

การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดินนาข้าว ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา

The isolation of cellulase producing bacteria from paddy field soil samples
in Phra Nakhon Si Ayutthaya province

พรพรรณ รัตนะสัจจะ^{1*} และ อุษณีย์ ทองดี¹

Pornpan Ruttanasutja^{1*} and Usanee Thongdee¹

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดินนาข้าวในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตัวอย่างดินนาข้าวในเขตพื้นที่ 5 อำเภอ ได้แก่ บางซ้าย บางบาล ท่าเรือ ภาชี และวังน้อย นำมาคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการเจือจางแบบลำดับส่วนบนอาหาร cellulose-degrading culture medium พบการเจริญของโคโลนีแบคทีเรียอยู่ในช่วง $1.06-6.87 \times 10^6$ CFU/g และสามารถคัดแยกแบคทีเรียไอโซเลททั้งหมด จำนวน 26 ไอโซเลท ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง (ร้อยละ 80.77) ผลจากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร carboxymethyl cellulose agar พบว่ามีเพียง 4 ไอโซเลท (ร้อยละ 15.38) ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเกิดเป็นวงไฮดรอลิโคไลซิสนาขนาดมากกว่าแบคทีเรียควบคุม *Paenibacillus curdianolyticus* strain B-6 ซึ่งไอโซเลท PC-C-1 มีขนาดวงไฮดรอลิโคไลซิส (2.56±1.03 เซนติเมตร) นอกจากนี้เมื่อนำไอโซเลท PC-C-1 ไปทดสอบการย่อยสลายฟางข้าวด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ที่มีการเติมฟางข้าวลงไปร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหาร และจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถย่อยฟางข้าวได้สูงถึงร้อยละ 64.80 จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายฟางข้าวจริง ซึ่งเป็นการลดวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อไปในอนาคตได้

คำสำคัญ: แบคทีเรีย เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์เอ็กซ์ตรีราเซลลูลาร์ อาหารทดสอบ carboxymethyl cellulose agar (CMC agar)

Abstract

The objective of this research was to isolate cellulase producing bacteria from rice paddy soil samples in Phra Nakhon Si Ayutthaya province. Soil samples of rice fields in five districts, namely Bangzai, Bangban, Tharuea, Phachi and Wangnoi, were used to screen for cellulase producing bacteria by serial ten-fold dilution method on cellulose-degrading culture medium. The bacterial colonization showed in the range of $1.06-6.87 \times 10^6$ CFU/g, and twenty-six isolates of bacteria were isolated. Morphological characterization of most isolates was gram-positive rod-

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

¹ Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi

* Corresponding author. E-mail: pornpan.r@rmutsb.ac.th

Received: April 25, 2020; Revised: June 25, 2020; Accepted: August 25, 2020

shaped bacteria (80.77%). The results of cellulase production test on carboxymethyl cellulose agar were found that only four isolates (15.38%) produced cellulase, which a halo zone around the colony larger than the zone produced by positive control bacteria, *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6. The isolate PC-C-1 had the highest halo zone size (2.56 ± 1.03 centimeters). Moreover, the rice straw degradation test of isolate PC-C-1 in nutrient broth added 5% rice straw at 1×10^8 cell/mL showed digestion of rice straw up to 64.80%. These results can be used as preliminary data for further studies of the practical application in rice straw degradation by bacteria, which is an agricultural waste reduction in the future.

Keywords: bacteria, cellulase, extracellular enzyme, carboxymethyl cellulose agar (CMC agar)

บทนำ

จังหวัดพระนครศรีอยุธยา มีการเพาะปลูกข้าว เป็นอาชีพหลักของเกษตรกรทั้ง 16 อำเภอ โดยมีผลผลิต ข้าวที่ออกสู่ตลาดในแต่ละปีปริมาณมาก ซึ่งหลังการ เก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวมักมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ ฟางข้าว ที่มีรายงานข้อมูลทางสถิติที่มีสูงถึง 26.90 ล้านตันต่อปี (Suphanburi Land Development Station, 2014) ทั้งนี้เกษตรกรมีกระบวนการจัดการฟางข้าวใน หลากหลายวิธี ได้แก่ การแปรรูปฟางข้าวเป็นอาหารสัตว์ หรือพลังงานทดแทน การไถกลบตอซังฟางข้าว การทำ ปุ๋ยหมักจากฟางข้าว รวมถึงการเผาฟางข้าวหลังการ เก็บเกี่ยว (Dongwongsa, & Losirikul, 2010) ซึ่งเป็น วิธีการที่เกษตรกรไม่นิยมที่นิยมเลือกใช้ เนื่องจากเป็น วิธีการที่ทำได้ง่าย ใช้ระยะเวลาสั้น และประหยัด ค่าใช้จ่าย แต่ผลเสียที่ตามมาคือเกิดฝุ่นละอองขนาดเล็ก จำนวนมาก ส่งผลเสียต่อสุขภาพต่อผู้สูดดม และเกิดเป็น ปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมที่รุนแรง ดังนั้นการหาแนวทาง ในการแก้ไขจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่ง จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มี การศึกษาและมีบทบาทสำคัญสำหรับเลือกใช้ในการกำจัด ฟางข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรีย ที่พบมีความหลากหลายและมีจำนวนมากที่สุดในดิน

และสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้มีงานวิจัยมากมายที่แสดงถึง ความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้ง ทางทางการเกษตรได้ชนิดต่างๆ เช่น ชานอ้อย ซังข้าวโพด ซี้เลื่อย เศษกระดาก รวมถึงฟางข้าว (Supasinsathit, 2012) ซึ่งการย่อยฟางข้าว นั้นเกิดจากเอนไซม์จำเพาะ ปล่อยออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่แบคทีเรีย สร้างขึ้น ทำการย่อยสลายประกอบของฟางข้าวให้เป็น สารโมเลกุลเล็กและนำเข้าสู่เซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่ง ของสารอาหาร โดยเอนไซม์ที่สำคัญคือเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลส (cellulose) (Manowattana, & Leksawasdi, 2014) ที่เป็นองค์ประกอบ หลักในฟางข้าว (ร้อยละ 40-60) (Malherbe, & Cloete, 2002) ตัวอย่างของแบคทีเรียในระดับจีโนมที่มีรายงาน การศึกษาสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Acetivibrio*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Paenibacillus*, *Ruminococcus*, *Thermonospora* และ *Actinomycetes* (Poodngam, 2014; Ahmed, Babalola, & McKay, 2017; Thanasrirangkul, Pinjai, & Vaithanomsat, 2018) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงทำการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่มี ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็น องค์ประกอบหลักของฟางข้าวที่มีประสิทธิภาพสูง

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยา จำนวน 5 อำเภอ ที่พบมีการเพาะปลูกข้าวมากที่สุด ได้แก่ บางบาล บางซ้าย วังน้อย ภาชี และท่าเรือ โดยทำการเก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มบริเวณรอบรากพืชของตอซังข้าวสายพันธุ์เดียวกัน กำหนดพื้นที่ของความกว้าง×ยาว×ลึก คือ 10×10×10 เซนติเมตร นำดินตัวอย่างมาศึกษาลักษณะทางกายภาพของชนิดดิน 3 ประเภท ได้แก่ ดินร่วน ดินเหนียวและดินทราย รวมถึงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดิน

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ตัวอย่างดินน้ำหนัก 10 กรัม ถูกนำมาทำการเจือจางด้วยวิธี serial ten-fold dilution ด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate ลงบนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) ตัวอย่างละ 3 ข้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่มีการเจริญ เพื่อดำเนินการปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g) และทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีความเหมือนและแตกต่างกันของฐานวิทยาศาสตร์ที่สังเกตได้ เช่น สี ขอบผิวหน้าโคโลนี การยกตัว เป็นต้น จากนั้นเลือกตัวแทนโคโลนีแต่ละกลุ่มมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ พร้อมทั้งศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การติดสีแบบแกรม รูปร่างของเซลล์ (Liang, Zhang, Wu, Wu, & Feng, 2014)

3. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

แบคทีเรียไฮโซเลทที่คัดแยกได้นำไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ point inoculation technique บนอาหาร

CMC agar ที่เติม 0.02 เปอร์เซ็นต์ Congo red บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตการสร้างเอนไซม์จากขนาดของวงสีที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับเชื้อควบคุมที่พบมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส คือ *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 (positive control) (Pason, Kyu, & Ratanakhanokchai, 2006)

4. การทดสอบการย่อยสลายฟางข้าวของแบคทีเรียไฮโซเลทที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด

นำฟางข้าวที่ผ่านการไปปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำจนค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าเป็นกลาง (pH 7) และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใส่ผสมลงในอาหารเหลว nutrient broth บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ดัดแปลงจาก Tachaapaikoon et al., 2012) ทำการทดลอง 3 ข้ว โดยเปรียบเทียบปริมาณของฟางข้าวที่ลดลงจากการวัดน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. คุณสมบัติทางกายภาพของดินตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างดินจากอำเภอที่มีการเพาะปลูกข้าวจำนวน 5 อำเภอ (Table 1) ทำการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณรอบรากตอซังข้าวจำวปทุมธานีสายพันธุ์ RD31, RD41, RD57 และ RD61 โดยลักษณะทางกายภาพของดินตัวอย่างทั้งหมดเป็นชนิดดินเหนียว และมีค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) อยู่ในช่วง 5.16-7.10 (Table 1) จะเห็นได้ว่าจากคุณสมบัติทางกายภาพของดินตัวอย่างดังกล่าว

ส่งผลให้น้ำสามารถซึมผ่านได้ค่อนข้างช้า การชะล้างของสารอินทรีย์น้อย จึงทำให้มีอินทรีย์วัตถุในดินค่อนข้างสูง โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าค่า

pH ของดินเหนียวอยู่ในช่วง 4.5-7.0 จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ (Hamarashid, Othman, & Hussain, 2010; Töysä, & Hänninen, 2017)

Table 1 Soil sample characteristics.

soil samples		soil physical characteristics	
sampling location (sub-district/ district)	rice varietie	texture	pH
1. Phra Khao/ Bang Ban (BB)	Pathum Thani RD41	clay	5.49
2. Bang Sai/ Bang Sai (BC)	Pathum Thani RD57	clay	5.16
3. Kra Chio/ Pha Chi (PC)	Pathum Thani RD61	clay	5.45
4. Pak Tha/ Tha Ruea (TR)	Pathum Thani RD57	clay	6.43
5. Lam Ta Sao/Wang Noi (WN)	Pathum Thani RD31	clay	7.10

2. แบคทีเรียไฮโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

จากการศึกษานำตัวอย่างดินรอบตอซังข้าวทั้ง 5 อำเภอ มาทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยวิธีการ ten-fold dilution spread plate method บนอาหารแข็งจำเพาะ CMC agar ซึ่งมีส่วนผสมของเซลลูโลสในรูปของ carboxymethyl cellulose ซึ่งจะได้ข้อมูลการเจริญของจำนวนโคโลนีแบคทีเรียและจำนวนแบคทีเรียไฮโซเลทที่แยกได้จากแต่ละตัวอย่างดิน (Table 2) โดยข้อมูลการเจริญของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารอยู่ในช่วง $1.06-6.87 \times 10^6$ CFU/g (Table 2) ซึ่งจำนวนของแบคทีเรียที่พบมีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งที่แยกได้จากตัวอย่างดินนาข้าวในแต่ละอำเภอนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ปริมาณของโคโลนีแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินในอำเภอท่าเรือมีปริมาณสูงที่สุดคือ 7.37×10^6 CFU/g และพบจำนวนน้อยที่สุดในดินตัวอย่างจากอำเภอบางบาลที่มีจำนวนโคโลนีเพียง 1.06×10^6 CFU/g แต่เมื่อทำการ

จัดกลุ่มของแบคทีเรียตามลักษณะความเหมือนและความแตกต่างของสัญญาณของโคโลนีที่ปรากฏ การเจริญบนอาหาร สามารถจัดกลุ่มและคัดเลือกโคโลนีที่เป็นตัวแทนแต่ละกลุ่มได้จำนวนรวม 26 ไฮโซเลท (Table 2) ทั้งนี้พิจารณาความหลากหลายของแบคทีเรียไฮโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากแต่ละอำเภอมีความผกผันกับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้ กล่าวคือ แบคทีเรียไฮโซเลทที่แยกได้มากที่สุดได้จากตัวอย่างดินอำเภอบางซาย จำนวน 7 ไฮโซเลท รองลงมาเป็นอำเภอบางบาล (6 ไฮโซเลท) อำเภอภาชี (5 ไฮโซเลท) อำเภอท่าเรือและวังน้อยได้แบคทีเรียได้จำนวนไฮโซเลทที่เท่ากันคือ 4 ไฮโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ของ Lu, & Mosier (2007) ที่กล่าวถึงช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์และการเกิดกิจกรรมการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส (CMC agar) ของแบคทีเรียอยู่ในช่วง pH 4-8 (สอดคล้องกับข้อมูลการศึกษา

ที่ได้ใน (Table 1) ทั้งนี้จะเป็นการทำงานของเอนไซม์ชนิดที่สร้างและปล่อยออกสู่นอกเซลล์ ที่พบได้หลากหลายจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่มีอินทรีย์วัตถุขององค์ประกอบเซลล์ลูโลส ในดินทั่วไป (Thanonkeo,

1995) และต้องมีการระบายอากาศของดินที่เหมาะสมก็ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่มีกิจกรรมในการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ (Mawadza, Rahni, & Bo, 2000)

Table 2 Colony counting and isolates from soil samples.

soil samples	colony counting (CFU/g)	isolates
1. Phra Khao/ Bang Ban (BB)	1.06×10^6	6
2. Bang Sai/ Bang Sai (BC)	1.95×10^6	7
3. Kra Chio/ Pha Chi (PC)	1.40×10^6	5
4. Pak Tha/ Tha Ruea (TR)	7.37×10^6	4
5. Lam Ta Sao/Wang Noi (WN)	6.87×10^6	4

เมื่อศึกษาการติดสีย้อมแบบแกรม (Gram's stain) และสังเกตรูปร่างของเซลล์จากแบคทีเรียไฮโซเลทที่แยกได้นั้น (Table 1) ผลที่ได้สามารถแบ่งแบคทีเรียได้ 3 กลุ่มตามความแตกต่างของลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์ (Table 3) คือ (1) แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง (rod) จำนวน 21 ไฮโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 80.77), (2) แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง จำนวน 4 ไฮโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 15.38) และ (3) แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลม จำนวน 1 ไฮโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 3.85) ซึ่งไฮโซเลทที่แยกได้ทั้งหมดมีลักษณะทางพื้นฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกัน (Figure 1) ทั้งนี้ผลการศึกษาที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยต่างๆ ที่สามารถพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลล์ลูโลสด้วยการสร้างเอนไซม์เซลล์ลูโลสออกมาเรื่อยๆ ที่พบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และมีลักษณะรูปร่างโคโลนีที่แตกต่างกัน (Mawadza, Rahni, &

Bo, 2000; Chakdar et al., 2016; Prabhu, Rao, & Li, 2017; Thanasrirangkul, Pinjai, & Vaithanomsat, 2018) ทั้งนี้ส่วนใหญ่มักพบเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากมีผนังเซลล์ที่หนาและแข็งแรงทำให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดีกว่าและมีการปรับตัวสร้างสารบางชนิดปล่อยออกมาเพื่อย่อยสลายอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์อีกด้วย ที่รู้จักกันดี ได้แก่ *Cellulomonas* (Yin, Huang, & Lin, 2010; Prabhu, Rao, & Li, 2017) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างเอนโดสปอร์ที่ทำให้ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีและสามารถงอกเป็นเซลล์ใหม่ มีการเจริญและเพิ่มจำนวนได้ดีกว่า เช่น *Bacillus* และ *Clostridium* เป็นต้น (He, Ding, & Long, 1991; Warnick, Methe, & Leschine, 2002; Balasubramanian, Toubarro, Teixeira, & Simos, 2012; Prabhu, Rao, & Li, 2017)

Table 3 Morphological characteristics of bacteria isolated from soil samples.

bacteria isolates	cell shape	Gram's stain
BB-C-1, BB-C-2, BB- C-3, BB-C-4, BB-C-5, BB-C-6, BS-C-1, BS-C-2, BS-C-3, BS-C-4, BS-C-5, BS-C-6, BS-C-7, PC-C-1, PC-C-3, PC-C-4, PC-C-5 ,TR-C-2, TR-C-3, TR-C-4, WN-C-1	rod	positive (+)
PC-C-2, TR-C-1,WN-C-2, WN-C-4	rod	negative (-)
WN-C-3	coccus	negative (-)

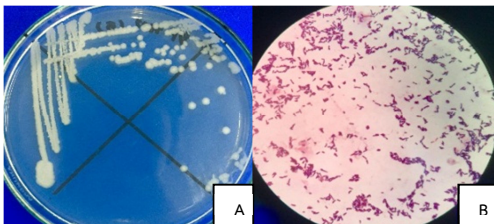


Figure 1 Morphological characteristics of bacteria isolated PC-C-1; (A) morphological of colony, (B) Gram's stain and cell shape.

3. การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียไฮโซเลทที่แยกได้

เมื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียไฮโซเลท ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร CMC agar ที่เติม 0.02 เปอร์เซ็นต์ Congo red พบว่าการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากการปรากฏวงใสรอบโคโลนี (Figure 2) เพียง 4 ไฮโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 15.38) ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยเซลลูโลสบนอาหาร CMC agar (Table 4) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสร้างจากขนาดของวงใสกับเชื้อควบคุมที่พบมีการรายงานว่ามีสร้างเอนไซม์เซลลูเลส คือ *P. curdlanolyticus* B-6 (positive control) (Pason, Kyu, & Ratanakhanokchai, 2006) นั้น ยังพบปริมาณการสร้างเอนไซม์ที่มากกว่า (ขนาดของวงใส

รอบๆ โคโลนีที่มากกว่า) โดยแบคทีเรียไฮโซเลทที่ให้ผลการสร้างเอนไซม์สูงที่สุด คือ PC-C-1 (ขนาดของวงใส 2.56 ± 1.03 เซนติเมตร) ที่แยกได้จากดินตัวอย่างในอำเภอกาฬ (Table 4) ซึ่งผลที่ได้คิดเป็นร้อยละ 3.84 ของแบคทีเรียไฮโซเลททั้งหมด

แบคทีเรียไฮโซเลทต่อความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้ในการศึกษารั้งนี้พบจำนวนน้อยนั้น มีผลที่ใกล้เคียงกันเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Ahmed, Babalola, & McKay (2017) ที่รายงานผลการคัดแยกแบคทีเรียจากดินรอบรากพืชในเมือง Mafikeng ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศแอฟริกาใต้ ได้จำนวนแบคทีเรียไฮโซเลทจำนวน 20 ไฮโซเลท แต่ทั้งนี้มีเพียง 10 ไฮโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไฮโดรไลสได้ ทั้งนี้ตัวอย่างดินที่นำมาศึกษามีความแตกต่างกันทั้งทางด้านลักษณะชนิดของดินและค่าความเป็นกรด-ด่างของดินตัวอย่าง รูปแบบของการเพาะปลูกข้าวบนพื้นที่ดิน ประวัติของการใช้ปุ๋ย/สารเคมีพื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และสภาพแวดล้อมบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง ล้วนมีผลต่อจำนวนและความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียและปริมาณในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ให้ผลแตกต่างกัน (Poodngam, 2014; Ahmed, Babalola, & McKay,

2017) รวมถึงพบว่าผลการศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างกับงานวิจัยของ Thanasrirangkul, Pinjai, & Vaithanomsat (2018) ที่รายงานผลการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างต่างชนิดกัน ได้แก่ ดินรอบรากชานอ้อย ชานอ้อย ทะลายปาล์ม และก้อนเห็ด โดยแยกแบคทีเรียไฮโซเลทสูงถึง 100 ไฮโซเลท และพบจำนวน 73 ไฮโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 73) ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ทั้งนี้ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่หลากหลายมีผลต่อจำนวนของการคัดแยกแบคทีเรียไฮโซเลทและความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส รวมถึงองค์ประกอบเซลล์ลูโลสในตัวอย่างที่นำมาศึกษา และสิ่งแวดล้อมในการเจริญของแบคทีเรียยังมีผลต่อปริมาณการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสอีกด้วย (Poodngam, 2014; Ahmed, Babalola, & McKay, 2017; Thanasrirangkul, Pinjai, & Vaithanomsat, 2018) แต่ทั้งนี้จากงานวิจัยของ Thanasrirangkul, Pinjai, & Vaithanomsat (2018) สามารถบ่งชี้ถึงการศึกษการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี Congo red (ในอาหาร CMC agar) เป็นวิธีที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและทราบปริมาณการสร้างเบื้องต้น เนื่องจากสามารถมองเห็นวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อันเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาของสี Congo red ที่ผสมลงในอาหาร โดยบริเวณที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมานั้น สาร CMC ที่ผสมอยู่ในอาหารจะถูกย่อยส่งผลให้เกิดเป็นโซนใสดังกล่าว (Johnsen, & Krause, 2014) และเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

Table 4 Cellulase activity of bacteria isolates.

isolates	clear zone (centimeters) ± standard deviation (S.D.)
control	2.10±0.14
PC-C-1	2.56±1.03
PC-C-5	2.22±0.95
TR-C-1	2.13±0.96
TR-C-2	2.45±1.51

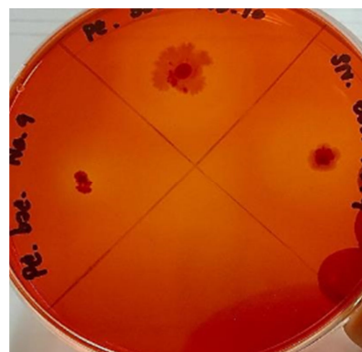


Figure 2 Cellulase test on CMC agar and the halo zone around the bacteria colony.

จากผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินที่มีการเพาะปลูกข้าวมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดปล่อยออกสู่นอกเซลล์ ออกมาย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบของฟางข้าว ให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลเล็กลงและละลายน้ำได้ และสามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ และนำไปใช้เป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญ (carbon source) ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนของตอซังข้าวและฟางข้าวที่อยู่ใต้พื้นดินที่มีการสัมผัสกับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินโดยตรง แบคทีเรียหลายกลุ่มมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ โดยกลไกการย่อยเซลลูโลสจะย่อย

โครงสร้างเซลลูโลสที่เรียงต่อกัน (crystalline cellulose) ให้เป็นสายสั้นลงในรูปเซลโลไบโอส (cellobiose) โดย อาคัยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) และ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) และได้ผลผลิตสุดท้ายคือน้ำตาลกลูโคส (glucose) ซึ่งย่อยโดย เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) (Liang, Zhang, Wu, Wu, & Feng, 2014; Nafi, Usman, Abdullahi, Mustapha, & Maiturare, 2017) ซึ่งสีย้อม Congo red จะสร้างพันธะไฮโดรเจนอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง โดยที่ระยะห่างของหมู่ที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน ซึ่งระยะห่างนั้นจะใกล้เคียงกับระยะห่างของหมู่ -OH ในเซลลูโลส โมเลกุลของสีจะหันหมู่ซัลโฟเนต (sulfonate) ที่มีประจุลบในขณะที่ผิวของเส้นใยเซลลูโลส ก็มีประจุลบเช่นกันหันออกด้านตรงข้าม เนื่องจากแรง ผลักทางไฟฟ้า ส่งผลทำให้บริเวณที่มีองค์ประกอบของ เซลลูโลสจะทำปฏิกิริยากับสีย้อมมองเห็นเป็นสีแดง และส่วนที่ไม่มีองค์ประกอบของเซลลูโลสจะไม่ถูกย้อม ด้วยสีมองเห็นเป็นบริเวณใส จึงเป็นวิธีการเหมาะสม ในการศึกษาความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียต่อ การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสดังกล่าว

4. ความสามารถย่อยสลายฟางข้าวของแบคทีเรีย ไอโซเลท PC-C-1

ผลการทดสอบการย่อยสลายฟางข้าวของ แบคทีเรียไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดคือ PC-C-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ที่มี ส่วนผสมของฟางข้าวครบ 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่าง ฟางข้าวด้วยการกรองและนำไปอบแห้งก่อนทำการชั่ง หนักน้ำหนักแห้งของฟางข้าวที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีการเติมแบคทีเรีย) พบว่า ไอโซเลท PC-C-1 มีร้อยละของการย่อยฟางข้าวที่

64.80 อาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรีย ไอโซเลท PC-C-1 มีประสิทธิภาพในการย่อยฟางข้าวมากกว่าชุดควบคุม (ที่มีร้อยละของการย่อยสลายฟางข้าวเท่ากับ 0) สำหรับ ย่อยโครงสร้างของผนังเซลล์ข้าวส่วนที่เป็นเซลลูโลส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าแบคทีเรีย ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสมีการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็น ส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชส่วนใหญ่ เพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการเมแทบอลิซึม และสร้างพลังงานภายในเซลล์ (Gilbert, & Hazlewood, 1993; Subramaniyan, & Prema, 2000; Ahmed, Babalola, & McKay, 2017; Prabhu, Rao, & Li, 2017) แต่ทั้งนี้ ในการนำไปประยุกต์ใช้จริงในการย่อยฟางข้าวใน แปลงนา นั้น ยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากในธรรมชาติ ของฟางข้าวยังมีส่วนประกอบอื่นนอกเหนือจาก เซลลูโลส ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Malherbe, & Cloete, 2002) จึงต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมของ แบคทีเรียไอโซเลท PC-C-1 ถึงคุณสมบัติการสร้าง เอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถย่อยสลายไซเลน (ชนิด ส่วนใหญ่ของเฮมิเซลลูโลส) และลิกนินเนสที่สามารถ ย่อยสลายลิกนินได้ (Ahmed, Babalola, & McKay, 2017; Thanasrirangkul, Pinjai, & Vaitanomsat, 2018) รวมถึงการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย ฟางข้าวของแบคทีเรียไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพใน การย่อยฟางข้าวได้สูงสุดและการเก็บข้อมูลเชิงสถิติ ของประสิทธิภาพการย่อยสลายฟางข้าวในระดับ ห้องทดลอง และศึกษาเก็บข้อมูลผลการย่อยฟางข้าว ในแปลงนาจริงเป็นกระบวนการสุดท้าย จึงจะสามารถ ประยุกต์ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในกลุ่มของ แบคทีเรียในการย่อยสลายฟางข้าวเพื่อลดปัญหาการ กำจัดฟางข้าวเหลือทิ้งทางการเกษตรให้แก่เกษตรกรได้

สรุป

การเก็บตัวอย่างดินรอบตอซังข้าวสาลีพันธุ์ปทุมธานีพื้นที่ 5 อำเภอ ได้แก่ บางบาล บางซ้าย วังน้อย ภาชี และท่าเรือ ในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตัวอย่างดินทั้งหมดเป็นชนิดดินเหนียว มีค่าความเป็นกรด-ด่างของดินที่เป็นกรดเล็กน้อยจนถึงค่าเป็นกลาง (pH 5.16-7.10) ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งพบการเจริญของโคไลนีแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ อยู่ในช่วง $1.06-6.87 \times 10^6$ CFU/g และคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท โดยจำแนกจำนวนพื้นที่เก็บตัวอย่างดินรอบ คือ บางบาล บางซ้าย วังน้อย ภาชี และท่าเรือ ได้แบคทีเรียไอโซเลทเท่ากับ 6, 7, 5, 4 และ 4 ไอโซเลทตามลำดับ ทั้งนี้ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์และโคไลนีของแบคทีเรียไอโซเลท พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง (ร้อยละ 80.77) และมีลักษณะสัณฐานวิทยาของโคไลนีที่แตกต่างกัน อีกทั้งผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียไอโซเลทที่แยกได้ พบเพียง 4 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 15.38) ที่มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเกิดวงใสรอบโคไลนีขนาดมากกว่าแบคทีเรียควบคุม *P. curdolanolyticus* B-6 โดยไอโซเลทที่พบสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเกิดวงใสรอบโคไลนีสูงที่สุด คือ PC-C-1 (2.56 ± 1.03 เซนติเมตร) จึงนำไปทดสอบการย่อยฟางข้าวในอาหารเหลว nutrient broth ที่มีการเติมฟางข้าวลงไป และให้ผลการย่อยฟางข้าวได้สูงถึงร้อยละ 64.80 ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 วัน ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมครอบคลุมการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเพิ่มเติมสำหรับการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย

ไอโซเลท PC-C-1 ในระดับจีโนม และการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างและทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยฟางข้าว ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง สภาวะการทำงานแบบมีอากาศและไม่มีอากาศ เพื่อการนำไปพัฒนาสำหรับใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายฟางข้าวเหลือทิ้งทางการเกษตรให้แก่เกษตรกรต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย ภายใต้งบกองทุนส่งเสริมงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2561 และขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ที่อนุเคราะห์สถานที่และสนับสนุนด้านวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือทางด้านวิทยาศาสตร์ สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Ahmed, A. A. Q., Babalola, O. O., & McKay, T. (2017). Cellulase and xylanase producing bacterial isolates with the ability to saccharify wheat straw and their potential use in the production of pharmaceuticals and chemicals from lignocellulosic material. *Waste and Biomass Valorization*, 9(5), 765-775.
- Balasubramanian, N., Toubarro, D., Teixeira, M., & Simos, N. (2012). Purification and biochemical characterization of a novel thermos-stable carboxymethyl cellulose from *Bacillus mycoides* S122C. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(8), 2191-2204.

- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6(2), 150.
- Doungwongsa, I., & Losirikul, M. (2010). *The rice straw management for N, P and K element conservation in the paddy field, Laos* (Master's thesis). Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani. (in Thai)
- Gilbert, H. J., & Hazlewood, P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of Microbiology*, 139(1), 187-194.
- Hamarashid, N. H., Othman, M. A., & Hussain, M. A. H. (2010). Effects of soil texture on chemical composition, microbial populations and carbon mineralization in soil. *The Egyptian Society of Experimental Biology*, 6(1), 59-64.
- He, Y. L., Ding, Y. F., & Long, Y. Q. (1991). Two cellulolytic *Clostridium* species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofementans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 14(2), 306-309.
- Johnsen, H. R., & Krause, K. (2014). Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 830-838.
- Liang, Y. L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., & Feng, J. X. (2014). Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2014(5), 1-13.
- Lu, Y., & Mosier, N. S. (2007). Biomimetic catalysis for hemicellulose hydrolysis in corn stover. *Biotechnology Progress*, 23(1), 116-123.
- Malherbe, S., & Cloete, T. E. (2002). Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Environmental Science and Bio/Technology*, 1, 105-114.
- Manowattana, A., & Leksawasdi, N. (2014). *Kinetic modeling enzyme xylanase* (Master's thesis). Chiang Mai University, Chiang Mai. (in Thai)
- Mawadza, C. H., Rahni, R. Z., & Bo, M. (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, 83(3), 177-187.
- Nafi, U. A., Usman, M. H., Abdullahi, B. Y., Mustapha, G., & Maiturare, H. M. (2017). Screening and identification of cellulase-producing bacteria isolated from rumen of camel in Sokoto main abattoir. *Scientific and Management*, 5(7), 5826-5832.
- Pason, P., Kyu, K. L., & Ratanakhanokchai, K. (2006). *Paenibacillus curdanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2483-2490.
- Prabhu, M., Rao, N., & Li, W. J. (2017). Chapter 4: Microbial cellulose and xylanase: their sources and application. *Advances in Biochemistry & Applications in Medicine*, 2017, 1-20.
- Poodngam, J. (2014). Isolation and selection of Actinomycetes capability to degrade lignocelluloses compounds on soil at the Namtok Yong National Park. *RMUTSB Academic Journal*, 2(2), 109-120. (in Thai)

- Subramaniyan, S., & Prema, P. 2000. Cellulase-free xylanase from *Bacillus* and other microorganism. *FEMS Microbiology Letter*, 183(1), 1-7.
- Supasinsathit, A. (2012). Energy from biomass with high lignocellulose. *Environmental Journal*, 16(2), 36-43. (in Thai)
- Suphanburi Land Development Station. (2014). *The incorporation of rice straw and crop residues after harvesting*. Retrieved 15 November 2019, from <http://r01.ldd.go.th/spb/>. (in Thai)
- Tachaapaikoon, C., Kosugi, A., Pason, P., Waeonukul, R., Ratanakhanokchai, K, Kyu, K. L., Arai, T., Murata, Y., & Mori, Y. (2012). Isolation and characterization of a new cellulosome-producing *Clostridium thermocellum* strain. *Biodegradation*, 23(1), 57-68.
- Thanasrirangkul, C., Pinjai, P., & Vaithanomsat, P. (2018). Screening of cellulase producing bacteria and efficiency of lignocellulosic decomposition. *King Mongkut's Agricultural Journal*, 36(3), 1-12. (in Thai)
- Thanonkeo, P. (1995). *Optimal conditions of cellulase production from fungi isolated from Agave sisalana Perrine plantations* (Master's thesis). Chulalongkorn University, Bangkok. (in Thai)
- Töysä, T., & Hänninen, O. (2017). Soil pH, Ca and Mg stability and pH association with temperature a groundwater silicon. *Journal of Scientific & Technical Research*, 1(7), 1851-1853.
- Warnick, T. A., Methe, B. A., & Leschine, S. B. (2002). *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4), 1155-1160.
- Yin, L. J., Huang, P. S., & Lin, H. H. (2010). Isolation of cellulose-producing bacteria and characterization of the cellulose from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 58(17), 9833-9837.