การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดินที่มีเศษฟางข้าว

พลอยไพลิน สุพรม[1] และ พรรณวิภา แพงศรี[1*]

[1]หลักสูตรวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
Phanwipa@vru.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินในทุ่งนาจากตำบลสวนดอกไม้ อำเภอเสาไห้ จังหวัด สระบุรี และศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยในการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหารแข็งของเชื้อที่แยกได้ ผลการวิจัยสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากดิน 3 แหล่งได้จำนวน 38 ไอโซเลต จากนั้นวัดความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสพบว่าจากการวัดความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากการเกิดวงใส (Hydrolytic capacity: (HC) value บนอาหารแข็ง Carboxy methyl cellulose (CMC) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 21 ไอโซเลต โดยตัวอย่างจากแหล่งที่ 1 คัดเลือกได้ 10 ไอโซเลต ตัวอย่างจากแหล่งที่ 2 คัดเลือกได้ 5 ไอโซเลต และตัวอย่างจากแหล่งที่ 3 คัดแยกได้ 6 ไอโซเลต และจากการศึกษาลักษณะของเชื้อบนจานเลี้ยงเชื้อพบว่าโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่มีลักษณะกลม

คำสำคัญ: แบคทีเรีย เอนไซม์เซลลูเลส ฟางข้าว

Selection and Screening of Cellulase Producing Bacteria from Soil Samples Containing Rice Straw Residues

Ploypailin Suhrom[1] and Phanwipa Pangsri[1*]

Department of Biotechnology , Faculty of Science and Technology,
Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage
Phanwipa@vru.ac.th

Abstract

The objective of this research is to isolate the bacteria that can produce cellulase from the soil in the rice fields from Suan Dok Mai Subdistrict, Sao Hai District, Saraburi Province, and to study the efficiency of cellulose degradation on solid medium. The results showed that 38 bacteria were isolated from soil at 3 sources. After that, only 21 isolates exhibited high cellulase producing activity with hydrolytic capacity (HC value) testing on carboxymethyl cellulose (CMC) agar plate. Samples from source 1 were selected 10 samples were selected from source 2, 5 were selected. And samples from source 3 were separated into 6 isolates and from the study of the characteristics of the culture on the petri dish, the colonies that occurred on the culture plate were round.

Keywords*: Bacteria, Cellulase Enzyme Rice Straw*

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีผลผลิตทางการเกษตรจากการเพาะปลูก เช่น อ้อย ข้าว เป็นต้น อย่างไรก็ตามจากการขยายตัวของการผลิตทางภาคการเกษตรภายในประเทศที่ส่งผลให้มีวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะปลูก เช่น ขี้เลื่อย ต้นอ้อย กากอ้อย ฟางข้าว มันสำปะหลัง เปลือกผลไม้และเปลือกไม้ เป็นต้น ซึ่งของเหลือทิ้งทางการเกษตรดังกล่าวส่วนมากมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ สามารถนำมาใช้ประโยชน์จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อให้ได้น้ำตาลที่สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์และการผลิตในภาคอุตสาหกรรมอื่น ๆ (สุทธิดาและผกามาส. 2558) ในธรรมชาติองค์ประกอบของพืชเหล่านี้สามารถถูกย่อยสลายได้โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีท) ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) เรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase producing microorganism) เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์เชิงซ้อนที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase) หรือเอนโด-บีต้า-1,4-กลูคาเนส ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูเลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase) ทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (Non-reducing) ของเซลลูโลส และเซลโลไบโอส (Cellbiose) จะย่อยเซลลูบิโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวนี้จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง 4 ถึง 8 (pH 4-8) (Lu and Mosier, 2007)

ในธรรมชาติพบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้และ แบคทีเรียเป็นที่สนใจในการผลิตเซลลูเลสเนื่องจากมีการเติบโตที่รวดเร็ว เช่น *Cellulomonas* sp. *Pseudomonas* sp. *Bacillus* sp. และ *Micrococcus* sp. (Lo et al., 2009) ดังนั้นในการศึกษานี้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในธรรมชาติที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยในการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหารแข็งของเชื้อที่แยกได้

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินท้องนาใน อำเภอเสาไห้ จังหวัดสระบุรี โดยเก็บตัวอย่างดินในบริเวณนาข้าวหลังการเก็บเกี่ยวให้ลึกลงจากระดับผิวดินปกติ 15 เซนติเมตร 3 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างมีระยะห่างกันที่ 100 200 และ 300 เซนติเมตร

2.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูโลส

คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน โดย ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในขวดชมพู่ที่มีน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางลำดับส่วนด้วยวิธี Serial dilution โดยปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตร เจือจางในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการ Spread plate โดยปิเปตสารละลายแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่ต้องการ นำมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ Streak plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียง Nutrient Agar slant เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 เซลเซียส เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหารแข็ง Carboxymethyl Cellulose Agar

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทำ Point inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC Medium) (Khatiwada et al.,2016) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วย ด้วยวิธี Gram's iodine (Kasana et al.,2008) โดยเทไอโอดีน ให้ท่วมอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี และคำนวณค่า hydrolysis capacity (HC value) (George et al., 2001)

$$\text{การคำนวณ hydrolysis capacity (HC value)} = \frac{\text{ขนาดเส้นเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)}}{\text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)}}$$

2.4 ศึกษาลักษณะรูปร่างโคโลนีของเชื้อที่แยกได้

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดและรูปร่างของโคโลนี และการสร้างสารสี

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูโลส

จากการศึกษาการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน ตำบล สวนดอกไม้ อำเภอเสาไห้ จังหวัด สระบุรี จำนวน 3 ตัวอย่างมาแยกเชื้อบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar, NA) พบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 38 ไอโซเลต คือ ตัวอย่างที่ 1 สามารถคัดแยกได้ 14 ไอโซเลต คือ I1-1,I1-2,I1-3,I1-4,I1-5,I1-6 ,I1-7, I1-8,I1-9, I1-10, I1-11, I1-12, I1-13,I1-14 ตัวอย่างที่ 2 สามารถคัดแยกได้ 11 ไอโซเลต คือ I2-1,I2-2, I2-3, I2-4, I2-5, I2-6, I2-7, I2-8, I2-9, I2-10, I2-11 ตัวอย่างที่ 3 สามารถคัดแยกได้ 13 ไอโซเลต คือ I3-1,I3-2,I3-3,I3-4,I3-5,I3-6,I3-7,I3-8,I3-9,I3-10, I3-11,I3-12,I3-13 ดังตารางที่ 1 จากการทดลองพบว่ามีผลการศึกษาสอดคล้องกับการคัดแยกเชื้อที่ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากดิน ฟิลเตอร์เค้ก และน้ำกากส่า พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 26 ไอโซเลต (ทิพย์นภา และคณะ,2556) นอกจากนั้นมีการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณรอบรากพืชและเศษวัสดุทางการเกษตร (ใบอ้อย ชานอ้อย ฟางข้าว และทะลายปาล์ม) สามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 100 ไอโซเลต โดยชานอ้อยเป็นเศษวัสดุที่มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุดอาจเป็นผลมาจากเศษวัสดุประเภทชานอ้อยที่นำมาใช้ในการคัดแยกนี้เป็นเศษวัสดุที่ผ่านการหมักมาแล้ว ชนิดาภา และคณะ (2561)

ตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

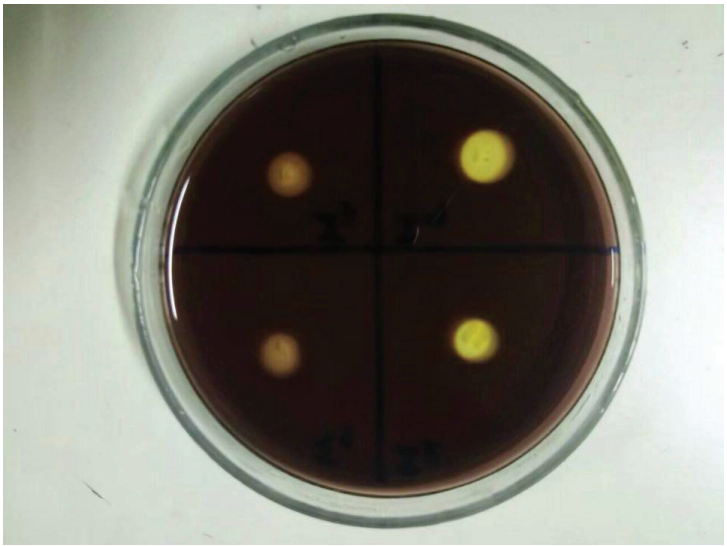
ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต	ไอโซเลต
1	14	I1-1,I1-2,I1-3,I1-4,I1-5,I1-6 ,I1-7, I1-8,I1-9, I1-10, I1-11, I1-12, I1-13,I1-14
2	11	I2-1,I2-2, I2-3, I2-4, I2-5, I2-6, I2-7, I2-8, I2-9, I2-10, I2-11
3	13	I3-1,I3-2,I3-3,I3-4,I3-5,I3-6,I3-7,I3-8,I3-9,I3-10, I3-11,I3-12,I3-13

3.2 ผลการศึกษาการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย Carboxy Methyl cellulose (CMC)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย Carboxy methyl cellulose (CMC) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ พบว่าเกิดวงใสและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีคือค่า hydrolysis capacity (HC value) ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1 พบว่าเชื้อที่มีค่า HC value สูงมากกว่า 10 ได้แก่ I1-4, I3-10, I2-4 และ I1-5 มีค่า HC สูงสุดเท่ากับ 13.72,12.17, 11.88 และ 10.43 ตามลำดับ ซึ่งมีผลสอดคล้องกับ ชนิดาภา และคณะ (2561) ซึ่งวัดความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากการเกิดโซนใส (Hydrolytic capacity: HC value มากกว่า 3 บนอาหารแข็ง Carboxy methyl cellulose (CMC) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 25 ไอโซเลต และกุสุมาวดี (2557) คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินใต้กองผักตบชวาที่เน่าเปื่อยทับถมกัน สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างวงใสได้จำนวน 37 ไอโซเลต นอกจากนั้นมีการศึกษาความสามารในการย่อยสลาย Carboxy methyl cellulose (CMC) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อที่แยกได้จากดิน ฟิลเตอร์เค้ก และน้ำกากส่า พบว่าเชื้อที่แยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงสุดมี 4 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลต BDS 31 มีค่า HC value เท่ากับ 2.25 และ แบคทีเรีย ไอโซเลต BFC 8 มีค่า hydrolysis capacity (HC value) เท่ากับ 2 ตามลำดับ (ทิพย์นภา และคณะ,2556)

ตารางที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่แยกได้ในการย่อยสลาย Carboxy Methyl Cellulose (CMC agar)

ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)	ค่า Hydrolysis Capacity (HC)
I1-1	1.10	6.23	5.66
I1-2	0.90	4.80	5.33
I1-3	0.80	7.20	9.00
I1-4	0.50	6.86	13.72
I1-5	0.60	6.26	10.43
I1-6	0.90	6.00	6.67
I1-10	1.50	5.80	3.86
I1-11	1.00	3.20	3.20
I1-12	1.12	5.10	4.25
I1-13	1.20	3.60	3.00
I2-2	0.90	6.10	6.78
I2-3	1.10	7.20	6.55
I2-4	0.90	10.70	11.88
I2-6	0.90	3.20	2.88
I2-13	1.10	8.70	7.91
I3-1	1.23	6.20	5.04
I3-6	1.23	6.20	5.04
I3-8	0.90	5.20	5.78
I3-9	0.80	5.20	6.50
I3-10	0.60	5.30	12.17
I3-11	1.00	5.20	5.20



ภาพที่ 1 ตัวอย่างการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย Carboxy methyl cellulose (CMC) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ด้วยวิธี Gram's iodine test

3.3 ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxy Methyl Cellulose agar

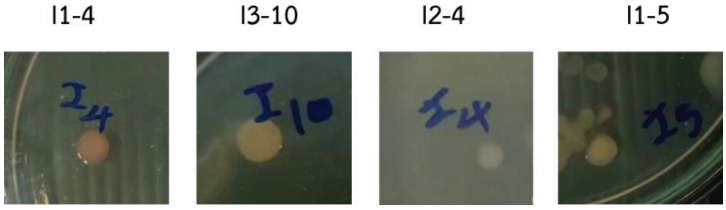
จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อที่แยกได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อทั้งหมด 21 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหาร Carboxy Methyl Cellulose agar พบว่าเชื้อส่วนใหญ่โคโลนีมีลักษณะกลม ดังตารางที่ 3 และเชื้อที่มี ค่า HC value สูงมากกว่า 10 ได้แก่ I1-4, I3-10, I2-4 และ I1-5 มีลกษณะโคโลนี ดังนี้ เชื้อไอโซโลต I1-4 โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีส้ม และผิวหน้ามันวาว I3-10 โคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลมแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีส้มอ่อน I2-4 โคโลนีมีลักษณะกลม สีขาว แบนราบตามผิวหน้าอาหาร และ I1-5 โคโลนีมีรูปร่างกลม มีสีเหลืองอ่อน และผิวหน้ามันวาว ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 2

ตารางที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้บนจานอาหารเพาะเชื้อ

ไอโซเลต	ลักษณะของโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
I1-1	โคโลนีมีลักษณะกลมสีเหลืองอ่อน และผิวหน้ามันวาว
I1-2	โคโลนีมีลักษณะกลม แบน และมีสีขาวขุ่น
I1-3	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีเหลือง และผิวหน้ามันวาว
I1-4	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีส้ม และผิวหน้ามันวาว
I1-5	โคโลนีมีรูปร่างกลม มีสีเหลืองอ่อน และผิวหน้ามันวาว
I1-6	โคโลนีมีลักษณะกลมแบนราบไปบนผิวหน้าอาหาร และมีสีขาวขุ่น
I1-10	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาวขุ่น และผิวหน้ามันวาว
I1-11	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาว และ ผิวหน้ามันวาว
I1-12	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีขาวขุ่น
I1-13	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน นูน มีสีเหลืองอ่อน และผิวหน้ามันวาว
I2-2	โคโลนีมีลักษณะกลม แบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีขาวขุ่น
I2-3	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาว และผิวหน้ามันวาว
I2-4	โคโลนีมีลักษณะกลม สีขาวแบนราบตามผิวหน้าอาหาร
I2-6	โคโลนีมีลักษณะกลม แบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีส้ม
I2-13	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีส้ม
I3-1	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาว และผิวหน้ามันวาว
I3-6	โคโลนีมีลักษณะ นูน มีสีขาวขุ่น และผิวหน้ามันวาว
I3-8	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลมแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีขาว
I3-9	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาว และผิวหน้ามันวาว
I3-10	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลมแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีส้ม
I3-11	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีส้ม
I1-1	โคโลนีมีลักษณะกลมสีเหลืองอ่อน และผิวหน้ามันวาว
I1-2	โคโลนีมีลักษณะกลม แบน และมีสีขาวขุ่น
I1-3	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีเหลือง และผิวหน้ามันวาว
I1-4	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีส้ม และผิวหน้ามันวาว
I1-5	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นนอน มีสีเหลือง และผิวหน้ามันวาว
I1-6	โคโลนีมีลักษณะกลมแบนราบไปบนผิวหน้าอาหาร และมีสีขาวขุ่น
I1-10	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาวขุ่น และผิวหน้ามันวาว
I1-11	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาว และ ผิวหน้ามันวาว
I1-12	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีขาวขุ่น
I1-13	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน นูน มีสีเหลืองอ่อน และผิวหน้ามันวาว
I2-2	โคโลนีมีลักษณะกลม แบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีขาวขุ่น
I2-3	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาว และผิวหน้ามันวาว

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะของโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
I2-4	โคโลนีมีลักษณะกลม แบนราบตามผิวหน้าอาหาร
I2-6	โคโลนีมีลักษณะกลม แบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีส้ม
I2-13	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีส้ม
I3-1	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาว และผิวหน้ามันวาว
I3-6	โคโลนีมีลักษณะ นูน มีสีขาวขุ่น และผิวหน้ามันวาว
I3-8	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลมแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีขาว
I3-9	โคโลนีมีลักษณะกลม นูน มีสีขาว และผิวหน้ามันวาว
I3-10	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างกลมแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีส้ม
I3-11	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนแบนราบตามผิวหน้าอาหาร และมีสีส้ม



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. สรุปผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากตัวอย่างดินบนจานบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) ได้เชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 38 ไอโซเลต จากการวัดความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC agar) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อแตกต่างกันเชื้อที่แยกได้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอนไซม์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมได้ เช่น ฟางข้าว ขี้เลื่อย และแกลบ เป็นต้น จึงสามารถลดปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอีกทางหนึ่งด้วย

5. เอกสารอ้างอิง

กุสุมาวดี ฐานเจริญ. (2557). การใช้ประโยชน์จากผักตบชวาในการผลิตเซลลูเลสจากแบคทีเรียทนร้อน และการนำมาผลิตไบโอเอทานอล. **วารสารเกษตรพระวรุณ**, 11, 159-166.

ชนิดภา ธนะศรีรากุล เพรชดา ปินใจ และ พิลานี ไวถนอมสัตย์. (2561). การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลูเลสและประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลส. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**, 36 (3),1-12.

ทิพย์นภา วงษ์คูณ โสภณ บุญลือ และ นันทวัน ฤทธิ์เดช. (2556). การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวโพดหวาน (*Zea mays* L. var. saccharata). **วารสารวิทยาศาสตร์ มข**, 41(4), 954-966.

สุทธิดา วิทนาลัย และ ผกามาส งามสง่า. (2558). การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อยกากมันสำปะหลัง. วารสาร **วิทยาศาสตร์เกษตร.**46(3)(พิเศษ): 129-132.

George, S.P., Ahmad, A and Rao, M.B. (2001). Studies on carboxy methyl cellulose produced by an Alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, 77 (2), 171-175.

Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Curr Microbiol**, 57, 503-507.

Khatiwada P, Ahmed J, Sohag MH, Islam K, Azad AK. (2016). Isolation, Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes**. J. Bioprocess Biotech**, 6 (4). http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000280.

Lo Y-C, Saratale GD, Chen W-M, Bai M-D, Chang J-S. (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. **Enzyme Microb Technol**, 44, 417-425.

Lu, Y. and N.S. Mosier. 2007. Biomimetic catalysis for hemicellulose hydrolysis in corn stover. **Biotechnol Prog**, 23,116-23**.**