รายงานวิจัยและพัฒนาฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการใช้ไส้เดือนดินย่อยสลายกากของเสียจากโรงงานผลิตกระดาษทิชชู

สัญญาเลขที่ 41/2553

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ้งเอี่ยม

นายศุภศิลป์ ทวีศักดิ์

นายอนันธชัย ฉายแสง

นางสาวอนุชิดา พบพิมาย

มิถุนายน 2555

สนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยและพัฒนา

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ไส้เดือนดินต่อการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) จากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์จากการนำมูลของไส้เดือนดิน 3 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการเลือกจุลินทรีย์ของไส้เดือนดิน นำมาย่อยสารละลายเซลลูโลสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินทั้ง 3 สายพันธุ์ทดลองย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ต่างกัน คือ นำเชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตรและ 3 มิลลิลิตร ของไส้เดือนดิน 3 สายพันธุ์มาย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ปริมาณ 2 กรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler สามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ $1.11x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ $1.32x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินสายพันธุ์ Blue worm สามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ $0.60x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ $0.75x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินสายพันธุ์ Tiger worm สามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ $0.94x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ $1.06x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler มีประสิทธิภาพในการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษได้ดี จากนั้นนำไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler มาย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยนำไส้เดือนดินน้ำหนัก 1 กรัมมาย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษหนัก 2 กรัม พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าเท่ากับ 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : กากตะกอนเยื่อกระดาษ, เซลลูโลส, เอนไซม์เซลลูเลส, เชื้อจุลินทรีย์, ไส้เดือนดิน

ABSTRACT

This research aims to study a feasibility of using earth worms for degrading waste paper sludge from tissue paper industry. The procedure of this study includes selection of microorganisms from earth worm's faeces of three different earth worm species and cultivation it in agar. Then microorganisms are selected and are used for degrading cellulose solution at 24 hour duration. In addition, selected microorganisms from three different earth worms are used for degrading waste paper sludge, 1 ml and 3 ml of microorganism solution of each earth worm species are used for degrading 2 gram of waste paper sludge. The results have shown that glucose production in microgram/milliliter ($\mu g/ml$), after degrading the waste paper sludge are, $1.11x10^{-2}$ and $1.32x10^{-2}$ by African Night Crawler earth worm. While, $0.60x10^{-2}$ and $0.75x10^{-2}$ by Blue worm and $0.94x10^{-2}$ and $1.06x10^{-2}$ by Tiger worm. Thus, microorganisms from African Night Crawler earth worm is the most effective among three different earth worm species for degrading waste paper sludge. Furthermore, the African Night Crawler earth worm is used for degrading waste paper sludge, 1 g of the earth worm : 2 g of paper sludge is tested. The glucose produced is collected after a specific time and analyzed, 0.1 microgram/ milliliter.

Key words; waste paper sludge, cellulose, microorganism, earth worm

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานทางวิศวกรรมฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยได้รับความกรุณาและความปรารถนาดีจากอาจารย์ศุภศิลป์ ทวีศักดิ์ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานที่ให้คำปรึกษาและ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ้งเอี่ยม ที่ให้ข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงงาน จึงขอกราบของพระคุณท่านอาจารย์เป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงงาน ขอกราบขอบพระคุณผู้ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ในการจัดทำโครงงานฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงลงได้ ดังต่อไปนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไพลิน เงาตระการวิวัฒน์ และคณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือ แนะนำ แก้ไข ในการจัดทำโครงงานจนสมบูรณ์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำโครงงานนี้

บริษัท เบอร์ลี่ ยุคเกอร์ เซลล็อกซ์ จำกัด ในการสนับสนุนวัตถุดิบกากตะกอนเยื่อกระดาษสำหรับการวิจัย

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัยจาก ทุนอุดหนุนการวิจัย และพัฒนาคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สัญญาเลขที่ 41/2553

คณะผู้ทำโครงงานวิจัย

มหาวิทยาลัยบูรพา

มิถุนายน 2555

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูปภาพ	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการทำโครงงาน	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ทฤษฎี	3
2.1.1 กากตะกอนเยื่อกระดาษ	3
2.1.2 ลักษณะทางกายภาพของไส้เดือนดิน	6
2.1.3 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร (plate count)	15
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	21
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	21
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์การทดลอง	22
3.3 วิธีการทดลอง	24
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	29
4.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์จากมูลไส้เดือนดินที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส	29
4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลไส้เดือนดินในการย่อยสลายกาก ตะกอนเยื่อกระดาษ จากโรงงานอุตสาหกรรม	30
4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler ในการย่อยสลาย กากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	35

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยด้วยเอนไซม์	8
3.1	แสดงอัตราส่วนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	26
4.3	แสดงค่าความเข้มข้นของกลูโคสที่ย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler	32

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อไม้	4
2.2 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	5
2.3 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส	5
2.4 โครงสร้างทางเคมีของลินิน	6
2.5 การย่อยและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	7
2.6 ไส้เดือนดินสายพันธุ์อายซิเนีย ฟูทิดา	11
2.7 ไส้เดือนดินสายพันธุ์ยูดริลลัส ยูจีนิแอ	12
2.8 ไส้เดือนดินสายพันธุ์เพอริโอนีกซ์ เอกซ์คาวาตัส	13
2.9 ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของไส้เดือนดิน	15
2.10 ผนังร่างกายของไส้เดือนดิน	16
2.11 ภาพตัดตามขวางที่แสดงลักษณะโครงสร้างอวัยวะภายในของไส้เดือนดิน	18
2.12 การทำเจือจางเป็นลำดับและวิธี pour plate	19
2.13 แสดงวิธี pour plate	20
2.14 แสดงวิธีการ spread plate	20

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำ

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษในกระบวนการผลิตกระดาษมีการสูญเสียเยื่อกระดาษไปกับน้ำเสียกลายเป็นส่วนที่เรียกว่า กากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) ซึ่งเป็นเยื่อขนาดสั้นไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ใหม่ในกระบวนการผลิตต้องนำไปกำจัดโดยวิธีการฝังกลบซึ่งเป็นการเสียค่าใช้จ่ายที่สูง เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาต่อเนื่องกับสิ่งแวดล้อม วิธีการนำของเสียหรือวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการผลิตมาใช้ให้เกิดประโยชน์เช่น การนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงหรือผลิตพลังงานทดแทน การแปรรูปเป็นปุ๋ย อาหารสัตว์ เป็นแนวคิดที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เพราะนอกจากจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียแล้ว ยังเป็นการควบคุมไม่ให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมและยังเป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ในต่างประเทศมีการใช้ไส้เดือนดินเพื่อย่อยสลายขยะชุมชน หรือมูลสัตว์ต่างๆมานานแล้ว เนื่องจากเล็งเห็นว่าไส้เดือนดินเป็นสัตว์ที่ลงทุนไม่มากในการเลี้ยง แต่ให้ผลประโยชน์ตอบแทนกลับมาสูง และไส้เดือนดินเป็นสัตว์ที่มีการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วถ้าอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Mertus, 1993)

จากปัญหาดังกล่าวจึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะแก้ไขปัญหาในเรื่องของการนำกากตะกอนเยื่อกระดาษไปจัดการ โดยการใช้ไส้เดือนดินเนื่องจากไส้เดือนดินกินอาหารที่เป็นสารอินทรีย์ที่เริ่มเน่าเปื่อยโดยเฉพาะกากตะกอนเยื่อกระดาษซึ่งส่วนใหญ่เป็นเส้นใยเซลลูโลส โดยจะเริ่มจากการศึกษาไส้เดือนดินซึ่งในประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากไส้เดือน 3 ชนิด ได้แก่ Eisenia foetida, Eudrilus eugeniae และ Perionyx excavates โดยขั้นแรกจะทำการดูประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในมูลไส้เดือนดินแต่ละชนิดว่าจุลินทรีย์ที่มาจากไส้เดือนดินชนิดใดจะมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด จากนั้นทำการนำเอาไส้เดือนดินทั้ง 3 ชนิด มาทำการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ ซึ่งในโครงการนี้จะเป็นแนวทางในการนำไส้เดือนดินมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและด้านอื่นๆ เพื่อแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไส้เดือนดินมาย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) จากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

1. กากตะกอนเยื่อกระดาษ จาก บริษัท เบอร์ลี่ ยุคเกอร์ เซลล็อกซ์ จำกัด
2. ไส้เดือนดิน 3 สายพันธุ์คือ Eisenia foetida, Eudrilus eugeniae, Perionyx excavatus แต่ละสายพันธุ์ช่วงอุณหภูมิจะอยู่ที่ 25 – 35 °C ค่า pH 4.7 – 8.0 ความชื้น 70 – 90 %

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบชนิดของไส้เดือนดินที่มีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) จากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ
2. ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) จากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษโดยไส้เดือนดิน

บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 ทฤษฎี

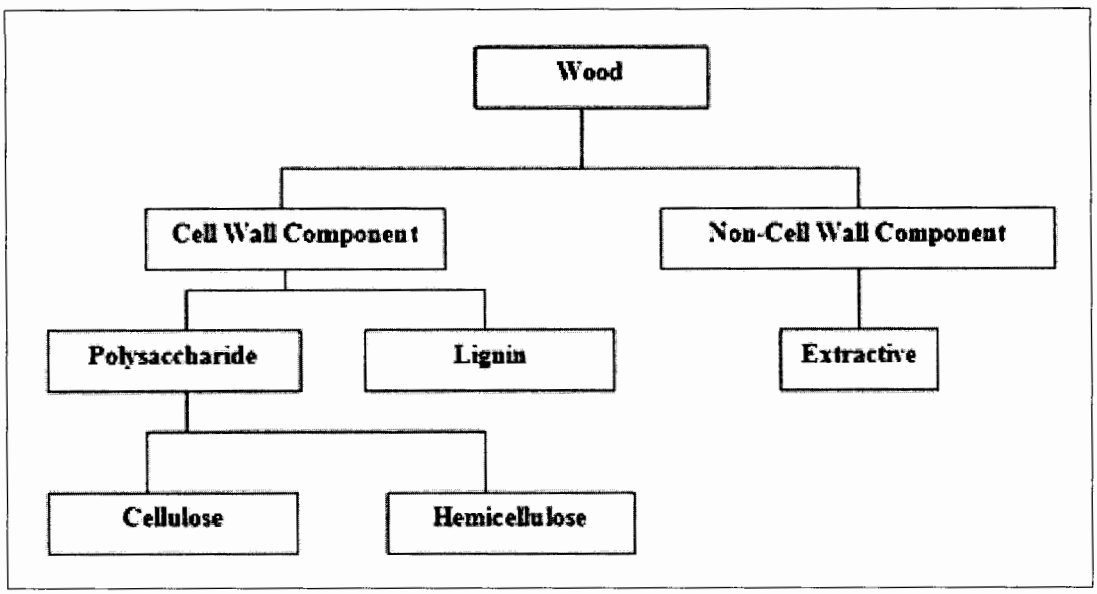
2.1.1 กากตะกอนเยื่อกระดาษ

กากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) จากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการผลิตกระดาษชนิดต่างๆ องค์ประกอบสำคัญในกากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) จากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ กระดาษสามารถยึดตัวเป็นแผ่นได้เกิดจากเส้นใยเป็นจำนวนมากสานกันอย่างไม่เป็นระเบียบเส้นใยดังกล่าวโดยทั่วไปจะใช้เส้นใยจากธรรมชาติจากพืชอาจมีการใช้เส้นใยจากสัตว์หรือจากแร่ก็ได้(C.Elvirs.1996) นอกจากนี้ยังมีการใช้เส้นใยสังเคราะห์ เช่นพวกพอลิเอไมด์ (Polyamide) ซึ่งช่วยทดแทนการใช้เส้นใยจากธรรมชาติและเพื่อเป็นการใช้ทรัพยากรได้คุ้มค่าประกอบกับการลดต้นทุนของกระดาษได้มีการนำกระดาษใช้แล้วมาใช้ในการผลิตกระดาษอีกครั้งหนึ่งเยื่อที่ได้จากกระดาษที่ใช้แล้วจะมีความขาวและความแข็งแรงต่ำลงเนื่องจากต้องผ่านขบวนการที่กำจัดสิ่งปนเปื้อนมาด้วย

เส้นใยจากพืชที่เป็นตัวหลักของกระดาษ ทำมาจากไม้เนื้ออ่อน เช่น ต้นสน ต้นยูคาลิปตัส ซึ่งมีเส้นใยยาวช่วยให้กระดาษมีความแข็งแรงและเหนียวและมีการนำไม้เนื้อแข็งจำพวกต้นโอ๊ก ต้นเมเปิลมาใช้ทำเส้นใยซึ่งจะได้เส้นใยที่สั้นกว่าแต่ช่วยทำให้ผิวกระดาษเรียบและทึบแสงมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการนำพืชล้มลุก เช่นต้นกก ปอกระเจา อ้อย ฝ้าย มาใช้ทำเยื่อกระดาษเส้นใยจะประกอบด้วยเซลลูโลส (Cellulose) ซึ่งเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาเรียงต่อกันกับเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ซึ่งเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างโมเลกุลของกลูโคสและน้ำตาลอื่น ๆ เช่น แมนโนส (Mannose) ฟูโคส (Fucose) ไซโลส (Xylose) มาต่อกันเส้นใยยังมีส่วนที่เป็นลิกนิน (Lignin) ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมเส้นใยให้อยู่ด้วยกันในขบวนการผลิตกระดาษลิกนินจะถูกขจัดออกจากเยื่อกระดาษหากมีลิกนินเหลืออยู่ในกระดาษจะทำให้กระดาษเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อได้รับแสง (ปรีชา, 2528)

องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อไม้

เนื้อไม้ประกอบด้วยสารประกอบต่างๆ ซึ่งจะแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยที่สำคัญได้ ดังรูปที่ 2.1

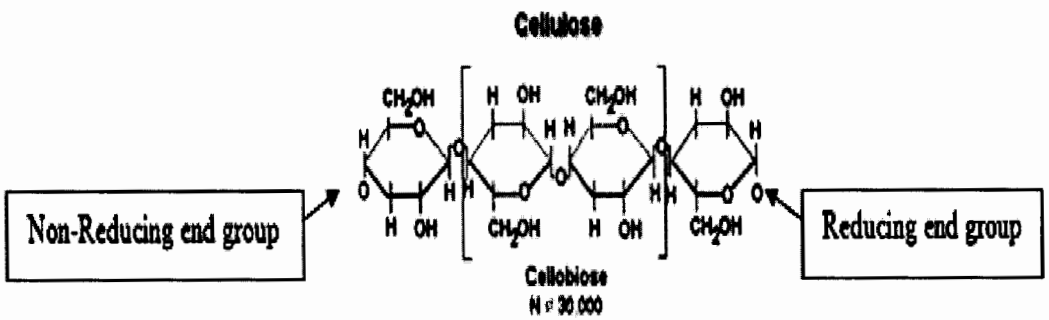


รูปที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อไม้ (ปรีชา, 2528)

เซลลูโลส (Cellulose)

ก) เป็นสารประกอบที่มีมากที่สุดของเนื้อไม้คือประมาณ 40% ทั้งในไม้ใบแคบหรือไม้ตระกูลสน (Softwood) และไม้ใบกว้าง (Hardwood) มีโครงสร้างอัดกันแน่นเป็นเส้นตรงไม่มีกิ่ง

ข) สูตรโครงสร้างทางเคมี $(C_6H_{10}O_5)n$ จะซ้ำกันใน 2 ลักษณะเรียกว่า Cellobiose unit ซึ่งส่วนปลายของทั้งสองข้าง คือ Reducing end group (C1) ส่วนที่ทำปฏิกิริยาได้ง่ายสุดและ Non-Reducing end group (C4) ส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาแสดงดังรูป 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส (ปรีชา, 2528)

ค) จำนวนโมเลกุลของ Glucose Unit (DP = Degree of Polymerization) เท่ากับ 1000-3000 หรือ 4000

ง) แต่ละ Unit ยึดเกาะกันด้วยพันธะ “1, 4-B-D-anhydroglucosidic bonding”

จ) เซลลูโลสจะไม่ละลายในน้ำตัวทำละลายอินทรีย์สะเทิน (Neutral organic solvent) เช่น เบนซีน แอลกอฮอล์และอีเทอร์ เป็นต้น แต่จะละลายได้ดีในกรดเกลือและกรดกำมะถันเข้มข้น

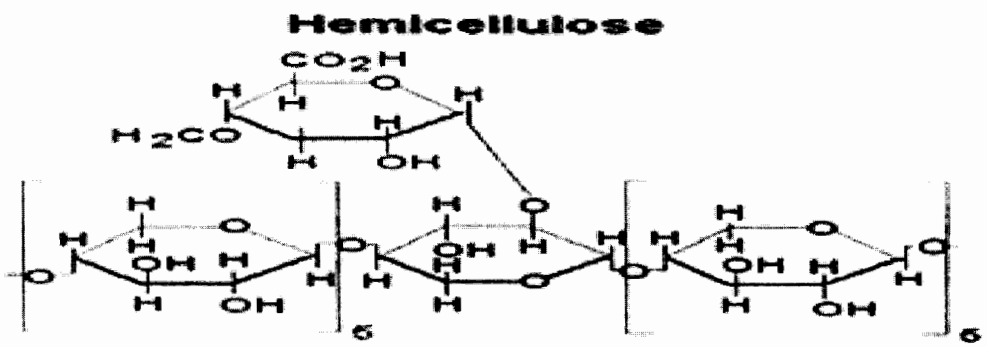
ฉ) เซลลูโลสเมื่อนำไปทำปฏิกิริยาทางเคมีเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามารถผลิตพลาสติก น้ำตาล เจล ฟิล์มเส้นใยชนิดใหม่สารเคลือบระเบิด เป็นต้น

<u>เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)</u>

ก) ไม้ในไม้ใบแคบหรือไม้ตระกูลสน (softwood) จะพบประมาณ 25-30% ส่วนในไม้ใบกว้าง (hardwood) มีประมาณ 30-35%

ข) เป็นโมเลกุลขนาดเล็กสีขาว

ค) มีโครงสร้างลักษณะเป็นกิ่งจับกันอยู่แบบหลวมๆแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส (ทรงกลด, 2528)

ง) ประกอบด้วยน้ำตาล 5 ชนิด และกรดบางชนิด คือ

Hexoses (จำนวน C = 6) : glucose,mannose, galactose

Pentose (จำนวน C = 5) : xylose, arabinose

Acid : 4-O-methyl-D glucuronic acid มีสูตรโครงสร้าง

ลิกนิน (Lignin)

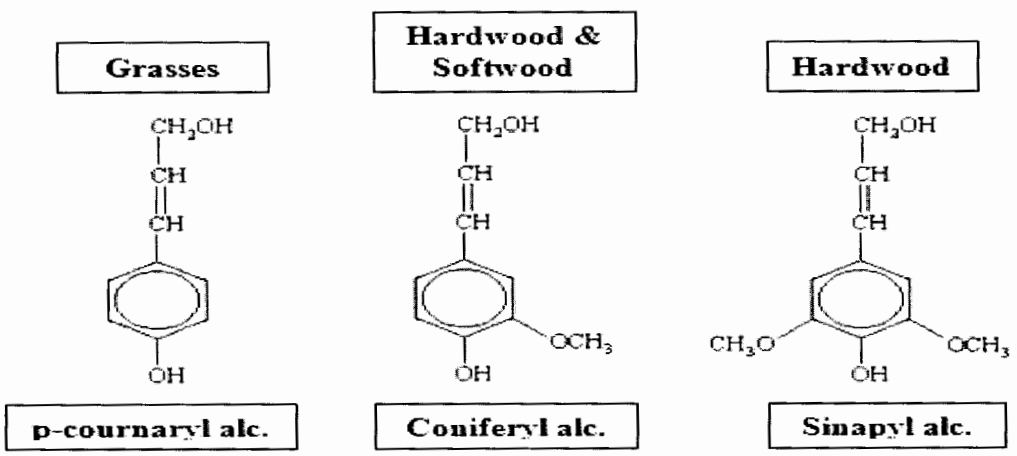
ก) เป็นสารประกอบที่มีมากรองจากเซลลูโลสในไม้ใบแคบหรือไม้ตระกูลสน (softwood) จะมีลิกนินประมาณ 25-30% ส่วนในไม้ใบกว้าง (hardwood) มีลิกนินประมาณ 20-25%

ข) โมเลกุลใหญ่ค่า Glucose Unit (DP = Degree of Polymerization) เยอะลักษณะโครงสร้างเป็น 3 มิติ

ค) ทำหน้าที่เป็น cell wall adhedsive ยึดเส้นใยที่อยู่รวมกันให้เป็นโครงสร้างของเนื้อไม้

ง) สามารถพบลิกนินในผลบาสท์ (bast), pith, เปลือก(bark)

จ) เป็นสารโพลิเมอร์ที่ซับซ้อนกว่า cellulose กับ hemicellulose และเป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ชนิดหนึ่งพบในไม้ใบกว้าง (hardwood), ไม้ใบแคบ(softwood), พืชล้มลุก (grasses) และพืชชั้นต่ำทั่วๆไปแต่ไม่พบใน lichens, mosses, fungi, mushrooms แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของลิกนิน (ทรงกลด, 2528)

2.1.2 ลักษณะทางกายภาพของไส้เดือนดิน

ไส้เดือนดินจัดอยู่ในอาณาจักรสัตว์ (Animalia) ศักดิ์แอนนิลิดา (Phylum : Annelida) ชั้นโอลิโกซีตา (Class : Oligochaeta) ตระกูลโอพิสโธโพรา (Order : Opisthopora) สำหรับวงศ์ (Family)ของไส้เดือนดินนั้นมีนักวิทยาศาสตร์ท่านได้จัดจำแนกออกเป็นจำนวนวงศ์ที่แตกต่างกันออกไป และจากการจำแนกสายพันธุ์ไส้เดือนดินล่าสุดโดย Renolds and Cook (1993)ได้จัดจำแนกไส้เดือนดินที่อยู่ในตระกูลโอพิสโธโพราทั้งหมดออกเป็น 21วงศ์ (Renolds and Cook, 1993)

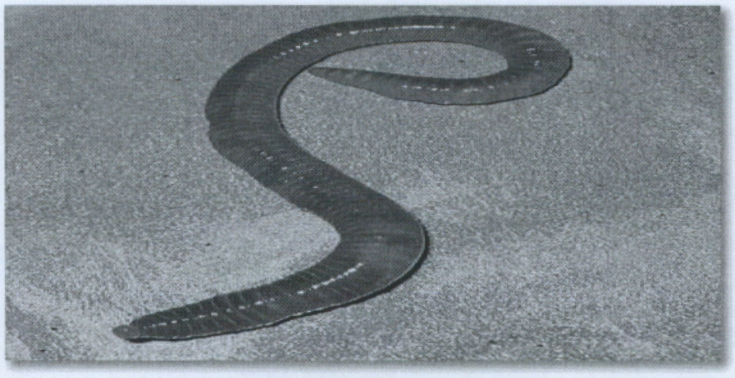
วิธีการจัดจำแนกไส้เดือนดินอย่างง่ายสามารถสังเกตได้จาก 1.ขนาดและความยาวของลำตัว 2.สีหรือแถบสีของลำตัว 3.แหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารในลำดับแรกจะแบ่งกลุ่มไส้เดือนเป็น 2 กลุ่มใหญ่ก่อนเป็นไส้เดือนดินสีแดงและไส้เดือนดินสีเทาแล้วจึงพิจารณาถึงขนาดความยาวของลำตัว ถิ่นที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของไส้เดือนดินในลำดับถัดไป (Piearce, 1972) ในปัจจุบันมีการจำแนกไส้เดือนดินทั่วโลกได้ 4,000 กว่าชนิดสายพันธุ์ที่นำมาใช้กำจัดขยะอินทรีย์ทางการค้ามีประมาณ 15 ชนิดส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของ Megadrili ในวงศ์ Lumbricidae ซึ่งอาศัยอยู่ในขยะอินทรีย์และมูลสัตว์ เช่น สายพันธุ์ Lumbricus rubellus, Eisenia foetida, Eudrilus eugeniae, Pheretima peguana, Perionyx excavates เป็นต้น

<u>สายพันธุ์ไส้เดือนดินที่เลือกใช้ในการทดสอบ</u>

ก) อายซิเนีย ฟูทิดา (Eisenia foetida) ชื่อสามัญ The Tiger worm, Manure Worm, Compost Worm ไส้เดือนดินสายพันธุ์ อายซิเนีย ฟูทิดา เป็นไส้เดือนสีแดงที่มีลำตัวกลมขนาดเล็กลำตัวมีสีแดงสดเห็นปล้องแต่ละปล้องแบ่งอย่างชัดเจนสามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้รวดเร็วและมีกลิ่นตัวที่รุนแรงซึ่งมีลักษณะทั่วไปดังนี้

- ลำตัวมีขนาด 35-130 x 3-5 มิลลิเมตร
- ลำตัวมีสีแดงร่องระหว่างปล้องและบริเวณปลายหางมีสีเหลือง
- มีอายุยืนยาว 4-5 ปี แต่มักจะอยู่ได้ 1-2 ปี เมื่อเลี้ยงภายในบ่อ
- สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ
- สร้างถุงไข่ได้โดยเฉลี่ยประมาณ 150-198 ถุง/ตัว/ปี
- ใช้เวลาในการฟักเป็นตัวประมาณ 32-40 วัน(ขึ้นอยู่กับฤดูกาล) โดยเฉลี่ยฟัก 3 ตัว/ถุง/ไข่
- ใช้เวลาในการเติบโตเต็มวัย 3-6 เดือน (ขึ้นอยู่กับฤดูกาล)
- อาศัยอยู่บริเวณผิวดินกินเศษซากอินทรียวัตถุที่เน่าสลายและมีอนุภาคขนานเล็กแสดงดัง

รูปที่ 2.6



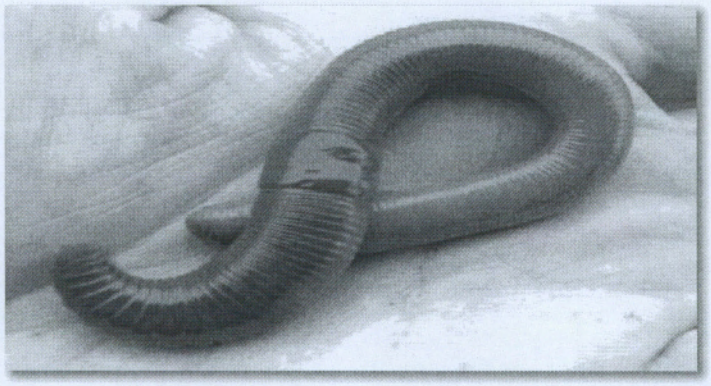
รูปที่ 2.6 แสดงไส้เดือนดินสายพันธุ์อายซิเนีย ฟูทิดา (THA, 2010)

โดยทั่วไปประเทศในแถบยุโรปและอเมริกาส่วนมากมักจะใช้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ Eisenia foetida หรือสายพันธุ์ใกล้เคียงกันคือ สายพันธุ์ Eisenia Andrei ในการกำจัดขยะอินทรีย์ซึ่งมีหลายเหตุผลที่ทำให้เลือกใช้ไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้ คือไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่มีอยู่ทั่วไปในบริเวณที่มีขยะอินทรีย์อยู่โดยพวกมันจะสร้างกลุ่มและเจริญเติบโตอยู่ในกองขยะอินทรีย์เหล่านั้นและมีความทนทานต่อช่วงอุณหภูมิที่กว้างและสามารถดำรงชีวิตอยู่ในขยะอินทรีย์ที่มีความชื้นได้หลายระดับ โดยรวมแล้วจะเป็นไส้เดือนดินสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมดีมากและเลี้ยงง่ายเหมาะสมในการนำมาเลี้ยงในขยะอินทรีย์ได้หลายชนิดที่ปะปนกันและพบว่าเมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไส้เดือนดินสายพันธุ์อื่นภายในฟาร์มพบว่าจะมีความทนทานมากกว่าไส้เดือนดินสายพันธุ์อื่นๆ (V.K.Garg,Priya.2004)

ข) ยูดริลลัส ยูจีนิแอ (Eudrilus eugeniae) ชื่อสามัญ African Night Crawler ไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler มีขนาดลำตัวค่อนข้างใหญ่เคลื่อนที่ได้รวดเร็วและไต่ขึ้นขอบบ่อได้เก่งมากไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้ความเหมาะสมมากในการนำมาผลิตเป็นโปรตีนสำหรับเลี้ยงสัตว์เนื่องจากมีขนาดใหญ่และมีอัตราการแพร่พันธุ์ได้สูงมาก แต่มีข้อเสียตรงที่ไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้ไม่ค่อยทนทานเลี้ยงยากและเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ยากด้วยไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการย่อยสลายขยะในปริมาณมากได้อย่างรวดเร็วชอบอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง เจริญเติบโตได้ไม่ดีในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 16 องศาเซลเซียสและจะตายในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเลี้ยงไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้ในประเทศเขตหนาวจะถูกจำกัดการเลี้ยงเฉพราะภายในโรงเรือนที่มีการควบคุมอุณหภูมิ

- ลำตัวมีขนาด 130-250 x 5-8 มิลลิเมตร
- ลำตัวมีสีน้ำตาลแดงปนเทา
- สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ

- จับคู่ผสมพันธุ์ใต้ดิน
- สร้างถุงไข่ได้โดยเฉลี่ยประมาณ 162-188 ถุง/ตัว/ปี
- ใช้เวลาในการฟักเป็นตัวประมาณ 13-27 วัน โดยเฉลี่ยฟัก 2 ตัว/ถุงไข่
- ใช้เวลาในการเติบโตเต็มวัย 6-10 เดือน
- อาศัยอยู่บริเวณผิวดินกินเศษซากอินทรียวัตถุที่เน่าสลายเป็นอาหาร
- มีอายุยืนยาว 4-5 ปี แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงไส้เดือนดินสายพันธุ์ยูดริลลัส ยูจีนิแอ (THA, 2010)

ค) เพอริโอนีกซ์ เอกซ์คาวาตัส (Perionyx excavatus) ชื่อสามัญ Blue worm ไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้เป็นไส้เดือนดินในเขตร้อนซึ่งขยายพันธุ์ได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายเหมือนกับไส้เดือนดินสายพันธุ์ Eisenia foetida และในการเก็บเกี่ยวผลผลิตหรือแยกไส้เดือนดินออกจากปุ๋ยหมักได้ง่ายมากแต่มีข้อเสีย คือมีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เหมาะสมได้ค่อนข้างต่ำ สำหรับการเลี้ยงไส้เดือนสายพันธุ์นี้ในเขตหนาวแต่ในสภาพเขตร้อนจะเหมาะสมมากสำหรับการเลี้ยงไส้เดือนดินสายพันธุ์นี้เนื่องจากเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่พบได้ทั่วไปในเอเชีย และมีการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินในประเทศฟิลิปปินส์และออสเตรเลียในประเทศไทยไส้เดือนดินที่พบและได้รับการจำแนกแล้วมีดังต่อไปนี้ Pheretima peguana เป็นไส้เดือนแดงพบได้ทั่วไป Pheretima posthuma แสดงดังรูปที่ 2.8

รูปที่ 2.8 แสดงไส้เดือนดินสายพันธุ์เพอริโอนีกซ์ เอกซ์คาวาตัส (THA, 2010)

ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของไส้เดือนดิน

ลักษณะภายนอกที่เด่นชัดของไส้เดือนดินคือการที่มีลำตัวเป็นปล้องตั้งแต่ส่วนหัวจนถึงส่วนท้าย มีรูปร่างเป็นรูปทรงกระบอก มีความยาวในแต่ละชนิดไม่เท่ากันเมื่อโตเต็มที่จะมีปล้องประมาณ 120 ปล้อง แต่ละปล้องจะมีเดือยเล็กๆ เรียงอยู่โดยรอบปล้องไม่มีส่วนหัวที่ชัดเจนไม่มีตา มีไคลเทลลัมซึ่งจะเห็นได้ชัดในระยะสืบพันธุ์และยังประกอบด้วยอวัยวะต่างๆที่สำคัญ ดังนี้ (Agarwal.1958)

ก) พรอสโตเมียม (Prostomium) มีลักษณะเป็นพูเนื้อที่ยืดหดได้ติดอยู่กับผิวด้านบนของช่องปากเป็นตำแหน่งหน้าสุดของไส้เดือนดินทำหน้าที่คล้ายริมฝีปากไม่ถือว่าเป็นปล้องมีหน้าที่สำหรับกวาดอาหารเข้าปาก

ข) เพอริสโตเมียม (Peristomium) ส่วนนี้นับเป็นปล้องแรกของไส้เดือนดินมีลักษณะเป็นเนื้อบางๆ อยู่รอบช่องปากและยืดหดได้

ค) ช่องปาก อยู่ในปล่องที่ 1-3 เป็นช่องทางเข้าออกของอาหารเข้าสู่ร่างกายซึ่งจะมีต่อมน้ำลายอยู่ในเยื่อบุช่องปากด้วย

ง) เดือยหรือขน (Setae) จะมีลักษณะเป็นขนแข็งสั้นซึ่งเป็นสารพวกไคตินที่งอกออกมาบริเวณผนังชั้นนอกสามารถยืดหดหรือขยายได้เดือยนี้มีหน้าที่ในการช่วยเรื่องการยึดเกาะและเคลื่อนที่ของไส้เดือนดิน

จ) ช่องเปิดกลางหลัง (Dorsal pore) เป็นช่องเปิดขนาดเล็กตั้งอยู่ในร่องระหว่างปล้องบริเวณแนวกลางหลังสามารถพบช่องเปิดชนิดนี้ได้ในไส้เดือนดินเกือบทุกชนิดยกเว้นไส้เดือนจำพวกที่อาศัยอยู่ในน้ำหรือกึ่งน้ำในร่องระหว่างปล้องแรกๆ บริเวณส่วนหัวจะไม่ค่อยพบช่องเปิด

ด้านหลังช่องเปิดดังกล่าวจะเชื่อมต่อกับช่องภายในลำตัวและของเหลวในช่องลำตัวมีหน้าที่ขับของเหลวหรือเมือกภายในลำตัวออกมาช่วยลำตัวภายนอกชุ่มชื่นป้องกันการระคายเคืองทำให้เคลื่อนไหวง่าย

ฉ) รูขับถ่ายของเสีย (Nephridiopore) เป็นรูที่มีขนาดเล็กมากสังเกตเห็นได้ยากเป็นรูสำหรับขับของเสียออกจากร่างกายเป็นรูเปิดภายนอกซึ่งมีอยู่เกือบทุกปล้องยกเว้น 3-4 ปล้องแรก

ช) ช่องสืบพันธุ์เพศผู้ (Male pore) เป็นช่องสำหรับปล่อยสเปิร์มจะมีอยู่ 1 คู่ ตั้งอยู่บริเวณลำตัวด้านท้องหรือข้างท้องในแต่ละสายพันธุ์ช่องสืบพันธุ์อยู่ในปล้องที่ไม่เหมือนกันมีลักษณะเป็นแอ่งคล้ายหลอดเล็กยาวเข้าไปภายใน

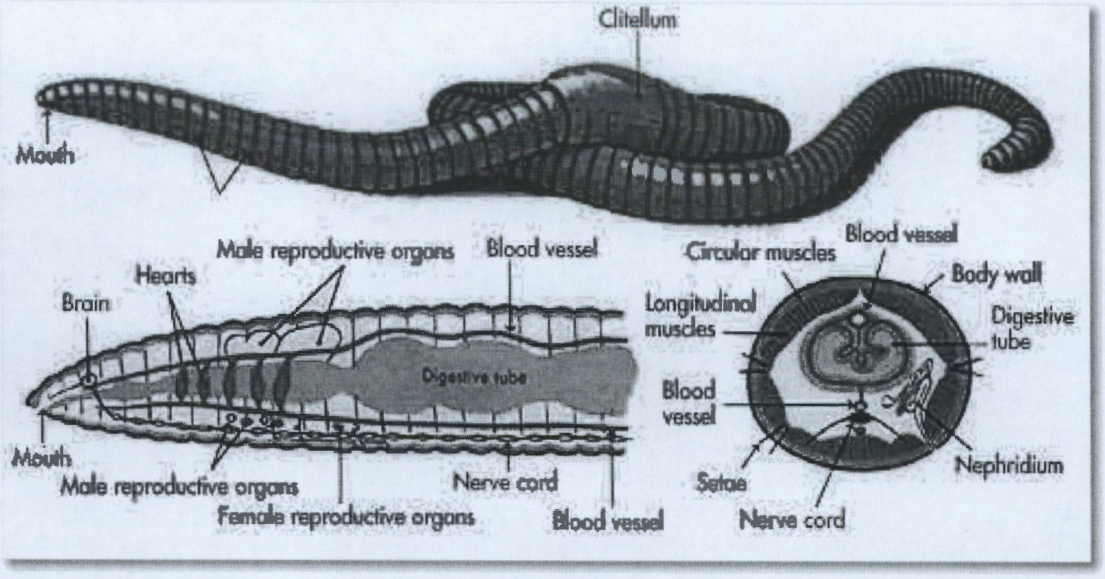
ซ) ช่องสืบพันธุ์เพศเมีย (Female pore) เป็นช่องสำหรับออกไข่ โดยทั่วไปมักตั้งอยู่ในปล้องถัดจากปล้องที่มีรังไข่ (avary) มักจะพบเพียง 1 คู่ ตั้งอยู่ในร่องระหว่างปล้องหรือบนปล้อง ตำแหน่งที่ตั้งมักจะแตกต่างกันในไส้เดือนแต่ละพันธุ์

ฌ) ช่องเปิดสเปิร์มมาทีกา (Spermathecal porse) เป็นช่องรับสเปิร์มจากไส้เดือนดินคู่ผสมอีกตัวหนึ่งขณะมีการผสมพันธุ์แลกเปลี่ยนสเปิร์มซึ่งกันและกันเมื่อรับสเปิร์มแล้วจะนำไปเก็บไว้ในถุงเก็บสเปิร์ม (Seminal receptacle)

ญ) ปุ่มยึดสืบพันธุ์ (Genital papilla) เป็นอวัยวะที่ช่วยในการยึดเกาะขณะที่ไส้เดือนดินจับคู่ผสมพันธุ์กัน

ฎ) ไคลเทลลัม (Clitellum) เป็นอวัยวะที่ใช้ในการสร้างไข่ขาวหุ้มไข่และสร้างเมือกโคคูน ไคลเทลลัมจะพบในไส้เดือนดินที่โตเต็มไวพร้อมที่ผสมพันธุ์แล้วเท่านั้น โดยจะตั้งอยู่บริเวณปล้องด้านหน้าใกล้กับส่วนหัวครอบคลุมปล้องตั้งแต่ 2-5 ปล้อง

ฏ) ทวารหนัก (Anus) เป็นรูเปิดที่ค่อนข้างแคบเปิดออกในปล้องสุดท้าย ซึ่งใช้สำหรับขับกากอาหารที่ผ่านการย่อยและดูดซึมแล้วออกนอกลำตัว แสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของไส้เดือนดิน (THA, 2010)

<u>โครงสร้างภายในของไส้เดือนดิน</u>

ผนังร่างกายของไส้เดือนดินประกอบด้วย ชั้นนอกสุดคือ คิวติเคิลและถัดลงมาคือ ชั้นอิพิเดอร์มิส ชั้นเนื้อเยื่อประสาท ชั้นกล้ามเนื้อตามขวางและชั้นกล้ามเนื้อตามยาวและถัดจากชั้นกล้ามเนื้อตามยาวจะเป็นเนื้อเยื่อเพอริโตเนียม ซึ่งเป็นเยื่อบุที่กั้นผนังร่างกายจากช่องภายในลำตัว

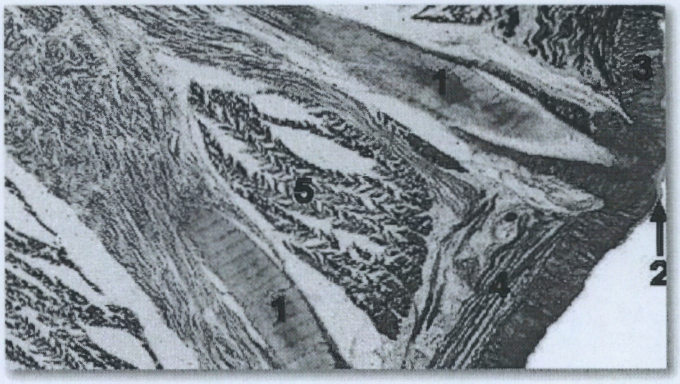
ชั้นคิวติเคิล (Cuticle) เป็นชั้นที่บางที่สุดเป็นชั้นที่ไม่มีเซลล์ไม่มีสีและโปร่งใส ประกอบด้วยคิวติเคิล 2 ชั้นหรือมากกว่าแต่ละชั้นประกอบด้วยเส้นใยโปรตีนคอลลาจีเนียสที่สานเข้าด้วยกันและมีชั้นของโฮโมจีเนียสจำนวนมากนอกจากนี้ยังมีโพลีแซคคาไรด์และมีเจลลาตินเล็กน้อยในชั้นคิวติเคิลจะมีบริเวณที่บางที่สุดคือ บริเวณที่มีอวัยวะรับความรู้สึกซึ่งบริเวณนี้จะมีรอยบุ๋มของรูขนขนาดเล็กมากมายและมีขนละเอียดออกมาจากรูดังกล่าวเป็นเซลล์รับความรู้สึก

ชั้นอิพิเดอร์มิส (Epidermis) คือเซลล์ชั้นเดียวที่เกิดจากเซลล์หลายชนิดที่แตกต่างกันรวมเข้าด้วยกันซึ่งประกอบด้วยเซลล์ค้ำจุนที่มีรูปร่างเป็นแท่งและเซลล์ต่อมโดยเซลล์ค้ำจุนเป็นเซลล์โครงสร้างหลักของชั้นอิพิเดอร์มิสที่มีรูปร่างเป็นแท่งเซลล์แท่งดังกล่าวนอกจากเป็นเซลล์โครงสร้างค้ำจุนแล้วยังเป็นเซลล์ที่สร้างสารคิวติเคิลให้กับชั้นคิวติเคิลด้วย สำหรับเซลล์ต่อมจะมีอยู่ 2 แบบ คือเซลล์เมือก Goblet cell และเซลล์ต่อมไข่ขาว (Albumen cell) โดยเซลล์ขับเมือกเหล่านี้จะขับเมือกผ่านไปยังผิวคิวติเคิลเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำระเหยออกจากตัว ทำให้ลำตัวชุ่มชื่นและเคลื่อนไหวในดินได้สะดวกและทำให้ออกซิเจนละลายในบริเวณผนังลำตัวได้และยังมีกลุ่มเซลล์รับ

ความรู้สึกรวมกันเป็นกลุ่มแทรกตัวอยู่ระหว่างเซลล์ค้ำจุน ซึ่งจะทำหน้าที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นของการสัมผัสสิ่งต่างๆ

ชั้นกล้ามเนื้อเส้นรอบวง (Circular muscle) เป็นชั้นกล้ามเนื้อที่ถัดจากชั้นอิพิเดอร์มิส ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อที่ขยายรอบๆ ลำตัวของไส้เดือนดินยกเว้นบริเวณตำแหน่งร่องระหว่างปล้องจะไม่มีเส้นใยกล้ามเนื้อนี้อยู่เส้นใยกล้ามเนื้อตามเส้นรอบวงจะมีการจัดเรียงเส้นใยเป็นเป็นระเบียบกลายเป็นกลุ่มเส้นใยโดยเส้นใยแต่ละกลุ่มจะถูกล้อมรอบด้วยแผ่นเนื้อเยื่อเชื่อมต่อรวมกลุ่มเส้นใยแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกันเป็นมัดกล้ามเนื้อ

ชั้นกล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle) อยู่ใต้ชั้นกล้ามเนื้อตามขวางมีความหนามากกว่ากล้ามเนื้อรอบวงโดยกล้ามเนื้อชั้นในจะเรียงตัวเป็นกลุ่มลักษณะคล้ายบล็อกรอบลำตัวและยาวต่อเนื่องตลอดลำตัว (VCH, 2006) แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงผนังร่างกายของไส้เดือนดิน (VCH, 2006)

1. ขนแข็ง (Setae)
2. ชั้นคิวติเคิล (Cuticle)
3. ชั้นอิพิเดอร์มิส (Epidermis)
4. ชั้นกล้ามเนื้อเส้นรอบวง (Circular muscle)
5. ชั้นกล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle)

<u>ระบบย่อยอาหาร</u>

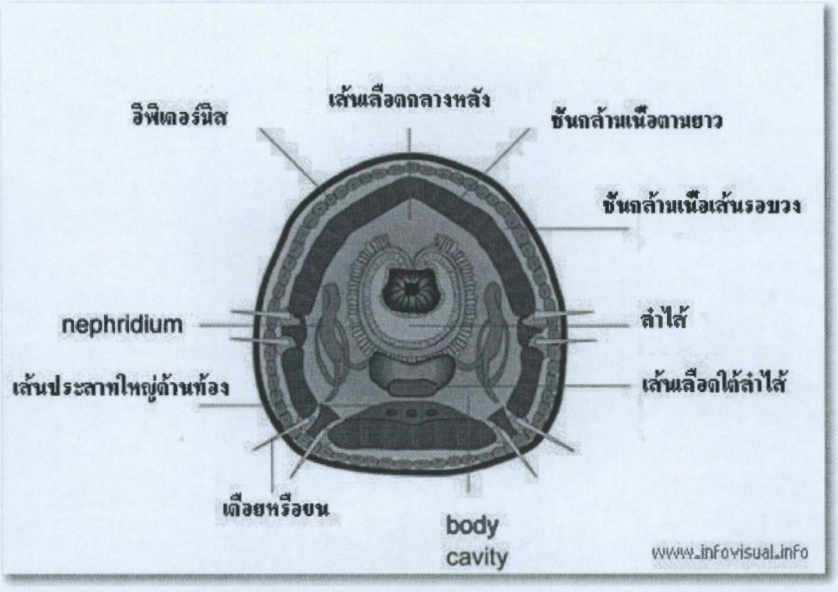
ทางเดินอาหารของไส้เดือนดินมีรูปร่างเป็นหลอดตรงธรรมดาที่เชื่อมต่อจากปากในช่องแรกยาวไปจนถึงทวารซึ่งประกอบด้วยอวัยวะดังนี้

ก) ปาก (Mouth) อยู่ใต้ริมฝีปากบนเป็นทางเข้าของอาหารนำไปสู่ช่องปากซึ่งจะเป็นบริเวณที่มีต่อมน้ำลายผลิตสารหล่อลื่นอาหารที่กินเข้าไปช่องปากจะอยู่ในปล้องที่ 1- 3

ข) คอหอย (Pharynx) เป็นกล้ามเนื้อที่หนา และมีต่อมขับเมือก ตั้งอยู่ระหว่างปล้องที่ 3 ถึงปล้องที่ 6 ไส้เดือนดินใช้คอหอยในการดูดอาหารต่างๆ เข้าปากโดยการหดตัวของกล้ามเนื้อซึ่งจะทำให้เกิดแรงดึงดูดให้อนุภาคอาหารภายนอกผ่านเข้าไปในปาก

ค) หลอดอาหาร (Esophagus) อยู่ระหว่างปล้องที่ 6 ถึงปล้องที่ 14 มีต่อมแคลซิเฟอรัส ช่วยดึงไอออนของแคลเซียมจากดินที่ปนมากับอาหารจำนวนมากนำเข้าสู่ทางเดินอาหารเพื่อไม่ให้แคลเซียมในเลือดมากเกินไปเฉพาะพวกที่กินอาหารที่มีดินปนเข้าไปมากๆ เท่านั้นจึงจะมีต่อมแคลซิเฟอรัสต่อจากหลอดอาหารจะพองโตออกเป็นหลอดพักอาหารมีลักษณะเป็นถุงผนังบางๆและกึ๋นซึ่งเป็นกล้ามเนื้อที่แข็งแรงและทำหน้าที่บดอาหารให้ละเอียดเพื่อส่งต่อไปยังลำไส้

ง) ลำไส้ (Intestine) มีลักษณะเป็นท่อตรงที่เริ่มจากปล้องที่ 14 ไปถึงทวารหนักผนังลำไส้ของไส้เดือนดินค่อนข้างบางและผนังลำไส้ด้านบนจะพับเข้าไปข้างในช่องทางเดินอาหารเรียกว่า Typhlosole ทำให้มีพื้นที่ในการย่อยและดูดซึมอาหารได้มากขึ้นโดยสำหรับไส้เดือนน้ำจืดไม่มี Typhlosole ผนังลำไส้ประกอบด้วยชั้นต่างๆ คือเยื่อบุช่องท้องวิสเซอรอลอยู่ชั้นนอกสุดของลำไส้ติดกับช่องลำตัวเซลล์บางเซลล์บนเยื่อนี้จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์พิเศษเรียกว่า เซลล์คลอราโกเจน ทำหน้าที่คล้ายตับของสัตว์ชั้นสูงคือสังเคราะห์และสมสมสารไกลโคเจน ไขมัน โดยเซลล์ไขมันในเนื้อเยื่อคลอราโกเจนที่มีขนาดโตเต็มที่จะหลุดออกมาอยู่ในช่องลำตัวเรียกว่า Eleocytes ซึ่งจะกระจายไปยังอวัยวะต่างๆและยังมีหน้าที่รวบรวมของเสียจากเลือดและของเหลวในช่องลำตัวโดยเป็นตัวดึงกรดอะมิโนออกจากโปรตีนสกัดแอมโมเนีย ยูเรีย และสกัดสารซิลิกาออกจากอาหารที่กินเข้าไปแล้วขับถ่ายออกนอกร่างกายทางรูขับถ่ายของเสียหรือเนฟริเดีย ถัดจากเยื่อบุช่องท้องวิสเซอรอลจะเป็นชั้นของกล้ามเนื้อโดยกล้ามเนื้อในลำไส้ของไส้เดือนดินประกอบด้วยกล้ามเนื้อ 2 ชั้นคือชั้นในเป็นกล้ามเนื้อเส้นรอบวงและชั้นนอกเป็นกล้ามเนื้อตามยาวซึ่งสลับกันกับกล้ามเนื้อของผนังร่างกายและชั้นในสุดของลำไส้จะเป็นเยื่อบุลำไส้ซึ่งประกอบด้วยเซลล์รูปแท่งและเซลล์ต่อมทำหน้าที่ผลิตน้ำย่อยชนิดต่างๆ (บพิธและนันทพร, 2538)แสดงดังรูปที่ 2.11 และส่วนที่พองออกหรือบางที่คอดเล็กน้อย เรียกว่า Clitellum ซึ่งบริเวณนี้มีต่อมตามผิวหนังสำหรับสร้างปลอกซึ่งเป็นถุงสำหรับหุ้มห่อไข่ที่ถูกผสมแล้ว เรียกปล้องนี้ว่า Cocoon (เชาว์และพรรณี,2541)



รูปที่ 2.11 แสดงภาพตัดตามขวางที่แสดงลักษณะโครงสร้างอวัยวะภายในของไส้เดือนดิน

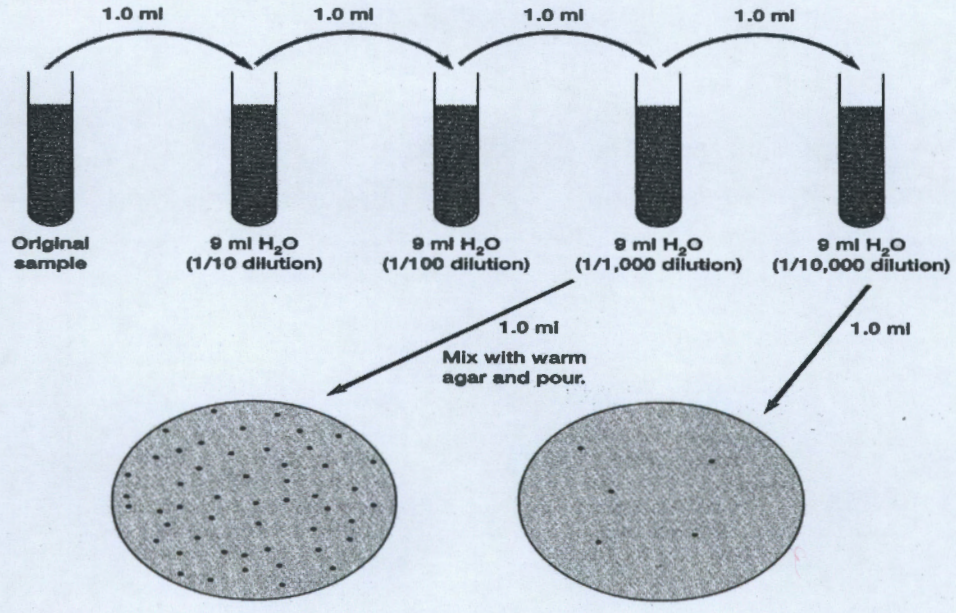
ระบบขับถ่าย

อวัยวะขับถ่ายของเสียหลักในไส้เดือนดินคือ เนฟริเดีย (Nephridia) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่แยกของเสียต่างๆออกจากของเหลวในช่องลำตัวของไส้เดือนดิน แต่ละปล้องของไส้เดือนดินจะมี Nephridia ที่เป็นท่อขดไปมาอยู่ปล้องละ 1 คู่ ทำหน้าที่รวบรวมของเหลวในช่องตัวจากปล้องที่อยู่ถัดไปทางด้านหน้าของลำตัวของเหลวในช่องตัวจะเข้าทางปลายท่อ Nephrostome ที่มีซิเลียอยู่โดยรอบ แล้วไหลผ่านไปตามส่วนต่างๆของท่อน้ำส่วนใหญ่พร้อมทั้งเกลือแร่บางชนิดที่ยังเป็นประโยชน์จะถูกดูดซึมกลับเข้าสู่กระแสเลือดส่วนของเสียพวกไนโตรจินัสเบสจะถูกขับออกสู่ภายนอกทางช่อง Nephridiopore ที่อยู่ทางด้านท้องซึ่งของเสียส่วนใหญ่ที่ขับออกมาเป็นพวกสารยูรินที่ประกอบด้วย แอมโมเนียและยูเรียเป็นส่วนใหญ่ (บพิธและนันทพร, 2538)

2.1.3 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร (plate count)

การนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมวุ้น (agar media) มาใช้ตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 1800 ทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนโคโลนี วิธีการดังกล่าวมีพื้นฐานจากข้อสมมติ 3 อย่างคือ (1)เซลล์จุลินทรีย์หนึ่งเซลล์เจริญและแบ่งตัวเพื่อสร้างโคโลนีเดี่ยว (2)เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (original inoculum) มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) และ (3)ไม่มีเซลล์ใดๆที่อยู่รวมกัน (no aggregate) วิธีนี้ทำง่ายนับจำนวนได้ดีแม้ว่าจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำ (sensitive) และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งจากตัวอย่างอาหาร น้ำ และดินในการนับเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารมีความสำคัญ คือต้องมีจำนวนไม่มากหรือ

น้อยเกินไป โดยทั่วไปจะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์เท่านั้น ดังนั้น เพื่อให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารอยู่ในช่วงดังกล่าว แสดงดังรูปที่ 2.12



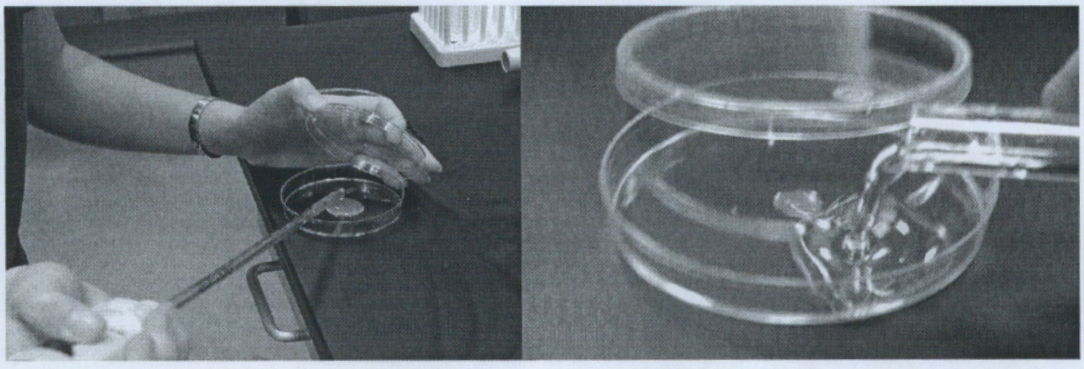
รูปที่ 2.12 แสดงการทำเจือจางเป็นลำดับและวิธี pour plate

ควรทำการเจือจากเชื้อเริ่มต้นหลายๆครั้งโดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆละ 10 เท่า (Serial-dilution) (รูปที่ 2.13) แล้วทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่แต่ละระดับการเจือจางลงบนจานอาหารเมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนจานอาหารแล้วนับจำนวนทำการคำนวณหาจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่างได้ การรายงานผลมักรายงานเป็น Colony Forming Unit (CFU) มากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ เนื่องจากไม่สามารถบอกได้อย่างแน่นอน ชัดเจนว่า 1 โคโลนีมาจาก 1 เซลล์ การนับจำนวนด้วยวิธี plate count จึงเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) ซึ่งมีหลายวิธี คือ

<u>Pour plate</u>

เมื่อตัวอย่างถูกเจือจางลงระดับละ 10 เท่า ทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างที่มีระดับการเจือจางเหมาะสมโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตรหรือ 0.1 มิลลิลิตรหยดไปบนจานอาหารแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44 – 46 องศาเซลเซียส ลงไปผสมเชื้อจุลินทรีย์กับให้เข้าอาหารโดยแกว่งจานอาหารไป-มาเบาๆแสดงดังรูปที่ 13 ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่มภายหลังบ่มแล้วโคโลนีของ จุลินทรีย์จะเจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ 25-250 เซลล์ ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัม

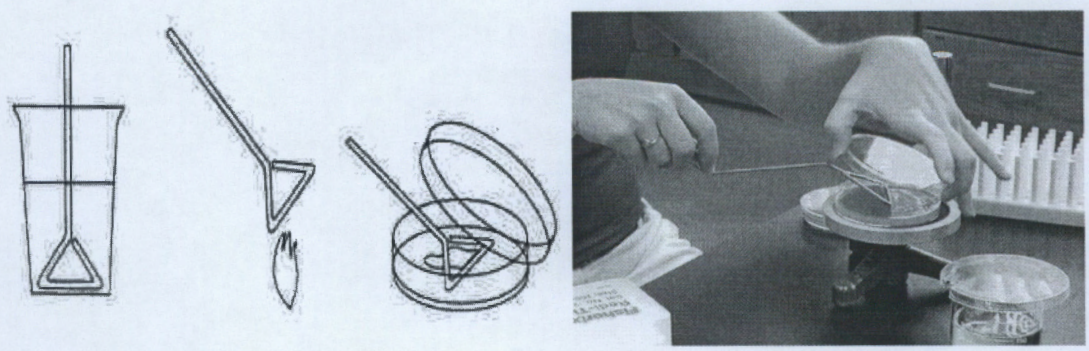
ตัวอย่างได้ วิธีนี้หากใช้วุ้นที่ร้อนไปอาจทำให้ sensitive cell ตายหรือบาดเจ็บไม่สามารถสร้างโคโลนีได้ แสดงดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 แสดงวิธี pour plate

Spread plate

เป็นวิธีการนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแข็งตัวแล้ว (solidified agar medium) เชื้อจุลินทรีย์จะถูกแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วพิเศษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (spreader) แสดงดังรูปที่ 2.14 วิธีนี้ผู้วิเคราะห์จะสามารถสังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ง่าย ในบางครั้งวิธี spread plate อาจนับปริมาณเซลล์ได้มากกว่าวิธี pour plate เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ได้เจอกับความร้อนจากอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมเหลวเหมือนวิธี pour plate ในกรณีที่ตัวอย่างมีเซลล์จุลินทรีย์อยู่น้อย การใช้วิธีนี้อาจขาดความถูกต้องแม่นยำเนื่องจากใช้ปริมาณตัวอย่างค่อนข้างน้อย (0.1 มิลลิลิตร) ในการ plating



รูปที่ 2.14 แสดงวิธีการ spread plate

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้จากโรงงานน้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอล

ปรัชญา วงษา, ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้จากโรงงานน้ำตาล เพื่อผลิตเอทานอลโดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูโลส ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลจากเซลลูโลสในกระดาษและปริมาณกระดาษที่เหมาะสมในการผสมกับกากน้ำตาลในการผลิตน้ำตาล

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากการหมักแบบจุ่มและบนอาหารแข็ง การผลิตเอนไซม์แบบจุ่มปริมาณสับสเตรตได้แก่ ฟางข้าวและกากตะกอนทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสมากขึ้น นอกจากนี้การไฮโดรไลซิสเซลลูโลสในเศษกระดาษเป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่มากขึ้นจะได้ปริมาณน้ำตาลที่สูงขึ้นส่วนการใช้กระดาษที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์จะสามารถประหยัดการใช้กากน้ำตาลได้ 25% โดยได้ปริมาณน้ำตาลที่ใกล้เคียงเพื่อนำไปหมักกับยีสต์ต่อไปในการผลิตแอลกอฮอล์

2.2.2 การบำบัดและการทำปุ๋ยหมักมูลไก่โดยใช้ไส้เดือน Lumbricus rubellus และ Eudrilus eugeniae

ชัยภูมิ บัญชาศักดิ์, ธิตินันท์ ขวัญสด, สมชัย จันทร์สว่างได้ศึกษาการบำบัดมูลไก่โดยใช้ไส้เดือนพันธุ์ Lumbricus rubellus และ Eudrilus eugeniae ทดสอบมูลไก่อัตราส่วนต่างๆ เพื่อหาระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและอัตราการเปลี่ยนเป็นปุ๋ยหมักวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ประกอบด้วย 4 ทรีทเมนต์ดังนี้ มูลไก่ 10 เปอร์เซ็นต์, มูลไก่ 20 เปอร์เซ็นต์, มูลไก่ 30 เปอร์เซ็นต์และมูลไก่ 40 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 6 ซ้ำ จากการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการเปลี่ยนวัสดุที่ใช้เลี้ยงเป็นน้ำหนักตัวของ L. rubellus ไม่แตกต่างกันทั้ง 4 ทรีทเมนต์ ส่วน E. eugeniae ประสิทธิภาพการเปลี่ยนวัสดุที่ใช้เลี้ยงเป็นน้ำหนักตัวเมื่อใช้มูลไก่ 10 เปอร์เซ็นต์ดีที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้มูลไก่ 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์แต่สูงกว่าการใช้มูลไก่ 20 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)จำนวนลูกของ L. rubellus เมื่อใช้มูลไก่ 10 เปอร์เซ็นต์ดีที่สุด ซึ่งมากกว่าการใช้มูลไก่ 40 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากการใช้มูลไก่ 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) จำนวนลูกของ E. eugeniae เมื่อใช้มูลไก่ 30 เปอร์เซ็นต์ให้จำนวนลูกมากที่สุดและแตกต่างจากการใช้มูลไก่ 40 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) อัตราการเปลี่ยนเป็นปุ๋ยหมักของ L. rubellus เมื่อใช้มูลไก่ 10 เปอร์เซ็นต์ดีที่สุด ซึ่งสูงกว่าการใช้มูลไก่ 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) และการใช้มูลไก่ 20 เปอร์เซ็นต์ให้อัตราการเปลี่ยนเป็นปุ๋ยหมักสูงกว่าการใช้มูลไก่ 40 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) การใช้มูลไก่ 20 เปอร์เซ็นต์เลี้ยง

E. eugeniae ให้อัตราการเปลี่ยนเป็นปุ๋ยหมักดีที่สุดและสูงกว่าการใช้มูลไก่ระดับอื่นๆ ($p<0.05$) การศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้มูลไก่ 40 เปอร์เซ็นต์ให้ผลตอบสนองที่ไม่ดีทั้งในด้านการเจริญเติบโตและการนำไปทำปุ๋ยหมัก

2.2.3 การหมักแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เซลลูเลสและ Saccharomyces cerevisiae

อำนวย ขวัญเมือง พบว่าเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อยและต้นมันสำปะหลัง การใช้ประโยชน์โดยเปลี่ยนเป็นเอทานอลทำได้โดยใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์ การหมักเอทานอล จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อราย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสและ หมักน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล จากการคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา 2 ชนิด 3 สายพันธุ์ คือ T. reesei QM 9414 T. reesei QM 6a และ Aspergillus sp. No 3335 พบว่า T. reesei QM 6a ให้ activity ของเอนไซม์สูงสุดที่อายุ 9 วัน โดยมีค่าของ endoglucanase (CMCase) เท่ากับ 3.69 หน่วย/มิลลิลิตร และ cellulose activity เท่ากับ 0.85 หน่วย/มิลลิลิตร

2.2.4 การผลิตเอ็นไซม์จากวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นแนวทางการใช้ในอาหารสัตว์

Hunsa Punnapayak and Narisa Kunpratum ได้ศึกษาเซลลูเลสและไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถใช้เสริมในอาหารสัตว์เพื่อช่วยย่อยองค์ประกอบของอาหารสัตว์บางประเภททำให้สัตว์มีการย่อยอาหารได้ดีขึ้น จากการวิเคราะห์ปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลน เซลลูโลสและลิกนินโดยวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) โดยนำวัสดุทางการเกษตร มาสกัดโปรตีนและส่วนที่ไม่ต้องการ ด้วยกระบวนการ Neutral Detergent Extractionจากนั้นนำตะกอนมารีฟลักซ์ด้วย Acid Detergent Solution จากนั้นสกัดแยกลิกนินออกด้วย permanganate-buffer solution และผ่านกระบวนการ demineralization นำตะกอนที่ได้มาเผาที่อุณหภูมิ 500 °C เพื่อหาปริมาณเซลลูโลสในการเลี้ยงเชื้อ *T. reesei* ให้เจริญ เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน ส่วนการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสและไซแลนเนสมีการเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน ในช่วงเวลา 12 วัน วิเคราะห์เอนไซม์ไซแลนเนสโดยดูค่าเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีของ Ghoseและ Bisaria (1987) วิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสโดยดูค่าเอนไซม์แอคติวิตีตามวิธีของ Ghose (1987) พบว่ารำข้าวสำลีให้เอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุด (23.931 ยูนิต/มิลลิลิตร) ผสมกับเซลลูเลส 0.226 ยูนิต/มิลลิลิตร ขณะที่รำข้าวเจ้าให้เซลลูเลสสูงสุด (0.656 ยูนิต/มิลลิลิตร) ผสมกับไซแลนเนส 21.70 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามด้วยชานอ้อยที่ให้เซลลูเลส 0.36 ยูนิต/มิลลิลิตร ไซแลน

เนส 13.40 ยูนิต/มิลลิลิตร และเปลือกถั่วลิสงที่ให้เซลลูเลส 0.26 ยูนิต/มิลลิลิตร ไซแลนเนส 2.00 ยูนิต/มิลลิลิตร การเติมสารกระตุ้นพวก Xyloside มีส่วนช่วยเพิ่มการผลิตไซแลนเนสเอนไซม์ได้ดีขึ้นถึง 5.32 เท่า ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงถึง 105.84 ยูนิต/-มิลลิลิตร โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบในการผลิต

บทที่3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความชื้นแบบเข็ม
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. เครื่องเขย่าสาร
5. เครื่องSpectrophotometer
6. หลอดทดสอบ
7. กระบอกตวง(Graduated Cylinder)
8. บีกเกอร์ (Beaker)
9. ขวดปริมาตร(Volumetric flask)
10. ขวดรูปชมพู่
11. กระดาษกรอง Whatman No.1
12. จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ
13. ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ
14. เข็มเขี่ยเชื้อ(Inoculating loop)
15. ไมโครปิเปต(Micropipette) ขนาด 1000 µL
16. จุกยาง
17. ปิเปตแบบปริมาตร(Volumetric Pipette)
18. อาบน้ำควบคุมอุณหภูมิ(Water bath)
19. ชุดกรอง Millipore filter
20. ช้อนตักสารสแตนเลส(Spatula Stainless)
21. พาราฟิน
22. เทอร์โมมิเตอร์

3.1.2 สารเคมี

1. Anhydrous sodium acetate
2. Glacial acetic acid
3. Carboxymethyl cellulose sodium salt
4. Anhydrous sodium carbonate
5. Potassium cyanide
6. Potassium hexacyanoferrate (lll)
7. Ferric ammonium sulfate
8. Sodium dodecyl sulfate
9. Conc.H_2SO_4
10. Anhydrous glucose
11. Yeast extract
12. LB-agar
13. Casein Peptone
14. Sodium chloride

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์การทดลอง

2.3.1 เครื่องมือตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer)

เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่นำเทคนิค UV-Vis Spectroscopy ไปใช้งาน เครื่องมือตัวนี้ทำหน้าที่ในการตรวจวัดความเข้มแสงที่ผ่านหรือสะท้อนจากตัวอย่างเปรียบเทียบกับความเข้มแสงจากแหล่งกำเนิดเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer โดยทั่วไปแล้วจะมีส่วนประกอบหลักที่เหมือนกันได้แก่ แหล่งกำเนิดแสงเกรตติ้งหรือโมโนโครเมเตอร์เซลล์ที่บรรจุ สารตัวอย่างและเครื่องตรวจวัดแหล่งกำเนิดแสงจะต้องให้แสงที่คงที่อย่างต่อเนื่องตัวที่นิยมใช้คือ หลอดทังสเตนฮาโลเจนซึ่งให้แสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง 320-2,500 นาโนเมตรสำหรับแหล่ง กำเนิดแสงในช่วงรังสียูวีนั้นจะใช้หลอดไฮโดรเจนหรือหลอดดิวทีเรียม ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 160-375 นาโนเมตรแต่แสงที่ได้จากแหล่งกำเนิดนั้นจะมีความยาวคลื่นต่างๆ ดังนั้นจึงต้องใช้โมโนโครเมเตอร์เป็นตัวกระจายแสงออกเพื่อให้แสงที่จะผ่านไปยังตัวอย่างมีความยาวคลื่นค่าเดียวตามที่ต้องการหลังจากนั้นแสงความยาวคลื่นค่าเดียวจะผ่านไปยังเซลล์ที่บรรจุสารตัวอย่างและสารเปรียบเทียบ (cuvettes) ซึ่งมีรูปร่างต่างๆกันออกไปแต่โดยส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นกล่องทรง

สี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีความกว้างภายใน 1 เซนติเมตร (ซึ่งค่านี้จะเป็นค่าระยะทางเดินของแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างตามกฎของ Beer-Lambert) เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer บางรุ่นสามารถใช้หลอดทดลองเป็น cuvettes ได้แต่ cuvettes ที่ดีที่สุดนั้นทำมาจากควร์ตที่มีคุณภาพสูงสำหรับ cuvettes ที่ทำจากแก้วหรือพลาสติกนั้นก็เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปแต่สามารถใช้ได้เฉพาะในช่วงแสงขาวเท่านั้นเพราะแก้วและพลาสติกดูดกลืนแสงในช่วงรังสียูวีแสงในส่วนที่ไม่ถูกดูดกลืนจะเดินทางผ่านตัวอย่างมาถึงเครื่องตรวจวัดสำหรับเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้ได้แก่ PMT (photomultiplier tube), diode arrays และ CCDs (charge coupled devices) เครื่องจะทำการบันทึกค่าความยาวคลื่นร่วมกับค่ามุมของแต่ละความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนผลของสเปคตรัมที่ได้จะแสดงในรูปของกราฟระหว่างค่า absorbance และค่าความยาวคลื่นเครื่อง UV-Vis spectrophotometer สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือแบบลำแสงเดี่ยวและแบบลำแสงคู่สำหรับเครื่องแบบลำแสงเดี่ยวเป็นเครื่องที่ใช้ลำแสงเดียวจากแหล่งกำเนิดผ่านไปยังตัวอย่างเครื่องมือนี้ได้รับการออกแบบให้สามารถใช้งานได้ง่ายสะดวกและมีราคาไม่แพงมากนักสำหรับเครื่องแบบลำแสงคู่นั้นแสงจะถูกแยกออกเป็น 2 ลำก่อนที่จะไปตกลงบนตัวอย่างโดยแสงลำหนึ่งจะใช้เป็นลำแสงอ้างอิงขณะที่อีกลำจะผ่านไปยังตัวอย่างเครื่องมือที่เป็นแบบลำแสงคู่บางรุ่นจะมีเครื่องตรวจวัด 2 ตัว เพื่อที่จะตรวจวัดแสงอ้างอิงและแสงที่มาจากตัวอย่างได้พร้อมกันแต่ใน บางรุ่นจะมีเครื่องตรวจวัดเพียงตัวเดียวโดยแสงทั้งสองลำจะผ่านตัว beam chopper ซึ่งจะทำหน้าที่กักแสงลำหนึ่งไว้ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเครื่องตรวจวัดจึงสามารถตรวจวัดความแตกต่างของแสงทั้งสองลำได้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ขั้นตอนการเตรียมการทดลอง

ตอนที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. Acetate buffer (2M,pH5.5); เตรียมโดยละลาย Anhydrous sodium acetate หนัก 164.06 กรัม ในน้ำกลั่นทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร ปิเปต Glacial acetic acid ปริมาณ 60 มิลลิลิตร ลงในขวด Volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นทำให้ปริมาตรทั้งหมด 500 มิลลิลิตร จากนั้นทำการผสม Sodium acetate solution ปริมาณ 1000 มิลลิลิตร กับ Diluted acetic acid ปริมาณ 190 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH เป็น 5.5

2. Substrate solution (0.7% w/v); เตรียมโดยละลาย Carboxymethyl cellulose sodium salt หนัก 7 กรัม ใน Acetate buffer และทำให้ปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร ด้วย Acetate buffer (ทำการคนละลายที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่งโมงเพื่อให้(Substrate ละลาย)

3. Reagent A; เตรียมโดยละลาย Anhydrous sodium carbonate หนัก 16 กรัม และ Potassium cyanide หนัก 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น และทำให้ปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร

4. Reagent B; เตรียมโดยละลาย Potassium hexacyanoferrate (lll) หนัก 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น และทำให้ปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ในขวดสีน้ำตาล

5. Reagent C; เตรียมโดยละลาย Ferric ammonium sulfate หนัก 1.5 กรัม และ Sodium dodecyl sulfate หนัก 1 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติม Conc.H_2SO_4 ปริมาณ 4.2 มิลลิลิตร แล้วทำการคนสารละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จนเมื่อสารละลายเย็นลง ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

6. Standard stock solution (250μg glucose*ml^{-1}); เตรียมโดยละลาย Anhydrous glucose หนัก 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น และทำให้ปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร

7. Working standard (25μg glucose*ml^{-1}); เตรียมโดยปิเปต Standard stock solution ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในขวด Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเพิ่มทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร

ตอนที่ 2 Calibration Curve

วิธีการทดลอง

1. ปิเปต Working standard ปริมาณ 0 (blank),0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 และ 0.9 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วทำการเจือจางปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ดังนั้นใน Calibration standard จะมีความเข้มข้นของGlucoseอยู่ในสารละลายเท่ากับ 0 , 2.5 , 5.0 , 7.5 , 10.0 , 12.5 , 15.0 , 17.5 , 20.0 และ 22.5 ไมโครกรัม (μg) ตามลำดับ

2. เติมสาร Reagent A และ Reagent B อย่างละ1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปิดหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มใน Water bath ที่มีน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที

3. จากนั้นทำสารละลายให้เย็น โดยแช่หลอดทดลองลงในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Reagent C 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อนเกิดขึ้น

4. ทำการวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร (nm)

5. พล็อตกราฟระหว่างค่า Absorbance และค่าความเข้มข้นที่เตรียม ได้สมการเส้นตรงเพื่อนำไปหาความเข้มข้นของ Glucose ในการทดลอง

ตอนที่ 3 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB)

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น สามารถเตรียมได้จากตารางที่ 3.1 ยกตัวอย่าง เช่น ต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร สามารถเตรียมได้จาก

- Casein Peptone 1 กรัม
- Yeast extract 0.5 กรัม
- NaCl 0.5 กรัม
- LB-agar* 1.5 กรัม

(*หมายเหตุ เมื่อต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวนั้นไม่ต้องใส่ LB-agar)

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

LB	50ml	100ml	200ml	500ml
Casein Peptone	0.05g	1.0g	2.0g	5.0g
Yeast extract	0.25g	0.5g	1.0g	2.5g
NaCl	0.25g	0.5g	1.0g	2.5g
LB-agar	0.75g	1.5g	3.0g	7.5g

3.3.2 ขั้นตอนการการทดลอง

ตอนที่ 1 ขั้นตอนการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์

วิธีการทดลอง

1. เก็บมูลไส้เดือนลงใน Eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เตรียม LB ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงใน Eppendrof ที่เก็บมูลไส้เดือน ทำการเขย่าให้เข้ากัน(หัวเชื้อ)

3. เตรียม LB ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ลงใน Eppendrof 6 หลอด

4. ปิเปต หัวเชื้อ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน Eppendrof หลอดที่ 1

5. จากนั้นทำการปิเปต Eppendrof หลอดที่ 1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน Eppendrof หลอดที่ 2

6. Eppendrof ที่มีสารละลายหลอดที่ 3,4,5 และ 6 ทำการเจือจางเหมือนกันกับ Eppendrof หลอดที่ 1 และ 2

7. นำตัวอย่างที่ถูกเจือจางทั้ง 6 หลอด มาทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ใน LB-agar โดยวิธีการ Spread Plate ตั้งทิ้งไว้ในตู้เพราะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24ชั่วโมง

8. จากนั้นทำการเลือกโคโลนีของจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันของแต่ละ plate มาทำการเพาะเลี้ยงใน LB-agar โดยวิธีการ Spread Plate เช่นเดียวกับข้อที่ 7

ตอนที่ 2 ขั้นตอนการศึกษาการย่อยเซลลูโลสของจุลินทรีย์

วิธีการทดลอง

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มาทำการเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองโดยเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

2. จากนั้นปิเปตเชื้อจากหลอดทดลองมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Substrate solution และ Acetate buffer ลงในหลอดทดลอง อย่างละ 15 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายในหลอดทดลองให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. สำหรับขั้นตอนการทำ photometric analysis ให้ทำการปิเปตสารละลายจากข้อ 2 มา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Reagent A และ Reagent B อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงไปปิดหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มใน Water bath ที่มีน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที

4. จากนั้นทำสารละลายให้เย็น โดยแช่หลอดทดลองลงในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Reagent C 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อนเกิดขึ้น

5. ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร (nm)

ตอนที่ 3 ขั้นตอนการวัดการเจริญของจุลินทรีย์

วิธีการทดลอง

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มาทำการเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองโดยเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. จากนั้นปิเปตเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตรมาเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 2 ไปวัดค่าความขุ่นทุกๆ 1 ชั่วโมงด้วยเครื่องUV-VisSpectrophotome-ter ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (nm) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของจุลินทรีย์เทียบกับเวลา

ตอนที่ 4 ขั้นตอนการศึกษาการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษของจุลินทรีย์

วิธีการทดลอง

1. เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ลงในหลอดทดลองที่มี LB ปริมาตร 12 มิลลิลิตร

2. เตรียมกากตะกอนเยื่อกระดาษลงในหลอดทดลอง โดยทำ 2 ชุดการทดลอง

3. เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ปิดหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บสารส่วนที่ใส (Filtrate) ที่ได้นำไปทดลองด้วยวิธี photometric analysis

ตอนที่ 5 ขั้นตอนการศึกษาการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษของไส้เดือนดิน

วิธีการทดลอง

1. เตรียมไส้เดือนดิน ปริมาณ 1 กรัม

2. เตรียมกากตะกอนเยื่อกระดาษลงในกล่องทดลองใสขนาด ด้านกว้าง 7 เซนติเมตร ด้านยาว 7 เซนติเมตร ด้านสูง 4 เซนติเมตร ปริมาณ 2 กรัม

3. นำไส้เดือนดินที่เตรียมไว้ลงในกล่องทดลองใส ทำการทดลอง 18 ชุดการทดลอง

4. เก็บมูลไส้เดือนดินที่ได้จากการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษจากข้อ 3 ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Acetate buffer 15 มิลลิลิตร ปิดหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน เป็นเวลา 30 นาที

5. จากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บสารส่วนที่ใส (Filtrate) ที่ได้นำไปทดลองด้วยวิธี photometric analysis

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยใช้ไส้เดือนดิน ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เชื้อจุลินทรีย์จากมูลไส้เดือนดินมาย่อยเซลลูโลสและกากตะกอนเยื่อกระดาษ เพื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษของไส้เดือนดินแต่ล่ะสายพันธุ์ โดยได้ออกแบบลำดับของการทดลองในการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษ ดังนี้

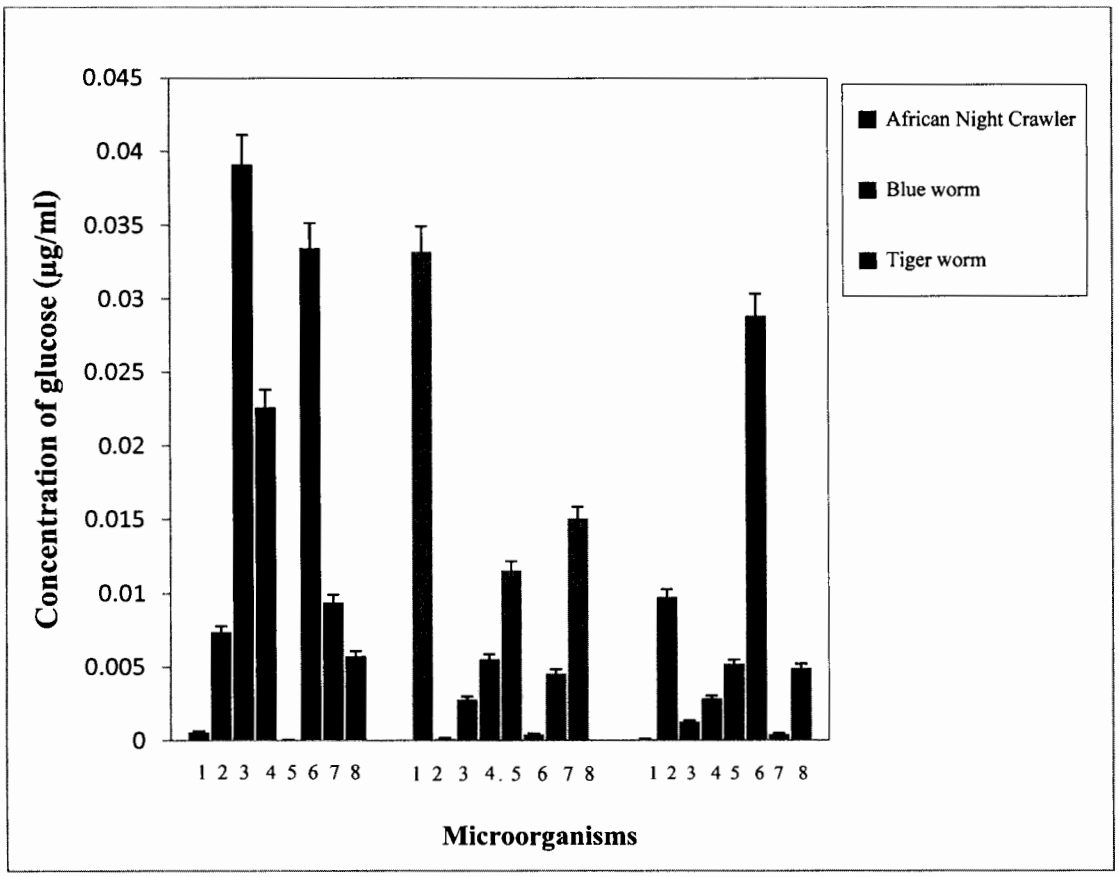
1.การคัดเลือกจุลินทรีย์จากมูลไส้เดือนดินที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

2.ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลไส้เดือนดินในการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม

3.ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawlerในการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม

4.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์จากมูลไส้เดือนดินที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

จากการนำมูลของไส้เดือนดิน 3 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทำการเลือกจุลินทรีย์ของไส้เดือนดิน สายพันธุ์ละ 8 ชนิด โดยสังเกตจากลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละตัว เพื่อนำมาทำการย่อยสารละลายเซลลูโลสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสที่เวลาสุดท้ายมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น จะสังเกตได้ว่าปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นนั้นจะเพิ่มขึ้นในปริมาณที่แตกต่างกันดังรูปที่ 4.1 โดยไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler เชื้อจุลินทรีย์ African Night Crawler ชนิดที่ 3 มีค่าความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไส้เดือนดินสายพันธุ์ Blue worm เชื้อจุลินทรีย์ Blue worm ชนิดที่ 1 มีค่าความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไส้เดือนดินสายพันธุ์ Tiger worm เชื้อจุลินทรีย์ Tiger worm ชนิดที่ 6 มีค่าความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการย่อยสารละลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดของไส้เดือนดิน 3 สายพันธุ์

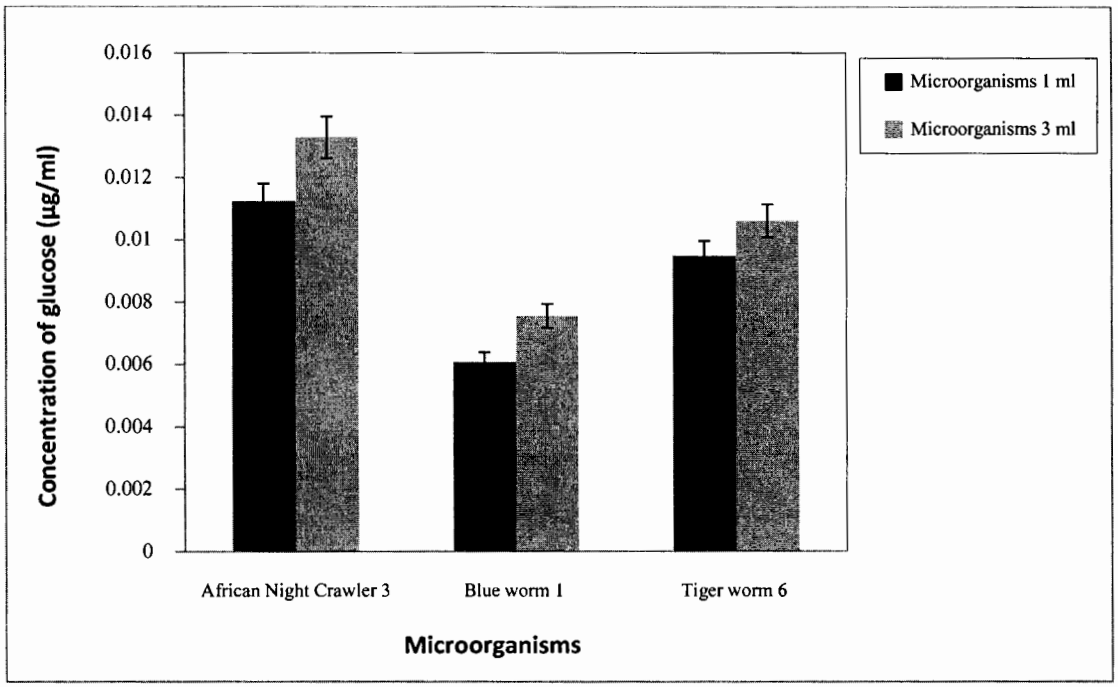


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับเชื้อจุลินทรีย์

4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลไส้เดือนดินในการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม

จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินทั้ง 3 สายพันธุ์ทำการทดลองย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษที่ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ต่างกัน คือ ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร ของไส้เดือนดิน 3 สายพันธุ์นำมาย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ปริมาณ 2 กรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler สามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.11×10^{-2} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินสายพันธุ์ Blue worm สามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.60×10^{-2} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินสายพันธุ์ Tiger worm สามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.94×10^{-2} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรส่วนเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ 3 มิลลิลิตร ของไส้เดือนดิน 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler สามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษ

ให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นเท่ากับ $1.32x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินสายพันธุ์ Blue worm สามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นเท่ากับ $0.75x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเชื้อจุลินทรีย์จากไส้เดือนดินสายพันธุ์ Tiger worm สามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษให้มีความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นเท่ากับ $1.06x10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของไส้เดือนดิน 3 สายพันธุ์

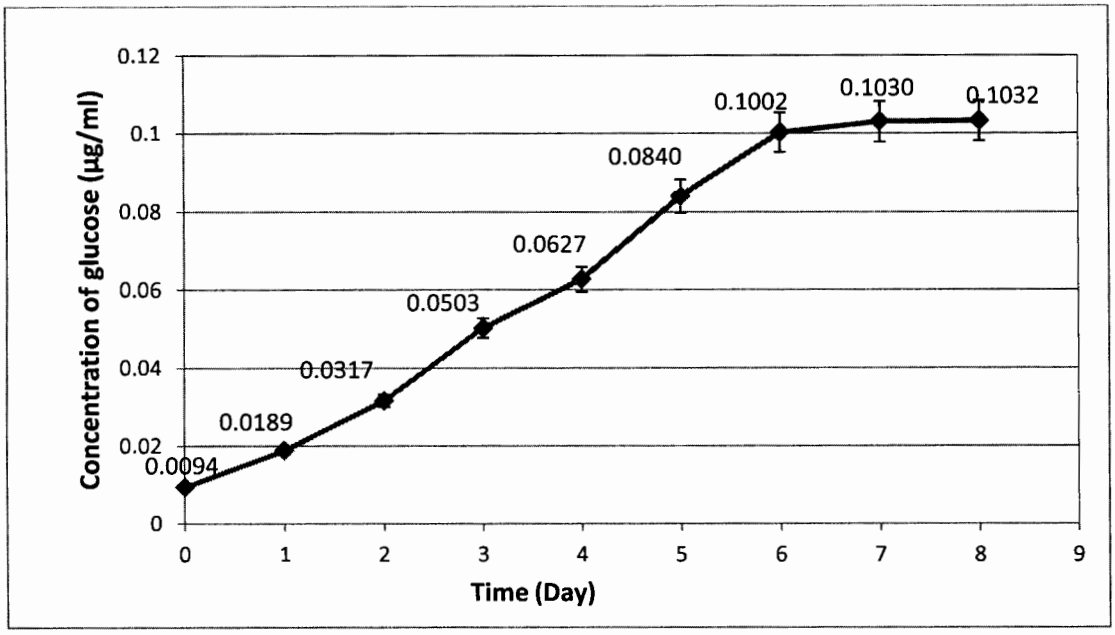
4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler ในการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม

จากการศึกษาได้นำไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler มาย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยนำไส้เดือนดินน้ำหนัก 1 กรัมมาย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษหนัก 2 กรัมในกล่องพลาสติกใสที่มีรูระบายอากาศ จะเห็นได้ว่าในช่วงระยะเวลาแรกจะมีการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณไม่มากนัก ดังตารางที่ 4.3 เพราะเป็นช่วงที่ไส้เดือนดินอยู่ในสภาพปรับตัว หลังจากที่ปรับตัวไปประมาณ 1-2 วัน ไส้เดือนดินได้มีการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษอย่างรวดเร็ว โดยสังเกตได้จากกราฟ ดังรูปที่ 4.3 ว่าช่วงเวลา 1-2 วัน ปริมาณกลูโคสจะเพิ่มขึ้นไม่สูงมาก หลังจากนั้นปริมาณกลูโคสก็เพิ่ม

สูงขึ้นจนถึงวันที่ 6 พบว่าปริมาณของกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ไส้เดือนดินย่อยเริ่มหมดลงความเข้มข้นของกลูโคสก็เริ่มคงที่ที่ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความเข้มข้นของกลูโคสที่ย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler

เวลา(วัน)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
0	0.0088	0.0098	0.0098	0.0094
1	0.0216	0.0173	0.0178	0.0189
2	0.0340	0.0297	0.0315	0.0317
3	0.0492	0.0517	0.0501	0.0503
4	0.0584	0.0654	0.0645	0.0627
5	0.0815	0.0865	0.0840	0.0840
6	0.0964	0.1024	0.1018	0.1002
7	0.1029	0.1027	0.1034	0.1030
8	0.1035	0.1018	0.1045	0.1032



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับเวลาในการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม

บทที่5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler ในการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม

จากการศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลไส้เดือนดินมาย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษทำให้เราทราบว่าไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night-Crawler มีประสิทธิภาพในการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษได้ดี และนำไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler มาย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยนำไส้เดือนดินน้ำหนัก 1 กรัมมาย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษหนัก 2 กรัม พบว่าในช่วงระยะเวลาแรกที่เวลา 1-2 วันจะมีการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษไม่มากนักเพราะเป็นช่วงที่ไส้เดือนดินปรับตัว หลังจากช่วงเวลา 1-2 วัน ไส้เดือนดินได้มีการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษอย่างรวดเร็ว โดยสังเกตได้จากกราฟ ดังรูปที่ 4.4 ว่าช่วงเวลา 1-2 วัน ปริมาณกลูโคสจะเพิ่มขึ้นไม่สูงมาก หลังจากนั้นปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสก็เพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 6 ปริมาณของกากตะกอนเยื่อกระดาษที่ไส้เดือนดินย่อยนั้นก็เริ่มหมดลงความเข้มข้นของกลูโคสก็เริ่มคงที่ที่ปริมาณความเข้มข้นเท่ากับ 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งงานทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของC. Elvira, M.Goicoechea, L. Sampedro,S. Mato และ R. Nogales พบว่าเป็นการศึกษาถึงการเปลี่ยนทางชีวภาพของกากตะกอนเยื่อกระดาษโดยใช้ไส้เดือนสายพันธุ์ Eisenia Andrei (African Night Crawler)ในระยะเวลา 40 วันในอัตราส่วน 03:01 วัน/น้ำหนัก ได้ทำการศึกษาในภาชนะบรรจุที่มีและไม่มีไส้เดือนดินผลการศึกษาปรากฏว่าอัตราการเจริญเติบโตของไส้เดือนดินมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด 0.90 กรัม ไส้เดือนจะมีการสร้างรังไข่ก่อนวันที่ 21 (45% ใน 12 วัน) จากการทดลอง และกากตะกอนเยื่อกระดาษก็ลดลงสังเกตได้อย่างชัดเจน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไส้เดือนดินได้มีการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษภายในลำไส้ด้วยจุลินทรีย์ (เอ็ดเวิร์ดและลอฟตี้, 1972)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ (Waste Paper Sludge; WPS) จากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษได้ดีและเหมาะสมที่จะเป็นแนวทางในการนำไส้เดือนดินมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและด้านอื่นๆ เพื่อแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมในอนาคตได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาตัวแปรอื่นๆ ที่จะส่งผลกระทบต่อการย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษของไส้เดือนดินและเชื้อจุลินทรีย์จากมูลไส้เดือนดิน

เอกสารอ้างอิง

จุไรรัตน์ คุรุโคตร.2552 การกำจัดขยะสดโดยใช้ไส้เดือนดินและและจุลินทรีย์ EM สาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ปรีชา เกียรติกระจาย.2528. เคมีของเนื้อไม้. ภาควิชาวนผลิตภัณฑ์ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริพรรณ สารินทร์.2550. จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ธิตินันท์ ขวัญสด.2546. การบำบัดและการทำปุ๋ยหมักมูลไก่โดยใช้ไส้เดือน Lumbricus rubellusและ Eudrilus eugeniae. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อานัฐ ตันโช.2549.ไส้เดือนดิน พิมพ์ครั้งที่ 1.สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี.259 หน้า

อำนวย ขวัญเมือง, การหมักแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เซลลูเลสและ Saccharomyces cerevisiae. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2538

ระวีวรรณ แก้วกล้า.2538. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Agarwal, G.W., Roa, K. S. K.and Negi, L. S. (1958). Influence of certain species of earthworms on the structure of some hill soil. Curr.Sri.,27, 213

Albersheim, P., Nevins, D. J. & English, P. D. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharidesby gas liquid chormatogaphy. Carbohydr.Res., 5, 340-345.

Butt, K. R. (1993). Utilisation of solid paper-mill sludge and spent brewery yeast as a feed for soil-dwelling earthworms. Biores. Technol., 44, 105-107.

Colvin, J.R., L. Chene, L.C. Sowdeu, and M. Takai. 1977. Purification and properties of a soluble polymer of glucose from cultures of Acetobacter xylinum. Can. J. Biohem.55:1057-1063.

C.Elvirs, M.Goicoechea, L.Sampedro, S.Mato&R.Nogales. (1996).Bioconversion of solid paper-pulp mill sludge by earthworms.Bioresource Technology 57 (1996) 173-177).

Edwards, C. A. & Fletcher, K. E. (1988). Interactions between earthworms and microorganisms in organicmatter breakdown. Agr. Ecosyst. Environ., 24, 235-247.Edwards, C. A. & Lofty, J. R. (1972). Biology of Earthworms.Chapman and Hall, London.

G. Halliwell and M. Riaz.,(1969)., The Formation of Short Fibres from Native Cellulose by Components of Trichoderma koningii Cellulase., Biochem. J. (1970) 116, 35-42

Limin Zhao,Yayi Wang,Jian Yang,Meiyan Xing,xiaowi Li,Danghao Yi, Deng.(2009).Earthworm-microorganism interactions:A strategy to stabilize domestic wastewater sludge.water research 44 (2010) 2572-2582.

Matsushita, K and M. Ameyama. 1982. D-Glucose dehydrogenase from Pseudomonas fluorescens, membrane-bound. Methods Enzymol. 89:149-154

Mitchell, A., 1997. Production of Eisenia foetida and vermicompost from feedlot cattle manure. Soil Biol. Biochem. 29, 763±766

Maria Gomez-Brandon,Cristina Lazcano,Marta lores,Jorge Dominguez.(2009). Detritivorous earthworms modifi microbial community structure and acceierate plant residue decomposition.Applied Soil Ecology 44(2010)237-244.

Priya Kaushik, V.K. Garg.(2003). Dynamics of biological and chemical parameters During vermicomposting of solid textile mill sludge mixed with cow dung and agricultural residues. Bioresource Technology 94 (2004) 203–209.

V.K.Garg,Priya Kaushik.(2004).Vermistabilization of textile mill sludge spiked with poultry droppings by an epigeic earthworm Eisenta foetida.bioresource technology 96(2005) 1063-1071

Rahul Kumar, Deepshikha Verma, Bhanu L. Singh, Umesh Kumar,Shweta.(2010).Composting of sugar-cane waste by-products throught treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting.

Jun Tao[a], Bryan Griffiths[b], Shujie Zhang[a], Xiaoyun Chen[a], Manqiang Liu[a], Feng Hu[a], Huixin Li[a].(2009).Effects of earthworms on soil enzyme activity in an organic residue amended rice-wheat rotation agro-ecosystem.Applied Soil Ecology 42 (2009)221-226.

Sudha Bansal, K.K. Kapoor.(1999). Vermicomposting of crop residues and cattle dung with Eisenia foetida. Bioresource Technology 73 (2000) 95-98

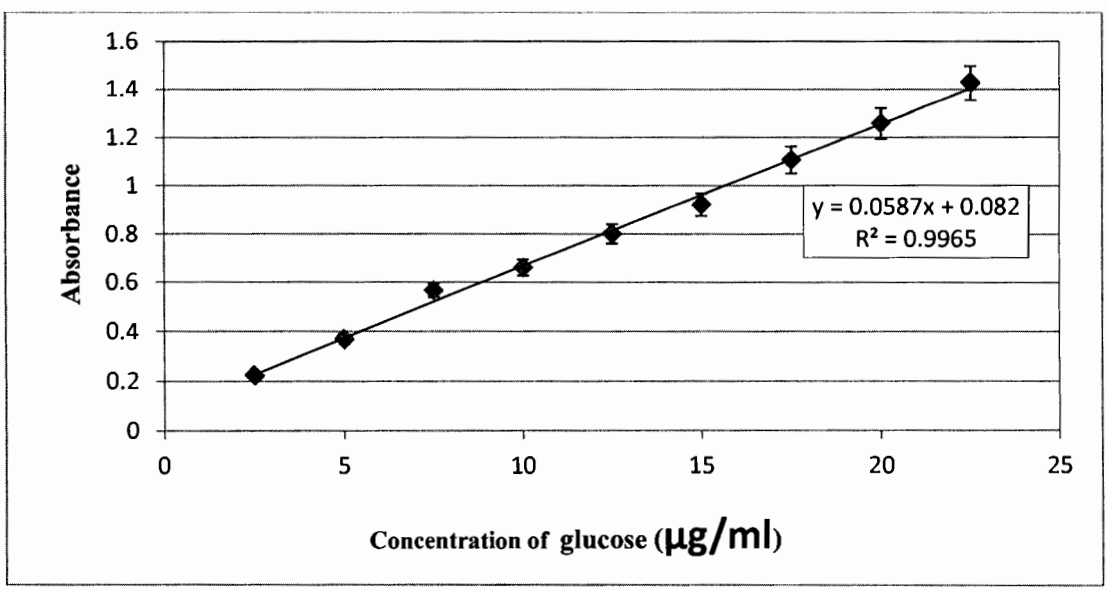
Satyawati Sharma, Kaviraj Pradhan, Santosh Satya, Padma Vasudevan.(2005). The Journal of American Science, 1(1), 2005, Sharma, et al, Potentiality of Earthworms for Waste Management.

ภาคผนวก ก

Calibration Curve

ตารางที่ ก-1 แสดงข้อมูลที่ได้จากการวัดค่า Abs (Absorbance) สำหรับใช้ในการทำ Calibration Curve

Concentration (μg/ml)	Absorbance 1	Absorbance 2	Absorbance 3	Average
2.5	0.2257	0.2255	0.2256	0.2256
5	0.3706	0.3709	0.3712	0.3709
7.5	0.5681	0.5679	0.5674	0.5678
10	0.6619	0.6615	0.6614	0.6616
12.5	0.8026	0.8021	0.8022	0.8023
15	0.9227	0.9231	0.9226	0.9228
17.5	1.1078	1.1085	1.1083	1.1082
20	1.2586	1.2587	1.2594	1.2589
22.5	1.4264	1.426	1.4265	1.4263



ภาคผนวก ข

ผลการศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์จากมูลไส้เดือนดินที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

ตารางที่ ข-1 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler ย่อยสลายเซลลูโลสที่เวลา 24 ชั่วโมง

เชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml))	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
African Night Crawler No.1	0.000631	0.000599	0.000662	0.000631
African Night Crawler No.2	0.007466	0.007494	0.007360	0.007440
African Night Crawler No.3	0.038920	0.038958	0.039658	0.039179
African Night Crawler No.4	0.022507	0.022776	0.022808	0.022697
African Night Crawler No.5	0.000058	0.000055	0.000059	0.000058
African Night Crawler No.6	0.033520	0.033587	0.033374	0.033494
African Night Crawler No.7	0.009778	0.009116	0.009478	0.009457
African Night Crawler No.8	0.005944	0.005749	0.005764	0.005819

ตารางที่ ข-2 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ Blue worm ย่อยสลายเซลลูโลสที่เวลา 24 ชั่วโมง

เชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml))	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
Blue No.1	0.033411	0.033105	0.033271	0.033262
Blue No.2	0.000186	0.000162	0.000190	0.000179
Blue No.3	0.002789	0.002876	0.002887	0.002851
Blue No.4	0.005579	0.005612	0.005576	0.005589
Blue No.5	0.011656	0.011567	0.011605	0.011609
Blue No.6	0.000451	0.000454	0.000495	0.000467
Blue No.7	0.004657	0.004618	0.004565	0.004613
Blue No.8	0.015095	0.015206	0.015095	0.015132

ตารางที่ ข-3 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ไส้เดือนดินสายพันธุ์ Tiger worm ย่อยสลายเซลลูโลสที่เวลา 24 ชั่วโมง

เชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml))	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
Tiger No.1	0.000116	0.000115	0.000108	0.000113
Tiger No.2	0.009845	0.009652	0.009947	0.009815
Tiger No.3	0.001304	0.001319	0.001319	0.001314
Tiger No.4	0.002911	0.002911	0.002918	0.002913
Tiger No.5	0.005279	0.005230	0.005224	0.005244
Tiger No.6	0.029087	0.029144	0.028782	0.028893
Tiger No.7	0.000452	0.000489	0.000469	0.000470
Tiger No.8	0.004943	0.004954	0.004994	0.004964

ภาคผนวก ค

ผลการศึกษาพฤติกรรมของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลไส้เดือนดิน

ตารางที่ ค-1 แสดงข้อมูลค่า Optical Density (OD) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler ที่วัดได้ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง

Time (Hour)	Optical Density.1	Optical Density.2	Optical Density.3	Average
0	0.0003	0.0001	0.0002	0.0002
1	0.0788	0.0800	0.0776	0.0788
2	0.2273	0.2279	0.2273	0.2275
3	0.6761	0.6765	0.6768	0.6764
4	1.1214	1.1226	1.1220	1.1220
5	1.4930	1.4938	1.4934	1.4934
6	1.6951	1.6965	1.6958	1.6958
7	1.7645	1.7693	1.7669	1.7669
8	1.7607	1.7743	1.7675	1.7675
9	1.7721	1.7753	1.7737	1.7737
10	1.7861	1.7965	1.7913	1.7913
11	1.8322	1.8332	1.8327	1.8327
12	1.8457	1.8485	1.8471	1.8471

ตารางที่ ค-2 แสดงข้อมูลค่า Optical Density (OD) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ Blue worm ที่วัดได้ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง

Time (Hour)	Optical Density.1	Optical Density.2	Optical Density.3	Average
0	0.0543	0.0573	0.0548	0.0556
1	0.0640	0.0648	0.0647	0.0645
2	0.1059	0.1071	0.1075	0.1068
3	0.2945	0.2982	0.2961	0.2962
4	0.9361	0.9375	0.9366	0.9367
5	1.5143	1.5155	1.5154	1.515
6	1.7852	1.7868	1.7855	1.7858
7	1.9664	1.9670	1.9662	1.9664
8	1.9984	2.0008	1.9991	1.9994
9	2.0404	2.0432	2.0428	2.0421
10	2.0624	2.0634	2.0632	2.0630
11	2.0896	2.0892	2.0899	2.0895
12	2.0954	2.0964	2.0954	2.0957

ตารางที่ ค-3 แสดงข้อมูลค่า Optical Density (OD) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ Blue worm ที่วัดได้ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง

Time (Hour)	Optical Density.1	Optical Density.2	Optical Density.3	Average
0	0.0516	0.0528	0.0512	0.0518
1	0.0694	0.0697	0.0692	0.0694
2	0.2978	0.2982	0.2979	0.2979
3	0.7033	0.7055	0.7059	0.7045
4	1.1414	1.1430	1.1427	1.1423
5	1.5975	1.5985	1.5980	1.5980
6	1.8683	1.8691	1.8672	1.8676
7	1.9598	1.9620	1.9604	1.9607
8	1.9871	1.9881	1.9876	1.9876
9	2.0654	2.0664	2.0657	2.0658
10	2.0774	2.0782	2.0768	2.0774
11	2.0816	2.0824	2.0818	2.0819
12	2.0883	2.0894	2.0897	2.0891

ภาคผนวก ง

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลไส้เดือนดินในการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม

ตารางที่ ง-1 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตรของไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler ย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml))	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
0	0.009099	0.009080	0.009113	0.009097
24	0.020323	0.020339	0.020387	0.020350
			Concentration increased	0.011253

ตารางที่ ง-2 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตรของไส้เดือนดินสายพันธุ์ Blue worm ย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml))	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
0	0.010823	0.010823	0.010806	0.010817
24	0.016905	0.016901	0.016910	0.016905
			Concentration increased	0.006088

ตารางที่ ง-3 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตรของไส้เดือนดินสายพันธุ์ Tiger worm ย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml))	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
0	0.009853	0.009830	0.009833	0.009839
24	0.019336	0.019329	0.019323	0.019329
			Concentration increased	0.009490

ตารางที่ ง-4 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตรของไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler ย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml))	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
0	0.007034	0.007019	0.007046	0.007033
24	0.020044	0.020469	0.020473	0.020329
			Concentration increased	0.013296

ตารางที่ ง-5 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตรของไส้เดือนดินสายพันธุ์ Blue worm ย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml))	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
0	0.007705	0.007702	0.007692	0.007700
24	0.015272	0.015271	0.015271	0.015271
			Concentration increased	0.007571

ตารางที่ ง-6 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 3 มิลลิลิตรของไส้เดือนดินสายพันธุ์ Tiger worm ย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml))	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
0	0.007513	0.007552	0.007546	0.007537
24	0.018145	0.018163	0.018132	0.018147
			Concentration increased	0.010610

ภาคผนวก จ

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler ในการย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม

ตารางที่ จ-1 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ไส้เดือนดินสายพันธุ์ African Night Crawler ย่อยสลายกากตะกอนเยื่อกระดาษจากโรงงานอุตสาหกรรม

เวลา(วัน)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่1 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่2 (μg/ml)	ความเข้มข้นของกลูโคสครั้งที่3 (μg/ml)	ค่าเฉลี่ย (μg/ml)
0	0.0088	0.0098	0.0098	0.0094
1	0.0216	0.0173	0.0178	0.0189
2	0.0340	0.0297	0.0315	0.0317
3	0.0492	0.0517	0.0501	0.0503
4	0.0584	0.0654	0.0645	0.0627
5	0.0815	0.0865	0.0840	0.0840
6	0.0964	0.1024	0.1018	0.1002
7	0.1029	0.1027	0.1034	0.1030
8	0.1035	0.1018	0.1045	0.1032