

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย	การคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของตัวอ่อนหนอนผีเสื้อและตัวอ่อนของด้วงชนิดต่างๆ ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส ไชแลน แป้ง และเพคติน
	Isolation and Identification of Bacteria from The Gut of Various Butterfly and Beetle Larva that have Potential to Degrade Cellulose, Xylan, Starch and Pectin
ชื่อผู้วิจัย	วิชุดา กล้าเวช
	สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์
	มณฑล เลิศวารปรีชา
	สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
	มหาวิทยาลัยทักษิณ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส ไชแลน แป้ง และเพคตินจากหนอนชนิดต่างๆ ซึ่งเก็บตัวอย่างตัวอ่อนหนอน และด้วงจากต้นพืชในบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง และจากร้านที่มีการจำหน่ายในบริเวณอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด โดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ โดยการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายด้วยการวัดวงใส (clear zone) ต่ออาหารแข็งเซลลูโลส ไชแลน แป้ง และเพคติน ผลการวิจัยพบว่าสามารถแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส เพคตินเนส และอะไมเลส จากตัวอย่างหนอนชนิดต่างๆ ในพื้นที่อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุงได้ทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ ด้วงมะพร้าว หนอนปลอก หนอนปกเหลือง หนอนผักบุ้ง หนอนบู่ หนอนนก หนอนม้วนใบกล้วย และหนอนใบคะน้า โดยคัดแยกได้จำนวน 42 ไอโซเลท (ด้วงมะพร้าว 4 ไอโซเลท หนอนปลอก 7 ไอโซเลท หนอนปกเหลือง 4 ไอโซเลท หนอนผักบุ้ง 2 ไอโซเลท หนอนบู่ 7 ไอโซเลท หนอนนก 11 ไอโซเลท หนอนม้วนใบกล้วย 5 ไอโซเลท และหนอนใบคะน้า 2 ไอโซเลท) ที่ให้ clear zone บนอาหาร CMC ไชแลน แป้ง และเพคติน นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดในอาหารเหลวโดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด คือเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคตินเนส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.11 0.63 0.59 และ 0.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด คือ 1.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus sciuri* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไชลานเนสมากที่สุด คือ 0.90 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter* sp. มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด คือ 1.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์

พันธุ์ *Enterobacter cancerogenus* มีกิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเนสสูงที่สุด คือ 1.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อีกทั้ง ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene sequencing ได้ทั้งสิ้น 37 สายพันธุ์ โดยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อย่อย CMC ได้มี 9 สายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus thuringiensis* *Bacillus cereus* *Enterococcus raffinosus* *Enterobacter aerogenes* *Bacillus tequilensis* *Acinetobacter soli* *Enterococcus gallinarum* *Bacillus subtilis* และ *Enterobacter cloacae* นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อย่อยไซเลน มี 12 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus pasteurii* *Pseudomonas taiwanensis* *Acinetobacter radioresistens* *Staphylococcus sciuri* *Bacillus subtilis* *Enterobacter aerogenes* *Staphylococcus gallinarum* *Enterococcus faecalis* *Staphylococcus warneri* และ *Enterobacter cloacae* ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้ง มี 8 สายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus thuringiensis* *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* *Bacterium endosymbiont* *Enterobacter* sp. *Acinetobacter schindleri* *Bacillus subtilis* และ *Enterobacter cloacae* ในขณะที่แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เพคตินเนสเพื่อย่อยเพคติน มี 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* *Enterococcus raffinosus* *Bacillus cereus* *Enterobacter cancerogenus* *Enterobacter* sp. *Bacillus tequilensis* *Enterococcus gallinarum* และ *Enterobacter cloacae*

งานวิจัยนี้ถือได้ว่าเป็นการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างหนอนที่มากที่สุดในประเทศไทย คือ 8 ตัวอย่าง อีกทั้งยังสามารถแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส ไซเลน แป้ง และเพคติน ได้จำนวนมากกว่างานวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ โดยแยกและคัดเลือกได้ 42 ไอโซเลท เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้แบคทีเรียทั้งหมด 37 สายพันธุ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลส และเพคตินเนส

Abstract

This research aims to isolate and screen bacteria that capable produce cellulose, xylan, starch and pectin. The various types of butterfly and beetle larvae were collected from the plants around Thaksin University, Phatthalung campus and the distribution area in the Pa-phayom District, Phatthalung Province. The result can isolate the cellulose, xylanase, amylase and pectinase-producing bacteria from 8 types of worm such as *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, Bagworm, *Orgyia postica*, *Eupterote testacca* Walker, *Trichoplusia ni* (Hubner), *Tenebrio molitor*, *Erionata thrax* Linnaeus and *Plutella xylostella*. The result exhibited 42 isolates (4 isolates from *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, 7 isolates from Bagworm, 4 isolates from *Orgyia postica*, 2 isolates from *Eupterote testacca* Walker, 7 isolates from *Trichoplusia ni* (Hubner), 11 isolates from *Tenebrio molitor*, 5 isolates from *Erionata thrax* Linnaeus and 2 isolates from *Plutella xylostella*) that degrade and have clear zone on CMC, xylan, starch and pectin agar. In addition, *Enterobacter cloacae* can produce 4 enzymes in CMC, xylan, starch and pectin broth with measuring the amount of reducing sugar by DNS method that showed cellulose, xylanase, amylase and pectinase activities as 0.11, 0.63, 0.59 and 0.98 U/ml, respectively. Moreover, *Enterobacter faecalis* showed the highest cellulose activity as 1.15 U/ml, *Staphylococcus sciuri* indicated the highest xylanase activity as 0.90 U/ml whereas *Enterobacter* sp. showed the highest amylase activity as 1.81 U/ml and *Enterobacter cancerogenus* showed the highest pectinase activity as 1.04 U/ml. Then the identification result of the isolated bacteria strains that have the potential to produce 4 enzymes with 16S rRNA gene sequencing technique indicated 37 bacteria strains such as the cellulose enzyme to digest CMC has 9 strains, *Bacillus thuringiensis* *Bacillus cereus* *Enterococcus raffinosus* *Enterobacter aerogenes* *Bacillus tequilensis* *Acinetobacter soli* *Enterococcus gallinarum* *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae*. The xylanase enzyme to degrade xylan has 12 strains, *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus pasteurii* *Pseudomonas taiwanensis* *Acinetobacter radioresistens* *Staphylococcus sciuri* *Bacillus subtilis* *Enterobacter aerogenes* *Staphylococcus gallinarum* *Enterococcus faecalis* *Staphylococcus warneri* and *Enterobacter cloacae* and the amylase enzyme to degrade starch has 8 strains, *Bacillus thuringiensis* *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* *Bacterium endosymbiont* *Enterobacter* sp. *Acinetobacter schindleri* *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* while the pectinase enzyme to digest pectin has 8 strains including *Bacillus thuringiensis* *Enterococcus raffinosus* *Bacillus cereus* *Enterobacter cancerogenus* *Enterobacter* sp. *Bacillus tequilensis* *Enterococcus gallinarum* and *Enterobacter cloacae*.

By the conclusion of this present study, we able to isolates of several hydrolytic enzyme-producing bacteria from 8 species of butterfly and beetle larvae were the most number comparing to any previously reports in Thailand. In addition, this research can also be isolated and screened the enzyme-producing bacteria that capable to degrade cellulose, xylan, starch and pectin with a greater number (42 isolated strains) more than previously reports. Moreover, when molecular identification technique was used to prove the isolated bacteria strains, 37 bacterium species were potential producing of cellulose, xylanase, amylase and pectinase enzymes.