การคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส จากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน จังหวัดมหาสารคาม ด้วยวิธี Gram's iodine

Screening of cellulolytic bacteria isolated from Dun Lamphan No-hunting Area Maha Sarakham Province using Gram's iodine method

กรชนก แก่นคำ[1], ศิริมา สุวรรณกูฏ จันต๊ะมา[2], สุดารัตน์ ถนนแก้ว[3*]
Kornchanok Kaenkham[1], Sirima Suvarnakuta Jantama[2], Sudarat Thanonkeo[3*]

บทคัดย่อ

เซลลูโลไลติคแบคทีเรีย (cellulolytic bacteria) เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในผนังเซลล์พืชให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แบคทีเรียกลุ่มนี้มีอัตราการเจริญเร็ว และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ซับซ้อนกว่าเชื้อรา ในการวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างดินและเศษซากพืชจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน จังหวัดมหาสารคาม รวมทั้งสิ้น 36 ตัวอย่าง นำมาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการเจือจาง และเกลี่ยบนอาหารสูตร Nutrient agar (NA) จากการศึกษาสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 763 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี Gram's iodine บนอาหารแข็ง Basal medium (BSM) พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งสิ้น 557 ไอโซเลท เมื่อนำมาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยเซลลูโลส โดยการวิเคราะห์สมการความสามารถในการไฮโดรไลซีส (hydrolysis capacity value: HC) จากสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรีย พบว่าเซลลูโลไลติคแบคทีเรีย จำนวน 5, 366, 167 และ 19 ไอโซเลท มีค่าความสามารถในการไฮโดรไลซีส ที่ระดับ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

คำสำคัญ: การคัดเลือก เซลลูโลไลติคแบคทีเรีย เซลลูเลส ความสามารถการไฮโดรไลซีส

Abstract

Cellulolytic bacteria are a group of bacteria that can produce cellulase for hydrolysis of cellulose, a major component in plant cell wall, into monosaccharides. This group of bacteria has a high growth rate and produces more complex cellulase than that of fungi. In this research study, 36 samples of soil and plant decayed collected from Dun Lamphan No-hunting area, Maha Sarakham province were subjected to isolation of cellulolytic bacteria by using serial dilution and spread plate technique on nutrient agar medium. As found in this study, 763 isolates of bacteria were obtained. The ability of bacteria on cellulase production was tested by Gram's iodine method using Basal medium and the results showed that only 557 isolates were able to produce the cellulase enzyme. Comparative study on hydrolysis capacity (HC) of the bacteria was determined based on the ratio of diameter of clear zone and colony. The results found that 5, 366, 167 and 19 isolates of cellulolytic bacteria showed HC score at the level of 1, 2, 3 and 4, respectively.

Keywords: screening, cellulolytic bacteria, cellulase, hydrolysis capacity value (HC)

---

[1] *นิสิตปริญญาโท, [3]อาจารย์, สาขาความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150*

[2] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190*

[1] *Graduate student, [3]Lecturer, Biodiversity program, Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Kantarawichai, Mahasarakam University, Maha Sarakham 44150, Thailand*

[2] *Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Warinchamrab, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*

* *Corresponding author : Sudarat Thanonkeo, Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Kantarawichai, Mahasarakam University, Maha Sarakham 44150, Thailand. E-mail:sthanonkeo@gmail.com*

บทนำ

ประเทศไทยมีภูมิประเทศอยู่ในเขตร้อนชื้น (Tropical climates)[1] แบ่งภูมิภาคต่างๆตามพื้นที่ตั้ง โดยพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีภูมิประเทศเป็นที่ราบสูง ด้านทิศตะวันตกมีทิวเขาเพชรบูรณ์และทิวเขาดงพญาเย็นเป็นแนวกั้นภาคเหนือและภาคกลาง ทางใต้มีทิวเขาสันกำแพงกั้นภาคตะวันออก และทิวเขาพนมดงรักกั้นประเทศกัมพูชา พื้นที่ภาคกลางเป็นที่ราบลุ่ม บางพื้นที่เป็นภูเขาไม่สูงมาก ยกเว้นด้านตะวันตกของภาคมีเทือกเขาตะนาวศรีกั้นประเทศพม่า ทางตะวันออกมีทิวเขาดงพญาเย็นกั้นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พื้นที่ภาคตะวันออกมีภูมิประเทศเป็นเทือกเขาและที่ราบ ทางด้านตะวันออกเฉียงใต้ของภาคมีทิวเขาบรรทัดเป็นแนวกั้นพรมแดนกับประเทศกัมพูชา ถัดเข้ามามีทิวเขาจันทบุรี ทางด้านเหนือมีทิวเขาสันกำแพงและทิวเขาพนมดงรักวางตัวในแนวตะวันตก-ตะวันออกเป็นแนวแบ่งเขตกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทางด้านตะวันตกและทางด้านใต้เป็นฝั่งทะเลติดกับอ่าวไทย พื้นที่ภาคใต้เป็นคาบสมุทรขนาบข้างด้วยทะเล ทิศตะวันตกคือทะเลอันดามัน ทิศตะวันออกคืออ่าวไทย ตอนบนของภาคมีทิวเขาตะนาวศรีซึ่งวางตัวในแนวเหนือ-ใต้ต่อเนื่องมาจากภาคเหนือและภาคกลางเป็นแนวกั้นพรมแดนกับประเทศพม่า ทางตอนล่างของภาคมีทิวเขาภูเก็ตและทิวเขานครศรีธรรมราชวางตัวในแนวเหนือ-ใต้ แบ่งภาคนี้ออกเป็นสองส่วนคือที่ราบชายฝั่งทะเลด้านตะวันออกติดกับอ่าวไทยซึ่งมีอาณาเขตกว้างขวางและที่ราบด้านตะวันตกขนานกับทะเลอันดามันและช่องแคบมะละกา ทิศใต้มีทิวเขาสันกาลาคีรีเป็นแนวกั้นประเทศมาเลเซีย[2] ด้วยสภาพภูมิประเทศและที่ตั้งนี้ทำให้ประเทศไทยเป็นศูนย์รวมของพันธุ์พืชและพันธุ์สัตว์นานาชนิด มีระบบนิเวศป่าไม้หลายแบบทั้งป่าดงดิบและป่าผลัดใบ โดยป่าดงดิบแยกย่อยเป็น ป่าดิบชื้น ป่าดิบแล้ง ป่าดิบเขา ส่วนป่าผลัดใบแยกย่อยเป็น ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง[3] ทำให้ประเทศไทยมีความหลากหลายของระบบนิเวศ มีระบบนิเวศทั้งเหมาะสมและไม่เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ เช่น น้ำพุร้อน เหมืองแร่ ดินเปรี้ยว ดินเค็ม จึงเป็นแนวทางที่นักวิจัยจะค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติแตกต่างไปจากการศึกษาของนักวิจัยที่มีการค้นพบแบคทีเรียในภูมิภาคอื่นๆ ของโลก

นอกจากนี้แล้วแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในประเทศไทยมีข้อได้เปรียบเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ซื้อจากต่างประเทศ เพราะแบคทีเรียไม่ต้องปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมและสามารถทำงานได้จริง อีกทั้งยังเป็นการลดการนำเข้าวัสดุทางชีวภาพจากต่างประเทศ จึงมีความสำคัญที่จะสำรวจและศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเซลลูโลไลติคแบคทีเรียในประเทศไทย ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการย่อยสลายเศษใบไม้และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลส โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะทำลายพันธะ β-1,4 glycosidic ของเซลลูโลส ให้มีการเปลี่ยนแปลงจากโพลีแซคาไรด์ เป็นโมโนแซคาไรด์ ที่มีความบริสุทธิ์สูง จะได้น้ำตาลกลูโคส[4] และสามารถนำกลูโคสไปใช้ในขบวนการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นพลังงานทดแทนได้

จากการศึกษาข้อมูลด้านการรวบรวม การคัดแยกและการนำเซลลูโลไลติคแบคทีเรีย ไปใช้ประโยชน์ในประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ชุ่มน้ำมีข้อมูลน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลัก เพื่อรวบรวมและคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่พบในดินและเศษซากใบไม้ชนิดต่างๆ ในบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน อำเภอนาเชือก จังหวัดมหาสารคาม ที่เป็นพื้นที่ชุ่มน้ำที่สำคัญแห่งหนึ่งในจังหวัดมหาสารคาม[5,6] คาดว่าน่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ เพราะเป็นพื้นที่ที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลลูโลไลติคแบคทีเรีย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน และเศษซากใบไม้

เก็บตัวอย่างดิน และเศษซากใบไม้รอบๆ โคนต้นไม้ในบริเวณพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน จังหวัดมหาสารคาม แสดงในภาพประกอบที่ 1 เก็บตัวอย่างดินในระดับพื้นดิน 0-15 เซนติเมตร ประมาณ 5-10 กรัม[7]และเก็บเศษซากใบไม้บริเวณรอบโคนต้นไม้ เว้นระยะการเก็บตัวอย่างแต่ละจุดของการเก็บตัวอย่างดินไม่น้อยกว่า 200 เมตร และนำตัวอย่างทั้งหมด แยกบรรจุในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ ปิดปากถุงให้แน่นสนิท เก็บในถุงพลาสติกทึบแสง พร้อมบันทึกรายละเอียดตัวอย่างที่เก็บ ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง หลังการเก็บตัวอย่างไม่เกิน 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส[7] จนกว่าจะทำการตรวจวิเคราะห์

Figure 1 Dun Lamphan No-hunting Area, Maha Sarakham Province [8]

การคัดแยกแบคทีเรีย[9-12]

นำตัวอย่างดินและเศษใบไม้ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นำมาเจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บนอาหาร Nutrient agar (NA) (Beaf extract 3 กรัม Peptone 5 กรัม, NaCl 5 กรัม, วุ้น 1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) เกลี่ยสารละลายตัวอย่าง ด้วยแท่งแก้วงอ (Spreader) ให้ทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกัน เก็บแบคทีเรียตัวอย่าง ในอาหารวุ้นเอียง (Slant) และเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี Gram´s iodine (ดัดแปลงจาก[10])

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth (NB) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง วัดความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียให้มีค่าเท่ากับ McFarland No. 0.5 ด้วยเครื่องวัดความเข้มของแสง (spectrophotometer) ที่ 625 nm หยดสารละลายแบคทีเรียลงบนอาหาร Basal medium agar[13] (BSM) ($NaNO_3$ 2 กรัม, KCl 0.5 กรัม, K_2HPO_4 1 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม, proteose peptone 2 กรัม, วุ้น 20 กรัม และ carboxymethyl cellulose sodium salt, CMC 0.5 กรัม) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มแบคทีเรียในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติม Gram´s iodine (KI 2 กรัม, I 1 กรัม, น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร) สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ถึง 5 นาที ดูดสารละลายไอโอดีนออกด้วยหลอดหยด ทำการวิเคราะห์ผลการไฮโดรไลซีส โดยวัดค่าการเกิดโซนใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นและนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าความสามารถในการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis capacity value) จากสมการ (1)[14]

สมการ การไฮโดรไลซิส (HC)

$$\text{ค่าการไฮโดรไลซิส} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (cm)}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรีย (cm)}} \quad (1)$$

เกณฑ์การจัดระดับค่า HC

1 = 1.01 - 1.09
2 = 1.10 - 2.00
3 = 2.01 - 3.00
4 = 3.01 - 4.00

ผลการวิจัยและวิเคราะห์ผล

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากการเก็บตัวอย่างดินและเศษใบไม้ใต้ต้นไม้ ในพื้นที่ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน ด้านทิศเหนือ เมื่อวันที่ 26 สิงหาคม พ.ศ. 2556 ตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมด 36 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาคัดเลือกแบคทีเรีย ด้วยเทคนิคการเจือจาง (serial dilution) และการเกลี่ยบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ด้วยวิธี spread plate สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 763 ไอโซเลท แสดงจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ ในเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน จังหวัดมหาสารคามใน Table 1

Table 1 Bacteria isolation of 36 samples from Dun Lamphan No-hunting area, Maha sarakam Province

No.	Sample ID.	Bacteria (Isolate)	GPS
1	1.1	25	48P0288623 UTM1744918
2	1.2	22	48P0288623 UTM 1744918
3	2.1	19	48P028863 UTM 1744922
4	2.2	20	48P0288632 UTM1744922
5	3.1	32	48P0288536 UTM 1744941
6	3.2	10	48P0288536 UTM 1744941
7	4.1	25	48P0288627 UTM 1744825
8	4.2	13	48P0288627 UTM 1744825
9	5.1	31	48P0288644 UTM 1744933
10	5.2	16	48P0288644 UTM 1744933
11	6.1	13	48P0288629 UTM 1744828
12	6.2	11	48P0288629 UTM 1744828
13	7.1	9	48P0288663 UTM 1744944
14	7.2	22	48P0288663 UTM 1744944
15	8.1	30	48P0288590 UTM 1744913

Table 1 Bacteria isolation of 36 samples from Dun Lamphan No-hunting area, Maha sarakam Province (Cont.)

No.	Sample ID.	Bacteria (Isolate)	GPS
16	8.2	15	48P0288590 UTM 1744913
17	9.1	20	48P0288455 UTM 1744947
18	9.2	8	48P0288455 UTM1744947
19	10.1	14	48P0288455 UTM1744947
20	10.2	15	48P0288460 UTM1744937
21	11.1	27	48P0288460 UTM1744937
22	11.2	16	48P0288370 UTM1744906
23	12.1	32	48P0288338 UTM1744884
24	12.2	27	48P0288338 UTM1744884
25	13.1	28	48P0288347 UTM1744809
26	13.2	22	48P0288347 UTM1744809
27	14.1	25	48P0288445 UTM1744717
28	14.2	21	48P0288445 UTM1744717
29	15.1	9	48P0288442 UTM1744763
30	15.2	14	48P0288442 UTM1744763
31	16.1	36	48P0288519 UTM1744816
32	16.2	25	48P0288519 UTM1744816
33	17.1	35	48P0288571 UTM1744746
34	17.2	31	48P0288571 UTM1744746
35	18.1	17	48P0288572 UTM 1744731
36	18.2	28	48P0288572 UTM 1744731
รวม	763		

Table 1 แสดงการคัดแยกแบคทีเรียจากเศษดินและเศษใบไม้ พบว่าตัวอย่าง 16.1 เป็นตัวอย่างที่มีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้มากที่สุด สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้จำนวน 36 ไอโซเลท ตัวอย่างที่มีคัดแยกแบคทีเรียได้น้อยที่สุดคือตัวอย่าง 9.2 คัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 8 ไอโซเลท

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยสารละลายไอโอดีน (Gram 's iodine method) ของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 763 ไอโซเท พบว่ามีแบคทีเรียที่ความสามารถในการไฮโดรไลซีส อาหาร Basal Medium (BSM) ที่มี carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) เป็นส่วนประกอบ มีจำนวนแบคทีเรีย ทั้งหมด 557 ไอโซเลท นำผลการเปรียบเทียบระดับการไฮโดรไลซีสตามสมการ (1) สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Cellulolytic bacteria isolation from Dun Lamphan No-hunting Area, Maha Sarakham Province by hydrolysis capacity score

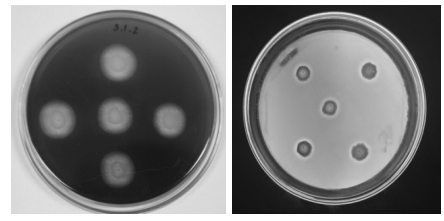
No.	Sample ID.	Hydrolysis capacity score (Isolate)			
		1	2	3	4
1	1.1	0	19	6	0
2	1.2	2	13	4	0
3	2.1	1	5	2	9
4	2.2	0	8	4	0
5	3.1	2	16	7	0
6	3.2	0	3	4	0
7	4.1	0	11	7	0
8	4.2	0	1	1	0
9	5.1	0	14	6	0
10	5.2	0	7	4	0
11	6.1	0	9	1	1
12	6.2	0	9	2	0
13	7.1	0	2	0	0
14	7.2	0	11	7	0
15	8.1	0	21	8	0

Table 2 Cellulolytic bacteria isolation from Dun Lamphan No-hunting Area, Maha Sarakham Province by hydrolysis capacity score (Cont.)

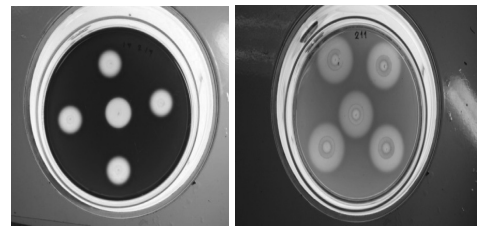
No.	Sample ID.	Hydrolysis capacity score (Isolate)			
		1	2	3	4
16	8.2	0	7	5	0
17	9.1	0	4	12	1
18	9.2	0	3	3	0
19	10.1	0	4	3	1
20	10.2	0	2	3	0
21	11.1	0	6	10	1
22	11.2	0	4	1	0
23	12.1	0	16	5	0
24	12.2	0	11	10	0
25	13.1	0	13	4	0
26	13.2	0	12	5	0
27	14.1	0	12	5	0
28	14.2	0	8	7	1
29	15.1	0	6	3	0
30	15.2	0	5	3	0
31	16.1	0	28	5	0
32	16.2	0	12	3	1
33	17.1	0	33	2	0
34	17.2	0	16	6	0
35	18.1	0	5	4	2
36	18.2	0	10	5	2
รวม	**5**	**366**	**167**	**19**	

พบว่าเซลลูโลไลติคแบคทีเรียจำนวน 5, 366, 167 และ 19 ไอโซเลท มีค่าการไฮโดรไลซีส ตามเกณฑ์การจัดแบ่งการไฮโดรไลซีส (hydrolysis capacity value , HC score) ที่ระดับ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ แสดงการไฮโดรไลซีสแต่ละระดับใน Figure 2

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในการย่อยสลายอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium ที่มี Carboxy methyl cellulose (CMC) เป็นส่วนประกอบ และใช้สารละลายไอโอดีนในการตรวจสอบความสามารถการผลิต พบว่ามีเซลลูโลไลติคแบคทีเรียในกลุ่มการไฮโดรไลซีสในระดับ 2 มากที่สุด จำนวน 366 ไอโซเลท และการไฮโดรไลซีส ระดับ 1 น้อยที่สุด จำนวน 5 ไอโซเลท



HC = 1 Sample ID. 3.1.2 HC = 2 Sample ID. 18.2.14



HC = 3 Sample ID. 17.2.13 HC = 4 Sample ID. 2.1.1

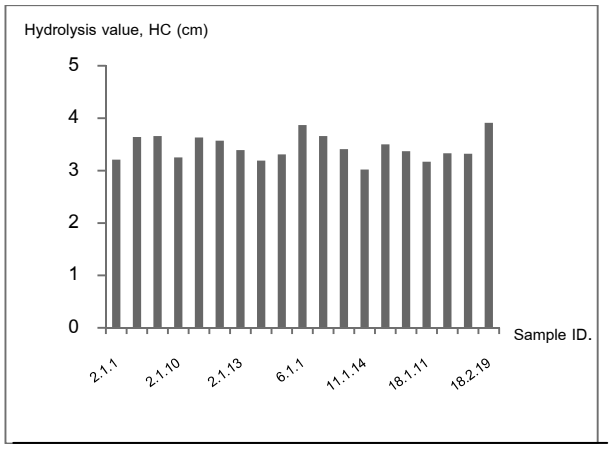
Figure 2 Hydrolysis capacity value of the cellulolytic bacteria was determined based on the ratio of diameter of clear zone and colony on Basal medium agar, BSM

การแสดงผลไฮโดรไลซีสของเซลลูโลไลติกแบคทีเรียจำแนกแบคที่เรีย ในกลุ่มที่มีการย่อยได้ดีที่สุดมีค่าการไฮโดรไลซีส ระดับ 4 จำนวน 19 ไอโซเลท แสดง Table 3

ผลจากการศึกษาความสามารถในการไฮโดรไลซีส พบว่าแบคทีเรียที่มีการไฮโดรไลซีสที่ระดับ 4 ซึ่งเป็นระดับดีที่สุด พบว่าแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลท พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ 2.1 มีเซลลูโลไลติคแบคทีเรียที่มีความสามารถในการไฮโดรไลซีสมากที่สุด ถึง 9 ไอโซเลท จึงเป็นแนวทางในการคัดแยกเซลลูโลไลติคแบคทีเรียที่มีคุณภาพดีต่อไป ทั้งนี้อาจเกิดจากตัวอย่างดินที่เก็บเป็นตัวอย่างที่เก็บจากต้นหว้าที่เป็นดินที่มีความชื้นสูง เนื่องจากใบ ทำให้มีความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลลูโลไลติคแบคทีเรีย ผลการไฮโดรไลซีสที่ระดับ 4 ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลท แสดงใน Grop 1

Table 3 Hydrolysis capacity (HC) of the cellulolytic bacteria at HC score level 4

Sample ID.	Diameter of clear zone (cm) mean ±sd (n=5)	hydrolysis capacity value
2.1.1	2.59 ±0.09	3.21
2.1.2	2.70 ±0.09	3.64
2.1.5	2.35 ±0.08	3.66
2.1.10	2.71 ±0.04	3.25
2.1.11	2.55 ±0.06	3.63
2.1.12	2.35 ±0.05	3.57
2.1.13	2.43 ±0.04	3.39
2.1.17	2.25 ±0.08	3.19
2.1.19	2.67 ±0.02	3.31
6.1.1	2.43 ±0.03	3.87
9.1.15	2.52 ±0.05	3.66
10.1.14	2.56 ±0.02	3.41
11.1.14	2.67 ±0.05	3.02
14.2.4	2.36 ±0.05	3.50
16.2.22	2.24 ±0.64	3.37
18.1.11	2.54 ±0.05	3.17
18.1.15	2.19 ±0.08	3.33
18.2.3	2.50 ±0.03	3.32
18.2.19	2.57 ±0.07	3.91



Graph 1 Hydrolysis capacity (HC) of the cellulolytic bacteria on Basal medium agar, BSM

จาก Graph 1 เซลลูโลไลติคแบคทีเรีย ไอโซเลทที่ 18.2.19 มีค่าการไฮโดรไลซิสในเกณฑ์การคัดเลือกไฮโดรไลซีส ระดับ 4 มากที่สุดเท่ากับ 3.91 และ ตัวอย่าง 11.1.14 มีค่าการไฮโดรไลซีสในเกณฑ์การคัดเลือกไฮโดรไลซีส ระดับ 4 น้อยที่สุดเท่ากับ 3.02 แสดงดังภาพประกอบที่ 3

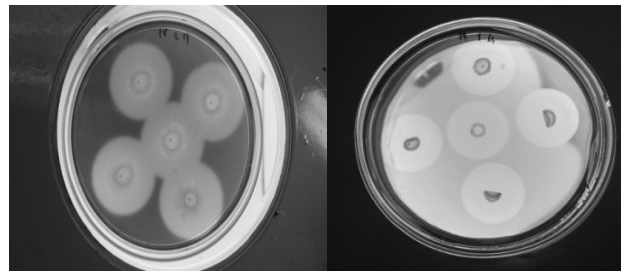


Figure 4 Hydrolysis capacity value of the cellulolytic bacteria at HC score level 4 on Basal medium agar A Sample ID. 18.2.19 Maximum of hydrolysis capacity Value at 3.91 B Sample ID. 11.1.14 minimum Hydrolysis capacity Value at 3.02

สรุปผลการทดลอง

เขตรักษาสัตว์ป่าดูนลำพัน จังหวัดมหาสารคามมีพื้นที่ป่าชนิดป่าเต็งรังและป่าพรุ[14] บริเวณที่เก็บตัวอย่างเป็นบริเวณป่าพรุที่เป็นพื้นที่ลุ่ม มีน้ำขังดิน มีซากใบไม้ทับถม เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส จากการเก็บตัวอย่างดินและเศษซากใบไม้จำนวนทั้งหมด 36 ตัวอย่าง นำมาแยกแบคทีเรียโดยทำการเจือจางและใช้เทคนิค spread plate มีแบคทีเรียตัวอย่างทั้งหมด 763 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดมาคัดแยกเชื้อที่มีความสามารถในการใช้สารอาหาร Basal medium (BSM) ที่มีส่วนประกอบของ Carboxyl Methyl Cellulose (CMC) มีเซลลูโลไลติคแบคทีเรียจำนวน 557 ไอโซเลท และใช้เกณฑ์การคัดเลือกเซลลูโลไลติคแบคทีเรียจากระดับ 1 ถึง 4 พบว่ามีเซลลูโลไลติคแบคทีเรีย ที่ระดับ 1 ถึง 4 จำนวน 5, 366, 167 และ 19 ไอโซเลท ตามลำดับ

จากเกณฑ์แบ่งระดับการไฮโดรไลซีส (Hydrolysis score) ของเซลลูโลไลติคแบคทีเรียทั้ง 4 ระดับนั้น พบว่าไอโซเลทที่มีระดับการไฮโดรไลซีสที่ระดับ 4 มีการแสดงโซนใส (clear zone) มากที่สุด ซึ่งมีเซลลูโลไลติคแบคทีเรียในเกณฑ์ระดับ 4 จำนวนทั้งสิ้น 19 ไอโซเลท และไอโซเลทที่มีการแสดงโซนใสมากที่สุดคือ 18.2.19 มีค่าความสามารถในการไฮโดรไลซีส (HC) เท่ากับ 3.91 จึงควรมีการศึกษาสภาวะและความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลลูโลไลติคแบคทีเรียในไอโซเลทนี้

เพื่อพัฒนาสู่การนำเอนไซม์เซลลูเลสจากไอโซเลทนี้ ไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อผลิตพลังงานทดแทนต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การอ่านผล โซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการไฮโดรไลซีสของเซลลูโลไลติคแบคทีเรียนั้น ควรอ่านผลการทดลองภายใน 2 ชั่วโมง เนื่องจากสีของไอโอดีนที่ทำปฏิกิริยากับ carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) ในอาหาร Basal medium (BSM) จะจางลง อาจทำให้การอ่านผลการทดลองผิดพลาดได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ กองส่งเสริมการวิจัยและบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2557 และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้มอบทุนอุดหนุนประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2558 จนทำให้การวิจัยประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี นอกจากนั้น ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการปฏิบัติงานวิจัย และหลักสูตรความหลากหลายทางชีวภาพสถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ได้เอื้อเฟื้อและให้การสนับสนุนสารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ บางส่วน รวมทั้งองค์ความรู้ที่มีคุณค่าในการปฏิบัติงานวิจัย

อ้างอิง

1. มูลนิธิป่าเขตร้อน. ความรู้เกี่ยวกับป่า. 2547 ได้จาก http://www.tropicalforest.or.th/knowledge.htm. 6 มีนาคม 2557.
2. กรมอุตุนิยมวิทยา. ความรู้อุตุนิยมวิทยา. 2555 ได้จาก http://www.tmd.go.th/info/info.php?FileD=22. 6 มีนาคม 2557.
3. นรารัตน์ พรหมศร. เอกสารประกอบการสอน วิชา 100 541 16 มนุษย์กับวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. 2556. ได้จาก http://www.pnu.ac.th/ webpnu /picupload/document_pdf/scitech/Eco.pdf. 30 มีนาคม 2557.
4. Tzi bun Ng, Randy Ch i Fai Cheung. Cellulase: Types and action, mechanism and uses. In : Golan AE (eds.) Cellulase : Types and action, mechanism and uses. New York. Nova science Publisher, Inc.p. 251-60.
5. สำนักความหลากหลายทางชีวภาพ งานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม. แผนที่พื้นที่ชุ่มน้ำเขตห้ามล่าดูนลำพัน. ได้จาก http://chm-thai. onep.go.th /Wetland/images/Map-Esan/230_Dune Lam Pan.jpg. 20 ธันวาคม 2556.
6. สำนักความหลากหลายทางชีวภาพ งานนโยบายและแผนทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม. พื้นที่ชุ่มน้ำ.2546;4: หน้า 1-4.
7. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. การเก็บดินอย่างถูกวิธี **: การเก็บ**ตัวอย่างดิน เพื่อประเมินความอุดมสมบูรณ์ของดิน**.** 2553. ได้จาก http://www**. Soiltest**ku**.**agr.ku.ac.th/ index.php?option=com_content&view=article&id= 17&Itemid=27. 20 มีนาคม 2557.
8. แผนที่ประเทศไทย. แผนที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่า ดูนลำพัน. 2557 ได้จาก http:// www.thailand-map-guide. com/ data/ maha_sarakham/travel-004.php. 10 มีนาคม 2557.
9. Soares Jr LF, Melo SI, Francodias CA, Andreote DF. Cellulolytic bacteria from soil in harsh environment. World J Microb Biot 2012;28(5): 2195-203
10. Barman D, Saud ZA, Habib MR, Islam MF, Hossain K, Yeasmin T. Isolation of Cellulytic Bacteria strains from soil for effective and efficient bioconversion of solid waste. Life Sci Med Res 2011;25;1-7.
11. Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's Iodine Curr Microbiol 2008:57(5):503-07.
12. Agustini L, Efiyanti L, Faulina AS, Santoso E. Isolation and characterization of Cellulase and Xylanase producing microbes isolation from tropical forest in Java and Summatra. Int J. Environ Bioener 2012;3(3):154-67.
13. Sreedevi S, Sajith S, B Sailas. Cellulase Producing bacteria from the wood-yards on Kallai River Bank. Adv Microbiol 2013;3(4):326-32.
14. Gupta p, Saman TK, Sahn A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. Inter J Microbiol 2012;1-5.
15. เขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน. รายงานการสำรวจประชากรปูทูลกระหม่อม ประจำปี พ.ศ. 2550. มหาสารคาม. 2550. หน้า 1-15.