

การคัดเลือกจุลินทรีย์ย่อยเซลลูโลสจากดินเกษตรอินทรีย์และความสามารถ ในการย่อยสลายต่อซังข้าว

ชญามา วงศ์สุภาพ¹, อรุณี คงสอน¹ และ สันติติ บินคาเดอร์^{1,2*}

¹ สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ
พระนครศรีอยุธยา 13000

² หน่วยวิจัยทางเกษตรและอาหาร ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเกษตรและอาหารปลอดภัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ
พระนครศรีอยุธยา 13000

*santiti.b@rmutsb.ac.th

บทคัดย่อ

การจัดการต่อซังข้าวเป็นประเด็นสำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบเกษตรกรรม รวมถึงการสูญเสียอินทรีย์วัตถุในดิน ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และมลพิษทางอากาศ โดยเฉพาะในพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งมีปัญหาเรื่องการเผาต่อซัง ในแปลงนาข้าวเป็นลำดับต้นๆของประเทศ การใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพในการเร่ง การย่อยสลายต่อซังข้าวและเพิ่มประสิทธิภาพการหมุนเวียนธาตุอาหารในดิน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของ จุลินทรีย์ย่อยเซลลูโลสจากดินเกษตรอินทรีย์และความสามารถในการย่อยสลายต่อซังข้าว โดยทำการเก็บตัวอย่างดินจาก แปลงเกษตรอินทรีย์ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นำมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน รวมถึงศึกษาปริมาณ จุลินทรีย์ทั้งหมด จากนั้นคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยเซลลูโลสด้วยวิธี Congo red assay on CMC agar นำสายพันธุ์ที่มี ประสิทธิภาพสูงมาศึกษาลักษณะพื้นฐานและจำแนกด้วยเทคนิคอนุชีวโมเลกุล และทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย ต่อซังข้าวสภาวะแบบเปียกในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่าดินเกษตรอินทรีย์มีปริมาณจุลินทรีย์ที่หลากหลายและ สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยเซลลูโลสได้มากกว่า 42 ไอโซเลท โดยไอโซเลท SeSt08 (*Bacillus paralicheniformis*) มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสสูงที่สุด (16.24 มิลลิเมตร) และสามารถย่อยสลายต่อซังข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในสภาวะทดลอง (weight loss 68.04 ถึง 73.80 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของจุลินทรีย์จากดินเกษตรอินทรีย์ ในการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อการจัดการต่อซังข้าว และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ทั้งนี้ ผลการศึกษาสามารถนำไป ประยุกต์ใช้ในการลดการเผาต่อซัง เพิ่มอินทรีย์วัตถุในดิน และสนับสนุนระบบเกษตรที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในอนาคตต่อไปได้

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ เซลลูโลส ดินเกษตรอินทรีย์ ต่อซังข้าว



Cellulolytic Microorganisms Selection from Organic Agricultural Soil and Their Ability to Degrade Rice Straw

Chayapa Wongsupap¹, Arunee Kongsorn¹ and Santiti Bincader^{1,2*}

¹Program in Plant Science, Faculty of Agricultural Technology and Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Phra Nakhon Si Ayutthaya 13000, Thailand.

²Agricultural Research Division, Center of Excellence in Agriculture and Food Safety, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Phra Nakhon Si Ayutthaya 13000, Thailand.

*santiti.b@rmutsb.ac.th

Abstract

Rice straw management is a critical issue in agricultural systems due to the loss of soil organic matter, environmental impacts and air pollution, especially Phra Nakhon Si Ayutthaya Province, Thailand, where open-field rice straw burning remains one of the most significant agricultural pollution problems in the country. The use of cellulolytic microorganisms represents a promising approach to accelerate rice straw decomposition and enhance nutrient in soil. This study aimed to investigate the potential of cellulolytic microorganisms isolated from organic agricultural soil and their ability to degrade rice straw. Soil samples were collected from organic fields in Phra Nakhon Si Ayutthaya Province and analyzed for physicochemical properties and total microbial population. Cellulolytic microorganisms were isolated using Congo red assay on CMC agar, and high-efficiency isolates were characterized based on morphological and molecular identification. The selected isolates were evaluated for rice straw degradation under wet laboratory conditions. The results indicated that organic agricultural soil contained diverse microbial populations and more than 42 cellulolytic isolates were obtained. Moreover, isolate SeSt08 (*Bacillus paralicheniformis*) showed the highest cellulolytic activity with a clear zone diameter of 16.24 mm and showed effective rice straw degradation under laboratory conditions (68.04 – 73.80% weight loss). The potential of cellulolytic microorganisms from organic agricultural soil for development as biological agents for rice straw and agricultural residue management. The results of this study can be applied to reduce open-field burning, increase soil organic matter and support environmentally sustainable agricultural systems in the future.

Keywords: Microorganisms, Cellulose, Organic agricultural soil, Rice straw

1. บทนำ

ข้าวเป็นหนึ่งในสินค้าเกษตรที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจและความมั่นคงทางอาหารของประเทศไทยอย่างมาก โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคกลาง เช่น พระนครศรีอยุธยา ชัยนาท ปทุมธานี ซึ่งเป็นแหล่งเพาะปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศ อย่างไรก็ตาม หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต มักจะเกิดวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในปริมาณมาก โดยเฉพาะตอซัง ซึ่งหากไม่มีการจัดการที่เหมาะสม เกษตรกรส่วนใหญ่มักเลือกกำจัดด้วยวิธีการเผา เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และลดต้นทุนในการเตรียมพื้นที่สำหรับเพาะปลูกรอบถัดไป โดยการเผาตอซังข้าว ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างกว้างขวาง ทั้งการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก ฝุ่นละอองขนาดเล็ก และมลพิษทางอากาศที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชน รวมถึงทำให้สูญเสียอินทรีย์วัตถุและธาตุอาหารที่มีประโยชน์ในดิน ส่งผลให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลงในระยะยาว จากงานวิจัยของ Chen et al. [1] ได้รายงานว่า การจัดการตอซังข้าวโดยใช้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพสามารถช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมและส่งเสริมการหมุนเวียนธาตุอาหารในระบบเกษตรกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้กระบวนการเผา ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดมลพิษทางอากาศและส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในดินเกษตร

จังหวัดพระนครศรีอยุธยาเป็นหนึ่งในพื้นที่ปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย และประสบปัญหาการเผาตอซังในพื้นที่การเกษตรอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีการเพาะปลูกข้าวหลายรอบต่อปี ส่งผลให้เกิดการสะสมของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจำนวนมาก การจัดการตอซังข้าวจึงเป็นประเด็นที่ได้รับความสนใจทั้งในด้านการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมและการพัฒนาระบบเกษตรกรรมอย่างยั่งยืน การไกล่เกลี่ยตอซังดินเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ได้รับการส่งเสริม แต่กระบวนการย่อยสลายตอซังข้าวในธรรมชาติ มักเกิดขึ้นช้า เนื่องจากตอซังข้าวมีองค์ประกอบหลักเป็นลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่มีโครงสร้างซับซ้อนและย่อยสลายได้ยาก จำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์และเอนไซม์เฉพาะในการย่อยสลายโครงสร้างดังกล่าว ให้กลายเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ [2, 3]

จุลินทรีย์ย่อยเซลลูโลส ถือเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในธรรมชาติ โดยสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ซึ่งสามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นได้ กระบวนการดังกล่าวมีความสำคัญต่อการหมุนเวียนคาร์บอนในระบบนิเวศทางการเกษตร โดยเฉพาะดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงหรือผ่านการทำเกษตรอินทรีย์ มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส และลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อชีวภาพเพื่อเร่งการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ลดระยะเวลาการย่อยสลาย และเพิ่มปริมาณธาตุอาหารในดินได้ [4, 5]

ดินเกษตรอินทรีย์จึงเป็นแหล่งที่มีศักยภาพในการค้นหาจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส เนื่องจากมีการสะสมอินทรีย์วัตถุและมีความหลากหลายของจุลินทรีย์สูงกว่าดินที่ใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง การจัดการดินในระบบเกษตรอินทรีย์ยังช่วยส่งเสริมกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุและการหมุนเวียนธาตุอาหาร นอกจากนี้ จุลินทรีย์จากดินเกษตรอินทรีย์ ยังมีแนวโน้มที่จะปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมและสามารถทำงานร่วมกันในรูปแบบกลุ่มจุลินทรีย์ (microbial consortium) ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ดียิ่งขึ้น [5, 6] ในปัจจุบัน มีการนำเทคนิคทางจุลชีววิทยาและอณูชีวโมเลกุลมาใช้ในการคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์ย่อยเซลลูโลสอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะการใช้ Congo red assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อ carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) เพื่อประเมินความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเบื้องต้น ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับในงานวิจัยด้านจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม หลังจากนั้น สามารถนำจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมเพื่อการจำแนกชนิดอย่างแม่นยำ รวมถึงทดสอบความสามารถในการย่อยสลายตอซังข้าวภายใต้สภาวะต่าง ๆ เพื่อประเมินศักยภาพในการใช้งานจริง งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาค้นหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายตอซังข้าวในพื้นที่การเกษตร ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายตอซังข้าวได้รวดเร็ว และไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเจริญเติบโตของข้าวในรุ่นถัดไป ทั้งนี้เพื่อนำผลที่ได้จากการศึกษามาเป็นแนวทางในการส่งเสริมและสนับสนุนการใช้จุลินทรีย์สำหรับการย่อยสลายตอซังให้เกษตรกร รวมถึงเป็นการสร้างภูมิคุ้มกันให้กับระบบนิเวศนาข้าวอย่างยั่งยืน

2. วิธีวิจัย/วิธีการศึกษา

2.1 การแยกเชื้อด้วยวิธี Dilution plate method

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงนาในอำเภอสนา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยขุดดินให้ลึกลงจากระดับผิวดินปกติ ประมาณ 10 เซนติเมตร ความกว้างของผิวดิน 30x30 เซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างดินมาร่อนเอาเศษซากพืช และก้อนกรวดออก ชั่งตัวอย่างดินประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ย้ายลงหลอดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร (ทำวิธีการเดิมซ้ำอีก 3 ครั้ง) จากนั้นดูดสารละลายแต่ละหลอดปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน [7] จากนั้นจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีความเหมือนและต่างกันทางด้านลักษณะพื้นฐานของโคโลนี ด้วยวิธี cross streak plate โดยใช้ loop ฆ่าเชื้อ เกลี่ยตัวอย่างแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 ความสามารถในการย่อยสลายส่วนประกอบของเซลลูโลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารทดสอบ carboxymethyl cellulose agar (CMC) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Kasana et al. [8] ด้วยการใช้กระดาษ Whatman No. 1 เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.6 มิลลิเมตร จุ่มในสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร วางบริเวณกึ่งกลางอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีน ให้ทั่วผิวกอโคโลนีเชื้อเป็นระยะเวลา 3 นาที บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางของการเกิดส่วนใสรอบโคโลนี จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดส่วนใสมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส และทำการทดสอบเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 4, 6 และ 8 โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใส (clear zone) ในวันที่ 3 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 7 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธี least significant difference test (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม R-stat X64 version 3.5.2

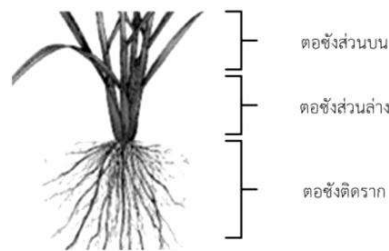
2.3 การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ดีทีเอสทีที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท มาทำการ cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ รูปร่าง สี ลักษณะผิว และขอบของโคโลนีด้วยตาเปล่า จากนั้นทดสอบคุณสมบัติด้วย 3% Potassium hydroxide (KOH) และทดสอบการติดสีย้อมแบบแกรมตามคำอธิบายของ Micro online [9] นำแบคทีเรียที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการของ Bincader et al. [10] โดยใช้ชุดสกัด DNAsecure Plant Kit (Tiangen, Beijing) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้บน 1.2% agarose gel ใน 1X TBE buffer ปลอ่ยให้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ ไหลผ่านนาน 30 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง Gel documentation จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F/1492R [11] นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (thermal cycler) ซึ่งทำปฏิกิริยา ดังนี้ pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ และปฏิกิริยารอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) บน 1.2% agarose gel ใน 1X TBE buffer ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยการปลอ่ยให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านที่ระดับ 80 โวลต์ เป็นระยะเวลา 40 – 45 นาที เปรียบเทียบกับ 100 bp plus DNA Ladder marker บันทึกการเกิดแถบของผลผลิตพีซีอาร์ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation

นำผลผลิตพืชที่ได้นำส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับ type species จากฐานข้อมูลของ GenBank จากนั้นสร้างแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) ค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA version 11 [12] เพื่อวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันของเชื้อแต่ละสปีชีส์

2.4 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยต่อซังในสภาพเปียก

นำต่อซังแต่ละส่วน (ภาพที่ 1) ปริมาตร 50 กรัม ใส่ลงในกล่องพลาสติกที่มีน้ำปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสโตร์แขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 25, 30, 35 และ 45 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความสามารถในการย่อยของจุลินทรีย์ที่ระยะเวลา 5 วัน หลังจากเติมเชื้อจุลินทรีย์ บันทึกผลและถ่ายภาพ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 7 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธี least significant difference test (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม R-stat X64 version 3.5.2

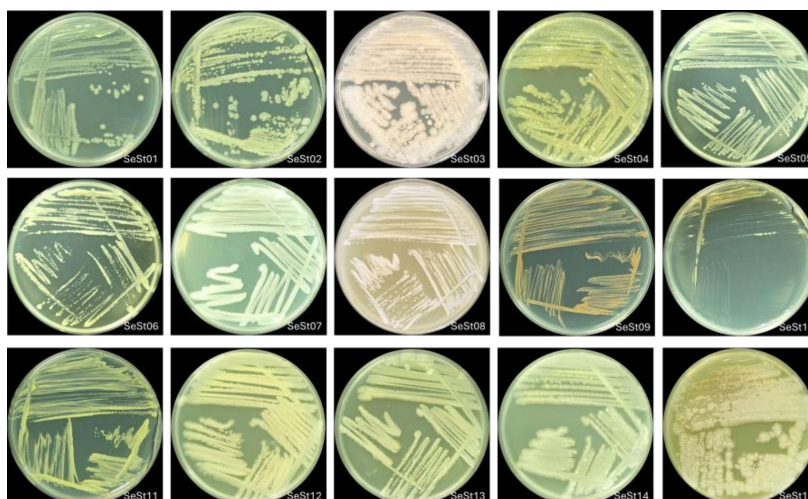


ภาพที่ 1 การแบ่งส่วนต่อซังข้าวเพื่อการศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 การแยกเชื้อด้วยวิธี Dilution plate method

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เก็บจากแปลงนาในอำเภอสวน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ได้ดีภายใต้สภาวะการบ่มที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 3 วัน เมื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบการกระจายตัวของโคโลนีในทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการเจือจาง อยู่ระหว่าง 30 – 300 CFU/ml แสดงให้เห็นว่าดินในพื้นที่ศึกษามีความหลากหลายของจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง ซึ่งสะท้อนถึงความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศในดินนาข้าว ต่อมาได้คัดเลือกและทำให้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยวิธี cross streak plate เมื่อนำมาศึกษาลักษณะพื้นฐานของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เบื้องต้น พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างกันทั้งด้านสี รูปร่าง ขนาด ลักษณะขอบ และความหนูนของโคโลนี โดยสามารถจัดกลุ่มตามลักษณะพื้นฐานของโคโลนีได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท (ภาพที่ 2) ขณะเดียวกันผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินตัวอย่างจากอำเภอสวน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่าดินมีสภาพเป็นกรดอ่อนถึงเป็นกลาง โดยมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) เท่ากับ 6.42 ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity; EC) เท่ากับ 0.38 dS/m ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินมีค่าเท่ากับ 2.14 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) มีค่าเท่ากับ 0.12 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (Available phosphorus) มีค่าเท่ากับ 28.67 mg/kg และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable potassium) มีค่าเท่ากับ 124.53 mg/kg ซึ่งจากการวิเคราะห์เบื้องต้น พบว่าตัวอย่างดินดังกล่าวเพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นข้าว รวมถึงมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของประชากรจุลินทรีย์ในดินอีกด้วย



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียที่แยกได้จากดินแปลงนาในอำเภอสนา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ภายใต้สภาวะการบ่มที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 3 วัน

จากข้อมูลดังกล่าว พบว่าค่า pH อินทรีย์วัตถุ และไนโตรเจนรวม เป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างประชากร เชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียในนาข้าว โดยปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินและไนโตรเจนทั้งหมดที่พบ แสดงให้เห็นถึงการ มีแหล่งคาร์บอนและธาตุอาหารที่เพียงพอสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญของแบคทีเรีย ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเศษซากพืชและการหมุนเวียนธาตุอาหาร [13] นอกจากนี้ งานวิจัยของ Wang et al. [14] ยังพบว่าการเพิ่มอินทรีย์วัตถุและธาตุอาหารในดินสามารถเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน รวมถึงส่งเสริมความหลากหลายและ กิจกรรมของชุมชนแบคทีเรียในระบบนิเวศนาข้าวได้อย่างมีนัยสำคัญ ขณะเดียวกันค่าการนำไฟฟ้าของดินที่อยู่ในระดับต่ำ (0.38 dS/m) บ่งชี้ว่าดินไม่มีปัญหาความเค็ม ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากดินเค็มมักส่งผล กระทบต่อการทำงานของเซลล์จุลินทรีย์และลดความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียได้ [15 – 17]

3.2 ความสามารถในการย่อยสลายส่วนประกอบของเซลลูโลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสจำนวน 15 ไอโซเลท บนอาหาร CMC agar พบว่า แบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายส่วนประกอบของเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนถึง 35 องศาเซลเซียส และลดลงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากการตรวจสอบการเจริญ พบว่าไอโซเลท SeSt08 มีความสามารถในการย่อยสลายส่วนประกอบเซลลูโลสดีที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 16.24 ± 0.37 มิลลิเมตร รองลงมาคือ SeSt14 และ SeSt06 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 15.86 ± 0.35 และ 15.02 ± 0.31 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ระหว่าง 3 ไอโซเลท) (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาการเจริญภายใต้อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลท SeSt08 ยังคงมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสสูงที่สุด โดยมี เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 19.54 ± 0.41 และ 22.73 ± 0.52 มิลลิเมตร รองลงมาคือ SeSt14 และ SeSt06 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 18.92 ± 0.42 22.56 ± 0.50 และ 18.35 ± 0.40 22.44 ± 0.48 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95% ระหว่าง 3 ไอโซเลท) อย่างไรก็ตาม เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส การเจริญของ แบคทีเรียทุกไอโซเลทลดลงอย่างชัดเจน แต่ไอโซเลท SeSt08 ยังคงมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงที่สุด เท่ากับ 15.02 ± 0.33 มิลลิเมตร รองลงมาคือ SeSt14 และ SeSt06 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.66 ± 0.32 และ 14.15 ± 0.29 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ระหว่าง 3 ไอโซเลท)

ตารางที่ 1 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหาร carboxymethyl cellulose (CMC) agar และประสิทธิภาพการย่อยสลายภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4 ระดับ

Isolate name	CMC Colony diameter (mm)	Temperature (mm)*			
		25°C	30°C	35°C	40°C
SeSt01	12.43±0.21 ^{de}	15.24±0.33 ^{de}	18.42±0.41 ^{cd}	20.51±0.28 ^{bc}	11.32±0.24 ^{cd}
SeSt02	13.15±0.18 ^{cd}	16.72±0.25 ^{cd}	20.11±0.37 ^{bc}	22.63±0.42 ^{ab}	12.04±0.22 ^{bc}
SeSt03	10.82±0.27 ^{fg}	13.51±0.29 ^{fg}	16.83±0.34 ^{de}	18.44±0.31 ^{de}	9.75±0.20 ^{ef}
SeSt04	14.26±0.35 ^{bc}	17.43±0.38 ^{bc}	21.26±0.44 ^{ab}	23.15±0.39^a	13.37±0.31 ^{ab}
SeSt05	9.64±0.22 ^{gh}	12.18±0.26 ^{gh}	15.47±0.35 ^{ef}	17.03±0.27 ^{ef}	8.53±0.18 ^{fg}
SeSt06	15.02±0.31^{ab}	18.35±0.40^{ab}	22.44±0.48^a	23.54±0.36^a	14.15±0.29^a
SeSt07	8.73±0.19 ^h	11.42±0.24 ^h	14.66±0.28 ^f	15.82±0.25 ^f	7.84±0.17 ^g
SeSt08	16.24±0.37^a	19.54±0.41^a	22.73±0.52^a	24.11±0.45^a	15.02±0.33^a
SeSt09	11.54±0.24 ^{ef}	14.86±0.31 ^{ef}	17.52±0.36 ^{cd}	19.63±0.34 ^{cd}	10.44±0.21 ^{de}
SeSt10	13.88±0.28 ^{bc}	16.94±0.37 ^{bc}	20.84±0.43 ^{ab}	22.91±0.40 ^{ab}	12.93±0.26 ^{ab}
SeSt11	7.95±0.18 ^h	10.86±0.21 ^h	13.92±0.25 ^f	15.16±0.24 ^f	7.25±0.16 ^g
SeSt12	14.72±0.33 ^{ab}	17.86±0.39 ^{ab}	21.94±0.47 ^{ab}	23.28±0.41^a	13.85±0.30 ^{ab}
SeSt13	10.35±0.23 ^{fg}	13.25±0.28 ^{fg}	16.21±0.32 ^{de}	17.74±0.30 ^{de}	9.12±0.19 ^{ef}
SeSt14	15.86±0.35^a	18.92±0.42^a	22.56±0.50^a	23.87±0.43^a	14.66±0.32^a
SeSt15	12.04±0.26 ^{de}	15.42±0.34 ^{de}	18.83±0.39 ^{bc}	20.26±0.35 ^{bc}	11.04±0.22 ^{cd}
C.V. (%)	4.2817	5.1934	4.8821	3.9925	6.1054
LSD	0.8124	1.0245	0.9342	0.8871	1.1035

* Values with the same column followed by different common letters mean that they are significantly different based on variance with the least significant difference test at $P < 0.05$

การทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึง 35 องศาเซลเซียส ก่อนที่ประสิทธิภาพจะลดลงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนเอนไซม์และผลกระทบต่อการทำงานของระบบเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสลดลง [18] นอกจากนี้ ไอโซเลท SeSt08 ยังแสดงศักยภาพสูงสุดของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสในการเจริญบนอาหาร CMC agar ทุกช่วงอุณหภูมิที่ศึกษา ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมและศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ไอโซเลทอื่น ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความคงตัวต่ออุณหภูมิ สอดคล้องกับรายงานของ Ajeje et al. [19] ที่พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม cellulolytic bacteria หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ thermostable cellulase ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะเดียวกัน การคัดเลือกแบคทีเรียโดยใช้ CMC agar ยังเป็นวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ในการประเมินศักยภาพการผลิต cellulose ของจุลินทรีย์ โดยการเกิดส่วนไฮรอปโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการย่อยสลาย CMC สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ [20, 21]

ต่อมาได้ทำการทดสอบผลการศึกษาศามารถในการเจริญของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสจำนวน 15 ไอโซเลท บนอาหาร carboxymethyl cellulose (CMC) agar ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่าแบคทีเรียแต่ละ

ไอโซเลทมีการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่มีแนวโน้มการเจริญ และการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 และมีประสิทธิภาพต่ำที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 จากการตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าไอโซเลท SeSt08 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงที่สุดเท่ากับ 16.24 ± 0.37 มิลลิเมตร รองลงมาคือ SeSt14 และ SeSt06 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.86 ± 0.35 และ 15.02 ± 0.31 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 2 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหาร carboxymethyl cellulose (CMC) agar และประสิทธิภาพการย่อยสลายภายใต้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ

Isolate name	CMC Colony diameter (mm)	pH (mm)*		
		pH 4	pH 6	pH 8
SeSt01	12.43 ± 0.21^{de}	10.54 ± 0.31^{cd}	19.83 ± 0.45^{bc}	16.25 ± 0.27^{cd}
SeSt02	13.15 ± 0.18^{cd}	11.18 ± 0.24^{bc}	21.45 ± 0.36^{ab}	17.53 ± 0.39^{bc}
SeSt03	10.82 ± 0.27^{fg}	8.92 ± 0.22^{ef}	17.36 ± 0.40^{de}	14.61 ± 0.33^{ef}
SeSt04	14.26 ± 0.35^{bc}	12.65 ± 0.28^{ab}	22.17 ± 0.42^a	18.64 ± 0.37^{ab}
SeSt05	9.64 ± 0.22^{gh}	7.92 ± 0.19^{fg}	15.74 ± 0.31^{ef}	13.25 ± 0.28^{fg}
SeSt06	15.02 ± 0.31^{ab}	13.22 ± 0.30^a	22.61 ± 0.39^a	19.26 ± 0.34^a
SeSt07	8.73 ± 0.19^h	7.15 ± 0.16^g	14.96 ± 0.27^f	12.43 ± 0.22^g
SeSt08	16.24 ± 0.37^a	14.11 ± 0.31^a	23.02 ± 0.46^a	20.18 ± 0.41^a
SeSt09	11.54 ± 0.24^{ef}	9.64 ± 0.23^{de}	18.22 ± 0.35^{cd}	15.37 ± 0.29^{de}
SeSt10	13.88 ± 0.28^{bc}	12.04 ± 0.27^{ab}	21.83 ± 0.38^{ab}	18.01 ± 0.35^{ab}
SeSt11	7.95 ± 0.18^h	6.82 ± 0.15^g	13.84 ± 0.24^f	11.76 ± 0.21^g
SeSt12	14.72 ± 0.33^{ab}	13.04 ± 0.29^{ab}	22.35 ± 0.43^a	18.93 ± 0.36^{ab}
SeSt13	10.35 ± 0.23^{fg}	8.54 ± 0.20^{ef}	16.58 ± 0.34^{de}	14.04 ± 0.27^{ef}
SeSt14	15.86 ± 0.35^a	13.86 ± 0.31^a	22.84 ± 0.45^a	19.72 ± 0.38^a
SeSt15	12.04 ± 0.26^{de}	10.26 ± 0.24^{cd}	19.35 ± 0.37^{bc}	16.04 ± 0.31^{cd}
C.V. (%)	4.2817	5.7823	4.3371	5.0246
LSD	0.8124	0.9562	0.8451	0.9174

* Values with the same column followed by different common letters mean that they are significantly different based on variance with the least significant difference test at $P < 0.05$

ภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 พบว่าไอโซเลท SeSt08 มีการเจริญสูงที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 14.11 ± 0.31 มิลลิเมตร รองลงมาคือ SeSt14 และ SeSt06 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 13.86 ± 0.31 และ 13.22 ± 0.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ ภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ พบว่าไอโซเลท SeSt08 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงที่สุดเท่ากับ 23.02 ± 0.46 มิลลิเมตร รองลงมาคือ SeSt14 และ SeSt06 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 22.84 ± 0.45 และ 22.61 ± 0.39 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยเส้นผ่านศูนย์กลางดังกล่าวสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4 และ 8 อย่างชัดเจน ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงภายใต้สภาวะเป็นกรดเล็กน้อย สำหรับการเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 พบว่าไอโซเลท SeSt08 ยังคงมีการเจริญสูงที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 20.18 ± 0.41 มิลลิเมตร รองลงมาคือ SeSt14 และ SeSt06

ซึ่งมีค่าเท่ากับ 19.72 ± 0.38 และ 19.26 ± 0.34 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ระหว่าง 3 ไอโซเลต) (ตารางที่ 2)

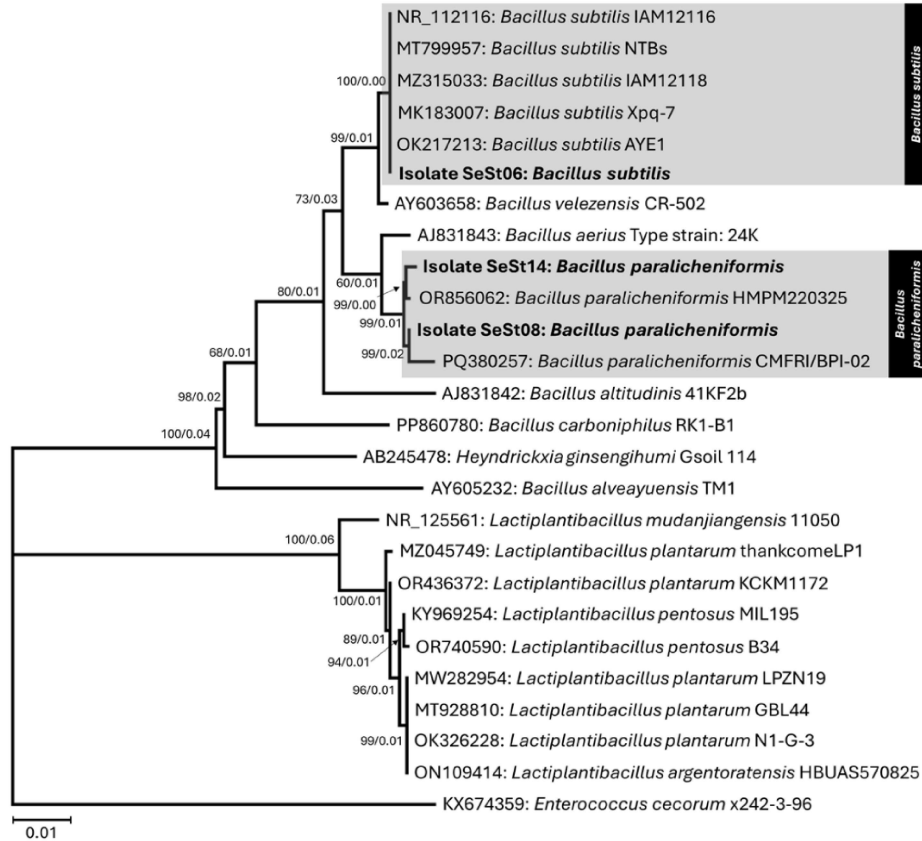
ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญ รองจากอุณหภูมิ ที่มีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ซึ่งเป็นสภาวะเป็นกรดเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะดังกล่าวเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ รวมถึงช่วยรักษาเสถียรภาพของโปรตีนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสส่งผลให้แบคทีเรียสามารถใช้สารตั้งต้นบนอาหาร CMC agar ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะในแบคทีเรียกลุ่ม cellulolytic bacteria ซึ่งส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ cellulase สูงสุดในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 6–7 [15] นอกจากนี้ ไอโซเลต SeSt08, SeSt14 และ SeSt06 ยังมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมและการผลิตเอนไซม์ที่มีความคงตัวต่อสภาวะกรดและด่างได้ดี โดยเฉพาะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ยังคงสามารถเจริญได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน [20, 21]

3.3 การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA และการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลตที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสทั้ง 3 ไอโซเลต ถูกจำแนกอยู่ในสกุล *Bacillus* เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่าไอโซเลต SeSt06 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Bacillus subtilis* และมีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* AYE1 (accession no. OK217213), *Bacillus subtilis* Xpq-7 (accession no. MK183007) และ *Bacillus subtilis* IAM12118 (accession no. MZ315033) มีค่า bootstrap value เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และแยกออกจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* CR-502 (accession no. AY603658) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียง โดยมีค่า bootstrap value เท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)

ขณะที่ไอโซเลต SeSt14 และ SeSt08 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus paralicheniformis* โดยไอโซเลต SeSt14 มีความใกล้ชิดกับเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus paralicheniformis* HMPM220325 (accession no. OR856062) ที่ค่า bootstrap value เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลต SeSt08 มีความใกล้ชิดกับ *Bacillus paralicheniformis* CMFRI/BPI-02 (accession no. PQ380257) ที่ค่า bootstrap value เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต มีการจัดกลุ่มแยกออกจากแบคทีเรียในสกุลอื่นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะในกลุ่ม genus *Lactiplantibacillus* และ *Enterococcus* (outgroup)

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการความสัมพันธ์แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลต SeSt06, SeSt08 และ SeSt14 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสในระดับห้องปฏิบัติการ ถูกจัดจำแนกอยู่ในสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus paralicheniformis* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ endoglucanase, exoglucanase และ β -glucosidase ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลาย cellulose ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว [15] อีกทั้งแบคทีเรียในสกุลดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเฮมิเซลลูเลส (hemicellulose) เพื่อย่อยสลายฟางข้าว ตอซัง และชีวมวลทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ [18, 22, 23] ขณะเดียวกัน มีรายงานว่า *Bacillus paralicheniformis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดและความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย จึงเหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ด้านการย่อยสลายชีวมวลและการผลิตเอนไซม์เชิงอุตสาหกรรม [21, 24–26]



ภาพที่ 3 แผนผังแสดงวิวัฒนาการความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลส จำนวน 3 ไอโซเลต ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap value และมีเชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus cecorum* isolate KX674359 เป็น outgroup วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA version X.

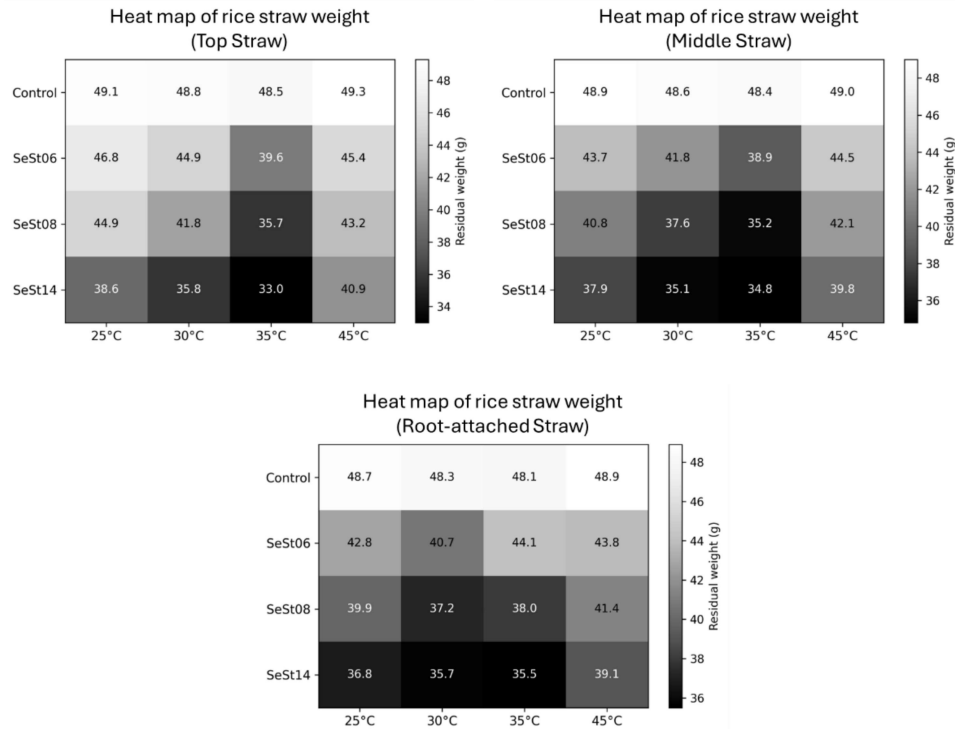
* ไอโซเลตแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษานี้แสดงด้วยตัวอักษรหนา

3.4 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยต่อซังในสภาพเปียก

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยต่อซังในสภาพเปียก โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายส่วนประกอบของเซลลูโลส บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ SeSt06, SeSt08 และ SeSt14 ผลการทดลอง พบว่าน้ำหนักคงเหลือของต่อซังข้าวหลังการเติมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลตที่ระยะเวลา 5 วัน ลดลงในทุกช่วงอุณหภูมิเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองควบคุม (control) โดยพบว่าไอโซเลต SeSt14 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายต่อซังข้าว ส่งผลให้ค่าน้ำหนักคงเหลือของต่อซังแต่ละส่วนต่ำที่สุดในทุกอุณหภูมิ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำหนักต่อซังส่วนบน ต่อซังส่วนล่าง และต่อซังติดราก ลดลงเหลือ 33.0, 34.8 และ 35.5 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองควบคุมที่มีน้ำหนักต่อซังเท่ากับ 48.5, 48.4 และ 48.1 กรัม สามารถคิดเป็นอัตราการลดลงของปริมาณต่อซังได้เท่ากับ 68.04, 71.90 และ 73.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส สามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายต่อซังข้าวในสภาพเปียกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยน้ำหนักคงเหลือของต่อซังข้าวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส และเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ซึ่งสามารถย่อยโครงสร้างเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ให้กลายเป็นสารประกอบโมเลกุลเล็กได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้

ชีวมวลของตอซังลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะไอโซเลท SeSt14 ที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในทุกช่วงอุณหภูมิ งานวิจัยหลายฉบับ รายงานว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายเศษวัสดุทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด และ ชานอ้อย โดยสามารถผลิตเอนไซม์ cellulase, xylanase และ lignin-degrading enzymes ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus velezensis* ที่มีความสามารถในการเพิ่มอัตราการย่อยสลายฟางข้าว และตอซังข้าวโพด และยังช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินหลังการย่อยสลาย นอกจากนี้ การใช้กลุ่มจุลินทรีย์ร่วมกัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพบางชนิด ยังสามารถกระตุ้นกระบวนการย่อยสลายได้ดีกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์เพียงอย่างเดียว เนื่องจากเกิดการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด [4, 23, 27, 28]



ภาพที่ 4 น้ำหนักคงเหลือของตอซังข้าวหลังการย่อยสลายในสภาพเปียกในระดับห้องปฏิบัติการ หลังการบ่มในสภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 5 วัน (กรัม)

4. สรุปผล

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากดินนาข้าวในอำเภอเสนา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ได้ 15 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูโลสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 ไอโซเลท SeSt06, SeSt08 และ SeSt14 มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA พบว่า SeSt06 คือ *Bacillus subtilis* ส่วน SeSt08 และ SeSt14 คือ *Bacillus paralicheniformis* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลสได้ดี นอกจากนี้ การทดสอบการย่อยตอซังข้าวในสภาพเปียกพบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถลดน้ำหนักตอซังข้าวได้ดีกว่าชุดควบคุม โดยเฉพาะ SeSt14 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แสดงให้เห็นศักยภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ในการประยุกต์ใช้เพื่อเร่งการย่อยสลายตอซังข้าวและจัดการเศษวัสดุทางการเกษตรในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับทุนอุดหนุนนักศึกษาในการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ และขอขอบคุณองค์การบริหารส่วนจังหวัดพระนครศรีอยุธยา สำหรับตัวอย่างดินและข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ของแปลงปลูกข้าว

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Chen, Q., Li, Y., Wang, C., & Wang, Y. (2023). Comparison of the effect of NaOH pretreatment and microbial agents on rice straw decomposition. *Agronomy*, 13(3), 816. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030816>.
- [2] Kongjan, K., Treewannakul, P., & Rengkwunkway, M. (2021). Management of rice stubble and straw of farmers in project of extension for stop burning at agri-area in Phra Nakhon Si Ayutthaya Province. *Agricultural Science Journal*, 52(1), 20-31.
- [3] Chang, C., Guo, Y., Tang, K., Hu, Y., Xu, W., Chen, W., McLaughlin, N., & Wang, Z. (2024). Straw from different crop species recruits different communities of lignocellulose-degrading microorganisms in black soil. *Microorganisms*, 12(5), 938. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050938>.
- [4] Anveshitha, A., Bandappa, S., Triveni, S., Katayani, K.K.S., Sathwika, N.H., Shailaja, K., Manasa, V., Kumar, N.V., Latha, P.C., Ronda, V., Mitra, D., Sundaram, R.M., & Babu, M.B.B.P. (2026). Harnessing the potential role of lignocellulolytic microbial consortia for rapid decomposition of rice straw. *Frontiers Media Frontiers in Microbiology*, 17, 1825309. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1825309>.
- [5] Zhao, B., Dong, W., Yu, Y., Zhao, X., Cai, Z., Zhang, H., Li, S., & Sun, X. 2026. The composition and function succession of lignocellulose-degrading microbial consortia drives in situ decomposition of rice straw in paddy fields. *Environmental Microbiome* 21, 73. <https://doi.org/10.1186/s40793-026-00888-6>.
- [6] Zhang, Z., Islam, M.S., Noman, M., Hao, Z., Chai, R., Qiu, H., Wang, J., Cai, Y., Wang, Y., & Wang, J. (2025). Enhanced mesophilic degradation of rice straw by microbial consortium SXJG15 through coordinated enzymatic activity and community reshaping. *Microorganisms*, 13(12), 2707. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13122707>.
- [7] Feng, H.W., Zhi, Y.E., Shi, W.W., Mao, L., & Zhou, P. (2013). Isolation, identification, and characterization of a straw degrading *Streptomyces griseorubens* JSD-1. *African Journal of Microbiology Research*, 7(22), 2730-2735.
- [8] Kasana, R.C., 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. *Current Microbiology*, 57, 503-50.
- [9] Micro online. (2026, May 20). Colony morphology of bacteria. Micro online <https://microbeonline.com/colony-morphology-bacteria-describe-bacterial-colonies/>.
- [10] Bincader, S., Pongpisutta, R., Tiansawang, T., Khienman, S., Boonyarittongchai, P., Phuntumart, V., & Rattanakeetakul, C. (2025). *Brassica oleracea* var. *sabellica*: A new host of *Agroathelia delphinii* in soilless cultivation systems in Central Thailand. *Horticulturae*, 11(4), 411. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11040411>.



- [11] Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., & Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- [12] Tamura, K., Stecher, G., & Kuma, G. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- [13] Yang, Y., Wang, P., & Zeng, Z. (2019). Dynamics of bacterial communities in a 30-year fertilized paddy field under different organic-inorganic fertilization strategies. *Agronomy*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.3390/agronomy9010014>.
- [14] Wang, W., Luo, X., Chen, Y., Ye, X., Wang, H., Cao, Z., Ran, W., & Cui, Z. (2019). Succession of composition and function of soil bacterial communities during key rice growth stages. *Frontiers in Microbiology*, 10, 421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00421>.
- [15] Kim, H., Jeon, J., Lee, K.K., & Lee, Y.-H. (2021). Compositional shift of bacterial, archaeal, and fungal communities is dependent on trophic lifestyles in rice paddy soil. *Frontiers in Microbiology*, 12, 719486. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719486>.
- [16] Arunrat, N., Sansupa, C., Kongsurakan, P., Sereenonchai, S., & Hatano, R. (2022). Soil microbial diversity and community composition in rice–fish co-culture and rice monoculture farming system. *Biology*, 11(8), 1242. <https://doi.org/10.3390/biology11081242>.
- [17] Qiu, C., Bao, Y., Petropoulos, E., Wang, Y., Zhong, Z., Jiang, Y., Ye, X., Lin, X., & Feng, Y. (2022). Organic and inorganic amendments shape bacterial indicator communities that can, in turn, promote rice yield. *Microorganisms*, 10(2), 482. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020482>.
- [18] Malik, W.A., & Javed, S. (2021). Biochemical characterization of cellulose from *Bacillus subtilis* strain and its effect on digestibility and structural modifications of lignocellulose rich biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 800265. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.800265>.
- [19] Ajeje, S.B., Hu, Y., Song, G., Peter, S.B., Afful, R.G., Sun, F., Asadollahi, M.A., Amiri, H., Abdulkhani, A., & Sun, H. (2021). Thermostable cellulases/xylanases from thermophilic and hyperthermophilic microorganisms: Current perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 794304. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794304>.
- [20] Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouket, A.C., Boudechicha, A., Luptakova, L., Alenezi, F.N., & Belbahri, L. (2022). Screening of cellulolytic bacteria from various ecosystems and their cellulases production under multi-stress conditions. *Catalysts*, 12(7), 769. <https://doi.org/10.3390/catal12070769>.
- [21] Cai, Z., Wang, Y., You, Y., Yang, N., Lu, S., Xue, J., Xing, X., Sha, S., & Zhao, L. (2024). Introduction of cellulolytic bacterium *Bacillus velezensis* Z2.6 and its cellulose production optimization. *Microorganisms*, 12(5), 979. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050979>.
- [22] Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., & Pretorius, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>.
- [23] Nargotra, P., Sharma, V., Lee, Y.C., Tsai, Y.-H., Liu, Y.-C., Shieh, C.-J., Tsai, M.-L., Dong, C.-D., & Kuo, C.-H. (2023). Microbial lignocellulolytic enzymes for the effective valorization of lignocellulosic biomass: A review. *Catalysts*, 13(1), 83. <https://doi.org/10.3390/catal13010083>.



- [24] Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouket, A.C., Boudechicha, A., Luptakova, L., Alenezi, F.N., & Belbahri, L. (2022). Screening of cellulolytic bacteria from various ecosystems and their cellulases production under multi-stress conditions. *Catalysts*, 12(7), 769. <https://doi.org/10.3390/catal12070769>.
- [25] Aktayeva, S., & Khasenov, B. (2024). New *Bacillus paralicheniformis* strain with high proteolytic and keratinolytic activity. *Scientific Reports*, 14, 22621. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73468-8>.
- [26] Zhang, T., Guo, R., Liu, F., Zhang, L., Li, L., Zhang, R., Shao, C., Zhou, J., Ding, F., & Yu, L. (2025). Isolation of *Bacillus paralicheniformis* BL-1 and its potential application in producing biofloculants using phenol saline wastewater. *Microbiology Research*, 16(1), 23. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16010023>.
- [27] Wang, S., Su, C., Yang, S., Wang, S., Jiang, X., He, H., Liu, J., & Cheng, Y. (2025). Synergistic co-inoculation of *Bacillus velezensis* and *Pseudomonas helmanticensis* enhances corn straw degradation via microbial community restructuring and saprotroph dominance. *Microorganisms*, 13(11), 2612. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13112612>.
- [28] Zhao, W., Wang, L., Liu, R., Jiang, H., Li, D., Hu, S., Gao, J., Yu, X., & Borjigin, Q. (2026). The application of straw returning combined with low-temperature degrading microbial inoculant M44 in cold and arid regions promotes the efficient decomposition of returned straw through the hierarchical interaction mechanism of “key microorganisms-bacterial community structure-extracellular enzyme activity-straw degradation”. *Frontiers Media Frontiers in Microbiology*, 17, 1765717. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1765717>.