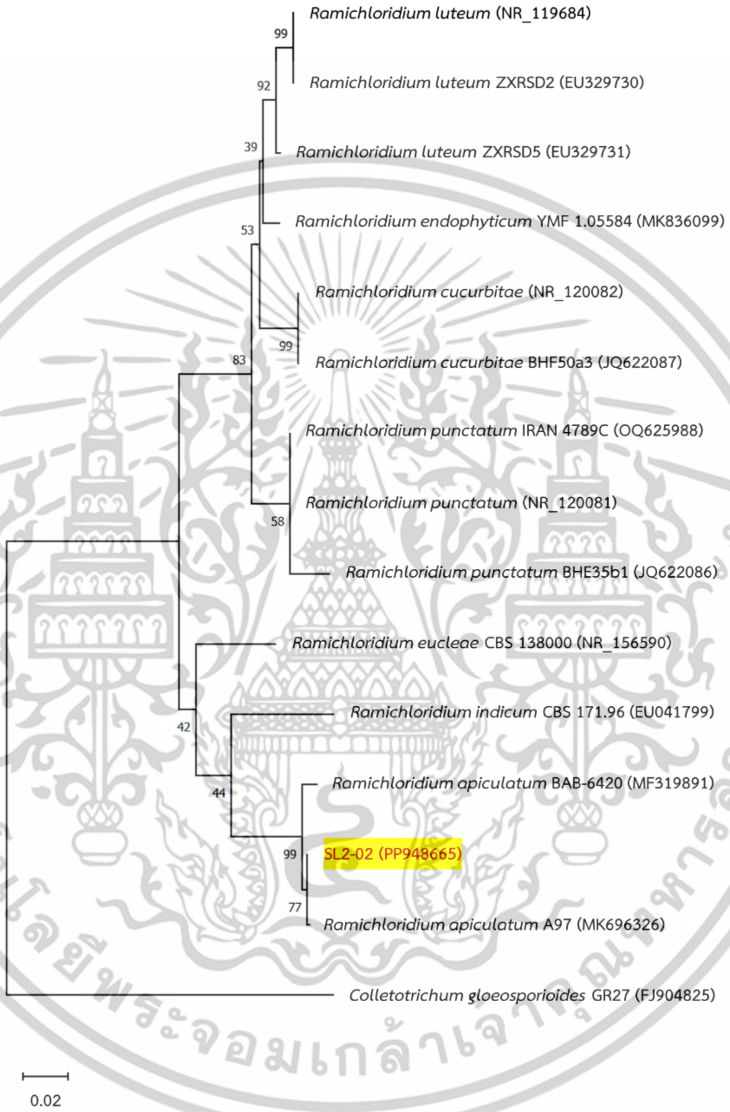


รูปที่ 4.16 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL2-01 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

ไอโซเลต SL2-02 จากผลการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในสกุล *Ramichloridium* ผลลัพธ์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แสดงการจับกลุ่มอยู่กับ *R. apiculatum* (MK696326) (รูปที่ 4.17) ที่ค่า Identity มากที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *R. apiculatum* รายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคใบจุดบนใบเมเปิ้ล เปลือกผลแอปเปิ้ล และลูกแพร (Batzer และคณะ, 2014)

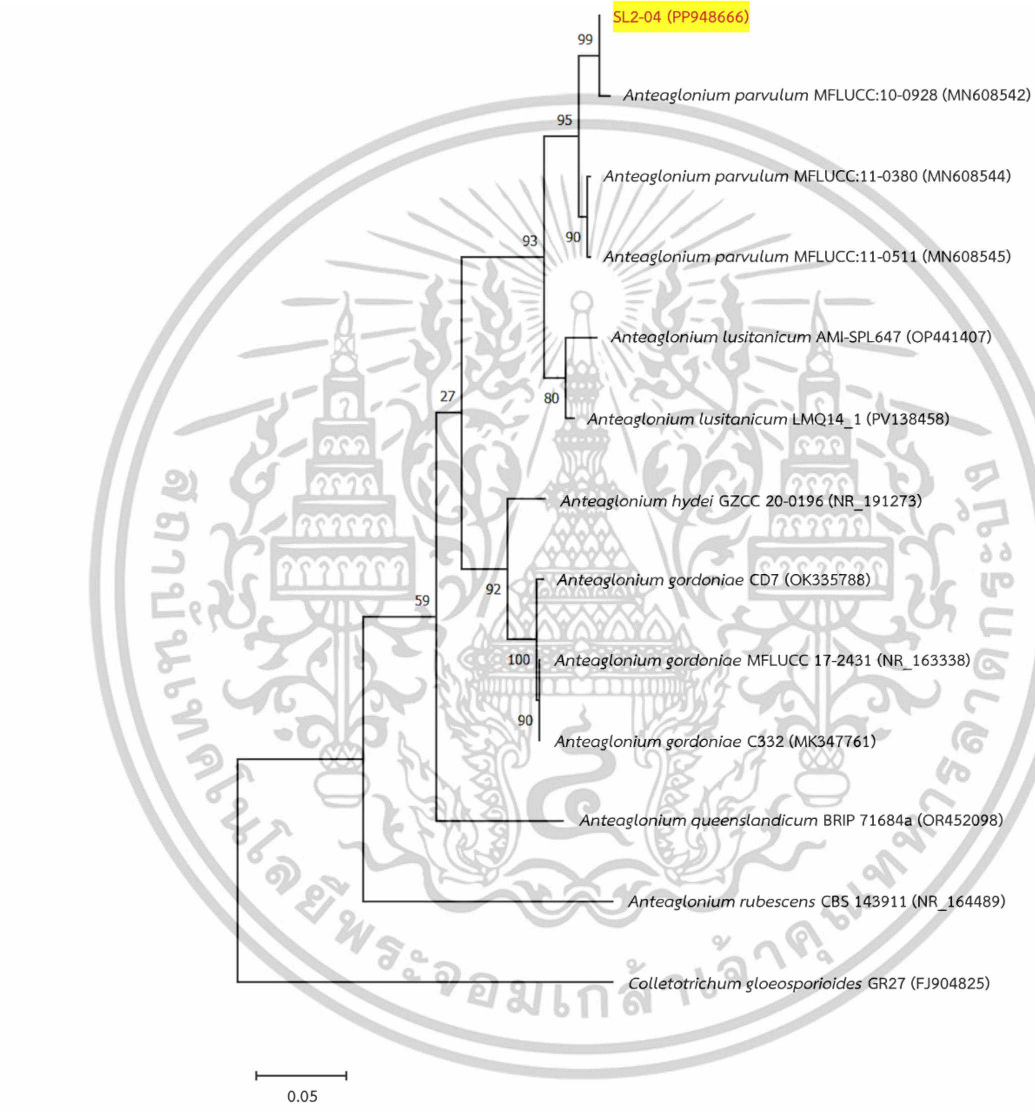


รูปที่ 4.17 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL2-02 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

ไอโซเลต SL2-04 จากผลการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในสกุล *Anteaglonium* ผลลัพธ์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แสดงการจับกลุ่มอยู่กับ *A. parvulum* (MN608542) (รูปที่ 4.18) ที่ค่า Identity มากที่สุดเท่ากับ 98.1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *A. parvulum* รายงานว่าเป็นเชื้อราที่คัดแยกได้จากสภาพแวดล้อมป่าชายเลน พบในดินซากพืชที่กำลังย่อยสลาย (Hashimoto และคณะ, 2017; Zhang และคณะ, 2023) แต่ยังไม่มีรายงานการใช้ประโยชน์ในด้านอื่นหรือรายงานเกี่ยวกับการก่อโรค

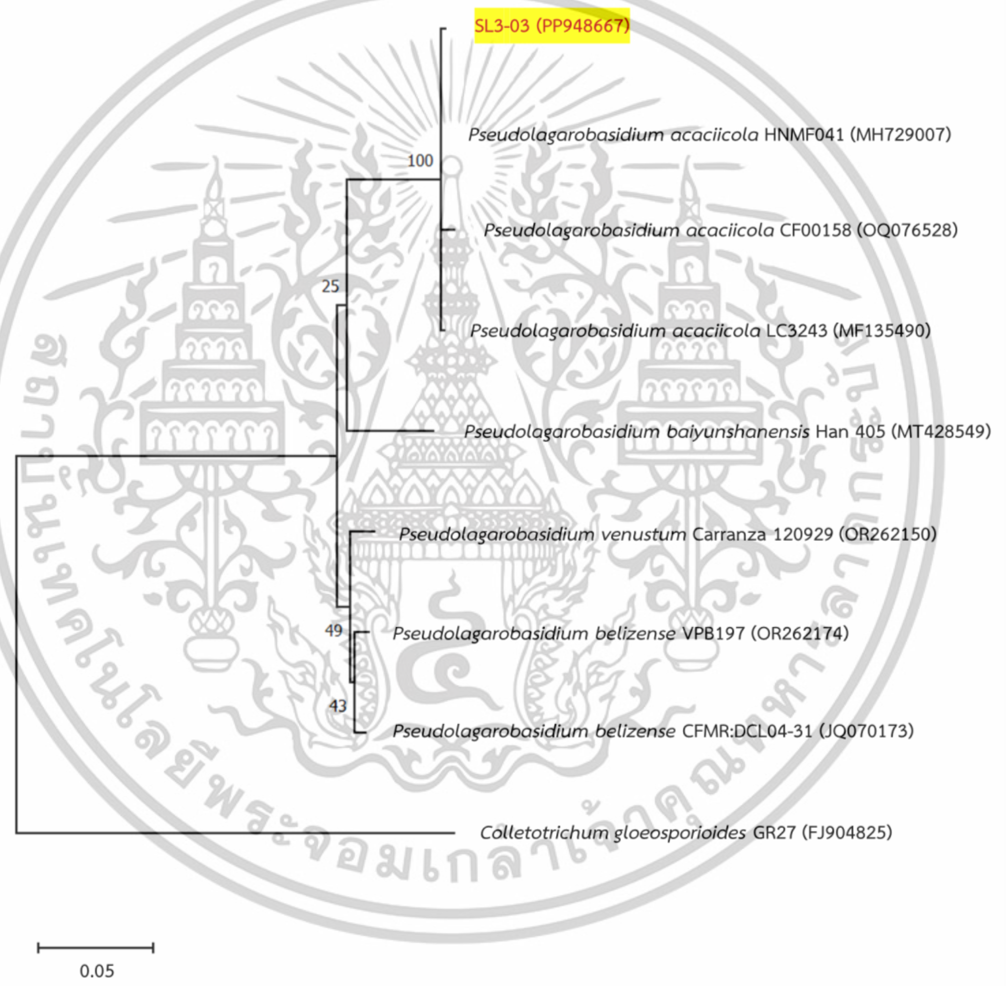


รูปที่ 4.18 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL2-04 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

ไอโซเลต SL3-03 จากผลการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในสกุล *Pseudolagarobasidium* ผลลัพธ์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แสดงการจัดกลุ่มอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับ *P. acaciicola* (MH729007) (รูปที่ 4.19) และมีค่า Identity มากที่สุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) โดยมีการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *P. acaciicola* รายงานว่าเชื้อรามีศักยภาพเป็นสารชีวภาพควบคุม *Acacia cyclops* ซึ่งเป็นพืชรุกรานในแอฟริกา และยังมีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเคสที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูง (Thakur และ Gupte, 2015; Behera และ Gupta, 2019; Luong และคณะ, 2025)

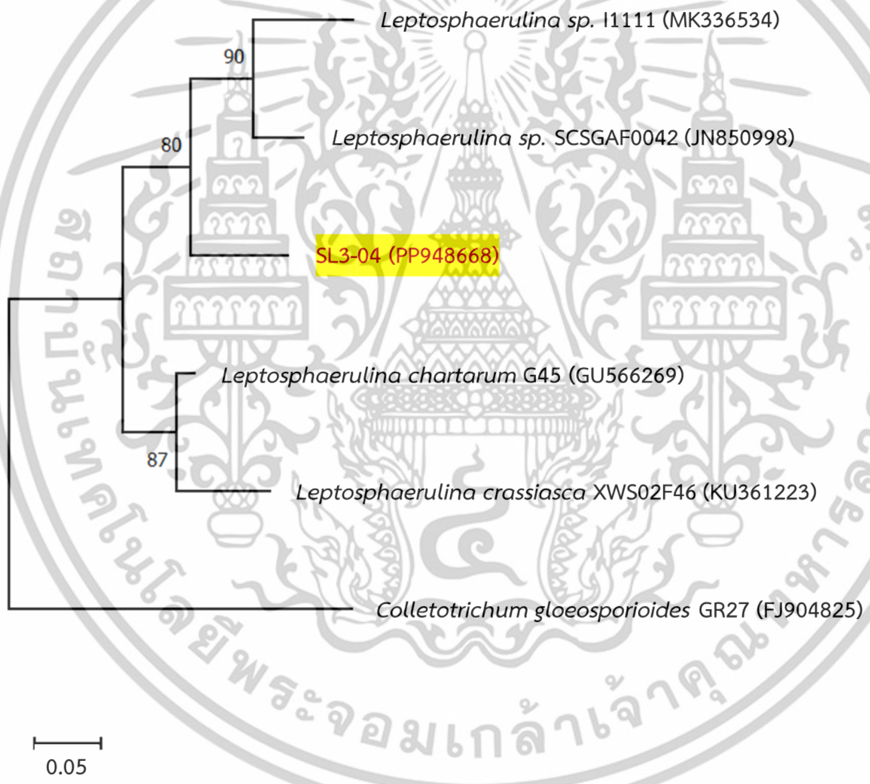


รูปที่ 4.19 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL3-03 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

ไอโซเลต SL3-04 จากผลการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในสกุล *Leptosphaerulina* ผลลัพธ์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงการจับกลุ่มอยู่กับ *Leptosphaerulina* sp. (JN850998) (รูปที่ 4.20) ที่ค่า Identity มากที่สุดเท่ากับ 94.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยังไม่สามารถระบุออกมาในระดับสายพันธุ์ของเชื้อราได้ (ตารางที่ 4.4) โดยมีการศึกษาเชื้อราสกุล *Leptosphaerulina* sp. รายงานว่าเป็นเชื้อราสามารถอาศัยอยู่ในระยะต่าง ๆ ของยุง *Anopheles gambiae* มีความสามารถในการควบคุมโรคไข้มาเลเรีย อีกทั้งยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูง และยังมีรายงานอีกว่าเป็นสาเหตุของโรคใบจุดในพืช *Medicago sativa* (แอลฟัลฟา) (Wu และคณะ, 2013; Nattoh และคณะ, 2021; Huo และคณะ, 2024)

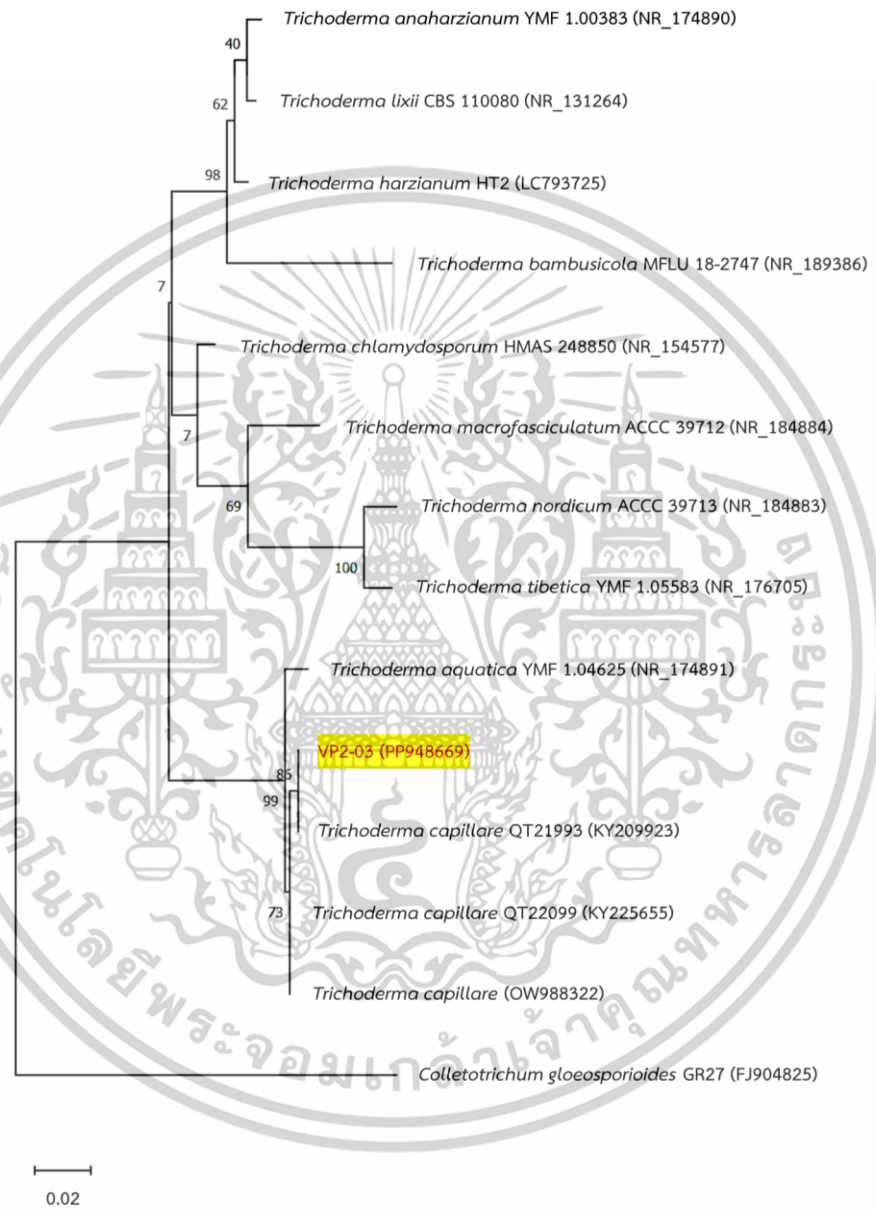


รูปที่ 4.20 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต SL3-04 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

ไอโซเลต VP2-03 จากผลการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในสกุล *Trichoderma* ผลลัพธ์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แสดงการจับกลุ่มอยู่กับ *T. capillare* (KY209923) (รูปที่ 4.21) ที่ค่า Identity มากที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *T. capillare* รายงานว่าเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายและเจริญเติบโตบนกระดาษได้ดี (Ezekwe และคณะ, 2020) แต่ยังไม่มีการศึกษาประโยชน์ในด้านอื่นๆ

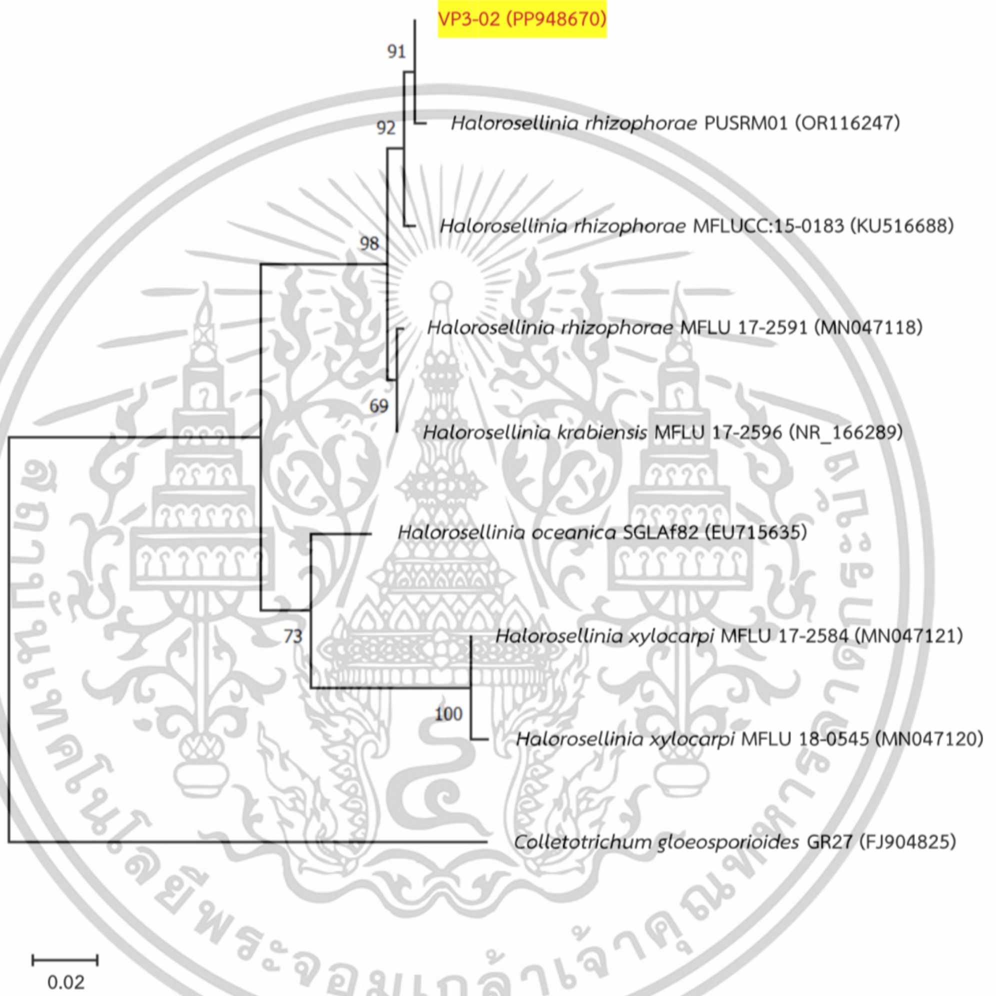


รูปที่ 4.21 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต VP2-03 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

ไอโซเลต VP3-02 จากผลการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในสกุล *Halorosellinia* ผลลัพธ์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แสดงการจับกลุ่มอยู่กับ *H.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

rhizophorae (MN047118) (รูปที่ 4.22) ที่ค่า Identity มากที่สุดเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) โดยมีการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *H. rhizophorae* รายงานว่าเป็นเชื้อราที่ถูกค้นพบครั้งแรกในป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ตของประเทศไทย (Thatoi และคณะ, 2013) แต่ยังไม่มีการศึกษาในด้านอื่นๆ

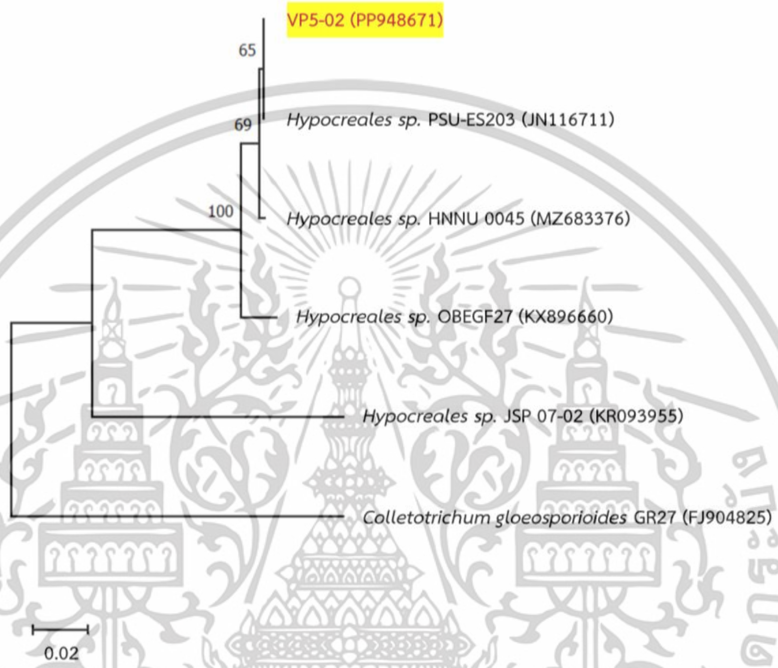


รูปที่ 4.22 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต VP3-02 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

ไอโซเลต VP5-02 จากผลการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในสกุล *Hypocreales* ผลลัพธ์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แสดงการจับกลุ่มอยู่กับ *Hypocreales* sp. (JN116711) (รูปที่ 4.23) ที่ค่า Identity มากที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยังไม่สามารถระบุออกมาในระดับสายพันธุ์ของเชื้อราได้ (ตารางที่ 4.4) โดยมีการศึกษาเชื้อราสกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

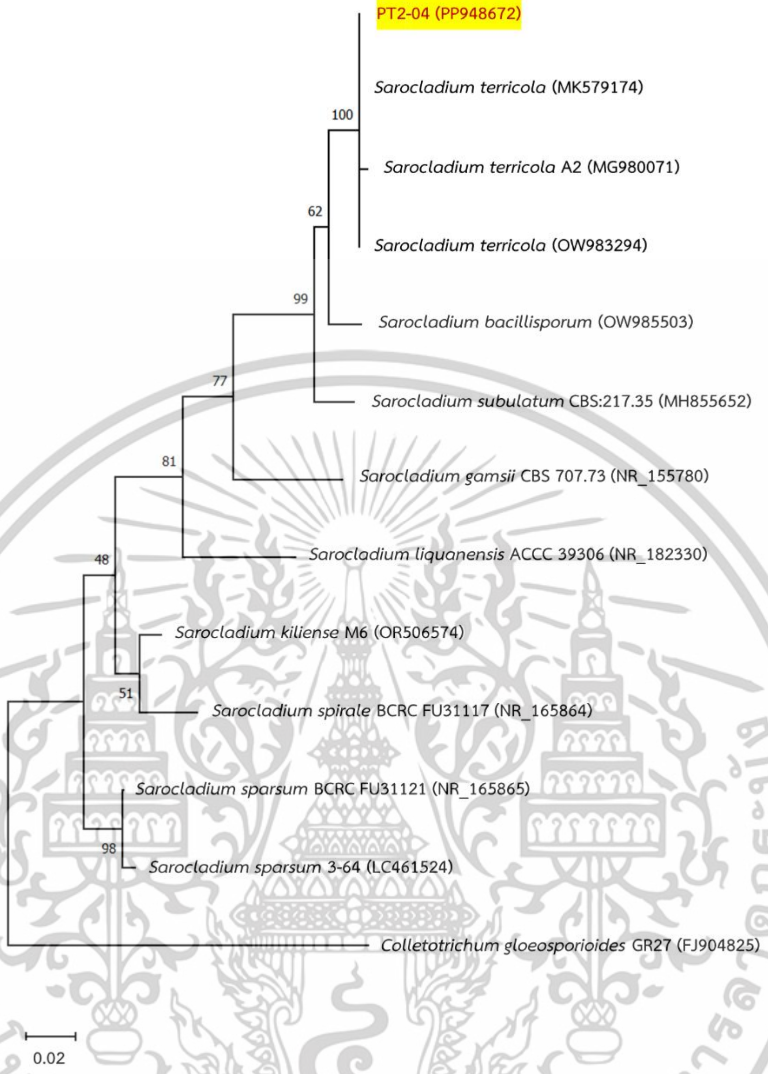
Hypocreales sp. รายงานว่าเชื้อราสกุลนี้มีบทบาทสำคัญในด้านการเกษตรและการควบคุมศัตรูพืช เนื่องจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์และสารต้านจุลชีพ รวมถึงการเป็นเชื้อราที่ก่อโรคในแมลง (Zhang และคณะ, 2016; Mantzoukas และคณะ, 2022; Zhao และคณะ, 2024)



รูปที่ 4.23 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต VP5-02 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

ไอโซเลต PT2-04 จากผลการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในสกุล *Sarocladium* ผลลัพธ์จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) แสดงการจับกลุ่มอยู่กับ *S. terricola* (MK579174, MG980071 และ OW983294) (รูปที่ 4.24) ที่ค่า Identity มากที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) โดยมีการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *S. terricola* รายงานว่าเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตสารต้านการอักเสบและสารต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังสามารถสร้าง D-mannitol, Galactomannan, Ergosterol, Cordycepin และกรดอะมิโนที่จำเป็น (Wang และคณะ, 2023)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.24 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราไอโซเลต PT2-04 วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ *C. gloeosporioides* เป็นกลุ่มอ้างอิงภายนอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการระบุสายพันธุ์เชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ไอโซเลต	Accession number	**คู่ไพรเมอร์**	**ขนาดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (คู่เบส)**	Identity/Query Coverage **(เปอร์เซ็นต์)**	**ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง**	**สายพันธุ์เชื้อราที่ระบุได้**
SL1-01	PP948663	ITS5/ITS4	537	99.7/100	LC484289	*Pyricularia grisea*
SL2-01	PP948664	ITS5/ITS4	620	100/91	PP384937 PP669901	*Cyphellophora fusarioides*
SL2-02	PP948665	ITS5/ITS4	546	100/90	MK696326	*Ramichloridium apiculatum*
SL2-04	PP948666	ITS1/ITS4	550	98.1/98	MN608542	*Anteaglonium parvulum*
SL3-03	PP948667	ITS1/ITS4	660	100/96	MH729007	*Pseudolagarobasidium acaciicola*
SL3-04	PP948668	ITS5/ITS4	614	94.8/82	JN850998	*Leptosphaerulina* sp.
VP2-03	PP948669	ITS5/ITS4	612	100/100	KY209923	*Trichoderma capillare*
VP3-02	PP948670	ITS1/ITS4	584	99/100	MN047118	*Halorosellinia rhizophorae*
VP5-02	PP948671	ITS5/ITS4	572	100/97	JN116711	*Hypocreales* sp.
PT2-04	PP948672	ITS5/ITS4	627	100/100	MK579174 MG980071 OW983294	*Sarocladium terricola*

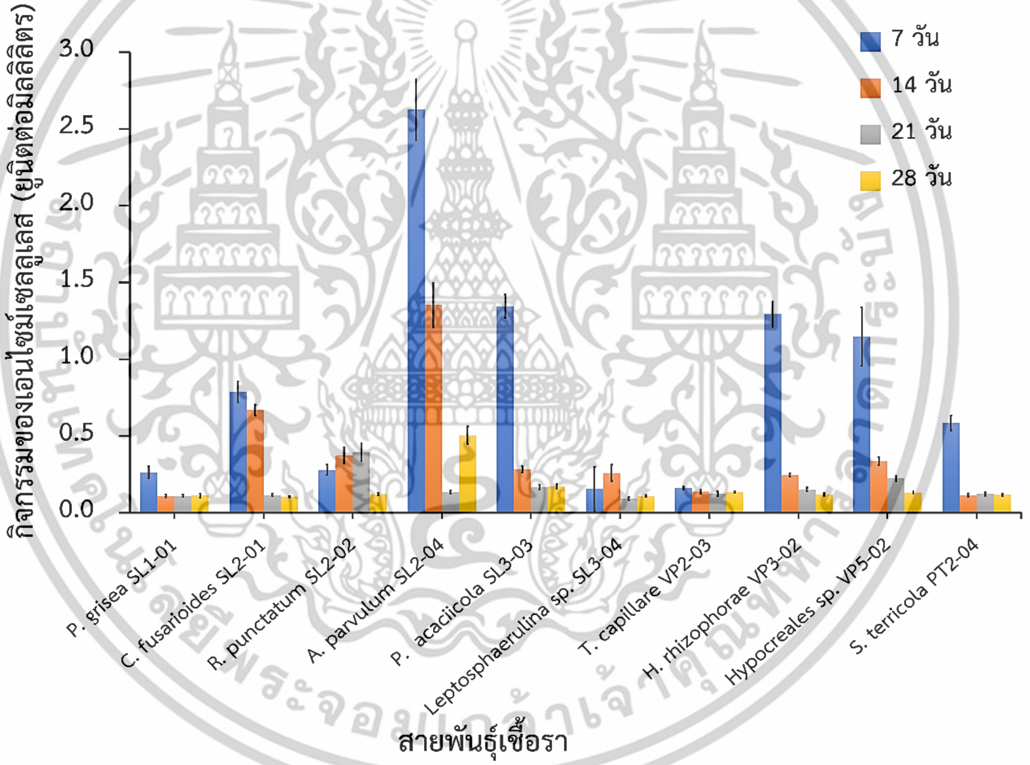
4.5 ผลการทดสอบการวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

การวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคสของเชื้อรา 10 ไอโซเลต โดยนำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร PDB บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 จากนั้นนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี DNSA และ ABTS เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคสที่ดีที่สุด ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นในตารางภาคผนวก ค–3, ค-4 และ ค-5 วิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว และตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p<0.05$) จากนั้นสร้างกราฟเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง ดังในรูปที่ 4.25, 4.26 และ 4.27 พบว่าเชื้อรา 8 สายพันธุ์ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในวันที่ 7 โดยมี *A. parvulum* SL2-04 ให้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด ที่ 2.63 ± 0.19 ยูนิตต่อมิลิลิตร รองลงมาคือ *P. acaciicola* SL3-03 ให้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ 1.35 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลิลิตร คล้ายคลึงกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งพบว่าเชื้อรา 9 สายพันธุ์ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดในวันที่ 7 โดยมี *A. parvulum* SL2-04 ให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด ที่ 1.95 ± 0.10 ยูนิตต่อมิลิลิตร รองลงมาคือ *C. fusarioides* SL2-01 ให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ 1.70 ± 0.18 ยูนิตต่อมิลิลิตร โดยสำหรับ *A. parvulum* SL2-04 ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อราสายพันธุ์นี้ หรือในสกุลนี้เลย ผลการวิเคราะห์นี้จึงเป็นการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ในเชื้อราสายพันธุ์ *A. parvulum* ต่อมาในส่วนของการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสในวันที่ 21 เชื้อราสายพันธุ์ *P. acaciicola* SL3-03 ให้กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมากที่สุดคือ 43.13 ± 2.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *P. grisea* SL1-01 ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่ 5.15 ± 0.69 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 โดยเชื้อราในสายพันธุ์ *P. acaciicola* มีรายงานวิจัยการผลิตเอนไซม์แลคเคสอยู่ในหลายการศึกษา เช่นการศึกษาของ Luong และคณะ (2025) ได้ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของ *P.acaciicola* TDW-48 ที่คัดแยกได้จากไม้ผุ ด้วยวิธีการ ABTS โดยผลการวิเคราะห์ระบุว่า *P. acaciicola* TDW-48 สามารถสร้างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุดที่ 9.25 ยูนิตต่อมิลลิตร ที่อายุการเจริญ 21 วัน เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของไอโซเลต *P. acaciicola* SL3-03 จะเห็นได้ว่า *P.acaciicola* TDW-48 ที่มีสภาวะการเจริญที่ใกล้เคียงกับ *P. acaciicola* SL3-03 แต่กลับมีกิจกรรมเอนไซม์ที่น้อยกว่า ซึ่งอาจสรุปได้ว่า *P.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

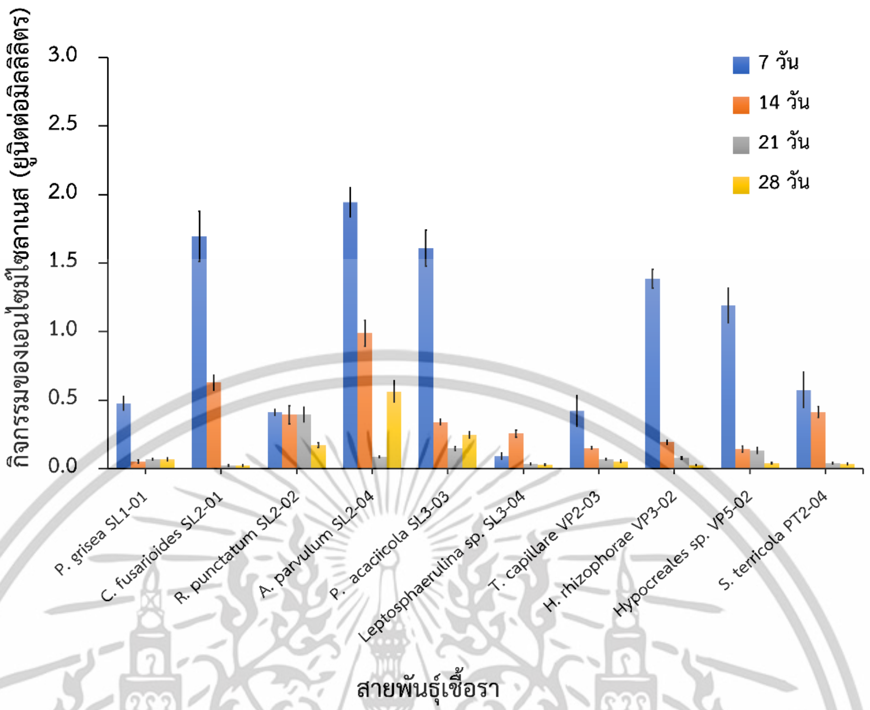
acaciicola ที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนนั้นสามารถสร้างกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสได้มากกว่า *P. acaciicola* ที่คัดแยกได้จากไม้ผุ

จากผลลัพธ์การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส *A. parvulum* SL2-04 ได้รับการคัดเลือกเป็นตัวแทนเชื้อราผู้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส สำหรับตัวแทนเชื้อราผู้ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้คัดเลือก *P. acaciicola* SL3-03 โดยจะนำเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลตไปทดสอบเก็บรักษาหัวเชื้อในวัสดุต่างๆ ต่อไป ก่อนนำไปทำการหมักเป็นปุ๋ยอินทรีย์

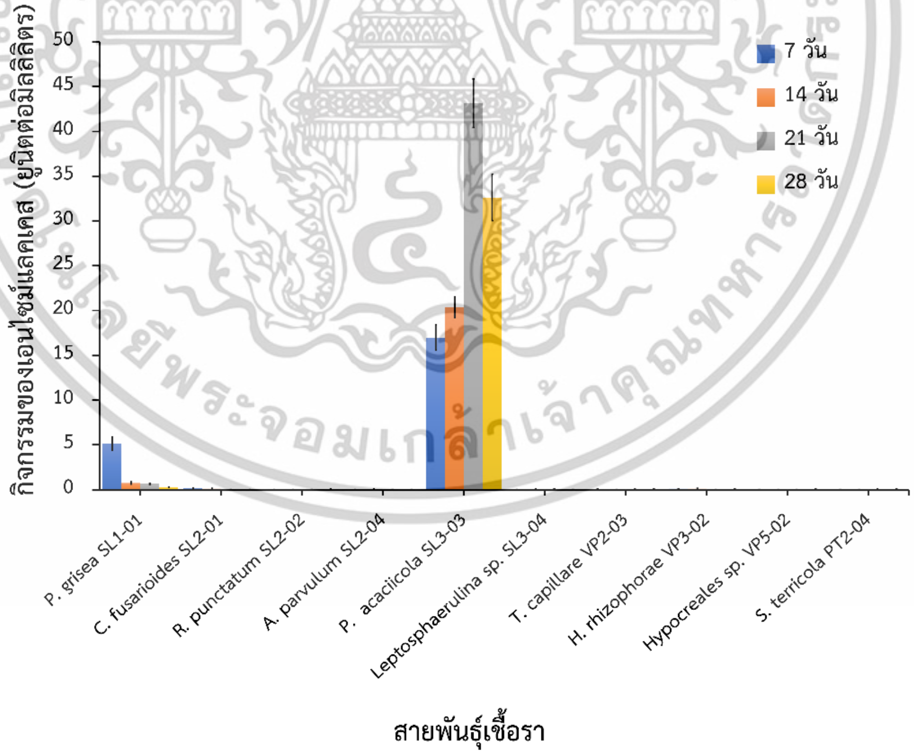


รูปที่ 4.25 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราจำนวน 10 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.26 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราจำนวน 10 สายพันธุ์



รูปที่ 4.27 กราฟแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของเชื้อราจำนวน 10 สายพันธุ์

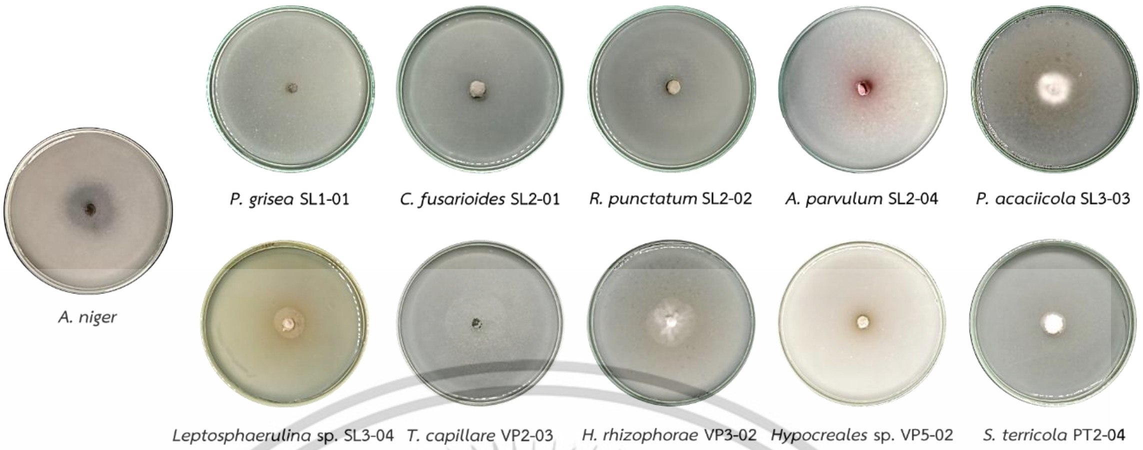
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลของความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม

ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต โดยการสังเกตบริเวณใสบน Pikovskaya agar และ Alekandrov agar เมื่อเชื้อราถูกเพาะเลี้ยงลงไปเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบกับ *A. niger* ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวกของทั้ง 2 อาหาร ผลการสังเกตพบว่าเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลตไม่พบการสร้างบริเวณใสรอบโคโลนี ในขณะที่ *A. niger* สังเกตพบบริเวณใสบน Pikovskaya agar โดยมีค่าดัชนีการละลายเท่ากับ 1.77 ± 1.51 และบริเวณใสบน Alekandrov agar เท่ากับ 2.23 ± 0.98 ดังที่แสดงในรูปที่ 4.28 และ 4.29 ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Elias และคณะ (2016) ซึ่งรายงานความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสของเชื้อราในสกุล *Aspergillus, Penicillium* และ *Fusarium* โดยให้ค่าดัชนีการละลายอยู่ในช่วง 1.10 - 3.05 รวมทั้งในงานของ Prajapati และคณะ (2012) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อรา 4 ไอโซเลตบนอาหาร Aleksandrov ager โดยสายพันธุ์เชื้อราที่ให้ค่าดัชนีการละลายที่ชัดเจนที่สุด คือ *A. niger* และ *A. terreus* ทั้งนี้เหตุที่เชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต ไม่มีการสร้างบริเวณใสอาจเป็นเพราะไม่มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ที่ใช้ในการละลายฟอสฟอรัสหรือโพแทสเซียม ทำให้ฟอสฟอรัสที่อยู่ในอาหาร Pikovskaya agar และโพแทสเซียมที่อยู่ในอาหาร Alekandrov agar ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นโครงสร้างที่สามารถละลายน้ำจึงไม่เกิดบริเวณใสขึ้น

รูปที่ 4.28 ผลการทดสอบความสามารถการละลายฟอสฟอรัสของเชื้อราจากดินป่าชายเลน 10 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Pikovskaya agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยมี *A. niger* เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 ผลการทดสอบความสามารถการละลายโพแทสเซียมของเชื้อราจากดินป่าชายเลน 10 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Alekandrov agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยมี *A. niger* เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

4.7 ผลของความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. oxysporum, C. musae, C. gloeosporioides, P. palmivora* และ *P. splendens* โดยผลการวิเคราะห์ได้จากการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมี ความผิดปกติของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมไปถึงจำนวนสปอร์ที่เปลี่ยนแปลงไปของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ที่ถูกเพาะเลี้ยงแบบวิธี Dual culture ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จากการสังเกตดังกล่าวแสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6 โดยพบว่าเชื้อรา *T. capillare* VP2-03 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีที่มากที่สุดกับเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *F. oxysporum, C. musae, C. gloeosporioides, P. palmivora* และ *P. splendens* โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีเท่ากับ 65.19 ± 2.85, 87.64 ± 2.15, 88.54 ± 1.81, 87.79 ± 4.57 และ 81.97 ± 3.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 4.30 รองลงมาคือ *P. acaciicola* SL3-03 โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีเท่ากับ 48.04 ± 2.16, 57.12 ± 2.40, 52.89 ± 3.00, 56.04 ± 4.81 และ 64.43 ± 1.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 4.31 และลำดับที่ 3 คือ *P. grisea* SL1-01 โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีเท่ากับ 39.44±2.00, 48.82±2.95, 50.34±3.48, 61.05±5.15 และ 51.05±1.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 4.32 ขณะเดียวกันในการหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรคพืชพบว่าได้ผลลัพธ์คล้ายคลึงกันกับการหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมี โดย *T. capillare* VP2-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

03 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์มากที่สุดกับ *F. oxysporum* และ *C. musae* ที่ 97.81 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *P. acaciicola* SL3-03 โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *F. oxysporum* และ *C. musae* เท่ากับ 49.41 และ 89.84 เปอร์เซ็นต์ และลำดับที่ 3 คือ *P. grisea* SL1-01 โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ *F. oxysporum* และ *C. musae* เท่ากับ 49.19 และ 80.34 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์พบว่า *T. capillare* VP2-03 เหมาะสำหรับเป็นตัวแทนเชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากเชื้อราสายพันธุ์นี้มาก่อน แต่เชื้อราในสกุลเดียวกันอย่าง *T. harzianum* นั่นได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีของเชื้อราสาเหตุโรคพืช *F. oxysporum* (Nwankiti และ Gwa, 2018), *C. musae* (Zhang และคณะ, 2022), *C. gloeosporioides* (Wang, 2024), *P. palmivora* (Geroche และคณะ, 2024) และ *P. ultimum* (Ghoniem และคณะ, 2021) อยู่ที่ 45.69, 79.73, 80.78, 70.54 และ 81.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันแล้วพบว่าไอโซเลต *T. capillare* VP2-03 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีใกล้เคียงกับ *T. harzianum* นอกจากนี้ยังพบว่า *P. acaciicola* SL3-03 ซึ่งถูกเลือกเป็นตัวแทนเชื้อราในการผลิตเอนไซม์แลคเคสก็มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเช่นกัน จึงอาจช่วยส่งเสริมความสามารถในการยับยั้งความเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในปุ๋ยอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น

จากผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส และผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้คัดเลือก *A. parvulum* SL2-04 เป็นตัวแทนเชื้อราผู้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส *P. acaciicola* SL3-03 เป็นตัวแทนเชื้อราผู้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และ *T. capillare* VP2-03 เป็นตัวแทนเชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบการทำหัวเชื้อราเริ่มต้นในการหมักปุ๋ยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์

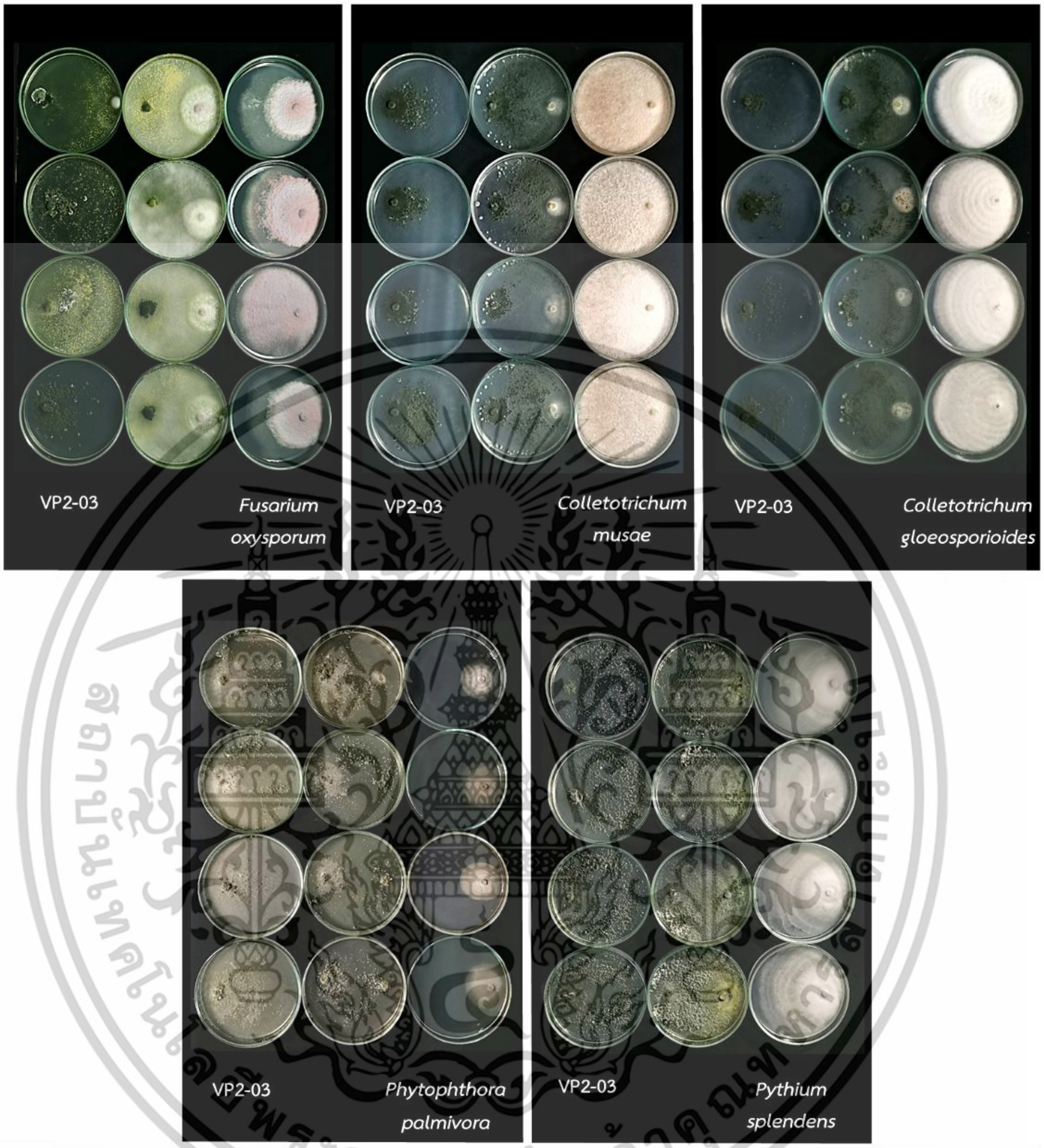
สายพันธุ์เชื้อรา	**การยับยั้งการเติบโตในแนวรัศมี (เปอร์เซ็นต์)**				
	F. oxysporum	*C. musae*	*C. gloeosporioides*	*P. palmivora*	*P. splendens*
P. grisea SL1-01	39.44±2.00	48.82±2.95	50.34±3.48	61.05±5.15	51.05±1.91
C. fusarioides SL2-01	22.30±3.24	31.08±2.29	25.05±1.04	22.25±1.29	5.99±0.96
R. punctatum SL2-02	21.54±2.87	36.80±2.18	28.76±2.40	1.79±1.27	3.03±1.38
A. parvulum SL2-04	22.30±2.49	38.10±2.34	33.25±2.20	29.73±3.14	34.94±1.18
P. acaciicola SL3-03	48.04±2.16	57.12±2.40	52.89±3.00	56.04±4.81	64.43±1.89
Leptosphaerulina sp. SL3-04	21.48±1.67	42.87±1.79	36.56±1.44	30.37±2.02	42.04±1.22
T. capillare VP2-03	65.19±2.85	87.64±2.15	88.54±1.81	87.79±4.57	81.97±3.97
H. rhizophorae VP3-02	21.81±1.08	53.12±1.63	33.04±0.84	58.31±0.18	57.46±1.26
Hypocreales sp. VP5-02	34.77±2.86	15.44±1.53	31.81±3.28	33.95±0.94	0.79±0.92
S. Terricola PT2-04	39.05±1.95	41.32±0.68	36.00±2.23	1.39±3.02	42.37±1.46

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์

ไอโซเลต	**การยับยั้งการสร้างสปอร์ (เปอร์เซ็นต์)**				
	F. oxysporum	*C. musae*	*C. gloeosporioides*	*P. palmivora*	*P. splendens*
P. grisea SL1-01	49.19	80.34	ND	ND	ND
C. fusarioides SL2-01	8.93	18.11	ND	ND	ND
R. punctatum SL2-02	12.28	20.61	ND	ND	ND
A. parvulum SL2-04	15.50	26.76	ND	ND	ND
P. acaciicola SL3-03	49.41	89.84	ND	ND	ND
Leptosphaerulina sp. SL3-04	10.92	21.13	ND	ND	ND
T. capillare VP2-03	97.81	100.00	ND	ND	ND
H. rhizophorae VP3-02	4.96	57.81	ND	ND	ND
Hypocreales sp. VP5-02	11.27	8.72	ND	ND	ND
S. Terricola PT2-04	19.21	20.89	ND	ND	ND

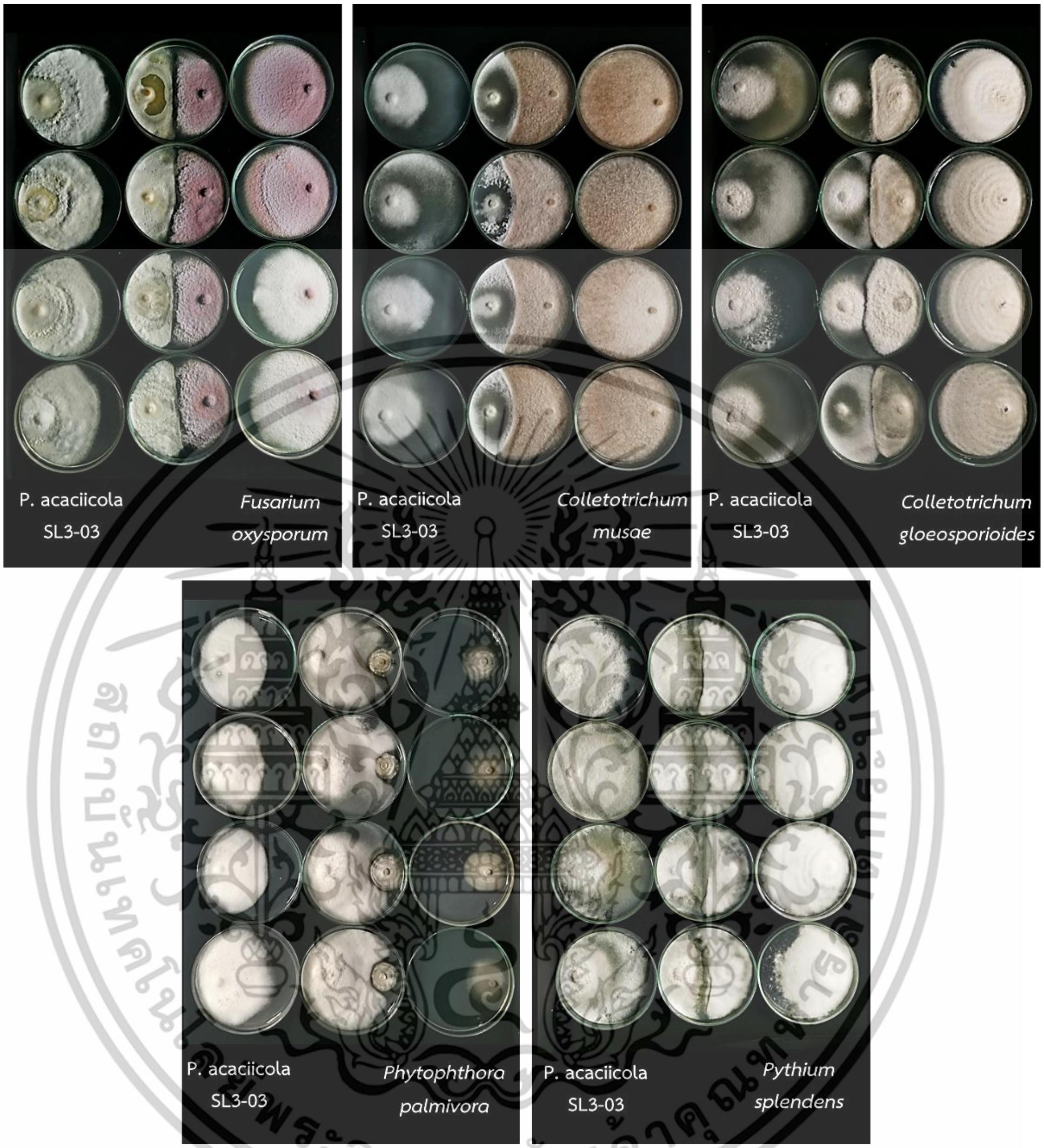
หมายเหตุ: สถานะ ND คือไม่พบสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบน Hemocytometer ทั้งในการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวและในการเพาะเลี้ยงคู่กับเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



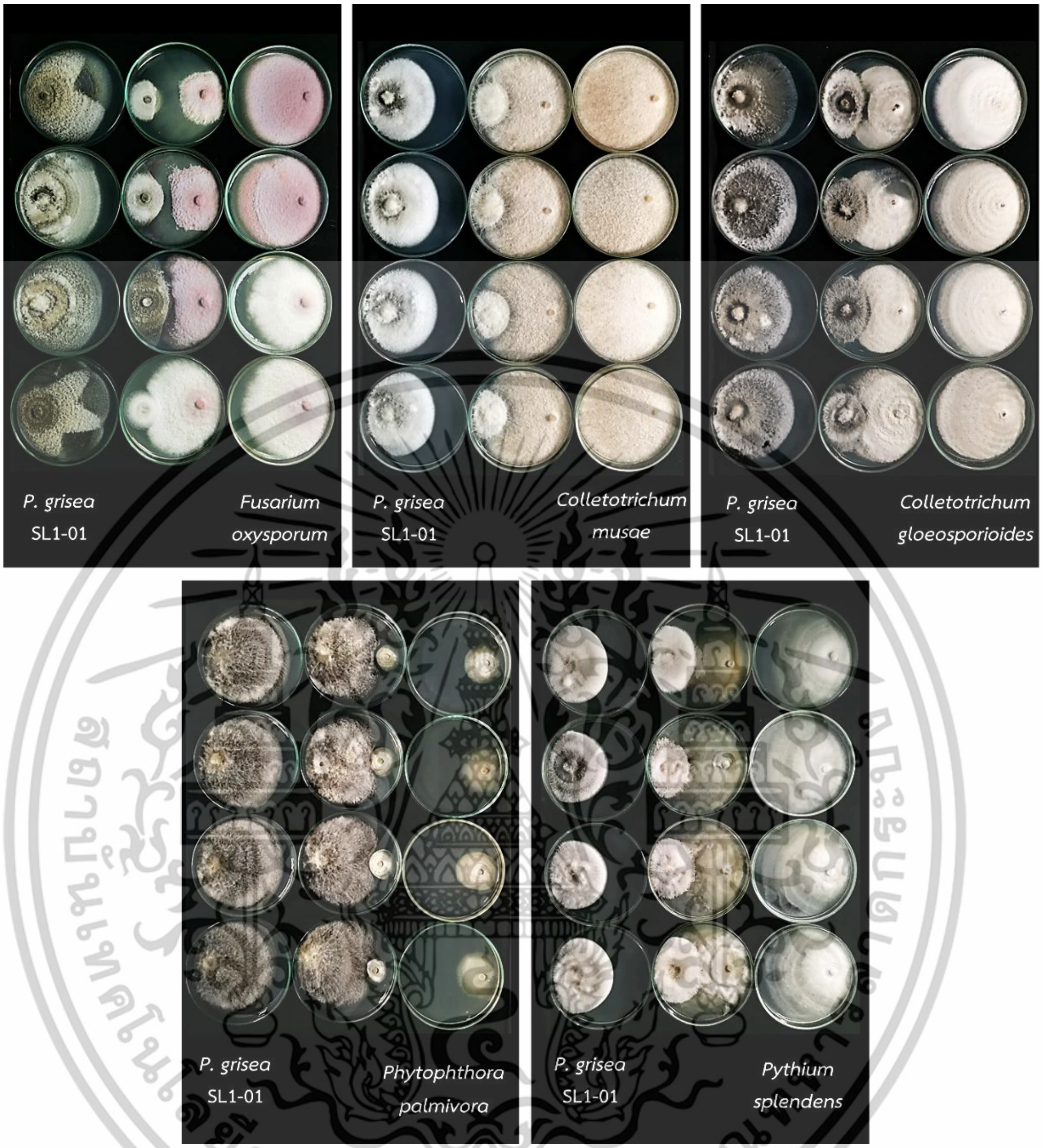
รูปที่ 4.30 การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน ระหว่าง *T. capillare* VP2-03 กับเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.31 การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน ระหว่าง *P. acaciicola* SL3-03 กับเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.32 การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน ระหว่าง *P. grisea* SL1-01 กับเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์

4.8 ผลการหมักปุ๋ยอินทรีย์

4.8.1 ผลการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อรา

เชื้อราที่คัดเลือกมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อมีด้วยกัน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. parvulum* SL2-04 เป็นตัวแทนเชื้อราผู้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส *P. acaciicola* SL3-03 เป็นตัวแทนเชื้อราผู้ผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์แลคเคส และ *T. capillare* VP2-03 เป็นตัวแทนเชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อราทั้งสามสายพันธุ์จะถูกนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อแยกกันในทั้ง 3 วิธี

ผลการพัฒนาหัวเชื้อวิธีที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้เส้นใยเชื้อราบดเป็นผง โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราให้เส้นใยเจริญเติบโตในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหาร PDB เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำเส้นใยไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดจนเป็นผงดังรูปที่ 4.33ก ผลการเจริญของเชื้อราเมื่อนำไป Spread บนอาหาร PDA โดยเจือจางผงเส้นใยเชื้อราที่ระดับความเจือจาง 10^{-6} บ่มที่อุณหูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน พบว่าไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนผิวของอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ สามารถสังเกตเห็นเส้นใยสายสั้นกระจายอยู่เต็มพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นเส้นใยจากผงหัวเชื้อแต่ไม่มีลักษณะการเจริญเติบโต เป็นไปได้ว่าอุณหภูมิสูงในการอบเส้นใย ทำให้เชื้อราไม่สามารถมีชีวิตและเจริญต่อไปได้

ผลการพัฒนาหัวเชื้อวิธีที่ 2 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้แป้งมันสำปะหรังเป็นวัสดุรองรับ โดยใช้การเลี้ยงเส้นใยเชื้อราในอาหารเช่นเดียวกับวิธีการเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้เส้นใยเชื้อราบดเป็นผง นำเส้นใยที่เจริญในอาหาร PDB ไปคลุกเคล้ากับวัสดุเก็บรักษาหัวเชื้อราจากแป้งมันสำปะหลัง บ่มที่อุณหูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดเป็นผงดังรูปที่ 4.33ข ผลการเจริญของเชื้อราเมื่อนำไป Spread บนอาหาร PDA โดยเจือจางผงเส้นใยเชื้อราที่ระดับความเจือจาง 10^{-6} บ่มที่อุณหูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน พบว่ามีการเจริญของโคโลนีเชื้อรา โดยสามารถคำนวณจำนวนโคโลนีต่อกรัมของเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 ได้เท่ากับ 2.35×10^6, 3.08×10^6 และ 8.43×10^6 โคโลนี/กรัม ตามลำดับ

ผลการพัฒนาหัวเชื้อวิธีที่ 3 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้ข้าวสุกเป็นวัสดุรองรับ โดยใช้การเลี้ยงเส้นใยเชื้อราในข้าวหุงสุก บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แต่หลังจากการอบพบว่าเชื้อราที่เจริญบนข้าวยังไม่แห้งสนิทจึงทำการอบเพิ่มเติมอีกเป็นเวลาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังการอบพบว่าเชื้อราที่เจริญบนข้าวยังคงไม่แห้งสนิท ดังรูปที่ 4.33ค อีกทั้งยังมีเชื้อชนิดอื่นเจริญปะปนขึ้นมา จึงสรุปว่าวิธีนี้ใช้เวลาอย่างมากในการอบแห้ง นอกจากนี้ยังง่ายต่อการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นในขั้นตอนการอบแห้งด้วยตู้อบ

จากผลการพัฒนาหัวเชื้อพบว่ามีเพียงวิธีที่ 2 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัสดุรองรับที่ทำให้เชื้อทั้ง *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ จึงเลือกวิธีนี้ไปใช้ในการทำหัวเชื้อโดยใช้เชื้อราเพื่อนำไปหมักเป็นปุ๋ยอินทรีย์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.33 ตัวอย่างหัวเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04 จากวิธีที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้เส้นใยเชื้อราบดเป็นผง (ก) วิธีที่ 2 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัสดุรองรับ (ข) และวิธีที่ 3 การเตรียมหัวเชื้อราโดยใช้ข้าวสุกเป็นวัสดุรองรับ (ค)

4.8.2 ผลผลิตปุ๋ยอินทรีย์

หมักปุ๋ยอินทรีย์โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เศษผัก (ผักกาด กะหล่ำ และคะน้า) เปลือกผลไม้ (กล้วย แตงโม เมล่อน อะโวคาโด้ และส้ม) แหนแดงแห้ง และมูลวัว ผสมเข้ากับหัวเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัสดุรองรับ ปุ๋ยอินทรีย์ถูกหมักโดยอัตราส่วนขององค์ประกอบที่ต่างกัน โดยปุ๋ยชุดควบคุมใส่เศษผักและเปลือกผลไม้ 500 กรัม แหนแดงแห้ง 250 กรัม มูลวัว 125 กรัม และแป้งมันสำปะหลัง 125 กรัม แต่ไม่ใส่เชื้อรา ปุ๋ย F1 ใส่เศษผักและเปลือกผลไม้ 500 กรัม แหนแดงแห้ง 250 กรัม มูลวัว 125 กรัม และหัวเชื้อรา 125 กรัม ปุ๋ย F2 ใส่เศษผักและเปลือกผลไม้ 750 กรัม มูลวัว 125 กรัม และแป้งมันสำปะหลัง 125 แต่ไม่ใส่แหนแดงแห้งและเชื้อรา และ F3 ใส่เศษผักและเปลือกผลไม้ 500 กรัม แหนแดงแห้ง 250 กรัม และหัวเชื้อรา 250 กรัม แต่ไม่ใส่มูลวัว ปุ๋ยทั้ง 4 สูตร หมักในเข่งพลาสติกโดยคลุมถุงดำ ทำการหมักปุ๋ยสูตรละ 3 ซ้ำ หลังจากผ่านการหมักเป็นเวลา 56 วัน สังเกตจากตาเปล่าพบว่าปุ๋ยมีสีน้ำตาลเข้ม โดยปุ๋ย F3 มีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ลักษณะเนื้อปุ๋ยสังเกตจากตาเปล่าจะเห็นได้ว่าปุ๋ย F1 และ F3 มีเนื้อปุ๋ยเล็กและละเอียดกว่าปุ๋ยชุดควบคุม และปุ๋ย F2 มีเนื้อปุ๋ยขนาดใหญ่และหยาบที่สุด ดังในรูปที่ 4.34

รูปที่ 4.34 ลักษณะจากการสังเกตด้วยสายตาของปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร หลังผ่านการหมักเป็นเวลา 56 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจากการย่อยสลายของส่วนประกอบต่างๆ ภายในปุ๋ยอินทรีย์ โดยเมื่อเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ย่อยสลายเศษผักและผลไม้ ซึ่งเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารอินทรีย์ให้กลายเป็นฮิวมัส (Humus) ที่มีสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลงและมีสีดำ (Ahmed และคณะ, 2023) ดังนั้นยิ่งมีการย่อยสลายของจุลินทรีย์มากปุ๋ยก็จะมีสีเข้ม เนื้อปุ๋ยมีขนาดเล็กและละเอียด จากการวิเคราะห์จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่าปุ๋ย F1 และ ปุ๋ย F3 มีการย่อยสลายจากจุลินทรีย์มากที่สุด รองลงมาเป็นปุ๋ยชุดควบคุมและปุ๋ย F2 ซึ่งปุ๋ย F1 และ F3 มีการผสมหัวเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 ลงไปด้วยจึงอาจวิเคราะห์ได้ว่าเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

4.8.3 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของปุ๋ยอินทรีย์

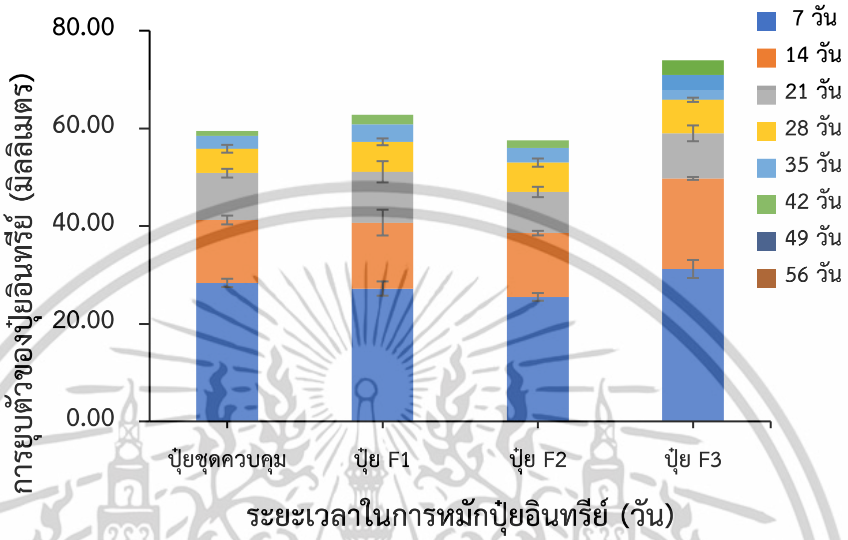
4.8.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ระหว่างการหมักปุ๋ย

ในขณะที่หมักปุ๋ยอินทรีย์ทุก 7 วัน ได้ทำการเก็บข้อมูลคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของปุ๋ย ได้แก่ ความสูงของการยุบตัว ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความชื้น ค่าการนำไฟฟ้า และเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ โดยผลการวิเคราะห์ตลอด 56 วันเป็นไปดังนี้

การยุบตัวของปุ๋ยจะเกิดขึ้นเมื่อวัสดุอินทรีย์มีปริมาตรรวมลดลงเนื่องจากเกิดการสลายตัวขององค์ประกอบเชิงโครงสร้างของสารอินทรีย์ ทำให้อนุภาคขององค์ประกอบปุ๋ยมีขนาดเล็กขึ้น มีความหนาแน่นรวมสูงขึ้น (Breitenbeck และ Schellinger, 2004) ค่าการยุบตัวของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ได้มาจากในวันแรกของการหมักปุ๋ยทำการปักยึดแท่งพลาสติกลงไปตรงกลางของกองปุ๋ยอินทรีย์ที่หมักในเข่งพลาสติก ขีดสัญลักษณ์ที่แท่งพลาสติกก่อนการคลุมถุงดำ หลังจากนั้นทุกๆ 7 วัน ทำการขีดสัญลักษณ์ที่แท่งพลาสติกเช่นเดิมจนถึงวันที่ 56 ของการหมักปุ๋ย ซึ่งค่าการยุบตัวหาได้จากค่าความสูงที่หายไปบนสัญลักษณ์ที่ขีดบนแท่งพลาสติก ผลการยุบตัวลงของปุ๋ยทั้ง 4 สูตรจะแสดงดังตารางภาคผนวก ค–7 โดยข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์การจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test ($p<0.05$) เมื่อนำผลการวิเคราะห์มาสร้างแผนภูมิแท่งเพื่อเปรียบเทียบความสูงของการยุบตัวของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ดังรูปที่ 4.35 จะสังเกตได้ว่าการยุบตัวของปุ๋ยทั้ง 4 สูตรได้หยุดลงในวันที่ 42 โดยการยุบตัวในวันที่ 7 เกิดขึ้นมากที่สุดรองลงมาคือวันที่ 14, 21, 28, 35 และ 42 เมื่อนำความสูงของการยุบตัวทั้งหมดมารวมกัน พบว่าปุ๋ย F3 มีการยุบตัวมากที่สุด โดยความสูงในการยุบตัวรวมกันได้ 73.95 ± 0.38 มิลลิเมตร รองลงมาคือปุ๋ย F1 ปุ๋ยชุดควบคุม และปุ๋ย F2 โดยแสดงการยุบตัวเท่ากับ 62.76 ± 0.75, 59.44 ± 0.65 และ 57.58 ± 0.56 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งปุ๋ย F1 และ F3 มีการผสมหัวเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 ลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

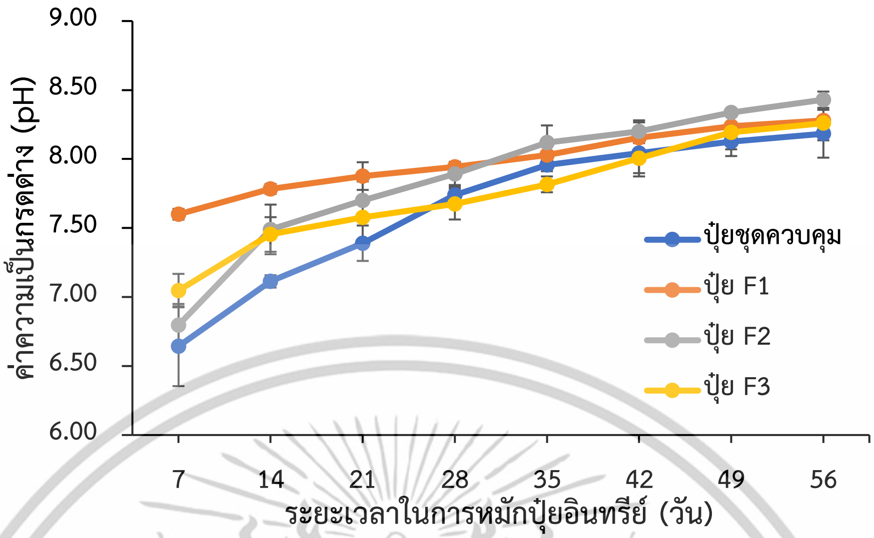
ด้วยจึงอาจวิเคราะห์ได้ว่าเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายซึ่งสอดคล้องกับผลการสังเกตสีและลักษณะเนื้อปุ๋ย



รูปที่ 4.35 กราฟแสดงระดับความสูงของการยุบตัวของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรในระยะเวลา 56 วัน โดยเก็บผลทุก 7 วัน

ค่าความเป็นกรดด่างของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร วิเคราะห์โดยการเก็บตัวอย่างปุ๋ยนำมาละลายโดยใช้น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 10 และทำการตรวจวัดค่าโดยใช้ pH meter ผลค่าความเป็นกรดด่างแสดงดังตารางภาคผนวก ค–8 โดยข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์การจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p<0.05$) เมื่อนำผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟเพื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ดังรูปที่ 4.36 จะสังเกตเห็นว่าในวันที่ 7 ของการเก็บบันทึกผล ปุ๋ยชุดควบคุมและ F2 แสดงค่าสถานะเป็นกรดอ่อน ในขณะที่ปุ๋ย F1 และ F3 แสดงค่าสถานะเป็นกลาง แต่ทั้งนี้ปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตรหลังจากผ่านการหมักเป็นเวลา 56 วัน ค่าความเป็นกรดด่างค่อยๆ สูงขึ้น โดยในวันที่ 56 ค่าความเป็นกรดด่างของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร อยู่ในช่วง 8.18 - 8.43 ซึ่งมีสถานะเป็นด่างอ่อนทั้งหมด สาเหตุที่ปุ๋ยอินทรีย์มีค่าความเป็นกรดด่างที่สูงขึ้นหลักจากการหมักนั้นเกิดจากการที่จุลินทรีย์ทำการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุปลดปล่อยแอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศจะมีฤทธิ์เป็นด่าง (Khalib และคณะ, 2020) โดยปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐานตามกำหนดราชกิจจานุเบกษาประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง กำหนดเกณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ พ.ศ. 2557 ได้กำหนดค่าความเป็นกรดด่างของปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐานที่ 5.5 - 8.5

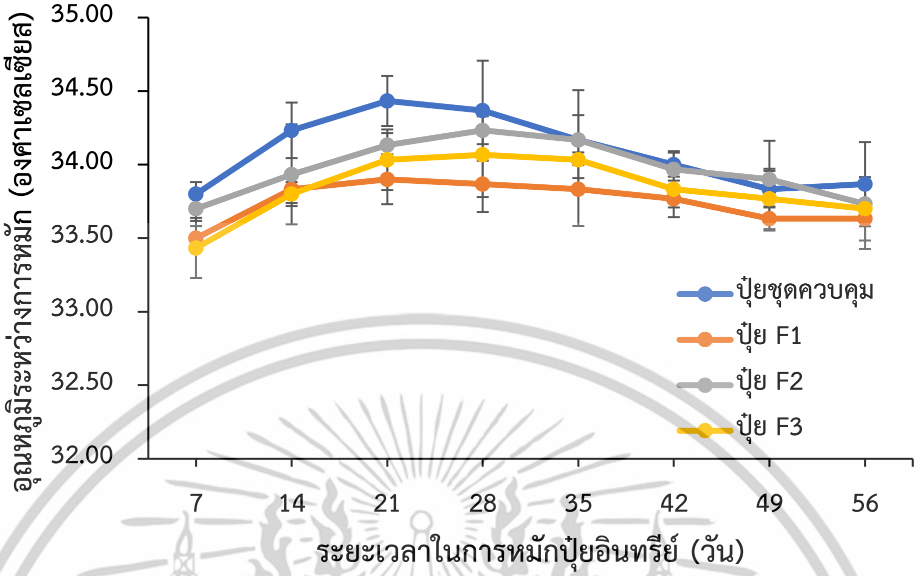
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.36 กราฟแสดงค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรในระยะเวลา 56 วัน โดยเก็บผลทุก 7 วัน

การวัดค่าอุณหภูมิระหว่างการหมักปุ๋ยทำโดยการเสียบวัด Thermometer ลงไปตรงกลางของกองปุ๋ยอินทรีย์ อุณหภูมิในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร แสดงดังตารางภาคผนวก ค-9 โดยข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์การจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p<0.05$) เมื่อนำผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟเพื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ดังรูปที่ 4.37 สังเกตได้ว่าปุ๋ยชุดควบคุมและปุ๋ย F1 มีอุณหภูมิสูงที่สุดในวันที่ 21 ของการหมักปุ๋ย ในขณะที่ ปุ๋ย F2 และปุ๋ย F3 มีอุณหภูมิสูงที่สุดในวันที่ 28 ของการหมักปุ๋ย ซึ่งช่วงอุณหภูมิที่สูงขึ้นนั้นเกิดจากการที่จุลินทรีย์ในปุ๋ยมีกิจกรรมในการย่อยสลายสารอินทรีย์ซึ่งจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาจนถึงระดับหนึ่งก่อนอุณหภูมิจะค่อยๆ ลดลง อาจมาจากกิจกรรมในการย่อยสลายสารอินทรีย์น้อยลงหรืออุณหภูมิที่สูงมากทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถมีชีวิตต่อได้ (Khalib และคณะ, 2020) แต่จากทั้งในข้อมูลที่ผ่านการจัดกลุ่มทางสถิติและข้อมูลการเปรียบเทียบที่แสดงในกราฟค่าของอุณหภูมิในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตรนั้นมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อีกทั้งยังมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิของสภาพอากาศ อาจจะเป็นเพราะปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ถูกหมักในเข่งพลาสติกซึ่งสามารถถ่ายเทอากาศและอุณหภูมิได้ดีทำให้อุณหภูมิระหว่างการหมักปุ๋ยไม่สูงจนมีผลต่อการลดลงของจุลินทรีย์

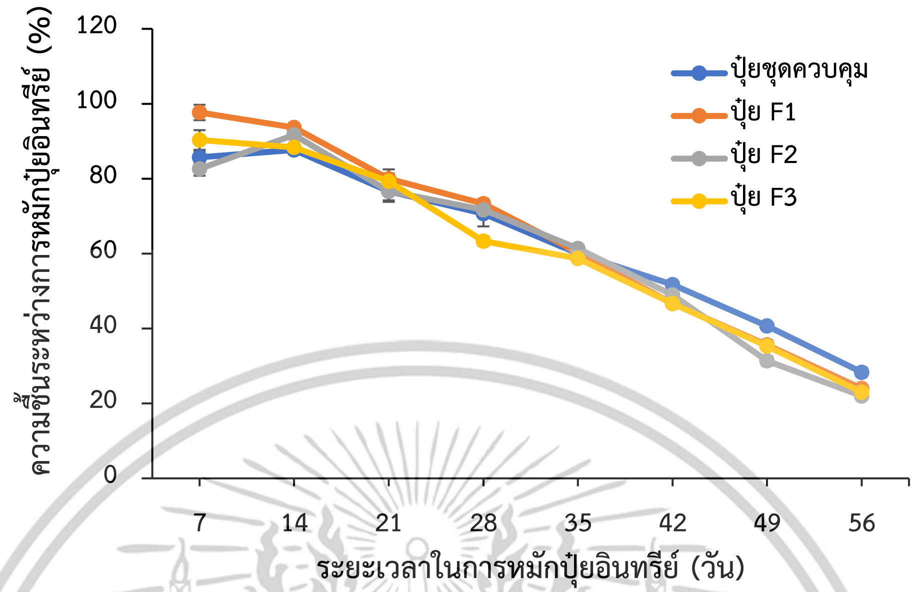
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.37 กราฟแสดงอุณหภูมิของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรในระยะเวลา 56 วัน โดยเก็บผลทุก 7 วัน

ค่าเปอร์เซ็นต์ของความชื้นในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยวัดได้จากเสียบหัววัดความชื้นของ Moisture meter ลงบริเวณตรงกลางของกองปุ๋ย โดยค่าเปอร์เซ็นต์ของความชื้นในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร แสดงดังตารางภาคผนวก ค–10 โดยข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์การจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p<0.05$) เมื่อนำผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟเพื่อเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ของความชื้นของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ดังรูปที่ 4.38 สังเกตได้ว่าปุ๋ย F1 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นมากที่สุดใน 7 วันแรก ก่อนที่ค่าเปอร์เซ็นต์ของความชื้นของปุ๋ยทั้ง 4 สูตรจะลดลงเข้าสู่ค่าที่ใกล้เคียงกันจนถึงวันที่ 56 ของการหมักปุ๋ย ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าค่าเปอร์เซ็นต์ของความชื้นของปุ๋ยทั้ง 4 สูตร มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เนื่องด้วยสภาวะการหมักและบริเวณที่ตั้งของระบบหมักมีความใกล้เคียงกัน เมื่อเวลาผ่านไปความชื้นในปุ๋ยจะระเหยออกไป จนถึงวันที่ 56 ค่าเปอร์เซ็นต์ของความชื้นจึงเหลืออยู่ในช่วง 28.33 ± 1.25 ถึง 22.00 ± 0.82 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีผลทำให้ปุ๋ยไม่มีการย่อยสลายต่อหรือมีการย่อยสลายได้ช้าลงเนื่องจากความชื้นจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการขนส่งไอออนของแร่ธาตุที่ละลายน้ำซึ่งจำเป็นต่อกิจกรรมทางสรีรวิทยาและเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยความชื้นต้องอยู่ในช่วง 40 - 60 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจะให้กิจกรรมทางสรีรวิทยาและเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ดำเนินไปได้ (Khalib และคณะ, 2020) โดยค่าความชื้นของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ยังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐานตามกำหนดราชกิจจานุเบกษาประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง กำหนดเกณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ พ.ศ. 2557 ซึ่งได้กำหนดค่าความชื้นของปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐานโดยต้องไม่เกิน 35 เปอร์เซ็นต์

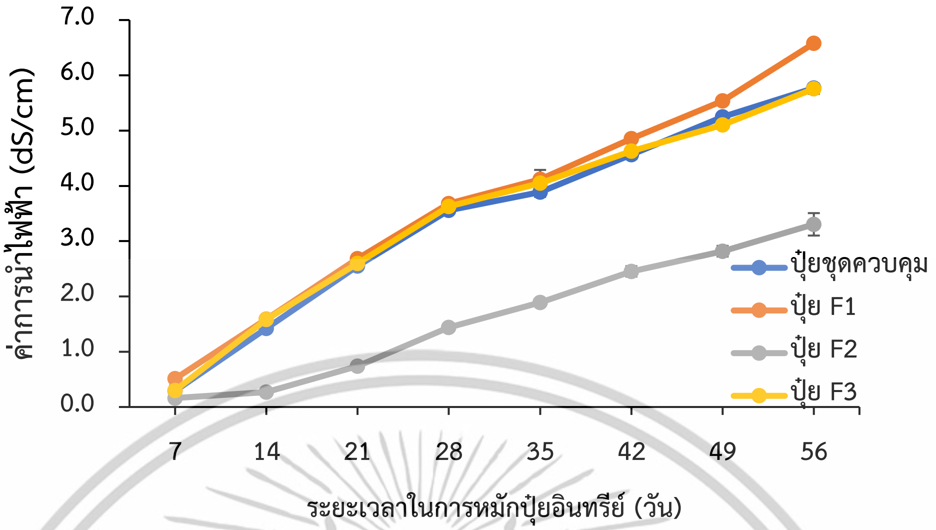
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.38 กราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรในระยะเวลา 56 วันโดยเก็บผลทุก 7 วัน

ค่าการนำไฟฟ้าของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร หาโดยการเก็บตัวอย่างปุ๋ยนำมาละลายโดยใช้น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 10 และทำการตรวจวัดค่าโดยใช้ EC meter ค่าการนำไฟฟ้าในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร แสดงดังตารางภาคผนวก ค–11 โดยข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์การจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p<0.05$) เมื่อนำผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟเพื่อเปรียบเทียบค่าการนำไฟฟ้าของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร ดังรูปที่ 4.39 สังเกตได้ว่าปุ๋ยชุดควบคุม ปุ๋ย F1 และปุ๋ย F3 มีแนวโน้มค่าการนำไฟฟ้าที่ใกล้เคียงกัน ต่างจากปุ๋ย F2 ที่มีแนวโน้มค่าการนำไฟฟ้าค่อนข้างต่ำ แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นค่าการนำไฟฟ้าของปุ๋ยทั้ง 4 สูตร มีค่าเกินมาตรฐานเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐานตามกำหนดราชกิจจานุเบกษาประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง กำหนดเกณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ พ.ศ. 2557 ที่ได้กำหนดค่าการนำไฟฟ้าของปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐานว่าต้องไม่เกิน 0.006 เดซิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร โดย Hammam และ Mohamed (2020) อธิบายว่าการที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงอาจจะสรุปได้ว่าความเข้มข้นของไอออนสูงเป็นผลทำให้ปุ๋ยมีความเค็มมากเกินไปจนทำให้เป็นอันตรายกับรากพืช ตรงกันข้ามหากเป็นมีค่าการนำไฟฟ้าที่ต่ำเกินไปนั่นเป็นไปได้ว่าแร่ธาตุและสารอาหารในปุ๋ยมีอยู่น้อยเกินไป ซึ่งค่าการนำไฟฟ้าเป็นตัวชี้วัดความเข้มข้นของไอออน เช่น ไนเตรต (NO_3^-), ฟอสเฟต (PO_4^{3-}), โพแทสเซียม (K^+), แคลเซียม (Ca^{2+}) ซึ่งจำเป็นต่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



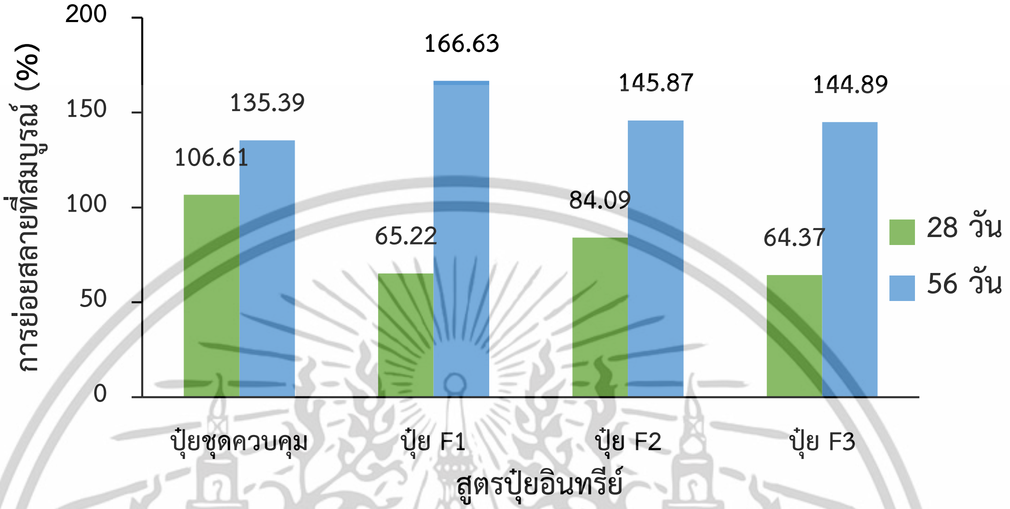
รูปที่ 4.39 กราฟแสดงค่าการนำไฟฟ้า (EC) ของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรในระยะเวลา 56 วันโดยเก็บผลทุก 7 วัน

4.8.3.2 ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์ทำได้โดยการหาดัชนีการงอกของเมล็ดพืชที่ถูกวางบนกระดาษทิชชูชุบสารละลายปุ๋ยซึ่งเก็บตัวอย่างมาในวันที่ 28 และวันที่ 56 โดยเปรียบเทียบกับค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพืชที่ถูกวางบนทิชชูที่ชุบด้วยน้ำสะอาดและคำนวณดัชนีการงอกของเมล็ดพืชออกมา ปุ๋ยที่มีการย่อยสลายที่สมบูรณ์จะต้องมีค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพืชมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมล็ดพืชสามารถงอกและเจริญเติบโตได้ จำเป็นต้องมีสภาวะที่เหมาะสม รวมถึงสารอาหารและแร่ธาตุที่เพียงพอ ซึ่งสอดคล้องกับกระบวนการย่อยสลายของปุ๋ย เมื่อการย่อยสลายสมบูรณ์จะเกิดแร่ธาตุที่สามารถละลายน้ำได้ และพืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Khalib และคณะ, 2020) ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพืชจากการย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 4 สูตร แสดงดังตารางภาคผนวก ค-12 ข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์การจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test ($p<0.05$) นำผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟเพื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพืชที่เพาะเลี้ยงด้วยปุ๋ยอินทรีย์ที่เก็บตัวอย่างในวันที่ 28 และวันที่ 56 ดังรูปที่ 4.40 จากข้อมูลจะสังเกตได้ว่าหลังจากทำการหมักปุ๋ยเป็นเวลา 28 วัน สารละลายปุ๋ย F1 และ F3 ที่นำไปเพาะเลี้ยงเมล็ดพืช แสดงดัชนีการงอกของเมล็ดพืชเท่ากับ 65.22 ± 6.90 และ 64.37 ± 7.59 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงได้ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ต่ออีกจนถึงวันที่ 56 โดยสารละลายปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร นำไปเพาะเลี้ยงเมล็ดพืช (รูปที่ 4.41) แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของปุ๋ยมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ปุ๋ย F1 และ F3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบูรณ์ของปุ๋ยสูงขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัด อีกทั้งปุ๋ย F1 แสดงค่าการย่อยสลายมากที่สุดอยู่ที่ 166.63 ± 1.87 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.40 กราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตรเปรียบเทียบระหว่างระยะเวลา 28 วัน และ 56 วัน

รูปที่ 4.41 ตัวอย่างการงอกของเมล็ดพืชที่เจริญบนกระดาษทิชชูชุบน้ำสะอาด (ก) และชุบสารละลายปุ๋ย F1 (ข) ในวันที่ 5

4.8.3.3 คุณสมบัติทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์

หลังจากหมักปุ๋ยครบ 56 วัน ทำการส่งตัวอย่างปุ๋ยไปที่กรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีสุดท้ายของปุ๋ยทั้ง 4 สูตร โดยผลการตรวจวิเคราะห์เป็นไปดังในตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบกับค่าคุณสมบัติปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐานในราชกิจจานุเบกษาประกาศกรมวิชาการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง กำหนดเกณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ พ.ศ. 2557 ผลการวิเคราะห์ระหว่างคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของปุ๋ยทั้ง 4 สูตรกับค่าคุณสมบัติปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐาน สามารถสรุปได้ว่าปุ๋ย F1 และ F3 มีค่าคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้นค่าการนำไฟฟ้า และ ค่าปริมาณฟอสฟอรัสโดยรวม ในขณะเดียวกันปุ๋ยชุดควบคุม และ ปุ๋ย F2 มีค่าคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีไม่ถูกต้องตามมาตรฐานอยู่ 4 หัวข้อ ได้แก่ ค่าการนำไฟฟ้า ค่าปริมาณไนโตรเจนโดยรวม ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน และค่าปริมาณฟอสฟอรัสโดยรวม เมื่อเปรียบเทียบค่าคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีระหว่างปุ๋ยชุดควบคุมและ F1 ที่มีการใส่เชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 ลงไปนั้น มีค่าปริมาณไนโตรเจนโดยรวม ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน ค่าความชื้นในปุ๋ย และ ค่าขนาดอนุภาคของปุ๋ยโดยเฉลี่ย อยู่ในเกณฑ์ที่ดีกว่า อาจสรุปได้ว่าเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 ทำให้ปุ๋ยมีกระบวนการตรึงไนโตรเจนมากขึ้น ส่งผลให้ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน หรือก็คือค่าความเหมาะสมของอัตราส่วนระหว่างปริมาณอินทรีย์วัตถุที่จุลินทรีย์ต้องการย่อยสลายต่อปริมาณไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ต้องใช้มีความสมดุลกันที่ไม่เกิน 20 ต่อ 1 (Khalib และคณะ, 2020) โดยหากมีค่ามากเกินไปจุลินทรีย์ก็จะทำการย่อยสลายอินทรีวัตถุได้ช้าลง และเนื่องจากค่าปริมาณไนโตรเจนโดยรวมและค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน ที่เหมาะสมทำให้จุลินทรีย์ในปุ๋ย F1 สามารถย่อยสลายอินทรีวัตถุต่อไปได้ ส่งผลให้เนื้อปุ๋ยมีขนาดเล็กและละเอียดกว่าปุ๋ยชุดควบคุม ต่อมาเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างปุ๋ย F1 และ F3 พบว่า ปุ๋ย F3 มีค่าปริมาณสารอินทรีย์ ค่าปริมาณไนโตรเจนโดยรวม และค่าปริมาณโพแทสเซียมโดยรวมดีกว่าปุ๋ย F1 เล็กน้อย อาจจะเป็นเพราะปุ๋ย F3 มีอัตราส่วนในการใส่หัวเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04 และ *P. acaciicola* SL3-03 มากกว่าปุ๋ย F1 ที่มีการใส่หัวเชื้อราผสมรวมกับมูลวัวเพื่อเป็นตัวแทนจุลินทรีย์ย่อยสลาย แต่ในทางกลับกันเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ย F1 กลับมีมากกว่าปุ๋ย F3 อาจเพราะเชื้อราจากมูลวัวและหัวเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 มีการผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ที่เกื้อหนุนคุณสมบัติการย่อยสลายให้แก่กัน สุดท้ายเมื่อเปรียบเทียบปุ๋ยชุดควบคุม และ ปุ๋ย F2 ที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 พบว่าการใส่แหนแห้งเพื่อเป็นตัวแทนของไนโตรเจนไม่ได้แสดงค่าความแตกต่างในค่าปริมาณไนโตรเจนโดยรวมของปุ๋ยทั้งสองสูตร เป็นไปได้ว่าเพราะจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในปุ๋ยชุดควบคุมและปุ๋ย F2 มีคุณสมบัติการตรึงไนโตรเจนที่ไม่ต่างกัน ทำให้ค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากัน

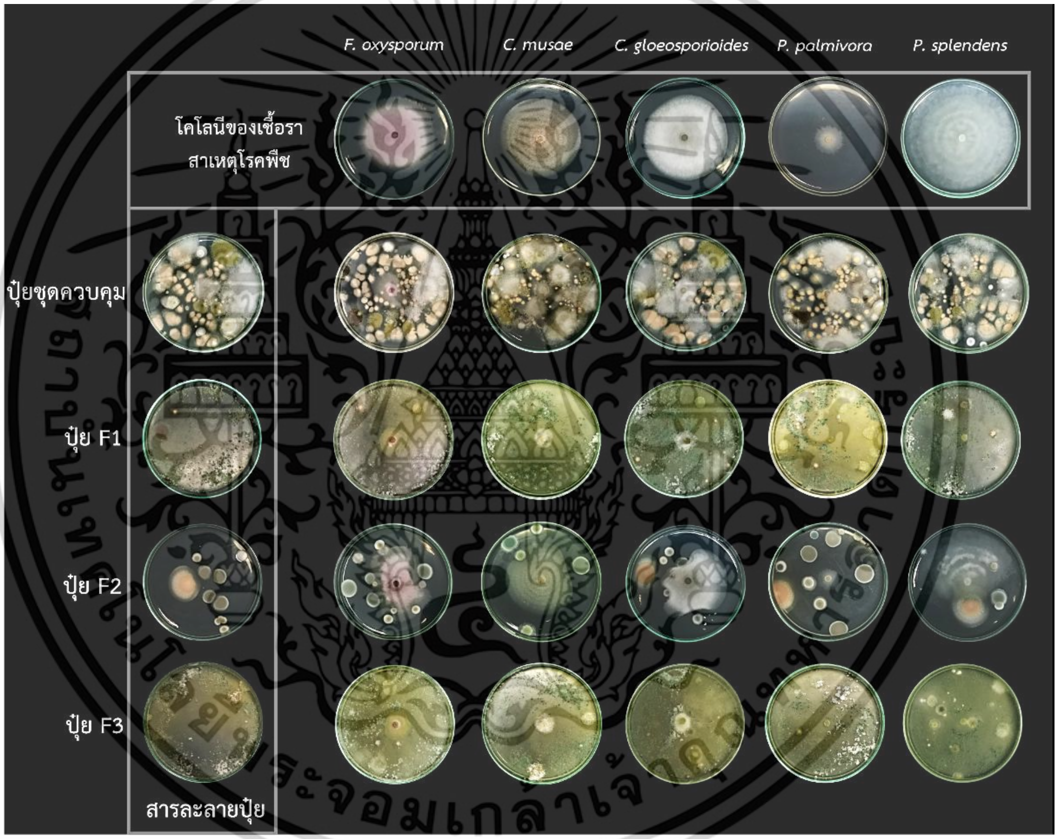
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตร เปรียบเทียบกับค่าคุณสมบัติปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐาน

รายการวิเคราะห์	ปุ๋ยชุดควบคุม	ปุ๋ย F1	ปุ๋ย F2	ปุ๋ย F3	ค่าคุณสมบัติปุ๋ยอินทรีย์มาตรฐาน
1. ค่าความเป็นกรดด่าง	8.21	8.37	8.52	8.30	5.5 - 8.5
2. ค่าการนำไฟฟ้า (เดซิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร)	6.05	7.36	3.80	6.10	ไม่เกิน 0.006 เดซิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร
3. ปริมาณสารอินทรีย์ (% w/w)	32.24	30.72	34.18	34.58	ไม่น้อยกว่า 30 % w/w
4. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (% w/w)	0.49	0.99	0.49	1.09	ไม่น้อยกว่า 1.0 % w/w
5. อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน	38.16	18.01	40.46	18.40	ไม่เกิน 20 : 1
6. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (% w/w)	0.074	0.070	0.078	0.068	ไม่น้อยกว่า 0.5 % w/w
7. ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด (% w/w)	2.03	1.63	1.65	2.98	ไม่น้อยกว่า 0.5 % w/w
8. ความชื้นในปุ๋ย (% w/w)	11.06	17.94	10.52	14.50	ไม่เกิน 35 % w/w
9. ขนาดอนุภาคของปุ๋ยโดยเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	< 1.08	< 0.78	< 1.34	< 0.74	ไม่เกิน 12.5 x 12.5 มิลลิเมตร

4.8.3.4 ผลการตรวจพิสูจน์ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำปุ๋ยชุดควบคุม ปุ๋ย F1 ปุ๋ย F2 และปุ๋ย F3 ไปเจือจางด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ค่าความเจือจางเท่ากับ 10^{-6} ทำการ Spread ลงบนอาหาร PDA ก่อนวางชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 สายพันธุ์ได้แก่ *F. oxysporum, C. musae, C. gloeosporioides, P. palmivora* และ *P. splendens* โดยทำทั้งหมด 5 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง หลังจากบ่มที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ปรากฏผลการสังเกตการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเป็นไปดังในภาพที่ 4.42 โดยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตที่วิเคราะห์ได้เป็นไปดังตารางที่ 4.8



รูปที่ 4.42 ลักษณะการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA ที่ผ่านการ Spread ด้วยปุ๋ยอินทรีย์จำนวน 4 สูตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของปุ๋ยจำนวน 4 สูตร กับเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์

สูตรปุ๋ย	การยับยั้งการเจริญเติบโต (%)				
	F. oxysporum	*C. musae*	*C. gloeosporioides*	*P. palmivora*	*P. splendens*
ปุ๋ยชุดควบคุม	$53.23^{b}\pm2.05$	$81.82^{a}\pm1.17$	$73.40^{a}\pm0.82$	$58.32^{b}\pm0.73$	$92.38^{a}\pm0.53$
ปุ๋ย F1	$68.66^{a}\pm0.56$	$82.08^{a}\pm0.54$	$73.10^{a}\pm0.77$	$64.58^{a}\pm0.63$	$92.17^{a}\pm0.25$
ปุ๋ย F2	$23.38^{c}\pm1.78$	$26.84^{b}\pm3.00$	$23.81^{b}\pm3.81$	$26.28^{c}\pm0.79$	$43.09^{b}\pm3.05$
ปุ๋ย F3	$68.48^{a}\pm0.64$	$79.44^{a}\pm0.64$	$74.81^{a}\pm0.18$	$66.27^{a}\pm0.54$	$91.07^{a}\pm0.75$

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p<0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร พบว่าปุ๋ยชุด F2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 สายพันธุ์ได้น้อยที่สุด โดยปุ๋ยชุดควบคุม ปุ๋ย F1 และปุ๋ย F3 ในการยับยั้ง *C. musae, C. gloeosporioides* และ *P. splendens* แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตที่ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การยับยั้ง *F. oxysporum* และ *P. palmivora* ปุ๋ย F1 และปุ๋ย F3 แสดงออกถึงผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่าปุ๋ยชุดควบคุม นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตได้ว่าปุ๋ย F1 และปุ๋ย F3 ที่ได้ผสมหัวเชื้อราในการศึกษานี้เพิ่มเข้าไป มีการเจริญของเส้นใยสีเหลืองเข้มถึงเขียว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อราสกุล *Trichoderma* ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อรา *T. capillare* VP2-03 ที่เป็นตัวแทนเชื้อราที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของโรคพืช ยังสามารถเจริญเติบโตได้หลักจากหมักปุ๋ยอินทรีย์ผ่านไปแล้วมากกว่า 56 วัน

4.8.4 ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

การวิเคราะห์คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส มีเป้าหมายเพื่อศึกษาลักษณะกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ในสภาวะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน โดยพบว่า *P. acaciicola* SL3-03 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษา เนื่องจากมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคสในปริมาณสูง โดยเก็บสารละลายเอนไซม์ของ *P. acaciicola* SL3-03 จากอาหาร PDB ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมา 7 วัน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีและเก็บส่วนใสเพื่อนำไปทดสอบผลกระทบของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และความเข้มข้นของ NaCl ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

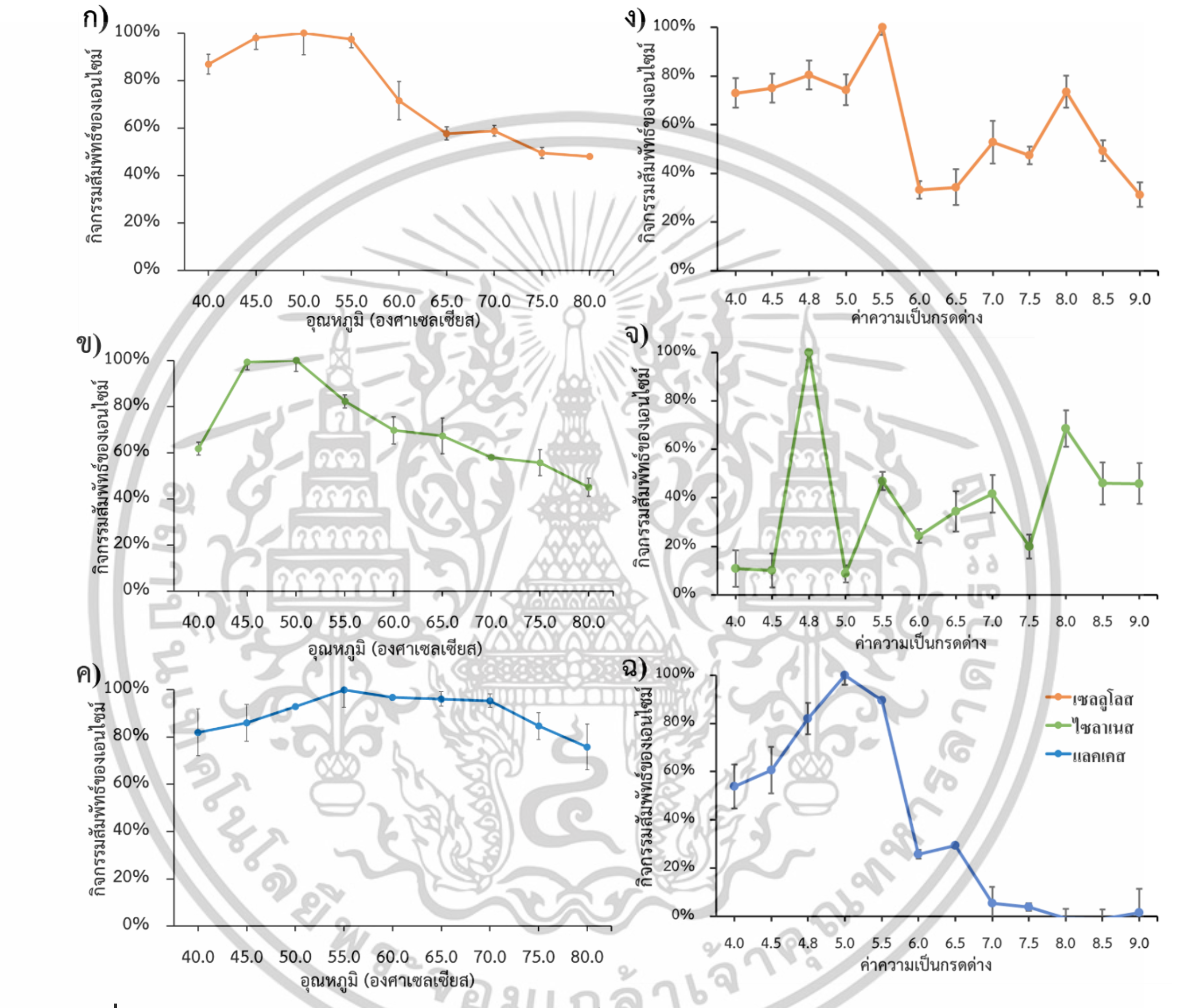
4.8.4.1 ผลกระทบของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

ผลกระทบของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อคุณลักษณะของเอนไซม์สามารถวิเคราะห์ได้โดยการกำหนดสภาวะอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันในช่วงกระบวนการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยในการศึกษานี้ใช้วิธี DNSA และ ABTS เป็นการทดสอบ ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส จาก *P. acaciicola* SL3-03 ถูกทดสอบในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 80 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.43) โดยจากการสังเกตพบว่าเซลลูเลสทำงานได้ดีในช่วง 45 - 55 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.43ก) นอกจากนี้ กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์ยังคงอยู่ที่ 48 เปอร์เซ็นต์ ที่ 80 องซาเซลเซียส คล้ายคลึงกับผลลัพธ์ของกิจกรรมไซลาเนสซึ่งแสดงเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และยังสามารถทำงานได้จนถึง 45 เปอร์เซ็นต์ที่ 80 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.43ข) ในส่วนของแลคเคสในการศึกษานี้พบว่ายังคงทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส และยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์ 76 เปอร์เซ็นต์ ที่ 80 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.43ค) ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าเซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส จาก *P. acaciicola* SL3-03 เป็นเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง (Thermophilic enzymes) และสามารถมีกิจกรรมของเอนไซม์ได้ที่สภาวะอุณหภูมิสูง

ต่อมาในการหาผลกระทบของค่าความเป็นกรดด่างต่อคุณลักษณะของเอนไซม์ สภาวะอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ถูกกำหนดโดยใช้อุณหภูมิที่ดีที่สุดที่ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดจากการทดลองผลกระทบของอุณภูมิ โดยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสกำหนดอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส และการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสกำหนดอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส โดยทดสอบผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 4 ถึง 9 ผลการทดสอบพบว่าเซลลูเลสมีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 (กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์) และที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 (กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 73 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังพบจุดยอดของกราฟที่มีขนาดเล็กกว่าในค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 และ 7 (รูปที่ 4.43ง) คล้ายคลึงกันกับผลกิจกรรมของไซลาเนสที่แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 (กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์) และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 (กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 69 เปอร์เซ็นต์) และยังพบจุดยอดของกราฟที่มีขนาดเล็กกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 และ 7 (รูปที่ 4.43จ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างสารละลายเอนไซม์จาก *P. acaciicola* SL3-03 อาจมีเซลลูเลสและไซลาเนสอย่างน้อย 4 ชนิด ที่ทำงานในช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน ในทางตรงกันข้ามแลคเคสของ *P. acaciicola* SL3-03 ทำงานได้ดีที่สุดในสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอ่อน โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 (กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 4.43ฉ) และพบจุดยอดของกราฟที่มีขนาดเล็กกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในเอนไซม์ของ *P. acaciicola* SL3-03 อาจมีแลคเคสมากกว่า 2 ชนิด



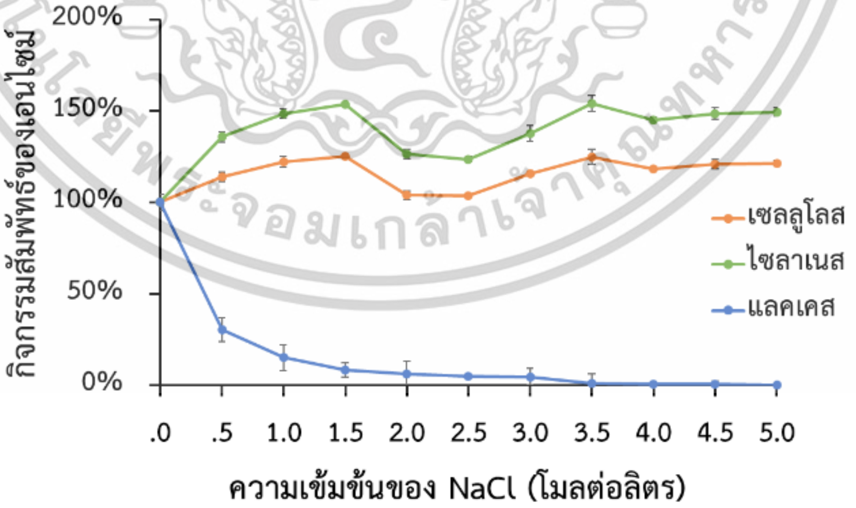
รูปที่ 4.43 ผลกระทบของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส (ก, ง) ไซลาเนส (ข, จ) และแลคเคส (ค, ฉ) ที่ผลิตโดย *P. acaciicola* SL3-03

4.8.4.2 ผลกระทบของความเข้มข้นของ NaCl ต่อคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

ต่อมาในการหาผลกระทบของความเข้มข้นของ NaCl ต่อคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส สภาวะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ถูกกำหนดโดยใช้อุณหภูมิค่าความเป็นกรดด่างที่ดีที่สุดที่ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลาเนส ใช้อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 และการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส ใช้อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 โดยทดสอบผลกระทบของความเข้มข้นของ NaCl ต่อคุณลักษณะของเอนไซม์ในช่วงความเข้มข้นของ NaCl ที่ 0 ถึง 5 M (รูปที่ 4.44) ผลการทดสอบพบว่าเซลลูเลสและไซลาเนส จาก *P. acaciicola* SL3-03 ถูกกระตุ้นโดย NaCl ทำให้มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่สูงมากกว่าสภาวะที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0 M และที่ความเข้มข้น 1.5 และ 3.5 M ส่งผลให้เซลลูเลสและไซลาเนสมีกิจกรรมสูงที่สุด โดยกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นถึง 125 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของไซลาเนสเพิ่มขึ้นถึง 154 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ พบว่าเซลลูเลสและไซลาเนสแสดงจุดยอดของกราฟสองจุด ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่าเซลลูเลสและไซลาเนสมีมากกว่าหนึ่งชนิดในการทดสอบผลกระทบของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง นอกจากนี้เซลลูเลสและไซลาเนสยังสามารถรักษากิจกรรมไว้ได้ถึง 121 และ 149 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 5 M ซึ่งสรุปได้ว่าเซลลูเลสและไซลาเนสจาก *P. acaciicola* SL3-03 เป็น เอนไซม์ที่ทนความเค็ม (Halotolerant enzymes) และสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มี NaCl สูง ในทางตรงกันข้ามแลคเคสจาก *P. acaciicola* SL3-03 มีค่ากิจกรรมลดลงอย่างมาก เมื่อเติม NaCl โดยพบว่ากิจกรรมของ laccase ลดลง 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.5 M และหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 3.5 M



รูปที่ 4.34 ผลกระทบของความเข้มข้นของ NaCl ต่อคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ที่ผลิตโดย *P. acaciicola* SL3-03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการวิเคราะห์คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ที่ได้จากเชื้อรา *P. acaciicola* SL3-03 สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 1.5 และ 3.5 M และยังคงรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ดีในสภาวะความเข้มข้นของ NaCl สูง (สามารถแสดงกิจกรรมได้ถึง 149% ที่ความเข้มข้น NaCl 5 M) สำหรับค่าความเป็นกรดด่าง เซลลูเลสเกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 และไซลาเนสเกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 ในขณะที่เอนไซม์แลคเคสเกิดกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่สภาวะอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 และหยุดการเกิดกิจกรรมเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 3.5 M ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส จาก *P. acaciicola* SL3-03 มีศักยภาพโดยสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่ดำเนินงานภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงและความเค็มสูง เช่น การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ การซักล้าง อุตสาหกรรมสิ่งทอ การฟอกหนัง การแปรรูปอาหารและการผลิตอาหารสัตว์ (Patel และ Saraf, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ตัวอย่างดินจาก 6 จังหวัด 7 สถานที่ โดยเก็บสถานที่ละ 6 ตัวอย่าง รวมเป็นตัวอย่างดิน 42 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกเชื้อราโดยเพาะเลี้ยงบน Corn Meal agar ที่มี 3 % เกลือทะเล ได้เชื้อราทั้งหมด 64 ไอโซเลต ต่อมาเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารวุ้นซึ่งมีส่วนผสมของผงผักกาดบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส คัดเลือกเชื้อราที่มีการเจริญของเส้นใยบนอาหารได้ 48 ไอโซเลต นำเชื้อราไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร CMC agar, Xylan agar และ 1 – naphthol agar เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่ให้ค่าดัชนีเอนไซม์ของเซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคสที่ดี คัดเลือกเหลือเชื้อราจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ SL1-01, SL2-01, SL2-02, SL2-04, SL3-03, SL3-04, VP2-03, VP3-02, VP5-02 และ PT2-04 นำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อรา โดยในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอได้ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ระบุสายพันธุ์เชื้อราได้เป็น *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *H. rhizophorae* VP3-02 และใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5/ITS4 ระบุสายพันธุ์เชื้อราได้เป็น *P. grisea* SL1-01, *C. fusarioides* SL2-01, *R. punctatum* SL2-02, *Leptosphaerulina* sp. SL3-04, *T. capillare* VP2-03, *Hypocreales* sp. VP5-02 และ *S. Terricola* PT2-04 ต่อมานำเชื้อราทั้ง 10 สายพันธุ์ ไปทดสอบการวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส โดยใช้วิธี DNSA และ ABTS เก็บผลในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 ของการเพาะเลี้ยง ผลลัพธ์ที่ได้คือ *A. parvulum* SL2-04 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสมากที่สุดในวันที่ 7 และในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส *P. acaciicola* SL3-03 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงที่สุดในวันที่ 21 ดังนั้น *A. parvulum* SL2-04 และ *P. acaciicola* SL3-03 จึงถูกเลือกเป็นตัวแทนในฐานะเชื้อราผู้ผลิตเอนไซม์ ต่อมาการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 10 สายพันธุ์ ลงบนอาหาร Pikovskaya agar และ Alekandrov agar โดยมี *A. niger* ทำหน้าที่เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อราทั้ง 10 สายพันธุ์ ไม่มีการสร้างกรดอินทรีย์ที่ทำหน้าที่สลายโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำของฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม จานนั้นนำเชื้อรา 10 สายพันธุ์ ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. oxysporum, C. musae, C. gloeosporioides, P. palmivora* และ *P. splendens* พบว่าเชื้อรา *T. capillare* VP2-03 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตในแนวรัศมีที่มากที่สุด ดังนั้น *T. capillare* VP2-03 จึงถูกเลือกให้เป็นตัวแทนของเชื้อราที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช นำเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 ไปทดสอบวิธีการทำหัวเชื้อราและการเปรียบเทียบวัสดุรองรับหัวเชื้อราเริ่มต้นโดยเปรียบเทียบการทำหัวเชื้อรา 3 วิธี คือ วิธีที่ 1 ใช้ผงเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อบแห้ง วิธีที่ 2 ใช้เส้นใยเชื้อราคลุกกับวัสดุรองรับหัวเชื้อราจากแป้งมันสำปะหลัง และวิธีที่ 3 ใช้เส้นใยเชื้อราคลุกกับวัสดุรองรับหัวเชื้อราจากข้าวหุงสุก ปรากฏว่าวิธีที่ 2 ให้ผลการเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อราได้ดีที่สุด หลังจากนั้นหัวเชื้อราที่ได้ถูกนำไปทำการหมักกับปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตรได้แก่ ปุ๋ยชุดควบคุม ปุ๋ย F1 ปุ๋ย F2 และปุ๋ย F3 เป็นเวลา 56 วัน โดยทุกๆ 7 วันได้ทำการเก็บผลการยุบตัวของปุ๋ย ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ เปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าการนำไฟฟ้า และในวันที่ 28 และ 56 ได้ทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์โดยพิจารณาจากอัตราการงอกของเมล็ดพืช จากผลลัพธ์ที่ได้แสดงให้เห็นว่าปุ๋ย F3 แสดงค่าการยุบตัวมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์ความชื้นของปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตรไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ต่อมาค่าการนำไฟฟ้าพบว่าปุ๋ย F2 มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำที่สุด และการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยโดยวันที่ 28 พบว่าปุ๋ย F1 และปุ๋ย F3 ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไม่ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปให้ทำการหมักปุ๋ยต่ออีกจนถึงวันที่ 56 ซึ่งผลลัพธ์ต่อมาปรากฏว่าปุ๋ย F1 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์มากที่สุด หลังจากหมักปุ๋ยเสร็จสิ้น ส่งตัวอย่างปุ๋ยไปตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและองค์ประกอบ ผลการวิเคราะห์ที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์พบว่าปุ๋ย F1 และปุ๋ย F3 มีคุณสมบัติทางเคมีและองค์ประกอบดีที่สุดตามมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช 5 สายพันธุ์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของปุ๋ยชุดควบคุม ปุ๋ย F1 และปุ๋ย F3 ให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นทำการศึกษาการวิเคราะห์คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคสเพิ่มเติม โดยใช้ตัวอย่างสารละลายเอนไซม์จาก *P. acaciicola* SL3-03 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีการสร้างกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคสสูง โดยผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสคือ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 สภาวะที่ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสคือ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 อีกทั้งค่าความเข้มข้นของ NaCl ที่ 1.5 และ 3.5 M ยังช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสให้เพิ่มมากขึ้น ในขณะเดียวกันสภาวะที่ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสคือที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 และหยุดกิจกรรมเอนไซม์เมื่อค่าความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 3.5 M

จะเห็นได้ว่าปุ๋ย F1 และปุ๋ย F3 มีผลการวิเคราะห์ที่โดดเด่น จึงเป็นไปได้ว่าในอนาคตอาจนำเชื้อรา *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 ไปพัฒนาในส่วนขององค์ประกอบปุ๋ยได้ต่อ อีกทั้งเชื้อราเหล่านี้อาจจะถูกประยุกต์ไปทำประโยชน์ในด้านเอนไซม์ หรือความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชในงานอื่นๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนพบว่าเชื้อราไอโซเลต *A. parvulum* SL2-04, *P. acaciicola* SL3-03 และ *T. capillare* VP2-03 มีความสามารถทั้งในด้านการผลิตเอนไซม์และในด้านยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช ในอนาคตอาจนำเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตไปประยุกต์ใช้ต่อยอด ยกตัวอย่างเช่น การควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อชักนำให้ได้ผลผลิตเอนไซม์ปริมาณมาก การศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก 5 สายพันธุ์ในการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังมีเชื้อราไอโซเลต *Leptosphaerulina* sp. SL3-04 และ *Hypocreales* sp. VP5-02 ที่ยังไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้ ในอนาคตอาจจะปรับเปลี่ยนบริเวณยีนที่ศึกษาในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อยืนยันสายพันธุ์ที่ถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม. 2562. ข้อเสนอ BCG in Action: The New Sustainable Growth Engine โมเดลเศรษฐกิจสู่การพัฒนาที่ยั่งยืน. กรุงเทพมหานคร : กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม.

ปริญญา จันทรศรี, ประทุมพร ยิ่งธงชัย และ ธิดา ศรีป่วน. 2550. โครงการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี “การผลิตปุ๋ยหมักชีวภาพจากวัสดุอินทรีย์เหลือให้ทางการเกษตร”. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วีณา นิลวงศ์. 2563. อิทธิพลของปุ๋ยอินทรีย์ชนิดต่างๆ และน้ำหมักชีวภาพต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติดินและผลผลิตของพืชผัก. Khon Kaen Agriculture Journal. 48 (3): 639-650.

Adibe, O., Ebah, E.E., Ado, B.V., Osuagwu S.O., and Fadayomic, V.K. 2022. Microbial activity of phosphate solubilizing organisms isolated from rhizosphere soil on the growth of sorghum plant (*Bicolor sorghum*). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 11(7): 222-236.

Agustini, L., Efiyanti, L., Faulina, S.A. and Santoso, E. 2012. Isolation and characterization of cellulase- and xylanase- producing microbes isolated from tropical forests in Java and Sumatra. International Journal of Environment and Bioenergy. 3(3): 154-167.

Ahmed, R.S., Jalal, S.Y., Ismael, H.M. and Shekha, Y.A. 2023. Chemical and Biological properties of compost produced from house solid waste. Zanco Journal of Pure and Applied Sciences. 35(3): 153-158.

Aishwarya, S., Viswanath, H.S., Singh A. and Singh, R. 2020. Biosolubilization of different nutrients by *Trichoderma* spp. and their mechanisms involved: A review. International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology. 7(6): 34-39.

Al-Sa'di, A.M., Deadman, M.L., Al-Said, F.A., Khan, I., Al-Azri, M., Drenth, A. and Aitken, E.A.B. 2008. First report of *Pythium* splendens associated with severe wilt of muskmelon (*Cucumis melo*) in Oman. Plant Disease. 92(2): 3-13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ameen, F. and Al-Homaidan, A.A. 2021. Compost inoculated with fungi from a mangrove habitat improved the growth and disease defense of vegetable plants. Sustainability. 12(124): 1-13.

Amraoui, B.E., Biard, J.F., Ikbal, F.E.Z., Wahidi, M.E., Kandil, M., Amraoui, M.E. and Fassouane, A. 2015. Activity of haliscosamine against *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis: in vitro and in vivo analysis. Springer Plus. 4(16): 1-15.

Arias, R.M., Abarca, G.H., Rojas, Y.D.C.P., Elizondo, Y.C. and Guzman, K.Y.G. 2023. selection and characterization of phosphate-solubilizing fungi and their effects on coffee plantations. Plants. 12(19): 3395.

Ashrafi-Saiedlou., S., Rasouli-Sadaghiani., M., Samadi, A., Barin, M. and Sepehr, E. 2024. *Aspergillus niger* as an eco-friendly agent for potassium release from K- bearing minerals: Isolation, screening and culture medium optimization using Plackett-Burman design and response surface methodology. Heliyon. 10(7): e29117.

Aziz, T., Sabir, M., Farooq, M., Maqsood, M. A., Ahmad, H. R. and Warraich, E. A. 2014. "Phosphorus deficiency in plants: responses, adaptive mechanisms, and signaling." 133-148. In Hakeem, K.R., Rehman, R.U. and Tahir, I. plant signaling understanding the molecular crosstalk. New Delhi: Springer.

Basiriya, R., Anuswedha, A. and Kalaiselvam, m. 2017. Isolation, identification and characterisation of mangrove rhizosphere soil fungi. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 8(3): 993-999.

Bassanini, I., Ferrandi, E.E., Riva, S. and Monti, D. 2021. Biocatalysis with laccases: An updated overview. Catalysts. 11(26)

Batzer, J.C., Mayfield, D.A., Braun, U. and Harrington, T.C. 2014. Four new species of sooty blotch and flyspeck fungi from apple. Mycologia. 106(5): 850-865.

Behera, S. and Gupta, N. (2019). Optimized culture conditions for enhanced recovery of exopolysaccharide from *Pseudolagarobasidium acaciicola*: A novel fungus isolated from the fruit body of *Russula nigricans*, a wild edible mushroom of odisha, India. Current Science. 116: 1397-1406.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Binagwa, P.H., Bonsi, C.K. Msolla, S.N. and Ritte, I.I. 2016. Morphological and molecular identification of *Pythium* spp. isolated from common beans (*Phaseolus vulgaris*) infected with root rot disease. African Journal of Plant Science. 10(1): 1-9.

Bovio, E., Garzoli, S., Poli, A., Prigione, V. and Varese, G.C. 2018. The culturable mycobiota associated with three Atlantic sponges, including two new species: *Thelebolus balaustiformis* and *T. spongiae*. Fungal Systematics and Evolution, 1(1): 23-38.

Breitenbeck, G.A. and Schellinger D. 2004. Calculating the reduction in material mass and volume during composting. Compost Science & Utilization. 12(4): 365–371.

Chamekh, R., Deniel, F., Donot, C., Jany, J.L., Nodet, P. and Belabid, L. 2019. Isolation, identification and enzymatic activity of halotolerant and halophilic fungi from the Great Sebkha of Oran in Northwestern of Algeria. Mycobiology. 47(2): 230-241.

Chukwuma, O.B., Rafatullah, M., Tajarudin, H.A. and Ismail, N. 2020. Lignocellulolytic enzymes in biotechnological and industrial Processes: a review. Sustainability. 12(8): 1-31.

Corwin, D.L. and Yemoto, K. 2017. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. Methods of Soil Analysis. 2: 1-16.

Damrongrak, I., Damrongrak, P. and Pangsuban, S. 2015. Soil properties, plant nutrient status in rubber leaf and Its growth in abandoned paddy field. Songklanakarin Journal of Plant Science. 2(3): 17-22.

Dayarathne, M.C., Jones, E.B.G, Maharachchikumbura, S.S.N., Devadatha, B., Sarma, VV., Khongphinitbunjong, K., Chomnunti, P. and Hyde, K.D. 2020. Morpho-molecular characterization of microfungi associated with marine based habitats. Mycosphere. 11(1), 1–188.

Dias, A.A., Matos, A.J.S., Fraga, I., Sampaio, A. and Bezerra, R.M.F. 2017. An easy method for screening and detection of laccase activity. The Open Biotechnology Journal. 11: 89-93.

Doilom, M., Guo, J.W., Phookamsak, R., Mortimer, P.E., Karunarathna, S.C., Dong, W., Liao, C.F., Yan, K., Pem, D., Suwannarach, N., Promputtha, I., Lumyong, S. and Xu, J.C.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2020. Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: Four novel species in *Aspergillus, Gongronella, Penicillium*, and *Talaromyces*. Frontiers in Microbiology. 11:585215.

Duravetz, S. and Morgan-Jones, J.F. 1971. Ascocarp development in *Rhytisma acerinum* and *R. punctatum*. *Canadian Journal of Botany*. **49**(8): 1267-1272.

Ebrahimi, L. and Fotouhifar, K.B. 2016. First report of *Cyphellophora fusarioides* (Chaetothyriales) on a plant host. Sydowia. 68: 131–137.

Elfiati, D., Delvian, Hanum, H., Susilowati, A. and Rachmat, H.H. 2021. Potential of phosphate solubilizing fungi isolated from peat soils as inoculant biofertilizer. Biodiversitas. 22(6): 3042-3048.

Elias, F. , Woyessa, D. and Muleta, D. 2016. Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma zone, Southwest Ethiopia. International Journal of Microbiology. 1-11.

Ezekwe, N., King, M. and Hollinger, JC. 2020 The use of natural ingredients in the treatment of alopecias with an emphasis on central centrifugal *Cicatricial Alopecia*: A systematic review. Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology. 13(8): 23-27.

Fu, C.H., Chen, C.M. and Hsieh, H.J. 2005. First Report of formosan michelia seedling root rot caused by *Pythium splendens* in Taiwan. Plant Disease. 89(12): 1361-1361.

Geroche, J.N., Macaya, R.D. and Seprado, J.L. 2024. Utilization of biological control agents against *Phytophthora palmivora* causing pod rot disease in cacao. TWIST. 19(1): 431-438.

Ghoniem, A.A., El-Hai, K.M.A., El-khateeb, A.Y., Eldadamony, N.M., Mahmoud S.F. and Elsayed, A. 2021. Enhancing the potentiality of *Trichoderma harzianum* against *Pythium* pathogen of beans using chamomile (*Matricaria chamomilla*, L.) Flower Extract. Molecules. 26: 1178.

Giraldo, A., Gené, J., Sutton, D.A., Madrid, H., de Hoog, G.S., Cano, J., Decock, C., Crous, P.W. and Guarro, J. 2015. Phylogeny of *Sarocladium* (*Hypocreales*). Persoonia. 34: 10 - 24.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Goh, J., Nam, B., Lee, J.S., Mun, H.Y., Oh, Y., Lee, H.B., Chung, N. and Choi, Y.J. 2018. First report of six *Trichoderma* species isolated from freshwater environment in Korea. The Korean Journal of Mycology. 46(3): 213-225.

Grimmett, I.J. Smith, K.A. and Bärlocher, F. 2012. Tar-spot infection delays fungal colonization and decomposition of maple leaves. Freshwater Science. 31(4): 1088–1095

Guo, Y., Sakalidis, M.L., Torres-Londono, G.A. and Hausbeck, M.K. 2021. Population structure of a worldwide *Phytophthora palmivora* collection suggests lack of host specificity and reduced genetic diversity in South America and the Caribbean. Plant Disease. 105(12): 4031-4041.

Hammam, A.A and Mohamed, E.S. 2020. Mapping soil salinity in the East Nile Delta using several methodological approaches of salinity assessment. The Egyptian Journal of Remote Sensing and Space Sciences. 23: 125–131.

Hamzah, T.N.T., Lee, S.Y., Hidayat, A., Terhem, R., Hanum, I.F. and Mohamed, R. 2018. Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, *Rhizophora mucronata*, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, *Fusarium solani*. Frontiers in Microbiology. 9: 1-17.

Han, M.L., Bian, L.S., Zhang, Y.X., Zhu, M.C. and An, Q. 2021. *Pseudolagarobasidium baiyunshanense* sp. nov. from China inferred from morphological and sequence analyses. Phytotaxa 483 (2): 169–176.

Hashimoto, A., Matsumura, M., Hirayama, K. and Tanaka, K. 2017. Revision of *Lophiotremataceae* (*Pleosporales, Dothideomycetes*): *Aquasubmersaceae*, *Cryptocoryneaceae,* and *Hermatomycetaceae* fam. nov. Persoonia 39: 51–73.

Hassan, O., Jeon, J.Y., Chang, T., Shin, J.S., Oh, N.K. and Lee, Y.S. 2018. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with *Persimmon Anthracnose* in South Korea. Plant disease. 102(5): 1015-1024.

Huo, H., Huangfu, J., Song, P., Zhang, D., Shi, Z., Zhao, L., Li, Z. and Zhou, H. 2024. Isolation, Identification and Characterization of *Leptosphaerulina trifolii*, the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Causative Agent of Alfalfa *Leptosphaerulina* Leaf Spot in Inner Mongolia. China. *Agronomy*. *14*(6): 1156.

Jackson, E., Li, J., Weerasinghe, T. and Li, X. 2024. The ubiquitous wilt-inducing pathogen *Fusarium oxysporum*—A review of genes studied with mutant analysis. Pathogens. 13: 8-23

Jayasiri, S.C., Jones, E.B.G., Kang, J.C., Promputtha, I., Bahkali, A.H. and Hyde, K.D. 2016. A new species of genus *Anteaglonium* (*Anteagloniaceae, Pleosporales*) with its asexual morph. Phytotaxa. 263(3): 233–244.

Jia, S.L., Chia, Z., Liua, G.L., Huc, Z., and Chia, Z.M. 2020. Fungi in mangrove ecosystems and their potential applications. Critical Reviews in Biotechnology. 40(6): 852-864.

Kamande, S.M., Omwenga, G.I. and Ngugi, M.P. 2024. Production of cellulases by *Xylaria* sp. and *Nemania* sp. using lignocellulose substrates for bioethanol production from maize cobs. Heliyon 10: e36802.

Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. and Gulati, A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Current Microbiology. 57: 503-507.

Kee, Y.Ji., Zakaria, L., and Mohd, M.H. 2020. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* species from Sansevieria trifasciata in Malaysia. Plant Pathology. 69: 442–454.

Khalib, S.N.B., Zakarya, I.A. and Izhar, T.N.T. 2020. The Effect of Low Initial C:N Ratio during Composting of Rice Straw Ash with Food Waste in Evaluating the Compost Quality. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 476: 012144.

Khan, S.A., Akbar, A., Permpornsakul, P., Yanwisetpakdee, B., Chen, X., Anwar, M. and Ali, I. 2020. Molecular diversity of halophilic fungi isolated from mangroves ecosystem of Miani Hor, Balochistan, Pakistan. Pakistan Journal of Botany. 52(5): 1-7.

Khodadadi, F., González, J.B., Martin, P.L., Giroux, E., Bilodeau, G.J., Peter, K.A., Doyle, V.P. and Aćimović, S.G. 2020. Identifcation and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in New York and description of *C. noveboracense* sp. nov. Scientific Repot. 10:11043.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khuna, S., Suwannarach, N., Kumla, J., Frisvad, J.C., Matsui, K., Nuangmek, W. and Lumyong, S. 2021. Growth enhancement of arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) and onion (*Allium cepa*) with inoculation of three newly identified mineral-solubilizing fungi in the Genus *Aspergillus* section Nigri. Frontiers in Microbiology. 12:705896.

Lee, S.J., Kang, H.B., Kim, S.H., Jeong, W.S., Kim, S.Y. and Yeo, S.H. 2023. Solid fungi starters using *Aspergillus* spp. under different manufacturing conditions. Fermentation. 9: 487.

Li, H.Y., Sun, G.Y., Zhai, X.R., Batzer, J.C., Mayfield, D.A., Crous, P.W., Groenewald, J.Z. and Gleason, M.L. 2012. Dissoconiaceae associated with sooty blotch and flyspeck on fruits in China and the United States. Persoonia. 28: 113–125.

Li, X., Wu Y. and Liu, Z. 2021. Antifungal Activity of an Endophytic Fungus *Aspergillus versicolor* DYSJ3 from *Aphanamixis grandifolia* Blume against *Colletotrichum musae*, Mycobiology, 49(5): 498-506.

Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., Hu, Y., Wang, S. and Hu, S. 2016. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. Scientific Repots. 6:25313.

Liu, R., Chen, M.,Gao, J., Luo, M. and Wang, G. 2023. Identification of antagonistic fungi and their antifungal activities against aconite root rot pathogens. plant signaling and behavior. VOL. 18(1): e2211852.

Lone, M.A., Wani, M.R., Sheikh, S.A., Sahay, S. and Dar, M.S. 2012. Antagonistic potentiality of *Trichoderma harzianum* against *Cladosporium spherospermum, Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum.* Journal of Biology, Agriculture and Healthcare. 2(8): 72-76.

Luong, T.T.H., Poeaim, S. and Tangthirasunun, N. (2023) Isolation and characterization of xylanase from a novel strain, *Penicillium menonorum* SP10. Mycobiology. 51(4):239-245.

Luong, T.T.H., Silar., P., Poeaim, S. and Tangthirasunun, N. 2025. Isolation, screening wood rot fungi from the tropical forest of Thailand and their lignocellulolytic enzyme production under solid state fermentation using agricultural waste as substrate. Biomass Conversion and Biorefnery. 15: 2915–2931.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Manter, D.K. and Vivanco, J.M. 2007. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. Journal of Microbiological Methods. 71(1): 7-14.

Mantzoukas, S., Daskalaki, E., Kitsiou, F., Papantzikos, V., Servis, D., Bitivanos, S., Patakioutas, G. and Eliopoulos, P.A. 2022. Dual action of *Beauveria bassiana* (Hypocreales; Cordycipitaceae) endophytic stains as biocontrol agents against sucking pests and plant growth biostimulants on melon and strawberry field plants. Microorganisms. 10(11): 2306.

Mikkonen, K.S. 2020. Strategies for structuring diverse emulsion systems by using wood lignocellulose-derived stabilizers. Green Chemistry. 22: 1019–1037.

Mirsam, H., Kalqutny, S.H., Suriani, Aqil, M., Azrai, M., Pakki, S., Muis, A., Djaenuddin, N., Rauf, A.W. and Muslimin. 2021. Indigenous fungi from corn as a potential plant growth promoter and its role in Fusarium verticillioides suppression on corn. Heliyon. 7: 1-12.

Mokhtari, W., Chtaina, N., Halmschlager, E., Volgmayr, H., Stauffer, C. and Jaklitsch, W. 2017. Potential antagonism of some *Trichoderma* strains isolated from Moroccan soil against three phytopathogenic fungi of great economic importance. Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires. 5(3): 248-254.

Moorman, G.W., Kang, S. and Geiser, D.M. 2002. Identification and characterization of *Pythium* Species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. Plant Disease. 86: 1227-1231.

Mukhopadhyay, Ria. and Kumar, D. 2020. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. Mukhopadhyay and Kumar Egyptian Journal of Biological Pest Control. 30: 1-33.

Nanxing, S., Zhaoyang, L., Qing, L., Chuandeng, T., Kunming, D., Changyun, W. and Min, C. 2020. Antifungal secondary metabolites isolated from mangrove rhizosphere soil-derived *Penicillium* fungi. Journal of Ocean University of China. 19(3): 717-721.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nattoh, G., Bargul, J.L., Magoma, G., Mbaisi, L., Butungi, H., Mararo, E., Teal, E. and Herren, J.K. 2021. The fungus *Leptosphaerulina* persists in *Anopheles gambiae* and induces melanization. PLOS One. 16(2): e0246452.

Nayak, S.S., Gonsalves, V. and Nazareth., S.W. 2012. Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar salterns in Goa – India. Indian Journal of Geo-Marine Sciences. 41(2): 164-172.

Nwankiti, A.O. and Gwa, V.I. 2018. Evaluation of Antagonistic Effect of *Trichoderma Harzianum* against *Fusarium oxysporum* causal Agent of White Yam (Dioscorearotundata poir) Tuber Rot. Trends in Technical & Scientific Researc. 1(1): 12-18.

Patel, S. And Saraf, M. 2015. Halophiles: Biodiversity and Sustainable Exploitation. Switzerland. Springer Cham.

Perrine-Walker, F. 2020. *Phytophthora palmivora*–Cocoa Interaction. Journal of Fungi. 6(3):167.

Ploetz, R.C. 2004. Influence of temperature on *Pythium splendens* – induced root disease on carambola, *Averrhoa carambola*. Mycopathologia 157: 225–231.

Prajapati, K., Sharma, M.C. and Modi, H.A. 2012. Isolation of two potassium solubilizing fungi from ceramic industry soils. Life Sciences Leaflets. 5: 71-75.

Qi, H., Yang, J., Yin, C., Zhao, J., Ren, X., Jia, S. and Zhang, G. 2019. Analysis of *Pyricularia oryzae* and *P. grisea* from different hosts based on multilocus phylogeny and pathogenicity associated with host preference in China. Phytopathology. 109: 1433-1440.

Qiao, M., Li, J., Fang, L.l., Li, J.y. and Yu, Z.f. 2021 Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Colletotrichum menglaense* sp. nov., isolated from air in China. Pathogens. 10: 12-43.

Rahman, M.A., Begum, M.F. and Alam, M.F. 2009. Screening of *Trichoderma* isolates as a biological control agent against Ceratocystis paradox a causing pineapple disease of sugarcane. Mycobiology. 37(4): 277-285.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Razeq, F.M., Jurak, E., Stogios, P.J., Yan, R., Tenkanen, M., Kabel, M.A., Wang, W. and Master, E.R. 2018. A novel acetyl xylan esterase enabling complete deacetylation of substituted xylans. Biotechnol Biofuels. 11(74): 1-12.

Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S. and Sakayaroj, J. 2005. Fungal biodiversity in soil and decaying plant materials in Thailand. ScienceAsia, 31(2): 105-112.

Rukachisirikul, V., Kaewbumrung, C., Phongpaichi, S., and Hajiwangoh, Z. 2005. *Eudesmane sesquiterpenes* from the aquatic fungus *Beltrania rhombica*. Chemical and Pharmaceutical Bulletins. 53: 238-240.

Sahana, B.K., Akhilesha, S, Priyanka, G.S. and Prashith-Kekuda, T.R. 2018. Antioxidant and antifungal activity *of Geophila repens* (L.) I. M. Johnst. (Rubiaceae). Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 8(5): 268-272.

Sakinah, M.A.I., Suzianti I.V. and Latiffah, Z. 2014. Phenotypic and molecular characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana (*Musa* spp) in Malaysia. Genetics and Molecular Research. 13(2): 3627-3637.

Sandoval, M. (2009). Biological control of *Colletotrichum fusarioides* O'Gara, pathogen of basil seeds (*Ocimum basilicum* L.) whit *Trichoderma Rifai*. Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas. 8: 104-109.

Santosa, R.C.B., Durrant, L.R., Silva, M.d. and Sette, L.D. 2010. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. Enzyme and Microbial Technology. 46: 32-37.

Sardans, J. and Peñuelas, J. 2021. Potassium control of plant functions: ecological and agricultural implications. Plants. 10: 1-31.

Saroj, P., Manasa, P. and Narasimhulu, K. 2018. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. Bioresources and Bioprocessing. 5: 31-39.

Shrestha, P., Joshi, B., Joshi, J., Malla, R. and Sreerama, L. 2016. Isolation and physicochemical characterization of laccase from *Ganoderma lucidum*-CDBT1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

isolated from its native habitat in Nepal. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. 2016: 1-10

Simamora, A.V., Hahuly, M.V. and Henuk, J.B.D. 2021. Endophytic fungi as potential biocontrol agents of *Phytophthora palmivora* in the cocoa plant. Biodiversitas 22: 2601-2609.

Sreedevi, B., Devi, M.C. and Saigopal, D.V.R. 2011. Isolation and screening of effective *Trichoderma* spp. against the root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Technology. 7(3): 623-635.

Sterflinger, K. 2000. Fungi as geologic agents. Geomicrobiol Jouenal. 17: 97–124.

Sutthisa, W., Popranom, A., Taddeetrakool, A. and Khankhum, S. 2024. Development of *Trichoderma* formulation and application to control durian anthracnose disease. Trends in sciences. 21(1): 7276.

Tangthirasunun, N and Poeaim, S. 2022. Studies on the Rapid and Simple DNA Extraction Method, Antibacterial Activity and Enzyme Activity Involved in Plant Biomass Conversion by *Cookeina sulcipes* and *C. tricholoma* (Cup Fungi). Journal of Pure and Applied Microbiology. 16(4): 8047.

Thakur, S., and Gupte, A. 2015. Optimization and hyper production of laccase from novel agaricomycete *Pseudolagarobasidium acaciicola* AGST3 and its application in in vitro decolorization of dyes. Annals of Microbiology. 65: 185-196.

Thanakitpipattana, D., Tasanathai, K., Mongkolsamrit, S., Khonsanit, A., Lamlertthon, S. and Luangsaard, J.J. 2020. Fungal pathogens occurring on Orthopterida in Thailand. Persoonia. 44: 140-160.

Thatoi, H., Behera, B.C. and Mishra, R.R. 2013. Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. Mycology. 4(1): 54-71.

Trianto, A., Radjasa, O.K., Subagiyo, Purnaweni, H., Bahry, M.S., Djamaludin, R., Tjoa, A., Singleton, I., Diele, K. and Evan, D. 2021. Potential of fungi isolated from a mangrove ecosystem in Northern Sulawesi, Indonesia: Protease, cellulase and anti-microbial capabilities. Biodiversitas 22(4): 1717-1724.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Trivedi, M., Kalkar, S. and Shanware, A. 2016. Isolation, characterization & development of liquid formulations of potassium solubilizing fungi. International Journal of Advanced Research. 4(9): 999-1003.

Varitha, A., Sugiharta, A. and Salim, M. 2017. Isolation and selection of fungi from matter and organic fertilizer product jembara bali's origin that have the capability to dissolve the phosphate as bio-fertilizer agent. Sainstek: Jurnal Sains dan Teknologi. 9(2): 190-197.

Vassileva, M., Mendes, G.O., Deriu, M.A., di Benedetto, G., Flor-Peregrin, E., Mocali, S., Martos, V. and Vassilev, N. 2022. Fungi, P-solubilization, and plant nutrition Microorganisms. 10(9): 1716.

Wang, Q., Zhang, X., Xie, Q., Tao, J., Jia, Y., Xiao, Y., Tang, Z., Li, Q., Yuan, M. and Bu, T. 2024. Exploring plant growth-promoting traits of endophytic fungi isolated from ligusticum chuanxiong hort and their interaction in plant growth and development. Journal of Fungi. 10: 7-13.

Wang, W., Nie, Y., Liu, XY. and Huang, B. 2023. The genome and transcriptome of *Sarocladium terricola* provide insight into ergosterol biosynthesis. Front Cell Infect Microbiol. 13: 1181287.

Wang, Y., Wang, J. and Wang, W. 2024. Identifcation of mycoparasitism related genes in *Trichoderma harzianum* T4 that are active against *Colletotrichum musae.* Archives of Microbiology. 206(1): 29.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and directsequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In PCR Protocols." A guide to methods and applications. 64: 315-322.

Wood, A. and Ginns, J. 2006. A new dieback disease of *Acacia cyclops* in South Africa caused by *Pseudolagarobasidium acaciicola* sp.nov. Canadian Journal of Botany. 84(5): 750-758.

Wu, J., Qiu, C., Ren, Y., Yan, R., Ye, X. and Wang, G. 2018. Novel salt-tolerant xylanase from a mangrove-isolated fungus *Phoma* sp. MF13 and its application in chinese steamed bread. ACS Omega. 3: 3708-3716.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wu, Q., Li, Y., Li, Y., Gao, S., Wang, M., Zhang, T. and Chen, J. 2013. Identification of a novel fungus, *Leptosphaerulina chartarum* SJTU59 and characterization of its xylanolytic enzymes. PLoS ONE. 8(9): e73729.

Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J. and Chen, J. 2023. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. Frontiers in microbiology, 14: 1160551.

Yasmin, Z. and Shamsi, S. 2019. Antagonistic potential of soil fungi against *Colletotrichum gloeosporiodes* (Penz.) Sacc., the causal agent of anthracnose of *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz. Dhaka University Journal of Biological Sciences. 28(2): 219-226.

Youssef, S.M., Shaaban, A., Abdelkhalik, A., El Tawwab, A.R.A., Al Halim, L.R.A., Rabee, L.A., Alwutayd M.K., Ahmed, R.M.M., Alwutayd, R. and Hemida, K.A. 2023. Compost and phosphorus/potassium-solubilizing fungus effectively boosted quinoa's physio-biochemical traits, nutrient acquisition, soil microbial community, and yield and quality in normal and calcareous soils. Plants. 12: 30-71.

Zakaria, L., Sahak, S., Zakaria, M. and Salleh, B. 2009. Characterisation of *Colletotrichum* Species associated with anthracnose of banana. Tropical Life Sciences Research. 20(2): 119–125.

Zhang, H., Kong, N., Liu, B., Yang, Y., Li, C., Qi, J., Ma, Y., Ji, S. and Liu, Z. 2022. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* CGMCC20739 (Tha739) against postharvest bitter rot of apples. Microbiological Research. 265: 127182.

Zhang, H., Zheng, X. and Zhang, Z. 2016. The magnaporthe grisea species complex and plant pathogenesis. Molecular Plant Pathology. 17(6):796-804.

Zhang, Y.Z., Chen, Q.L., Ma, J., Lu, Y.Z., Chen, H.B. and Liu, N.G. 2023. Morphological and multi-gene phylogenetic analyses reveal five new hyphomycetes from freshwater habitats. Frontiers in Microbiology. 14: 1253239.

Zhao, B., Rasheed, H.A., Ali, I. and Hu, S. 2021. Efficient enzymatic saccharification of alkaline and ionic liquid-pretreated bamboo by highly active extremozymes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

produced by the co-culture of two halophilic fungi. Bioresource Technology. 319: 1-9.

Zhao, R., Chen, K.Y., Mao, L.J. and Zhang, C.L. 2024. Eleven new species of *Trichoderma* (Hypocreaceae, Hypocreales) from China. Mycology. 1: 180-209.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินป่าชายเลน

1.1 Potato dextrose broth

เตรียม Potato dextrose broth ปริมาตร 1 ลิตร โดยการต้มมันฝรั่ง 200 กรัม ก่อนการต้มมันฝรั่งจะถูกหันเป็นลูกเต๋าขนาด 2 x 2 เซนติเมตร รอจนเดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใช้ผ้าขาวบางกรองแยกเนื้อมันฝรั่งออก ชั่งน้ำตาล Dextrose 20 กรัมเติมลงในน้ำมันฝรั่ง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

1.2 Potato dextrose agar

เตรียม Potato dextrose agar ปริมาตร 1 ลิตร โดยใช้วิธีการเดียวกันกับการเตรียม Potato dextrose broth แต่ทำการเติม Agar 15 กรัม ลงไปก่อนนำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

1.3 Corn Meal agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ Corn Meal agar ปริมาตร 1 ลิตร เตรียมโดยการชั่ง Corn Meal 2 กรัม เกลือทะเล 30 กรัม และ Agar 15 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ(Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

1.4 อาหารวุ้นซึ่งมีส่วนผสมของผงผักกาด

อาหารวุ้นซึ่งมีส่วนผสมของผงผักกาด ปริมาตร 1 ลิตร เตรียมโดยการชั่ง ผงผักกาด 25 กรัม Malt extract 1 กรัม Yeast extract 1 กรัม และ agar 18 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง

2.1 Carboxy methyl cellulose agar

เตรียม Carboxy methyl cellulose agar ปริมาตร 1 ลิตร โดยการชั่ง Carboxy methyl cellulose 2 กรัม $NaNO_3$ 2 กรัม Paptone 2 กรัม K_2HPO_4 1 กรัม KCL 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม และ Agar 15 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.2 Xylan agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียม Xylan agar ปริมาตร 1 ลิตร โดยการชั่ง Xylan 2 กรัม $NaNO_3$ 2 กรัม Paptone 2 กรัม K_2HPO_4 1 กรัม KCL 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม และ Agar 15 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.3 1 – naphthol agar

การเตรียม 1 – naphthol agar สามารถใช้วิธีเดียวกันกับการเตรียมอาหาร Potato dextrose agar โดยก่อนการเทอาหารลงจานเพาะเลี้ยงให้เติม 1 – naphthol ลงไป 500 ไมโครลิตร

3. การเตรียมสารในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

3.1 สารในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

3.1.1 0.05M sodium citrate buffer pH 4.8

การเตรียม 0.05M sodium citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำโดยการตวง 0.1M Citric acid ปริมาตร 38.46 มิลลิตร ต่อมาเติม 0.1M Sodium citrate ปริมาตร 61.54 มิลลิตร ปรับ pH ให้ได้ 4.8 จากนั้นใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรจนได้ 200 มิลลิลิตร

3.1.2 สารละลาย 1% Carboxymethylcellulose และ 1% Beechwood Xylan

การเตรียมสารละลาย 1% Carboxymethylcellulose และ 1% Beechwood Xylan ปริมาตร20 มิลลิลิตร ทำโดยการชั่ง Carboxymethylcellulose หรือ Beechwood Xylan 0.2 กรัม จากนั้นใช้ 0.05M sodium citrate buffer pH 4.8 ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วคนสารจนกระทั่งสาร Carboxymethylcellulose หรือ Beechwood Xylan ละลายจนหมด

3.1.3 สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

การเตรียมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยการชั่ง โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 30 กรัม และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.6 กรัม ละลายจนหมดในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 3,5-dinitrosalicylic acid 1 กรัม คนด้วยเครื่องกวนสาร Hotplate Stirrer ที่ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส จนละลายหมด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.2 สารในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส

3.2.1 0.1M Sodium acetate buffer pH 4.5

การเตรียม 0.1M Sodium acetate buffer pH 4.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำโดยการตวง 0.2M Acetic acid ปริมาตร 53.49 มิลลิตร ต่อมาเติม 0.2M Sodium acetate ปริมาตร 46.51 มิลลิตร ปรับ pH ให้ได้ 4.5 จากนั้นใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรจนได้ 200 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 สารละลาย 1 mM of ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

การเตรียมสารละลาย 1mM ABTS ปริมาตร 20 มิลิลิตร เตรียมโดยการชั่ง ABTS 10.29 มิลลิกรัม ละลายใน 0.1M Sodium acetate buffer pH 4.5 ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลิลิตร เก็บไว้ภาชนะทึบแสง ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง

4.1 Pikovskaya agar

เตรียมอาหาร Pikovskaya agar ปริมาตร 1 ลิตร โดยชั่งอาหาร Pikovskaya agar 31.3 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

4.2 Alekandrov agar

เตรียมอาหาร Alekandrov agar ปริมาตร 1 ลิตร โดยชั่งอาหาร Alekandrov agar 29.6 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานกลูโคสและไซโลส

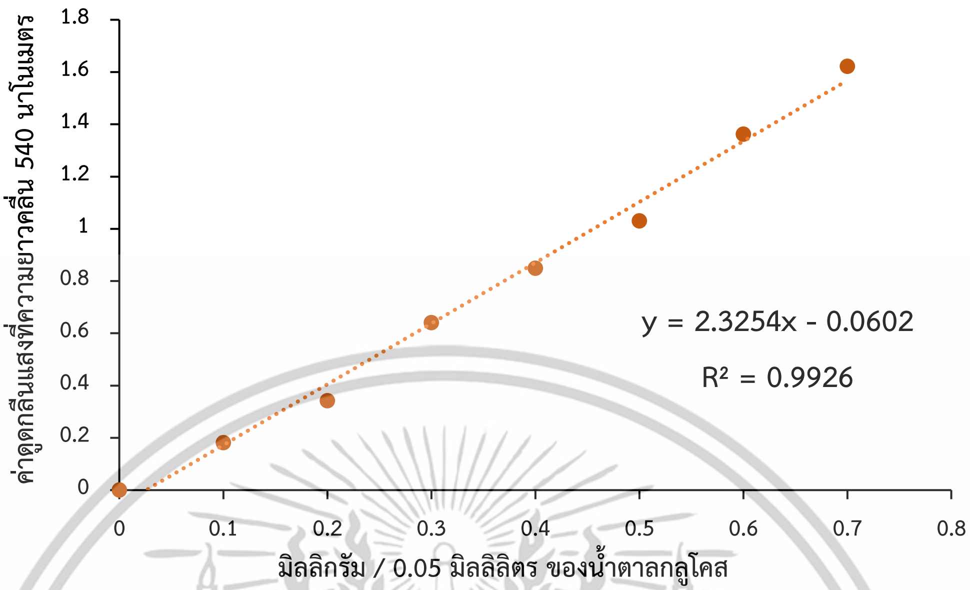
1. การกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานกลูโคส

นำค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกลูโคส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเซลลูเลส ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากตารางภาคผนวกที่ ข-1 มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปภาคผนวกที่ ข-1

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสหลังจากทำปฏิกิริยากับ DNS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส		ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
(mg/ml)	(mg/0.05ml)	1	2	3	
0	0	0.063	0.062	0.060	0.062±0.001
2	0.1	0.242	0.241	0.247	0.243±0.003
4	0.2	0.381	0.428	0.404	0.404±0.019
6	0.3	0.663	0.72	0.724	0.702±0.028
8	0.4	0.915	0.900	0.917	0.910±0.008
10	0.5	1.101	1.077	1.100	1.093±0.011
12	0.6	1.419	1.379	1.474	1.424±0.039
14	0.7	1.675	1.767	1.610	1.684±0.064

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวก ข-1 กราฟเส้นแสดงระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานจากวิธีการ DNS

จากกราฟมาตรฐานกลูโคส (รูปภาคผนวกที่ ข-1) ได้สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 2.3254x - 0.0602 \quad \text{(ข-1)}$$

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
x คือ ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อ 0.05 มิลลิลิตร)

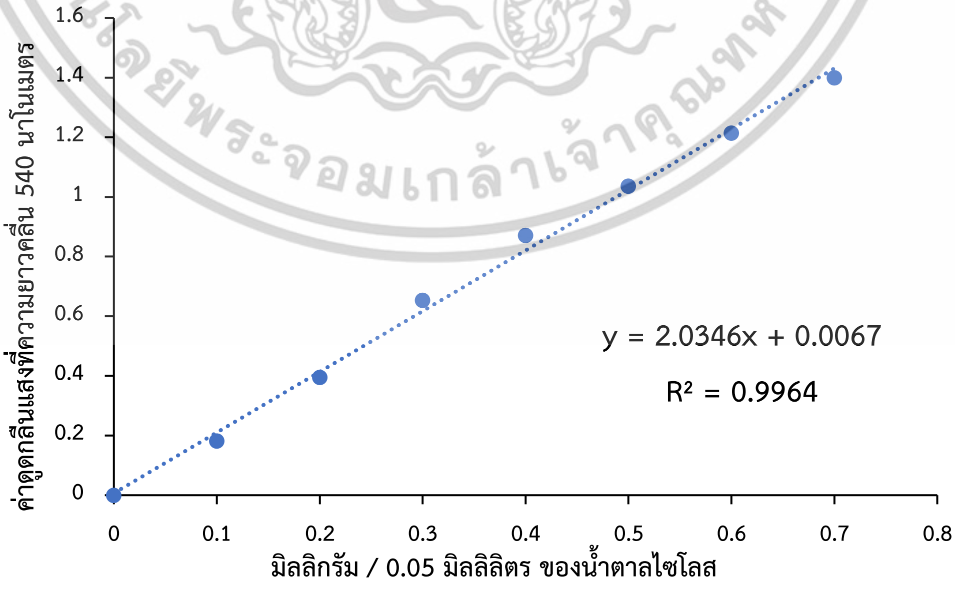
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานไซโลส

นำค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกลูโคส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเซลลูเลส ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากตารางภาคผนวกที่ ข-2 มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปภาคผนวกที่ ข-2

ตารางภาคผนวกที่ ข-2 ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสหลังจากทำปฏิกิริยากับ DNS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไซโลส		ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
(mg/ml)	(mg/0.05ml)	1	2	3	
0	0	0.054	0.057	0.054	0.055±0.001
2	0.1	0.232	0.248	0.231	0.237±0.008
4	0.2	0.444	0.451	0.457	0.451±0.005
6	0.3	0.712	0.696	0.717	0.708±0.009
8	0.4	0.923	0.93	0.924	0.926±0.003
10	0.5	1.134	1.155	0.983	1.091±0.077
12	0.6	1.255	1.298	1.253	1.269±0.021
14	0.7	1.382	1.489	1.492	1.454±0.051



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปภาคผนวก ข-2 กราฟเส้นแสดงระดับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมาตรฐานจากวิธีการ DNS

จากกราฟมาตรฐานไซโลส (รูปภาคผนวกที่ ข-2) ได้สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 2.0346x - 0.0067 \quad \text{(ข-1)}$$

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของสารละลายไซโลสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อ 0.05 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

1. ผลลัพธ์ค่าดัชนีเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ของเชื้อรา 48 ไอโซเลต

ตารางภาคผนวก ค-1 ตารางแสดงค่าดัชนีเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ของเชื้อรา 48 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ค่าดัชนีเอนไซม์		
	เซลลูเลส	ไซลาเนส	แลคเคส
SL1-01	$1.18^{qrs}\pm0.03$	$1.23^{hij}\pm0.04$	$1.31^{b}\pm0.01$
SL2-01	$2.51^{e}\pm0.05$	$2.52^{d}\pm0.11$	$0.00^{d}\pm0.00$
SL2-02	$3.66^{b}\pm0.23$	$3.78^{b}\pm0.30$	$0.00^{d}\pm0.00$
SL2-04	$3.39^{c}\pm0.50$	$3.64^{bc}\pm0.23$	$0.00^{d}\pm0.00$
SL3-02	$1.25^{nopqrs}\pm0.09$	$1.28^{hij}\pm0.06$	$0.00^{d}\pm0.00$
SL3-03	$1.37^{lmnop}\pm0.02$	$1.49^{efghij}\pm0.07$	$4.38^{a}\pm0.09$
SL3-04	$1.47^{kl}\pm0.14$	$1.53^{efghij}\pm0.14$	$0.93^{c}\pm0.32$
SL3-05	$1.97^{f}\pm0.07$	$2.58^{c}\pm0.36$	$0.00^{d}\pm0.00$
SL5-01	$1.41^{klm}\pm0.09$	$1.45^{ghij}\pm0.02$	$0.00^{d}\pm0.00$
SL5-02	$1.41^{klmno}\pm0.04$	$1.24^{hij}\pm0.03$	$1.29^{b}\pm0.08$
SM1-01	$1.42^{klmn}\pm0.09$	$1.70^{efgh}\pm0.11$	$0.00^{d}\pm0.00$
SM2-04	$0.00^{u}\pm0.00$	$0.00^{k}\pm0.00$	$0.00^{d}\pm0.00$
SM4-01	$1.34^{lmnopq}\pm0.05$	$1.33^{hij}\pm0.04$	$0.00^{d}\pm0.00$
SM5-01	$1.85^{fgh}\pm0.03$	$1.59^{efghi}\pm0.15$	$0.00^{d}\pm0.00$
LP1-01	$1.87^{fgh}\pm0.12$	$1.85^{efg}\pm0.17$	$0.00^{d}\pm0.00$
LP1-04	$1.84^{fgh}\pm0.12$	$1.80^{efg}\pm0.05$	$0.00^{d}\pm0.00$
LP2-01	$1.71^{hi}\pm0.04$	$0.00^{k}\pm0.00$	$0.00^{d}\pm0.00$

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-u ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค-1 ตารางแสดงค่าดัชนีเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ของเชื้อรา 48 ไอโซเลต **(ต่อ)**

ไอโซเลต	ค่าดัชนีเอนไซม์		
	เซลลูเลส	ไซลาเนส	แลคเคส
LP3-06	$1.25^{nopqrs}\pm0.06$	$1.19^{ij}\pm0.03$	$0.00^{d}\pm0.00$
LP4-01	$1.03^{t}\pm0.01$	$1.12^{ij}\pm0.12$	$0.00^{d}\pm0.00$
LP6-02	$1.23^{pqrs}\pm0.02$	$1.33^{hij}\pm0.06$	$0.00^{d}\pm0.00$
VP2-02	$1.32^{lmnopq}\pm0.04$	$1.28^{hij}\pm0.26$	$0.00^{d}\pm0.00$
VP2-03	$5.58^{a}\pm0.08$	$5.86^{a}\pm0.59$	$0.00^{d}\pm0.00$
VP3-02	$3.24^{d}\pm0.32$	$3.54^{bc}\pm0.27$	$0.00^{d}\pm0.00$
VP3-04	$1.44^{klm}\pm0.01$	$1.47^{fghij}\pm0.11$	$0.00^{d}\pm0.00$
VP4-01	$0.00^{u}\pm0.00$	$0.00^{k}\pm0.00$	$0.00^{d}\pm0.00$
VP4-04	$1.72^{hi}\pm0.10$	$1.68^{efgh}\pm0.22$	$0.00^{d}\pm0.00$
VP5-02	$2.54^{e}\pm0.25$	$1.94^{e}\pm0.11$	$0.00^{d}\pm0.00$
KK1-03	$1.74^{hi}\pm0.10$	$1.93^{ef}\pm0.02$	$0.00^{d}\pm0.00$
KK4-01	$1.02^{t}\pm0.08$	$1.10^{j}\pm0.02$	$0.00^{d}\pm0.00$
KK6-01	$1.36^{lmnopq}\pm0.07$	$1.28^{hij}\pm0.05$	$0.00^{d}\pm0.00$
PT1-01	$1.33^{lmnopq}\pm0.11$	$1.29^{hij}\pm0.06$	$0.00^{d}\pm0.00$
PT2-01	$1.64^{ij}\pm0.04$	$1.45^{ghij}\pm0.08$	$0.00^{d}\pm0.00$
PT2-03	$1.14^{rst}\pm0.04$	$1.29^{hij}\pm0.02$	$0.00^{d}\pm0.00$
PT2-04	$1.91^{fg}\pm0.02$	$1.83^{efg}\pm0.05$	$0.00^{d}\pm0.00$
PT5-01	$1.24^{opqrs}\pm0.01$	$1.18^{ij}\pm0.07$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR1-01	$1.09^{st}\pm0.11$	$1.13^{ij}\pm0.01$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR1-02	$1.02^{t}\pm0.03$	$1.21^{efg}\pm0.02$	$0.00^{d}\pm0.00$

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-u ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test (p<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค-1 ตารางแสดงค่าดัชนีเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส ของเชื้อรา 48 ไอโซเลต **(ต่อ)**

ไอโซเลต	ค่าดัชนีเอนไซม์		
	เซลลูเลส	**ไซลาเนส**	**แลคเคส**
SR1-03	$1.30^{lmnopqr}\pm0.04$	$1.27^{hij}\pm0.04$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR2-01	$1.30^{lmnopqr}\pm0.03$	$1.18^{ij}\pm0.08$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR2-07	$1.28^{mnopqr}\pm0.05$	$1.25^{hij}\pm0.05$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR3-02	$0.00^{u}\pm0.00$	$0.00^{k}\pm0.00$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR4-01	$1.35^{lmnopq}\pm0.05$	$1.30^{hij}\pm0.21$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR4-02	$1.23^{pqrs}\pm0.02$	$1.18^{ij}\pm0.14$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR5-02	$1.42^{klmn}\pm0.06$	$1.32^{hij}\pm0.06$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR5-03	$1.37^{lmnop}\pm0.05$	$1.30^{hij}\pm0.10$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR6-01	$1.77^{ghi}\pm0.02$	$1.46^{ghij}\pm0.05$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR6-02	$1.56^{jk}\pm0.31$	$1.49^{efghij}\pm0.09$	$0.00^{d}\pm0.00$
SR6-03	$0.00^{u}\pm0.00$	$0.00^{k}\pm0.00$	$0.00^{d}\pm0.00$

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-u ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (*p*<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ตัวอย่างเชื้อราจำนวน 46 ไอโซเลตที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ตารางภาคผนวก ค-2 สายพันธุ์และหมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราจำนวน 46 ไอโซเลต

สายพันธุ์ของตัวอย่างเชื้อรา	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์
Pyricularia grisea FmBWMRI-72	(LC484289)
Pyricularia grisea FmBWMRI-40	(LC484287)
Pyricularia grisea TNFxM26	(MW494589)
Pyricularia oryzae MoK19-32	(MT757299)
Pyricularia oryzae MoK19-29	(MT757296)
Pyricularia zingibericola CBS 138605	(NR_173730)
Pyricularia ctenantheicola GR0002	(KM484879)
Pyricularia ctenantheicola CBS 138601	(NR_173727)
Pyricularia cortaderiae ICMP 17830	(NR_175022)
Pyricularia cortaderiae PDD 95061	(HQ283076)
Pyricularia pennisetigena CBS 138604	(NR_173729)
Pyricularia pennisetigena ML0036	(KM484935)
Cyphellophora fusarioides JS13A04	(PP384937)
Cyphellophora fusarioides D2B3_A2h	(PP669901)
Cyphellophora suttonii CBS:125441	(MH863484)
Cyphellophora aestiva CBS:228.86	(MH861947)
Cyphellophora vermispora CBS 228.86	(JQ766426)
Cyphellophora laciniata CBS:239.91	(MH862251)
Cyphellophora laciniata CBS:190.61	(MH858019)
Cyphellophora pauciseptata CBS:284.85	(MH861880)
Cyphellophora phyllostachydis HLHNZWYZZ08	(KP010371)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค-2 สายพันธุ์และหมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราจำนวน 46 ไอโซเลต **(ต่อ)**

สายพันธุ์ของตัวอย่างเชื้อรา	**หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์**
Cyphellophora pluriseptata CBS:286.85	MH861881
Cyphellophora guyanensis CBS:129342	MH865228
Cyphellophora goniomatis CPC:37032	MN562133
Ramichloridium luteum	NR_119684
Ramichloridium luteum ZXRSD2	EU329730
Ramichloridium luteum ZXRSD5	EU329731
Ramichloridium endophyticum YMF 1.05584	MK836099
Ramichloridium cucurbitae	NR_120082
Ramichloridium cucurbitae BHF50a3	JQ622087
Ramichloridium punctatum IRAN 4789C	OQ625988
Ramichloridium punctatum	NR_120081
Ramichloridium punctatum BHE35b1	JQ622086
Ramichloridium eucleae CBS 138000	NR_156590
Ramichloridium indicum CBS 171.96	EU041799
Ramichloridium apiculatum BAB-6420	MF319891
Ramichloridium apiculatum A97	MK696326
Anteaglonium parvulum MFLUCC:10-0928	MN608542
Anteaglonium parvulum MFLUCC:11-0380	MN608544
Anteaglonium parvulum MFLUCC:11-0511	MN608545
Anteaglonium lusitanicum AMI-SPL647	OP441407
Anteaglonium lusitanicum LMQ14_1	PV138458

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค-2 สายพันธุ์และหมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราจำนวน 46 ไอโซเลต **(ต่อ)**

สายพันธุ์ของตัวอย่างเชื้อรา	**หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์**
Anteaglonium hydei GZCC 20-0196	NR_191273
Anteaglonium gordoniae CD7	OK335788
Anteaglonium gordoniae MFLUCC 17-2431	NR_163338
Anteaglonium gordoniae C332	MK347761
Anteaglonium queenslandicum BRIP 71684a	OR452098
Anteaglonium rubescens CBS 143911	NR_164489
Pseudolagarobasidium acaciicola HNMF041	MH729007
Pseudolagarobasidium acaciicola CF00158	OQ076528
Pseudolagarobasidium acaciicola LC3243	MF135490
Pseudolagarobasidium baiyunshanensis Han 405	MT428549
Pseudolagarobasidium venustum Carranza 120929	OR262150
Pseudolagarobasidium belizense VPB197	OR262174
Pseudolagarobasidium belizense CFMR:DCL04-31	JQ070173
Leptosphaerulina sp. I1111	MK336534
Leptosphaerulina sp. SCSGAF0042	JN850998
Leptosphaerulina chartarum G45	GU566269
Leptosphaerulina crassiasca XWS02F46	KU361223
Trichoderma anaharzianum YMF 1.00383	NR_174890
Trichoderma lixii CBS 110080	NR_131264
Trichoderma harzianum HT2	LC793725

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค-2 สายพันธุ์และหมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราจำนวน 46 ไอโซเลต **(ต่อ)**

สายพันธุ์ของตัวอย่างเชื้อรา	**หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์**
Trichoderma bambusicola MFLU 18-2747	NR_189386
Trichoderma chlamydosporum HMAS 248850	NR_154577
Trichoderma macrofasciculatum ACCC 39712	NR_184884
Trichoderma nordicum ACCC 39713	NR_184883
Trichoderma tibetica YMF 1.05583	NR_176705
Trichoderma aquatica YMF 1.04625	NR_174891
Trichoderma capillare QT21993	KY209923
Trichoderma capillare QT22099	KY225655
Trichoderma capillare	OW988322
Halorosellinia rhizophorae PUSRM01	OR116247
Halorosellinia rhizophorae MFLUCC:15-0183	KU516688
Halorosellinia rhizophorae MFLU 17-2591	MN047118
Halorosellinia krabiensis MFLU 17-2596	NR_166289
Halorosellinia oceanica SGLAf82	EU715635
Halorosellinia xylocarpi MFLU 17-2584	MN047121
Halorosellinia xylocarpi MFLU 18-0545	MN047120
Hypocreales sp. PSU-ES203	JN116711
Hypocreales sp. HNNU 0045	MZ683376
Hypocreales sp. OBEGF27	KX896660
Hypocreales sp. JSP 07-02	KR093955

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค-2 สายพันธุ์และหมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราจำนวน 46 ไอโซเลต **(ต่อ)**

สายพันธุ์ของตัวอย่างเชื้อรา	**หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์**
Sarocladium terricola	MK579174
Sarocladium terricola A2	MG980071
Sarocladium terricola	OW983294
Sarocladium bacillisporum	OW985503
Sarocladium subulatum CBS:217.35	MH855652
Sarocladium gamsii CBS 707.73	NR_155780
Sarocladium liquanensis ACCC 39306	NR_182330
Sarocladium kiliense M6	OR506574
Sarocladium spirale BCRC FU31117	NR_165864
Sarocladium sparsum BCRC FU31121	NR_165865
Sarocladium sparsum 3-64	LC461524
Colletotrichum gloeosporioides GR27	FJ904825

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลลัพธ์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และแลคเคส

ตารางภาคผนวก ค–3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา 10 สายพันธุ์ เก็บผลวันที่ 7, 14, 21 และ 28

สายพันธุ์เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิตร)			
	7 วัน	**14 วัน**	**21 วัน**	**28 วัน**
P. grisea SL1-01	0.26^{f}±0.04	0.11^{e}±0.01	0.11^{ef}±0.01	0.11^{d}±0.01
C. fusarioides SL2-01	0.79^{d}±0.07	0.67^{b}±0.03	0.12^{ef}±0.01	0.11^{d}±0.00
R. punctatum SL2-02	0.28^{f}±0.03	0.37^{c}±0.05	0.39^{a}±0.06	0.12^{cd}±0.01
A. parvulum SL2-04	2.63^{a}±0.19	1.35^{a}±0.14	0.14^{de}±0.01	0.50^{a}±0.06
P. acaciicola SL3-03	1.35^{b}±0.07	0.28^{d}±0.02	0.17^{c}±0.01	0.17^{b}±0.01
Leptosphaerulina sp. SL3-04	0.16^{g}±0.14	0.26^{d}±0.05	0.09^{g}±0.01	0.11^{d}±0.01
T. capillare VP2-03	0.16^{g}±0.01	0.14^{e}±0.01	0.12^{ef}±0.02	0.13^{c}±0.00
H. rhizophorae VP3-02	1.29^{b}±0.08	0.25^{d}±0.01	0.15^{cd}±0.01	0.12^{cd}±0.01
Hypocreales sp. VP5-02	1.15^{c}±0.18	0.34^{c}±0.03	0.22^{b}±0.02	0.13^{c}±0.01
S. Terricola PT2-04	0.58^{e}±0.05	0.12^{e}±0.01	0.12^{ef}±0.01	0.12^{cd}±0.01

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-g ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (p<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค–4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา 10 ไอโซเลต เก็บผลวันที่ 7, 14, 21 และ 28

ไอโซเลต	กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	7 วัน	**14 วัน**	**21 วัน**	**28 วัน**
P. grisea SL1-01	0.48^{g}±0.05	0.05^{h}±0.01	0.07^{c}±0.00	0.07^{d}±0.01
C. fusarioides SL2-01	1.70^{b}±0.18	0.63^{b}±0.05	0.02^{d}±0.00	0.03^{f}±0.00
R. punctatum SL2-02	0.41^{g}±0.02	0.40^{c}±0.06	0.40^{a}±0.05	0.17^{c}±0.02
A. parvulum SL2-04	1.95^{a}±0.10	0.99^{a}±0.09	0.09^{c}±0.00	0.56^{a}±0.07
P. acaciicola SL3-03	1.61^{c}±0.13	0.34^{d}±0.02	0.15^{b}±0.01	0.25^{b}±0.02
Leptosphaerulina sp. SL3-04	0.09^{h}±0.02	0.26^{e}±0.02	0.03^{d}±0.01	0.03^{f}±0.01
T. capillare VP2-03	0.42^{g}±0.11	0.15^{g}±0.01	0.07^{c}±0.01	0.05^{de}±0.01
H. rhizophorae VP3-02	1.39^{d}±0.06	0.19^{f}±0.01	0.08^{c}±0.01	0.03^{f}±0.00
Hypocreales sp. VP5-02	1.19^{e}±0.12	0.14^{g}±0.02	0.14^{b}±0.02	0.04^{ef}±0.01
S. Terricola PT2-04	0.58^{f}±0.12	0.41^{c}±0.04	0.04^{d}±0.00	0.04^{ef}±0.01

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-h ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (p<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค–5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสของเชื้อรา 10 ไอโซเลต เก็บผลวันที่ 7, 14, 21 และ 28

ไอโซเลต	กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (ยูนิตต่อมิลลิตร)			
	7 วัน	**14 วัน**	**21 วัน**	**28 วัน**
P. grisea SL1-01	5.15[b]±0.69	0.74[b]±0.11	0.65[b]±0.04	0.29[b]±0.02
C. fusarioides SL2-01	0.14[c]±0.02	0.12[c]±0.01	0.00[b]±0.00	0.00[b]±0.00
R. punctatum SL2-02	0.00[c]±0.00	0.00[c]±0.00	0.01[b]±0.01	0.05[b]±0.01
A. parvulum SL2-04	0.00[c]±0.00	0.01[c]±0.02	0.01[b]±0.00	0.00[b]±0.00
P. acaciicola SL3-03	16.99[a]±1.34	20.37[a]±1.14	43.13[a]±2.06	32.63[a]±2.49
Leptosphaerulina sp. SL3-04	0.00[c]±0.00	0.02[c]±0.03	0.03[b]±0.01	0.00[b]±0.00
T. capillare VP2-03	0.03[c]±0.01	0.01[c]±0.01	0.03[b]±0.01	0.08[b]±0.01
H. rhizophorae VP3-02	0.11[c]±0.01	0.12[c]±0.02	0.02[b]±0.00	0.06[b]±0.01
Hypocreales sp. VP5-02	0.00[c]±0.00	0.01[c]±0.01	0.01[b]±0.01	0.08[b]±0.01
S. Terricola PT2-04	0.00[c]±0.00	0.01[c]±0.01	0.04[b]±0.02	0.08[b]±0.01

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (p<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลลัพธ์การสังเกตความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ตารางภาคผนวก ค–6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 5 สายพันธุ์

เชื้อราที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน	*Fusarium oxysporum*			*Colletotrichum musae*		
	จำนวนสปอร์ (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์	จำนวนสปอร์ (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์
	ชุดควบคุม	จำนวนสปอร์		ชุดควบคุม	จำนวนสปอร์	
P. grisea SL1-01	8.94	4.54	49.19	1.22	2.40	80.34
C. fusarioides SL2-01	9.61	8.75	8.93	1.50	1.23	18.11
R. punctatum SL2-02	9.61	8.43	12.28	5.76	4.55	20.61
A. parvulum SL2-04	9.03	7.64	15.50	1.50	1.10	26.76
P. acaciicola SL3-03	8.94	4.52	49.41	1.22	0.12	89.84
Leptosphaerulina sp. SL3-04	8.94	7.96	10.92	5.73	4.52	21.13
T. capillare VP2-03	8.94	0.20	97.81	1.22	0	100.00
H. rhizophorae VP3-02	9.61	9.14	4.96	4.93	2.08	57.81
Hypocreales sp. VP5-02	9.10	8.07	11.27	4.93	4.50	8.72
S. Terricola PT2-04	9.10	7.35	19.21	4.93	3.90	20.89

2. ผลลัพธ์การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของปุ๋ยอินทรีย์ระหว่างการหมัก

ตารางภาคผนวก ค–7 การยุบในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร

สูตรปุ๋ย	การยุบตัวในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ (มิลลิเมตร)								การยุบตัวทั้งหมด (เซนติเมตร)
	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน	35 วัน	42 วัน	49 วัน-	56 วัน	
ปุ๋ยชุดควบคุม	28.37^{b}±0.87	12.88^{b}±1.45	9.59^{ab}±0.78	5.00^{a}±1.89	2.62^{d}±0.19	0.99^{c}±0.02	0.00^{a}±0.00	0.00^{a}±0.00	59.44±0.65
ปุ๋ย F1	25.51^{c}±0.91	13.06^{b}±2.65	8.41^{b}±0.49	6.02^{a}±0.27	2.95^{c}±0.08	1.62^{b}±0.04	0.00^{a}±0.00	0.00^{a}±0.00	57.58±0.56
ปุ๋ย F2	27.21^{b}±0.89	13.51^{b}±2.17	10.38^{a}±1.08	6.14^{a}±1.63	3.59^{b}±0.19	1.93^{b}±0.07	0.00^{a}±0.00	0.00^{a}±0.00	62.76±0.75
ปุ๋ย F3	31.22^{a}±0.79	18.52^{a}±0.71	9.24^{ab}±0.83	6.87^{a}±0.45	5.07^{a}±0.10	3.03^{a}±0.16	0.00^{a}±0.00	0.00^{a}±0.00	73.95±0.38

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test (p<0.05)

ตารางภาคผนวก ค–8 ค่า pH ในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร

สูตรปุ๋ย	ค่า pH ในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์							
	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน	35 วัน	42 วัน	49 วัน	56 วัน
ปุ๋ยชุดควบคุม	6.64 ^{b}±0.29	7.11^{c}±0.04	7.39^{c}±0.13	7.74^{bc}±0.06	7.96^{ab}±0.04	8.04^{a}±0.17	8.13^{a}±0.10	8.18^{a}±0.17
ปุ๋ย F1	6.80^{b}±0.04	7.49^{b}±0.04	7.70^{ab}±0.10	7.89^{ab}±0.04	8.12^{a}±0.06	8.20^{a}±0.13	8.34^{a}±0.08	8.43^{a}±0.14
ปุ๋ย F2	7.60^{a}±0.15	7.78^{a}±0.18	7.88^{a}±0.14	7.94^{a}±0.08	8.03^{a}±0.12	8.15^{a}±0.07	8.24^{a}±0.01	8.28^{a}±0.06
ปุ๋ย F3	7.05^{b}±0.12	7.45^{b}±0.13	7.58^{bc}±0.03	7.67^{c}±0.11	7.82^{b}±0.06	8.01^{a}±0.11	8.19^{a}±0.12	8.26^{a}±0.05

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test (p<0.05)

ตารางภาคผนวก ค–9 อุณหภูมิในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร

สูตรปุ๋ย	อุณหภูมิในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ (องศาเซลเซียส)							
	7 วัน	**14 วัน**	**21 วัน**	**28 วัน**	**35 วัน**	**42 วัน**	**49 วัน**	**56 วัน**
ปุ๋ยชุดควบคุม	$33.80^{a}\pm0.08$	$34.23^{a}\pm0.19$	$34.43^{a}\pm0.17$	$34.37^{a}\pm0.34$	$34.17^{a}\pm0.34$	$34.00^{a}\pm0.08$	$33.83^{a}\pm0.12$	$33.87^{a}\pm0.29$
ปุ๋ย F1	$33.70^{ab}\pm0.08$	$33.93^{a}\pm0.09$	$34.13^{ab}\pm0.17$	$34.23^{a}\pm0.19$	$34.17^{a}\pm0.25$	$33.97^{a}\pm0.12$	$33.90^{a}\pm0.08$	$33.73^{a}\pm0.21$
ปุ๋ย F2	$33.50^{b}\pm0.08$	$33.83^{a}\pm0.34$	$33.90^{b}\pm0.08$	$33.87^{a}\pm0.09$	$33.83^{a}\pm0.17$	$33.77^{a}\pm0.12$	$33.63^{a}\pm0.26$	$33.63^{a}\pm0.12$
ปุ๋ย F3	$33.43^{b}\pm0.21$	$33.80^{a}\pm0.08$	$34.03^{b}\pm0.21$	$34.07^{a}\pm0.29$	$34.03^{a}\pm0.12$	$33.83^{a}\pm0.12$	$33.77^{a}\pm0.21$	$33.70^{a}\pm0.22$

หมายเหตุ: ตัวอักษร a และ b ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวก ค–10 ค่าเปอร์เซ็นต์ของความชื้นในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร

สูตรปุ๋ย	ค่าเปอร์เซ็นต์ของความชื้นในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ (เปอร์เซ็นต์)							
	7 วัน	**14 วัน**	**21 วัน**	**28 วัน**	**35 วัน**	**42 วัน**	**49 วัน**	**56 วัน**
ปุ๋ยชุดควบคุม	$85.67^{bc}\pm1.70$	$87.67^{c}\pm0.94$	$76.67^{a}\pm2.87$	$70.67^{a}\pm3.40$	$60.00^{a}\pm0.82$	$51.67^{a}\pm1.25$	$40.67^{a}\pm0.47$	$28.33^{a}\pm1.25$
ปุ๋ย F1	$82.67^{c}\pm2.05$	$91.67^{b}\pm0.94$	$76.67^{a}\pm2.49$	$71.67^{a}\pm1.25$	$61.33^{a}\pm0.47$	$49.00^{b}\pm0.82$	$31.33^{c}\pm1.25$	$22.00^{b}\pm0.82$
ปุ๋ย F2	$97.67^{a}\pm1.89$	$93.67^{a}\pm0.94$	$80.00^{a}\pm2.45$	$73.33^{a}\pm1.70$	$60.33^{a}\pm0.47$	$46.67^{b}\pm1.25$	$35.67^{b}\pm1.25$	$24.00^{b}\pm0.82$
ปุ๋ย F3	$90.33^{b}\pm2.62$	$88.33^{c}\pm0.47$	$79.33^{a}\pm2.05$	$63.33^{b}\pm1.25$	$58.67^{b}\pm0.47$	$46.67^{b}\pm0.47$	$35.33^{b}\pm0.47$	$23.00^{b}\pm0.82$

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวก ค–11 ค่าการนำไฟฟ้าในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร

สูตรปุ๋ย	**ค่าการนำไฟฟ้าในช่วงระยะเวลาที่ทำการหมักปุ๋ยอินทรีย์ (เดซิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร)**							
	7 วัน	**14 วัน**	**21 วัน**	**28 วัน**	**35 วัน**	**42 วัน**	**49 วัน**	**56 วัน**
ปุ๋ยชุดควบคุม	0.29^{b}±0.10	1.42^{b}±0.05	2.55^{b}±0.02	3.56^{c}±0.02	3.89^{a}±0.09	4.56^{b}±0.08	5.25^{b}±0.02	5.77^{b}±0.02
ปุ๋ย F1	0.16^{b}±0.02	0.27^{c}±0.01	0.74^{c}±0.08	1.44^{d}±0.02	1.89^{b}±0.17	2.45^{c}±0.01	2.82^{d}±0.02	3.30^{c}±0.04
ปุ๋ย F2	0.51^{a}±0.03	1.59^{a}±0.01	2.68^{a}±0.03	3.68^{a}±0.04	4.12^{a}±0.03	4.86^{a}±0.09	5.54^{a}±0.10	6.58^{a}±0.20
ปุ๋ย F3	0.30^{b}±0.07	1.59^{a}±0.02	2.60^{ab}±0.02	3.63^{b}±0.01	4.05^{a}±0.03	4.63^{b}±0.07	5.10^{c}±0.02	5.76^{b}±0.09

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-d ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (*p*<0.05)

ตารางภาคผนวก ค–12 ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์ 4 สูตร

สูตรปุ๋ย	**ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยอินทรีย์ (เปอร์เซ็นต์)**	
	28 วัน	**56 วัน**
ปุ๋ยชุดควบคุม	106.61^{a}±2.63	135.39^{c}±7.12
ปุ๋ย F1	84.09^{b}±4.06	145.87^{b}±6.58
ปุ๋ย F2	65.22^{c}±6.90	166.63^{a}±1.87
ปุ๋ย F3	64.37^{c}±7.59	144.89^{b}±7.43

หมายเหตุ: ตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการจัดกลุ่มของค่าความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (*p*<0.05)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวชนาภรณ์ จาดตานิม
วัน เดือน ปีเกิด	15 กันยายน 2541
ที่อยู่ปัจจุบัน	163/4 หมู่ 1 ซอยสุวินทวงศ์ 12 ถนนสุวินทวงศ์ แขวงมีนบุรี เขตมีนบุรี กรุงเทพฯ 10510
ประวัติการศึกษา	(2564) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.45 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2567) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยวิจัยและทุนผู้ช่วยสอน (ระดับปริญญาโท) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตามสัญญาเลขที่ RA/TA-2564-M-016 ปีการศึกษา 2564
ผลงานทางวิชาการ	Jadtanim, C., Luong, T.T.H. and Poeaim, S*. (2025). Isolation and Characterization of a Promising Lignocellulolytic Enzyme Producer *Pseudolagarobasidium acaciicola* SL3-03 from Mangrove Soil in Thailand. Current Microbiology. 82(62). https://doi.org/10.1007/s00284-024-04029-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้