

**การแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถย่อยสลาย
สารประกอบลิกโนเซลลูโลสได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง**
**Isolation and Selection of Actinomycetes Capability to Degrade
Lignocelluloses Compounds on Soil at the Namtok Yong National Park**

จรินทร์ พุดงาม^{1*}

Jarin PoodNgam^{1*}

บทคัดย่อ

ลิกโนเซลลูโลสเป็นสารประกอบแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารที่มีค่าทางการค้า แอคติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์หลักที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสโดยเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง จังหวัดนครศรีธรรมราช 2 ตัวอย่าง คือ ดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ ที่มีค่าอินทรีย์วัตถุร้อยละ 8.74 พีเอช 3.87 และดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารน้ำตกโยงที่มีค่าอินทรีย์วัตถุร้อยละ 3.91 พีเอช 4.01 นำมาแยกและเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส ต่างกัน 4 วิธี บนอาหาร Humic acid vitamin agar ที่เติม Nalidixic acid 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถแยกเชื้อจากดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติได้ 11 ไอโซเลท และจากดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารของน้ำตกโยง ได้ 8 ไอโซเลท ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสและไซแลน พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ในวันที่ 21 ของการทดสอบ โดยสายพันธุ์ KAN-243 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด รองลงมาคือ RMU-5307 และ AC-06 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่สามารถย่อยไซแลนได้มากที่สุดคือ KAN-243, KAN-244 และ RMU-5307 ตามลำดับ

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีท ลิกโนเซลลูโลส อุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง

Abstract

Lignocellulose is the most abundant renewable carbon source for production of commercial value added feedstock chemicals. Actinomycetes are the main cellulase-producing microorganisms. Present study aimed to isolate and screen potential lignocellulolytic actinomycetes from soil. Two samples of soil were collected from Nam Tok Yong National Park, Nakhon Si Thammarat Province at the trail area with 8.74 % organic matter pH 3.87 and the hillside area with 3.91 organic matter pH 4.01. By using 4 different methods of soil threaded before isolating actinomycetes capability of degrading celluloses compounds on Humic acid vitamin agar containing 50 mg/L of

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช

¹ Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Sivijaya, Nakhon Si Thammarat Campus, Nakhon Si Thammarat.

* Corresponding author. E-mail: th_jarin@yahoo.com

Nalidixic acid, 11 isolates were isolated from trail's soil and 8 isolates were isolated from hillside's soil. After that, the capability of cellulose and xylan degradation were tested. As a results, all of the isolates could degraded cellulose after 21 days, 3 isolates that degraded most of cellulose were KAN-243, RMU-5307 and AC-06 respectively whereas 3 isolates including KAN-243, KAN-244 and RMU-5307 respectively could degrade most of xylan.

Keywords : Actinomycetes, lignocellulose, Namtok Yong National Park

บทนำ

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย โดยส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเส้นใย เชื้อในกลุ่มนี้มีความสำคัญในระบบนิเวศและมีบทบาทต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน โดยผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่หลายชนิดที่ทับถมในดินซึ่งย่อยสลายยาก เช่น ไคติน เซลลูโลส ลิกนิน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการสร้างสารต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ เช่น สารปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง และวิตามินชนิดต่างๆ

แอคติโนมัยซีทบางกลุ่มยังสามารถตรึงไนโตรเจนได้ ช่วง 20 ปี ที่ผ่านมามีอัตราการค้นพบแอคติโนมัยซีทส่วนมากสามารถแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ โดยเฉพาะบนดินและยังพบการแพร่กระจายในปุยหมัก น้ำโคลน ตม บริเวณซากพืช ซากสัตว์ และมีหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรค เชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบในดินส่วนใหญ่จะเป็น เชื้อกลุ่ม *Streptomyces* ซึ่งมีมากถึงร้อยละ 70-90 (Hayakawa *et al.*, 1988) รองลงมาคือเชื้อในสกุล *Nocardia* และ *Micromonospora* (Alexander, 1977 ; Kim, 1992)

นอกจากนี้ยังมีเชื้อที่เป็น non-streptomycetes ที่เรียกว่าแอคติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) ได้แก่ *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*,

Actinomadura, *Nocardia*, *Dectylosporangium* และ *Actinoplanes* เป็นต้น เหตุผลที่จัดเป็นแอคติโนมัยซีทหายาก เนื่องจากมีปริมาณน้อยและเจริญได้ช้า จะเจริญได้ดีเมื่อมีจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งได้ลดปริมาณลง คือในช่วงที่มีสารประกอบที่ทนทานต่อการย่อยสลายเหลืออยู่มาก แอคติโนมัยซีทหลายชนิดจะช่วยกันย่อยสลายสารพวก แป้ง อินซูลิน ไคติน เซลลูโลส ลิกนิน พาราฟิน ฟีนอล และไพรมิดีน เป็นต้น (Hayakawa *et al.*, 1988)

ในปัจจุบันการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทใหม่ๆ ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่เชื้อแอคติโนมัยซีทหายากเพื่อค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ (Lazzarini *et al.*, 2000) และการแยกเชื้อที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลไซโลสจากซังข้าวโพด (Czoch and Mordarski, 1988) และเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ทนร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสและไซแลนได้ในสภาวะที่เป็นกรด (Mac Kenzie *et al.*, 1984) นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* สามารถย่อยสลายลิกนินและสารประกอบโมโนเมอร์ที่เป็นสารอะโรมาติก ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโครงสร้างที่เป็นหน่วยของสารประกอบฟีนอลสำหรับการรวมตัวเป็นฮิวมัส (humification) จะเห็นได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายปฐมภูมิในการย่อยสลาย

และการทำให้เกิดกระบวนการเกิดอิทธิพลวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช ศึกษาคุณลักษณะของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้เบื้องต้น และทำการคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส เพื่อคุณสมบัติของเชื้อในกลุ่มนี้ในระบบนิเวศ และสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

วิธีการศึกษา

1. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

1.1 เก็บตัวอย่างจากดินจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช บริเวณที่มีการย่อยสลายสูง บริเวณแสงแดดส่องถึง และในบริเวณที่มีการทับถมของสารอินทรีย์ วิเคราะห์พีเอช และปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน (ทัศนีย์และจรงค์, 2542)

1.2 ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินที่เตรียมด้วยวิธีการที่ต่างกัน 4 วิธี คือ

1) เจือจางตัวอย่างดินที่ความเจือจาง 1:100 ในสารละลายผสมของ yeast extract ความเข้มข้นร้อยละ 6 และ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และจากนั้นเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นในความเจือจางที่เหมาะสม (Nonomura and Hayakawa, 1988)

2) อบดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจางระดับต่างๆ (Hayakawa *et al.*, 1991)

3) แช่ดินที่ความเจือจาง 1:10 ด้วยสารละลาย phenol ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 นาน

30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจางที่เหมาะสม

4) อบดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ร่วมกับแช่ดินที่ความเจือจาง 1:10 ด้วยสารละลาย phenol ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.3 หลังจากนั้นเกลี่ยตัวอย่างดินที่เตรียมด้วยวิธีการทั้ง 4 วิธี ที่ระดับความเจือจางต่างกันบนอาหาร humic acid vitamin agar (HV) ซึ่งเติม Nalidixic acid 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

1.4 ใช้เข็มเย็บเชื้อเชื้อโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำมาลากเป็นเส้นตรงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 2 (International Streptomyces Project) บ่มให้เชื้อเจริญและแยกจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ เก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทลงในอาหารวุ้นเลี้ยง ISP2 ที่เจือจาง 1 เท่า

2. การตรวจสอบเชื้อบริสุทธิ์และการเก็บเชื้อ

ใช้เข็มเย็บสปอร์หรือโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทที่แยกได้นำมาขีดบนแผ่นเซลลูโลสขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร ที่วางบนอาหาร IMA-2 จากนั้นนำไปบ่มไว้ในที่มีด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วเปิดแผ่นเซลลูโลสออก ถ้าหากเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทจะพบเชื้อเจริญผ่านแผ่นเซลลูโลสมาที่ผิวอาหาร ตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อที่แยกได้ และศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บเชื้อเป็น stock culture โดยเก็บในหลอดอาหาร IMA-2 บ่มไว้ในที่มีดอุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาต่อไป

3. ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิโนเซลลูโลส

1. ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการเกิดโซนใสเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร modified starch casein agar เป็นเวลา 14 - 21 วัน (Rautela and Cowling, 1966)

2. การย่อยสลายไซแลนโดยการเกิดโซนใส่ภายหลังการรดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เชื้อบนอาหารที่มีไซแลน เป็นเวลา 7 วัน และการย่อยไคตินโดยการเกิดโซนใสเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มีไคตินเป็นเวลา 10 วัน (วาสนา, 2539)

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์วัตถุและค่าพีเอช

จากตัวอย่างดินทั้ง 2 บริเวณ คือดินในบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ เขตอุทยานแห่งชาติ น้ำตกโยงกับดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารของน้ำตกโยงนำมาตรวจสอบหาปริมาณสารอินทรีย์วัตถุและวัดค่าพีเอช พบว่า ดินในบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ มีลักษณะเป็นดินร่วนเหนียวสีน้ำตาล มีอินทรีย์วัตถุ ร้อยละ 8.74 ค่าพีเอชเท่ากับ 3.87 ส่วนดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารน้ำตกโยง มีลักษณะเป็นดินร่วนปนทรายสีดำนี้อินทรีย์วัตถุ ร้อยละ 3.91 และมีความเป็นกรดโดยมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.01 เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่าพีเอชค่าปริมาณอินทรีย์วัตถุและปริมาณของเชื้อแอคติ-

โนมัยสียที่แยกได้ จะพบว่าดินที่มีปริมาณอินทรีย์วัตถุมากและมีค่าพีเอชเป็นกรดมาก จะได้ปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยสียมากกว่าดินที่มีปริมาณอินทรีย์วัตถุน้อยและมีค่าพีเอชเป็นกรดน้อย

2. การแยกเชื้อแอคติโนมัยสียจากดินตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเมื่อนำมาแยกเชื้อโดยใช้อาหาร HV agar ที่เติม Nalixidic acid 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธีการต่างๆ 4 วิธี คือ

1) การเจือจางตัวอย่างด้วย yeast extract เข้มข้นร้อยละ 6 และ SDS เข้มข้นร้อยละ 0.05 สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสียที่หายากจากดินทั้ง 2 ตัวอย่างได้ 11 ไอโซเลท โดยได้จากดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ 6 ไอโซเลท และดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารของน้ำตกโยง 5 ไอโซเลท 2) การอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสียได้ 4 ไอโซเลท โดยได้จากดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ 2 ไอโซเลท และดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารของน้ำตกโยง 2 ไอโซเลท 3) การเจือจางตัวอย่างด้วย phenol ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสียจากดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติได้ 1 ไอโซเลท และ 4) การอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงร่วมกับการเจือจางด้วย phenol ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสียได้ 3 ไอโซเลท โดยได้จากดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ 2 ไอโซเลท และดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารของน้ำตกโยง 1 ไอโซเลท (Table 1)

Table 1 Number of actinomycetes isolated from 4 methods of soil sample preparation.

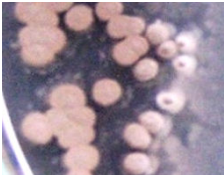
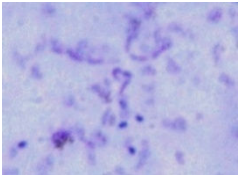
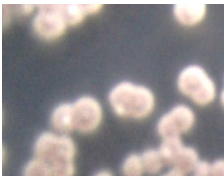
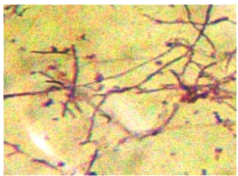
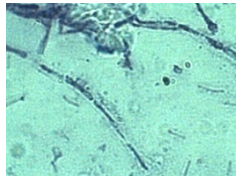
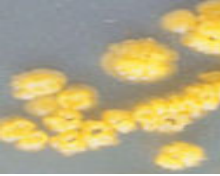
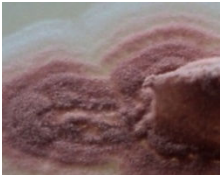
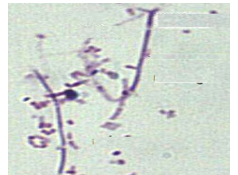
Soil source	Actinomycetes isolated from 4 methods of soil sample preparation			
	(6% YE + 0.05% SDS)	Dry heat at 120°C 1 hr	1.5% Phenol	Dry heat at 120°C 1 hr + 1.5% Phenol
Trail area	RMU-5300 RMU-5301 RMU-5306 AC-01 AC-02 AC-06	RMU-5304 RMU-5307	RMU-5303	AC-04 AC-05
Hillside area	KAN-241 BC-01 BC-02 BC-03 BC-04	KAN-243 KAN-244	-	BC-05

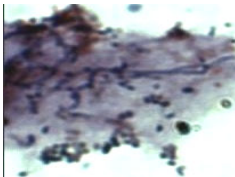
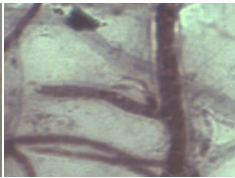
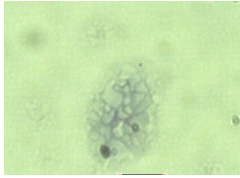
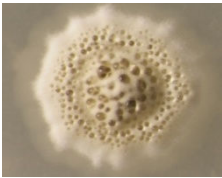
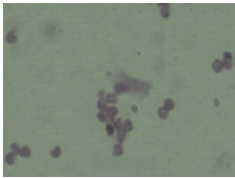
3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้

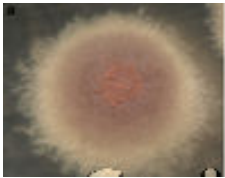
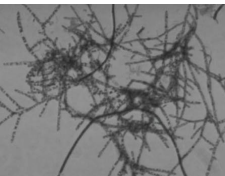
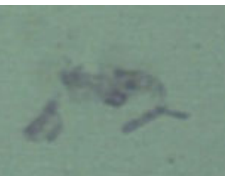
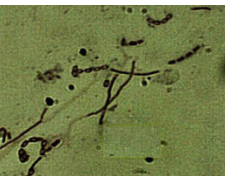
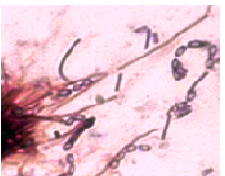
ลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้ แสดงดัง

Table 2

Table 2 Colony morphology and microscopic characteristics of the lignocellulolytic actinomycetes isolates.

Isolate	Colony morpholoies and microscopic characteristics
AC-01	Round brown colonies, roughness surface dry and brittle texture, form a short chain spore and has a pieces was caused mycelium breakage  
AC-02	Round, gray and hardness colonies, roughness surface, opaque, dry and brittle texture, create a bisporous spore  
AC-06	Irregular yellow colonies, roughness surface, Jagged-like flowers, sticky mucus texture, create a oligosporous spore  
BC-01	Round orange and hardness colonies, Irregular edges have a substrate and aerial mycelium, form a long chain spore  
BC-02	Round white colonies, powdery, smooth surface, dry and brittle, short chain spore, spread the hook at the end of spores and formed into groups on aerial mycelium  
BC-03	Irregular pink and white colonies, roughness surface, dry and brittle, pairs of spore connected by long and shoots branch on aerial mycelium  

Isolate	Colony morphologies and Microscopic characteristics		
BC-04	Irregular white colonies, roughness surface, dry and brittle oval spores, arranged in parallel rows		
RMU-5300	Round hard gray colonies, roughness surface, Irregular edges, light gray substrate mycelium and dark gray aerial mycelium with a single spores		
RMU – 5301	Round white colonies, roughness surface, Irregular edges, long chain spore		
RMU-5306	Round white colonies, umbonate elevation, undulate edge, white substrate mycelium, long chain spore		
RMU-5304	Irregular blue black and hardness colonies, roughness surface, undulate edge white mycelium and black substrate mycelium, single spore with the short aerial mycelium		
RMU-5307	Round white brown colonies, flossy slightly and water droplets on colonies, single spore with the short aerial mycelium		

Isolate	Colony morpholoies and Microscopic characteristics		
KAN - 243	Round light brown colonies, flossy slightly, reddish brown aerial mycelium and light grey aerial mycelium, short chain oval spore		
KAN-244	Round light brown colonies , flossy slightly, gray substrate mycelium and brown and light green aerial mycelium, and water droplets on colonies, long chain spore		
RMU-5303	Round gray and hardness colonies, roughness surface, Irregular edges, gray substrate mycelium and dark grey aerial mycelium, short chain oligosporous spore		
AC-04	Round white colonies, smooth, roughness surface, dry and brittle. short chain oval spore and cluster arrangement		
AC-05	Round orange smooth and curled colonies, dry and brittle, pale aerial mycelium, long chain oval spore		
BC-05	Round brownish black smooth and curled colonies, dry and brittle, short chain spore flexion be hooked, spread and cluster the aerial mycelium		

4. ความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

4.1 ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส

เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 19 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส บนหลอดอาหาร starch casein agar ที่มีส่วนผสมของกระดาษกรองเบอร์ 1 ผลการทดสอบดัง Table 3 พบว่า มีเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวนทั้งสิ้น 17 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส ได้ภายใน 3 วันแรกของการทดสอบและทุกไอโซเลทสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ในวันที่ 21 ของการทดสอบ ส่วนไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดคือ KAN-243 รองลงมาคือ RMU-5307 และ AC-06 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการย่อยสลายเซลลูโลสจะเป็นไปอย่างช้า ๆ ดังในงานวิจัยของ Wilkie (1979) ที่กล่าวว่า แมคโครโมเลกุลของเซลลูโลสจะมีโครงสร้างซับซ้อน มีลักษณะเป็นผลึกซึ่งไม่ละลายน้ำและทนทานต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรเซชัน (depolymerization) ด้วยเอนไซม์และสารเคมี ในธรรมชาติเซลลูโลสจะรวมอยู่กับเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน (Marchessault and Sundararajan, 1983) ทำให้ยากต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ Sandrak (1977) อธิบายว่า นอกจากเชื้อ *Streptomyces* แล้วยังพบว่า *Micromonospora* สามารถย่อยสลายเซลลูโลส พบว่ามีปริมาณของเชื้อแอกติโนมัยซีท สกุล *Micromonospora* ซึ่งสามารถย่อยสลายเซลลูโลสสูง

ถึง 3×10^3 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมของดิน บริเวณรากต้นข้าวสาลี ในขณะที่ Johnson and Cross (1976) พบว่า สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora* ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากไม้ที่ผุพัง

4.2 ความสามารถในการย่อยไซแลน

เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 19 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการย่อยไซแลน ในอาหาร Xylan medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่า เชื้อที่สามารถย่อยสลายไซแลนได้มี 14 ไอโซเลท โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ที่สามารถย่อยไซแลนได้มากที่สุด คือ KAN-243, KAN-244 และ RMU-5307 ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่ามีเพียงเชื้อ BC05 และ RMU-5300 ที่ให้กิจกรรมการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสและไซแลนได้น้อย จากความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ไซแลนและเซลลูโลส แสดงให้เห็นบทบาทของเชื้อแอกติโนมัยซีทในการย่อยสลายสารต่าง ๆ ในระบบนิเวศได้ซึ่งในการทดลองนี้ยังไม่ครอบคลุมพอที่จะศึกษาบทบาทของเชื้อแอกติโนมัยซีทดังกล่าว หากจะให้สมบูรณ์ควรทดสอบการย่อยสลายลิกนิน และไคตินด้วยแต่เนื่องจากติดขัดด้านงบประมาณงานวิจัยต่อไปคือการทดสอบความสามารถดังกล่าว และการทดสอบการย่อยสลายสารต่าง ๆ ในธรรมชาติต่อไป

Table 3 The capability to degradable of xylan and cellulose of Actinomycetes isolates.

Isolate	The diameter of xylan degradation 7 days (mm.)	The depth of cellulose degradation (mm.)		
		3 day	7 day	21 day
AC-01	12	3	6.5	22
AC-02	14	5	7.5	24
AC-04	13.5	4	6.5	20
AC-05	10	3	5.5	16
AC-06	11	6	9	28
BC-01	10	3.5	7	19
BC-02	0	3	6	17
BC-03	10.5	5.5	8.5	25
BC-04	0	3	5	14
BC05	0	1	3	8
RMU-5300	0	0	3	7
RMU-5301	9.5	5	7.5	24
RMU-5303	13	6.5	9.5	29
RMU-5304	11.5	3.5	7	21
RMU-5306	0	3	5	12
RMU-5307	14.5	2.5	4.5	13.5
KAN-241	8.5	3	4	13
KAN-243	21	8	12	37
KAN-244	20	3	5	15

สรุป

1. ปริมาณอินทรีย์วัตถุและค่าพีเอช ของตัวอย่างดินจากบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง
2 บริเวณ ดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ มีค่าอินทรีย์วัตถุร้อยละ 8.74 พีเอชเท่ากับ 3.87 ส่วนดิน

บริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารน้ำตกโยง มีค่าอินทรีย์วัตถุร้อยละ 3.91 พีเอชเท่ากับ 4.01
2. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสจากดิน 2 ตัวอย่างในเขตบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง ด้วยอาหาร

humic acid vitamin agar ที่เติม Nalidixic acid 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เชื้อทั้งหมด 19 ไอโซเลท โดยแยกด้วยวิธีต่าง ๆ 4 วิธี คือ การเจือจางตัวอย่างดินด้วย yeast extract เข้มข้นร้อยละ 6 และ โซเดียมไดคิซัลเฟต เข้มข้น ร้อยละ 0.05 ซึ่งสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ได้ 11 ไอโซเลท โดยได้จากดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ 6 ไอโซเลท และดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารของน้ำตกโยง 5 ไอโซเลท การนำดินมาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง สามารถแยกเชื้อได้ 4 ไอโซเลท โดยได้จากดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ 2 ไอโซเลท และดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารของน้ำตกโยง 2 ไอโซเลท และการแช่ดินด้วยสารละลายฟีนอล ร้อยละ 1.5 นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถแยกเชื้อจากดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติได้ 1 ไอโซเลท ส่วนการอบดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงร่วมกับการเจือจางด้วย phenol ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ได้ 3 ไอโซเลท โดยได้จากดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ 2 ไอโซเลท และดินบริเวณเชิงเขาใกล้ลำธารของน้ำตกโยง 1 ไอโซเลท

3. เชื้อ แอ ค ตี โน มัย ซี ท ที่ ย่อย ส ลาย สารประกอบเซลลูโลส 17 ไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส ได้ภายใน 3 วันแรกของการทดสอบ และทุกไอโซเลทสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ในวันที่ 21 ของการทดสอบ โดยเชื้อที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดคือ KAN-243 รองลงมาคือ RMU-5307 และ AC-06 ตามลำดับ

4. พบเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถย่อยสลายไซลันได้มี 14 ไอโซเลท โดยเชื้อแอคติโนมัยซีท์

ที่แยกได้ที่สามารถย่อยไซลันได้มากที่สุด คือ KAN-243, KAN-244 และ RMU-5307 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

แอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการนำไปใช้ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อการเกษตร การอุตสาหกรรม หรือแม้แต่การศึกษาทางการแพทย์เพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยฉบับนี้ เริ่มต้นจนสำเร็จลงด้วย ความสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ผู้วิจัยได้รับการช่วยเหลือจาก นางสาวฮัสนีดา แซะอาห์ลี และนางสาวกาญจนา ฤทธิผล ในกระบวนการทำวิจัย ตลอดจนคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย ประโยชน์และคุณค่าของงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับผู้มีพระคุณทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

- ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และ จงรักษ์ จันทรเจริญสุข. 2542. การวิเคราะห์ดินและพืช. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ฯ.
- วาสนา ฉัตรดำรง. 2539. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil microbiology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

- Czoch, W. P. and M. Mordarski. 1988. Actinomycete Enzymes. In: M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski, Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press. San Diego. P. 219 – 283.
- Hayakawa, M., K. Ishizawa and H. Nonomura. 1988. Distribution of Rare Actinomycetes in Japanese Soils. *J. Ferment Technology* 66 : 367 - 373.
- Hayakawa, M., Sadaka, T., Kayiura, T. and Nonomura, H. 1991. New methods for the highly selective isolation *Micromonospora* and *Microbispora*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 72 : 320-326.
- Johnson, D. W, and T. Cross. 1976. The Occurrence Distribution of Actinomycetes in Lake of the Eng Lake District. *Freshwater Biol* 6 : 457-463.
- Kim, J.C. 1992. Isolation and Screening of Actinomycetes from Natural Environment. In: UNESCO Regional Training Workshop on Exploitation of Novel Microorganisms, Especially Actinomycetes Taedox Science Town Taejon Republic of Korea. Aug. 24-Sept. 2.
- Lazzarini A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli. 2000. Rare genera of Actinomycetes as Potential Producers of New Antibiotics. *Antoine van Leeuwenhoek* 78 : 399 - 405.
- Mac Kenzie, C. R., D. Bilous and K. G. Johnson. 1984. Purification and Characterization of an exo-glucanase from *Streptomyces favogriseus*. *Can. Journal of Microbiol* 30 : 1171 - 1178.
- Marchessault, R. H. and P. R. Sundararajan. 1983. Cellulose In: Aspinall, G.O. *The Polysaccharides* 2 : 11-95.
- Nonomura, H., and M. Hayakawa. 1988. New Methods for the Selective Isolation of Soil Actinomycetes. *Biology of Actinomycetes* 88 : 288 - 293.
- Rautela, G. S., and E. B. Cowling. 1966. Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. *Applied Microbiology* 14 : 892 – 98.
- Sandrak, N. Y. 1977. Cellulose Decomposition by *Micromonosporas*. *Microbiol* 46 : 478 - 481.
- Wilkie, K. C. B. 1979. The hemicelluloses of grasses and cereals. *Adv. Carbohydrate Chemical Biochemical* 36 : 215 – 264.