



## การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายใบอ้อย

ธนาพร การตรง\*, พรพรรณ อยู่สุวรรณ, ศุภสุตา การูจี, เสาวณี คงศรี และพิทักษ์พงศ์ ป้อมปราณี

สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

\*pop12054@gmail.com

### บทคัดย่อ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ในช่วงเก็บเกี่ยวอ้อยเกษตรกรจะนิยมเผาอ้อย เนื่องจากง่ายต่อการจัดการ ประหยัดแรงงาน และลดต้นทุนการผลิต แต่การเผาส่งผลเสียที่สำคัญ คือ ทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ รวมทั้งยังทำให้ดินสูญเสียความชื้น จุลินทรีย์และสัตว์ในดินตาย ดินเสื่อมโทรมส่งผลถึงการเจริญเติบโตของอ้อยต่อไปได้ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งแปลงเก่าและแปลงใหม่ รวมถึงเศษวัสดุทางการเกษตร (ใบอ้อย และชานอ้อย) ผลการวิจัยสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 24 ไอโซเลต จากการวัดความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากการเกิดโซนใส (clear zone) บนอาหารแข็ง carboxy methyl cellulose (CMC) จึงคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ TOA102, TOE104, TOB201, TOB204, TOB205, TOB206, TOC202, TLA203, TLC202 และ TLC204 ตามลำดับ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสเฉลี่ยเท่ากับ 4.01, 2.66, 2.51, 3.23, 3.08, 2.52, 2.53, 2.50, 2.50 และ 2.50 เซนติเมตร ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** แบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เศษใบอ้อย

## Isolation of bacterial strains capable of degrading sugarcane leaf biomass

Thanatorn Kantrong\* , Pornpan Usuwan , Supasuta Karoojee , Saowanee Kongsri and  
Phitakphong Pompranee

Department of Plant Production Technology, Faculty of Science and Technology,  
Nakhon Pathom Rajabhat University

\*pop12054@gmail.com

### Abstract

Sugarcane is an important economic crop both globally and in Thailand. After the harvest season, farmers often burn sugarcane fields because it facilitates easier management, reduces labor requirements, and lowers production costs. However, this practice has several adverse effects, including air pollution, loss of soil moisture, destruction of soil microorganisms and fauna, and soil degradation, which negatively impacts the growth of ratoon crops. Therefore, the objective of this study was to isolate cellulase-producing bacteria from soils in both old and newly cultivated sugarcane fields, as well as from agricultural residues (sugarcane leaves and bagasse). From this study, a total of 24 bacterial isolates capable of producing cellulase enzymes were obtained by assessing their cellulose-degrading ability, indicated by the formation of clear zones on carboxy methyl cellulose (CMC) agar plates. Among these, 10 isolates showing the highest cellulase activity were selected: TOA102, TOE104, TOB201, TOB204, TOB205, TOB206, TOC202, TLA203, TLC202, and TLC204. The diameters of the clear zones produced by these isolates were 4.01, 2.66, 2.51, 3.23, 3.08, 2.52, 2.53, 2.50, 2.50, and 2.50 centimeters, respectively.

**Keywords:** Cellulase-producing bacteria, sugarcane leaf residue

### 1. บทนำ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) อยู่ในวงศ์ GRAMINEAE เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ และยังเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำตาลทรายของประเทศไทย มีถิ่นกำเนิดแถบเกาะนิวกินี โดยในปี 2566-2567 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกอ้อย ในเขตพื้นที่สำรวจรวม 47 จังหวัด จำนวน 11,125,480 ไร่ ซึ่งจังหวัดที่มีการปลูกอ้อยมากที่สุด ได้แก่ จังหวัดกำแพงเพชร กาญจนบุรี อุตรดิตถ์ และสระแก้ว ตามลำดับ [1] ปัจจุบันในการผลิตอ้อยส่วนใหญ่เกษตรกร มักจะเผาทำลายใบอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยวเพราะง่ายต่อการจัดการและเป็นการประหยัดแรงงาน แต่วิธีดังกล่าวนี้ส่งผลเสียมากมาย เช่น การทำให้อากาศเกิดมลพิษทางอากาศ ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ สูญเสียอินทรีย์วัตถุ ทำลายจุลินทรีย์ดิน ดินสูญเสียความชื้น และโดยเฉพาะอย่างยิ่งทำให้ธาตุอาหารสูญเสียไป ส่งผลให้อ้อยโตมีการเจริญเติบโตและผลผลิตอ้อยที่ต่ำตามไปด้วย [2] จะเห็นได้ว่าหากมีการเผาใบอ้อยในช่วงการเก็บเกี่ยว ส่งผลให้เกิดการสูญเสียธาตุอาหารที่อยู่ในใบอ้อยโดยเปล่าประโยชน์ ควรใช้คนตัดใบอ้อยออกหรือใช้รถตัดอ้อยในการเก็บเกี่ยว โดยการใช้แบคทีเรียเพื่อนำมาย่อยสลายเซลลูโลสจากใบอ้อยก็เป็นอีกวิธีที่น่าสนใจ

เนื่องจากใบอ้อยเป็นแหล่งอินทรีย์วัตถุที่ดีทำให้โครงสร้างของดินนั้นร่วนซุย และระบายอากาศได้ดี เพื่อเป็นทางเลือกให้กับเกษตรกรในการจัดการใบอ้อยในแปลงต่อไปได้ในอนาคต

## 2. วิธีการศึกษา

### 2.1 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

สุ่มเก็บตัวอย่างดิน 5 จุด ในพื้นที่แปลงเก่าและใหม่ สำหรับคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส บริเวณหน้าดิน และบริเวณใต้ดินที่ระดับความลึก 15 เซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างดินมาคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเทคนิค Dilution plating method ที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$   $10^{-5}$  บนอาหาร carboxyl methyl cellulose agar (CMC) (CMC 5.0 กรัม, yeast extract 1.0 กรัม,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 กรัม และ agar 15.0 กรัม) pH 7.0 (Zucker and Hankin, 1970) [3] บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้น และเก็บรักษาไว้เป็น stock culture

### 2.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี Congo red ทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว CMC เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบน อาหารแข็ง CMC ที่เจาะหลุมไว้แล้วด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเท Congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงบนอาหารแข็ง CMC นาน 15 นาที ล้างสีออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่ปรากฏ

## 3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### 3.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย จากดินที่ปลูกอ้อย

จากตัวอย่างดินปลูกอ้อยของเกษตรกร ตำบลรางสาลี่ อำเภอดำรงวิทยะ จังหวัดกาญจนบุรีจำนวน 4 ชุด ได้แก่ ดินชั้นบนของอ้อยแปลงเก่า (TOA1-TOE1) ดินชั้นล่างของอ้อยแปลงเก่า (TLA1-TLC1) ดินชั้นบนของอ้อยแปลงใหม่ (TOA2-TOC2) และดินชั้นล่างของอ้อยแปลงใหม่ (TLA2-TLC2) สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลต แบ่งเป็นดินชั้นบนของอ้อยแปลงเก่า (TOA1-TOE1) 30 ไอโซเลต ดินชั้นล่างของอ้อยแปลงเก่า (TLA1-TLC1) 17 ไอโซเลต ดินชั้นบนของอ้อยแปลงใหม่ (TOA2-TOC2) 19 ไอโซเลต และดินชั้นล่างของอ้อยแปลงใหม่ (TLA2-TLC2) 15 ไอโซเลต ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาและจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรีย ที่แยกได้จากพื้นที่ปลูกอ้อย

| แหล่งที่มา                           | ไอโซเลต                                         | จำนวน |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------|-------|
| ดินชั้นบนของอ้อยแปลงเก่า (TOA1-TOE1) | TOA101, TOA102, TOA103, TOA104, TOA105, TOA106, | 30    |
|                                      | TOA107                                          |       |
|                                      | TOB101, TOB102, TOB103, TOB104, TOB105, TOB106, |       |
|                                      | TOB107, TOB108                                  |       |
|                                      | TOC101, TOC102, TOC103, TOC104, TOC105, TOC106  |       |
|                                      | TOD101, TOD102, TOD103, TOD104, TOD105          |       |
|                                      | TOE101, TOE102, TOE103, TOE104                  |       |



ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาและจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรีย ที่แยกได้จากพื้นที่ปลูกอ้อย (ต่อ)

| แหล่งที่มา                                | ไอโซเลต                                                                                                                                                                      | จำนวน |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ดินชั้นล่างของอ้อยแปลงเก่า<br>(TLA1-TLC1) | TLA101, TLA102, TLA103, TLA104<br><br>TLB101, TLB102, TLB103, TLB104, TLB105, TLB106,<br>TLB107<br><br>TLC101, TLC102, TLC103, TLC104, TLC105, TLC106                        | 17    |
| ดินชั้นบนของอ้อยแปลงใหม่<br>(TOA2-TOC2)   | TOA201, TOA202, TOA203, TOA204, TOA205, TOA206,<br><br>TOA207, TOA208<br><br>TOB201, TOB202, TOB203, TOB204, TOB205, TOB206,<br>TOB207, TOB208<br><br>TOC201, TOC202, TOC203 | 19    |
| ดินชั้นล่างของอ้อยแปลงใหม่<br>(TLA2-TLC2) | TLA201, TLA202, TLA203, TLA204, TLA205, TLA206,<br><br>TLC201, TLC202, TLC203, TLC204, TLC205                                                                                | 15    |
| รวมทั้งหมด                                |                                                                                                                                                                              | 81    |

### 3.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี Congo red

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 81 ไอโซเลต มาทดสอบการย่อยสลายเซลลูเลสด้วยวิธี Congo red สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ปรากฏโซนใสรอบโคโลนีหรือมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 24 ไอโซเลต (ตารางที่ 3.2) โดยเชื้อแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด ได้แก่ TOA102, TOE104, TOB201, TOB204, TOB205, TOB206, TOC202, TLA203, TLC202 และTLC204 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสเฉลี่ยเท่ากับ 4.01, 2.66, 2.51, 3.23, 3.08, 2.52, 2.53, 2.50, 2.50 และ 2.50 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.3 และภาพที่ 3.1) ทั้งนี้การวัดประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี Congo red เป็นวิธีที่สามารถช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว และราคาไม่แพง เนื่องจากสามารถสังเกตการเกิดโซนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็นผลมาจากสาร CMC ในอาหารแข็งสามารถทำปฏิกิริยากับสี Congo red ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งสาร CMC จะดูดซึมสีแดงของ Congo red ทำให้บริเวณที่มีสาร CMC ปรากฏเป็นสีแดง ส่วนบริเวณที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้น สาร CMC จะถูกย่อยและ ทำให้บริเวณดังกล่าวนี้ไม่เกิดการดูดซึมสีแดงของ Congo red จึงปรากฏเห็นเป็นโซนใส [4]

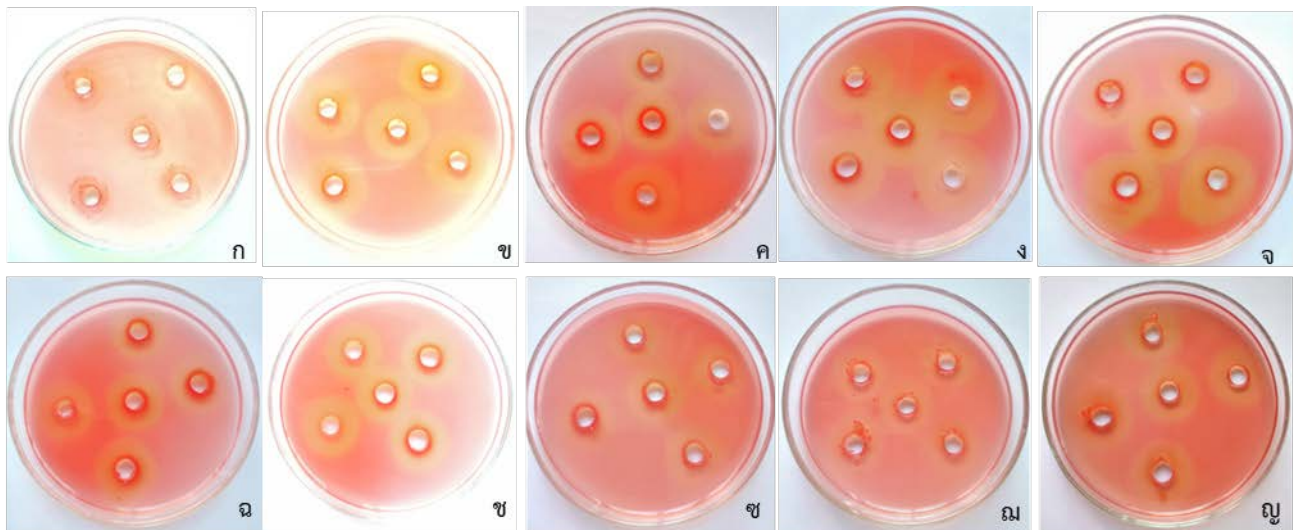


ตารางที่ 3.2 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 24 ไอโซเลต ต่อการย่อยสลายเซลลูโลส

| ไอโซเลต | เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใส clear zone (ซม.) | ไอโซเลต | เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใส clear zone (ซม.) |
|---------|-----------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------|
| TOA102  | 4.01                                          | TOA204  | 2.21                                          |
| TOB105  | 2.50                                          | TOA206  | 1.40                                          |
| TOB107  | 1.41                                          | TOB201  | 2.51                                          |
| TOB108  | 2.13                                          | TOB204  | 3.23                                          |
| TOC101  | 2.28                                          | TOB205  | 3.05                                          |
| TOC103  | 1.64                                          | TOB206  | 2.53                                          |
| TOC105  | 2.00                                          | TOC201  | 2.60                                          |
| TOE104  | 2.66                                          | TOC202  | 2.53                                          |
| TLB105  | 2.27                                          | TOC203  | 1.87                                          |
| TLB106  | 2.34                                          | TLA203  | 2.50                                          |
| TLC102  | 2.08                                          | TLC202  | 2.50                                          |
| TLC103  | 1.87                                          | TLC204  | 2.50                                          |

ตารางที่ 3.3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย 10 อันดับแรก ต่อการย่อยสลายเซลลูโลสในไบโอฟิล์ม

| Isolates | เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใส clear zone (ซม.) |
|----------|-----------------------------------------------|
| TOA102   | 4.01                                          |
| TOE104   | 2.66                                          |
| TOB201   | 2.51                                          |
| TOB204   | 3.23                                          |
| TOB205   | 3.08                                          |
| TOB206   | 2.52                                          |
| TOC202   | 2.53                                          |
| TLA203   | 2.50                                          |
| TLC202   | 2.50                                          |
| TLC204   | 2.50                                          |



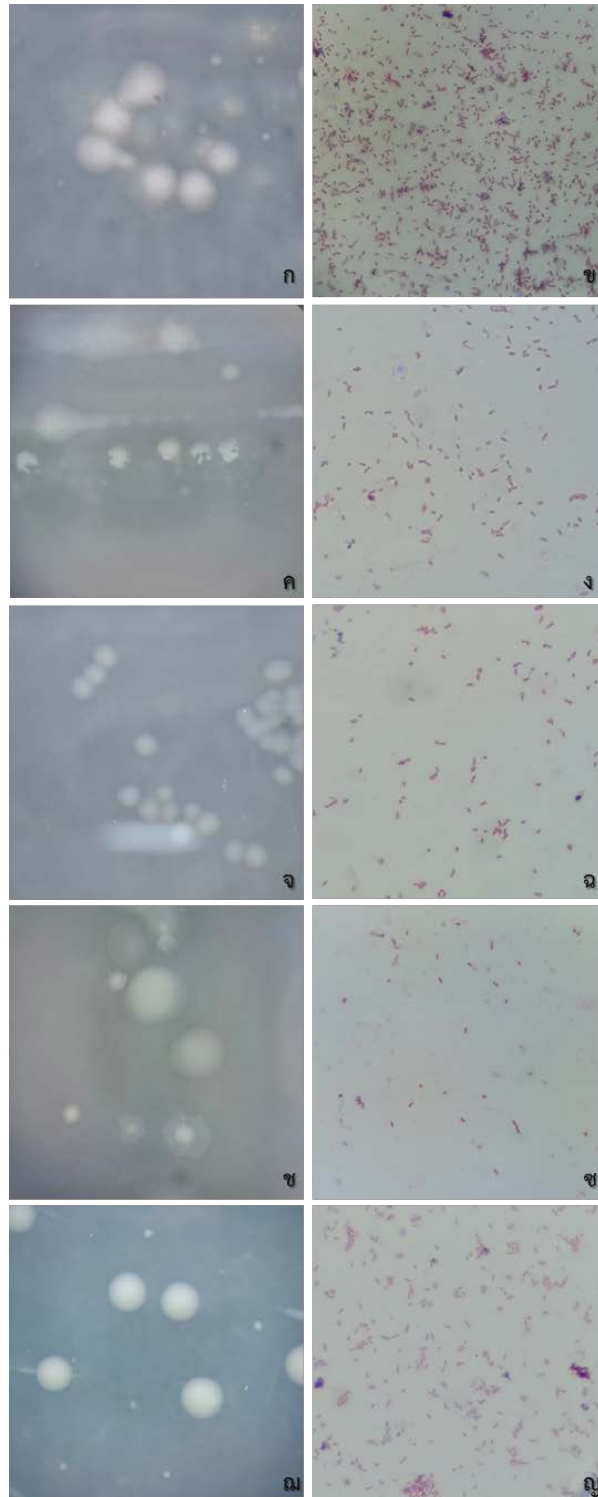
**ภาพที่ 3.1** ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย 10 อันดับแรก ต่อการย่อยสลายเซลลูเลสในใบอ้อย

ก. ไอโซเลต TOA102 ข. ไอโซเลต TOE104 ค. ไอโซเลต TOB201 ง. ไอโซเลต TOB204 จ. ไอโซเลต TOB205

ฉ. ไอโซเลต TOB206 ช. ไอโซเลต TOC202 ซ. ไอโซเลต TLA203 ฌ. ไอโซเลต TLC202 ญ. ไอโซเลต TLC204

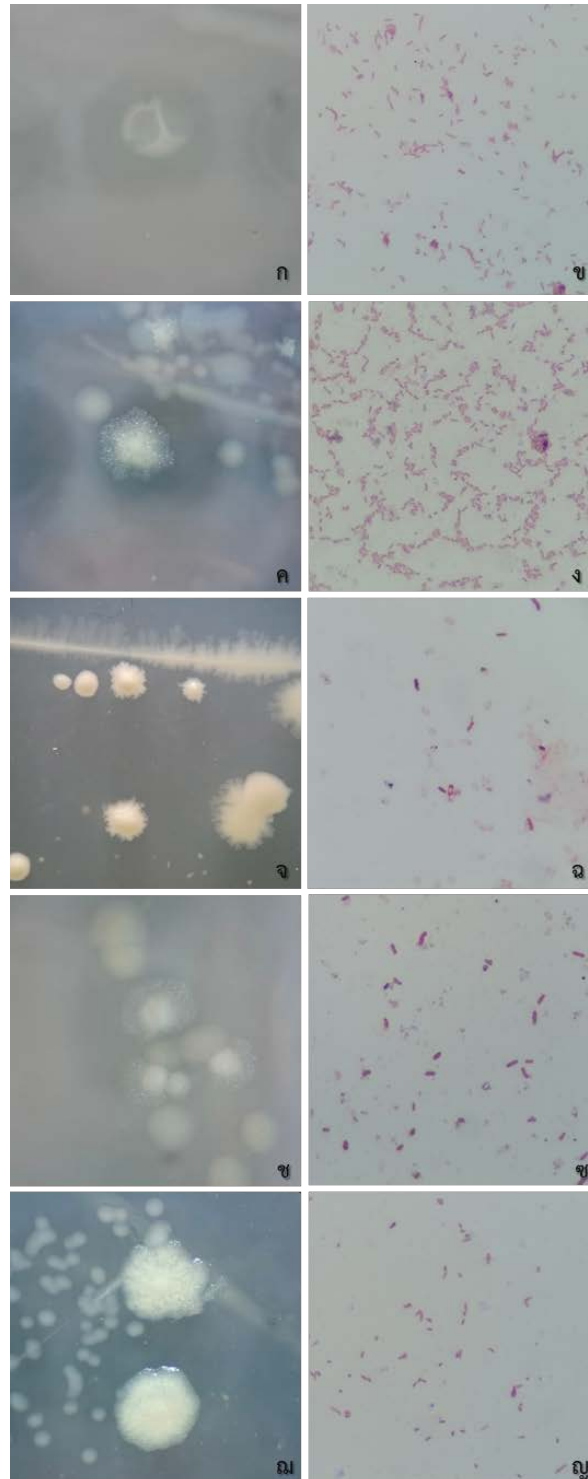
### 3.3 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มาเลี้ยงในอาหารเหลว CMC แล้วทำการศึกษา ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแกรม เพื่อศึกษารูปร่าง และการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ไอโซเลต TOA102 โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบแบบ Entire ความนูนแบบ Raised รูปร่างเซลล์แบบ Single (ภาพที่ 3.2 ก และ ข) ไอโซเลต TOE104 โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบแบบ Entire ความนูนแบบ Raised รูปร่างเซลล์แบบ Single (ภาพที่ 3.2 ค และ ง) ไอโซเลต TOB201 โคโลนีมีสีขาวใส ขอบเรียบแบบ Entire ความนูนแบบ Flat รูปร่างแบบ Single (ภาพที่ 3.2 จ และ ฉ) ไอโซเลต TOB204 โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบแบบ Entire ความนูนแบบ Flat รูปร่างแบบ Single (ภาพที่ 3.2 ช และ ซ) ไอโซเลต TOB205 โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบแบบ Entire ความนูนแบบ Raised รูปร่างแบบ Single (ภาพที่ 3.2 ฌ และ ญ) ไอโซเลต TOB206 โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบแบบ Entire ความนูนแบบ Raised รูปร่างเซลล์แบบ Single (ภาพที่ 3.3 ก และ ข) ไอโซเลต TOC202 โคโลนีมีสีขาวใส ขอบเรียบแบบ Irregular ความนูนแบบ Flat รูปร่างเซลล์แบบ Single (ภาพที่ 3.3 ค และ ง) ไอโซเลต TLA203 โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบแบบ Irregular ความนูนแบบ Convex รูปร่างเซลล์แบบ Single (ภาพที่ 3.3 จ และ ฉ) ไอโซเลต TLC202 โคโลนีมีสีขาวใส ขอบเรียบแบบ Entire ความนูนแบบ Flat รูปร่างเซลล์แบบ Single (ภาพที่ 3.3 ช และ ซ) ไอโซเลต TLC204 โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบแบบ Entire ความนูนแบบ Raised รูปร่างเซลล์แบบ Single (ภาพที่ 3.3 ฌ และ ญ)



ภาพที่ 3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 10 ไอโซเลต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x เท่า

ก. ไอโซเลต TOA102 ข. ไอโซเลต TOA102 ค. ไอโซเลต TOE104 ง. ไอโซเลต TOE104  
จ. ไอโซเลต TOB201 ฉ. ไอโซเลต TOB201 ช. ไอโซเลต TOB204 ช. ไอโซเลต TOB204  
ณ. ไอโซเลต TOB205 ณ. ไอโซเลต TOB205



**ภาพที่ 3.3** ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 10 ไอโซเลต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x เท่า

ก. ไอโซเลต TOB206 ข. ไอโซเลต TOB206 ค. ไอโซเลต TOC202 ง. ไอโซเลต TOC202

จ. ไอโซเลต TLA203 ฉ. ไอโซเลต TLA203 ช. ไอโซเลต TLC202 ซ. ไอโซเลต TLC202

ณ. ไอโซเลต TLC204 ญ. ไอโซเลต TLC204



#### 4. สรุปผล

คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณพื้นที่ปลูกอ้อยแปลงเก่าและใหม่ รวมถึงเศษวัสดุทางการเกษตรทางการเกษตร (ใบอ้อย และขานอ้อย) พร้อมทั้งศึกษาความหลากหลายและความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย รวมทั้งการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสในสภาวะจำลอง ผลการวิจัยสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 24 ไอโซเลต จากการวัดความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากการเกิดโซนใส (Hydrolytic capacity: (HC) จึงคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ TOA102, TOB204, TOB205, TOE104, TOC202, TOB206, TOB201, TLA203, TLC202 และ TLC204 ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 4.01, 3.23, 3.08, 2.66, 2.53, 2.52, 2.51, 2.5, 2.5 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

#### 5. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Office of the Cane and Sugar Board. (2024). *Report on Sugarcane Planting Situation for the 2023–2024 Production Year*
- [2] Vimol Phukongchai and Wannawipa Kaewpradit. (2018). *Management of Sugarcane Leaf Residues Affecting Decomposition and Nitrogen Release. Kaen Kaset Journal, Special Issue 46(1), 2018.*
- [3] (Zucker and Hankin, 1970)
- [4] Chanidapa Thanasrirangkul, Pechrada Pinjai and Pilanee Vaithanomsat. (2018). *Screening of Cellulase Producing Bacteria and Efficiency of Lignocellulosic Decomposition. Kasetsart Journal of King Mongkut's Institute, 2018: Volume 36, Issue 3*