ว.วิทย. มข. 41(4) 954-966 (2556) KKU Sci. J. 41(4) 954-966 (2013)

การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวโพดหวาน (*Zea mays* L. var. saccharata)

Screening of Cellulolytic Microorganisms for Stimulating of Rice (*Oryza sativa* L.) and Sweet Corn (*Zea mays* L. var. saccharata) Seed Germination

ทิพย์นภา วงษ์คูณ[1] *โสภณ บุญลือ*[1] *และ นันทวัน ฤทธิ์เดช*[1*]

บทคัดย่อ

งานวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาจุลินทรีย์จากดิน ฟิลเตอร์เค้ก และน้ำกากส่า ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส และนำเชื้อที่คัดแยกได้มาทดสอบการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์พืช เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อปุ๋ยจุลินทรีย์สำหรับทำปุ๋ยหมักที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืชต่อไป จากการทดลองพบแบคทีเรียจำนวน 26 ไอโซเลท แอคติโนมัยซีท 4 ไอโซเลท และเชื้อรา 1 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ไอโซเลทของเชื้อที่สามารถย่อยสลาย carboxy methyl cellulose (CMC) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงสุดมี 4 ไอโซเลท ได้แก่ ACSI BDS31 BFC8 และ FFC2 โดยให้ผลการทดสอบของค่า hydrolysis capacity (HC value) เท่ากับ 2.5 2.25 2.0 และ 1.02 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (exoglucanase) ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท BDS31 และไอโซเลท BFC8 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท ACSI และเชื้อรา FFC2 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.37 0.36 0.5 และ 0.16 unit/ml ตามลำดับ การตรวจหาดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (*Oryza sativa* L.) และข้าวโพดหวานพันธุ์หวานบุรี (*Zea mays* L. var. saccharata) โดยใช้เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท คือ BFC8 BDS31 ACSI และ FFC2 เป็นหัวเชื้อกระตุ้นการงอกของราก พบว่าดัชนีการงอกของรากของเมล็ดข้าวสูงสุด (127.13 เปอร์เซ็นต์) เมื่อใช้หัวเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท BDS31 ในการกระตุ้นการเจริญ ในขณะที่เชื้อราไอโซเลท FFC2 สามารถกระตุ้นการงอกของรากเมล็ดข้าวโพด โดยมีดัชนีการงอกสูงสุด 86.97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อไอโซเลท BFC8 ติดสีแกรมลบ ลักษณะเซลล์จุลินทรีย์มีรูปท่อน เรียงตัวเป็นสายยาว ไอโซเลท BDS31 ติดสีแกรมบวก ลักษณะเซลล์จุลินทรีย์มีรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ ผิวหน้าโคโลนีมันวาว ไอโซเลท ACSI สายสปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง โคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลือง ผิวหน้าโคโลนีด้าน

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

[*]Corresponding Author, E-mail: nunrid@kku.ac.th

สร้างสปอร์สีเทา และไอโซเลท FFC2 พบการสร้างสปอร์สีดำ ลักษณะเส้นใยสีขาวบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าเชื้อไอโซเลท BFC8 มีความใกล้เคียงกับ *Cronobacter sakazakii* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เชื้อไอโซเลท BDS31 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus licheniformis* ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ เชื้อไอโซเลท ACSI มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces thermodiastaticus* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อไอโซเลท FFC2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์

ABSTRACT

Isolation of cellulolytic microorganisms from soil, filter cake and distillery samples was made. The isolated cellulolytic microorganisms were studied for the stimulating of seed germination. It was found that 26 isolates of bacteria, 4 isolates of actinomycetes and one isolate of fungus degraded carboxy methyl cellulose on CMC agar. The hydrolysis of carboxy methyl cellulose (CMC) was tested on the agar plate. The highest hydrolysis capacity (HC value) was found in isolates ACSI (2.5), BDS31 (2.25), BFC8 (2.0) and FFC2 (1.02) respectively. The isolates of bacteria, actinomycetes and fungus were detected for filter paper activity for cellulase. Cellulase activity in bacterial isolates BDS31 and BFC8, actinomycetal isolate ACSI and fungal isolate FFC2 were 0.37, 0.36, 0.5 and 0.16 unit/ml, respectively. Cellulolytic microorganisms isolate ACSI, BDS31, BFC 8 and FFC2 were used to stimulate the germination of seeds of rice variety Phitsanulok 2 (*Oryza sativa* L.) and sweet corn (*Zea mays saccharata)* variety wanburi. The highest germination index value (GI) of rice root was 127.13 % when inoculated with bacteria isolate BDS31. Whereas, fungal isolate FFC2 could stimulate (GI 86.97 %) the germination of sweet corn root. 4 isolates of the cellulolytic microorganisms were studied on morphology under the compound microscope together with the analysis of DNA sequencing. The isolate of BFC8 was gram negative bacteria, rod shape and streptobacilli. Isolate BDS31 was gram positive bacteria, rod shape, endospore forming and brow color of colony. Isolate ACSI has straight spore chain, yellow color of colony and gray color of spore and isolate FFC2 was black spore and white hypha color. The data of DNA sequencing were identified as *Cronobacter sakazakii* (100 % similarity), *Bacillus licheniformis* (98 % similarity), *Streptomyces thermodiastaticus* (100 % similarity) and *Thermomyces lanuginosus* (100 % similarity) respectively.

คำสำคัญ: เอนไซม์เซลลูเลส จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส ดัชนีการงอกของเมล็ดพืช การกระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวและข้าวโพด

Keywords: Enzyme cellulase, Cellulolytic microorganisms, Germination index, Stimulating of rice and sweet corn seed germination

1. บทนำ

จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting microorganism) มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและผลผลิตของพืช จุลินทรีย์กลุ่มนี้ประกอบด้วยแบคทีเรีย เชื้อรา และมีบทบาทที่สำคัญต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชหลายด้าน เช่น ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ละลายหินฟอสเฟต สร้างฮอร์โมนพืช ยับยั้งการเจริญเติบโตของโรคพืช เป็นต้น *Azospirillum*, *Pseudomonas* และ *Azotobacter* เป็นจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยพบว่าหัวเชื้อแบคทีเรียสามสายพันธุ์นี้สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์พืช และต้นกล้าพืชได้ (Asghar et al, 2002; Bashan et. al, 2004; Biswas et al, 2000) Glick et al. (1997) พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* และ *Pseudomonas fluorescens* ส่งเสริมกระตุ้นการงอกของราก และลำต้นของต้น คาโนลา (canola) จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายอินทรียวัตถุซึ่งใช้ทำปุ๋ยหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้บางสายพันธุ์พบว่าสามารถสร้างฮอร์โมนพืช ทำให้สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ (นันทวัน, 2555) ในปุ๋ยหมักนอกจากจะประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก N P K แล้วยังประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์กับพืช นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการหมุนเวียนธาตุอาหารในดิน กระตุ้นการเจริญและเพิ่มผลผลิตของพืช ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในย่อยสลายเซลลูโลสจากดิน ฟิลเตอร์เค้ก และน้ำกากส่า เพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อปุ๋ยจุลินทรีย์ในรูปหัวเชื้อปุ๋ยหมักที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และหัวเชื้อที่คัดแยกได้จะถูกทดสอบการกระตุ้นการงอกของรากเมล็ดพันธุ์ข้าว และข้าวโพด ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินในบริเวณที่มีการทับถมของเศษใบไม้ ขอนไม้ผุ โดยเก็บตัวอย่างที่อยู่ลึกลงไปจากผิวดิน 1-5 เซนติเมตร ตัวอย่างฟิลเตอร์เค้ก และน้ำกากส่า จากโรงงานขอนแก่นแอลกอฮอล์ จ.ขอนแก่น โดยตัวอย่างที่เก็บมานำส่งห้องปฏิบัติการทันที เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ (นงลักษณ์, 2552)

2.2 การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสจากตัวอย่างดิน ฟิลเตอร์เค้ก และน้ำกากส่า

เพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสโดยใส่ตัวอย่างดิน ฟิลเตอร์เค้ก จำนวน 1 กรัม และน้ำกากส่า 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลวเซลลูโลส 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย cellulose 1.0 กรัม, polypeptone 0.5 กรัม, yeast extract 0.1 กรัม, K_2HPO_4 0.4 กรัม, KCl 0.02 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัม, น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7.0 สำหรับแยกแบคทีเรีย และค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5 สำหรับแยกเชื้อรา บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แบคทีเรียบ่มเป็นเวลา 2 วัน และเชื้อราบ่มเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธีเกลี่ยเชื้อ (spread plate technique) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเซลลูโลส ใช้สภาวะการบ่มเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น

แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากดินโดยการทำ pretreatment ตัวอย่างดิน และฟิลเตอร์เค้กด้วยวิธีความร้อนชื้น (moist heat) โดยนำ

ตัวอย่าง 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำกากส่า 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกรองปลอดเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง vortex mixer แล้วนำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เจือจางตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} แล้วปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหาร starch casein agar ที่ประกอบด้วย cellulose 10.0 กรัม, soluble starch 10.0 กรัม, KNO_3 2.0 กรัม, casein (vitamin free) 0.3 กรัม, K_2HPO_4 2.0 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 กรัม, NaCl 2.0 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม, $CaCO_3$ 0.02 กรัม, agar 18.0 กรัม, น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร, cycloheximide 500 มิลลิกรัม, nystatin 10 มิลลิกรัม ปรับค่า pH เป็น 7.0 บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน (Seiller , 1916)

คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีท ที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสโดยใช้ carboxy methyl cellulose (CMC) เป็นซับสเตรทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อย carboxy methyl cellulose (CMC)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาทำการปลูกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี spot inoculation บนอาหารแข็ง carboxy methyl cellulose agar ที่ประกอบด้วย carboxy methyl cellulose 0.1 กรัม, polypeptone 0.5 กรัม, yeast extract 0.1 กรัม, K_2HPO_4 0.4 กรัม, KCl 0.02 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัม, agar 1.5 กรัม น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 7.0 สำหรับแบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท และ pH 5.0 สำหรับเชื้อรา บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วันสำหรับแบคทีเรีย 7 วันสำหรับเชื้อรา และเชื้อแอคติโนมัยซีท จากนั้นเมื่อจุลินทรีย์เจริญเทราดด้วย 0.1% Congo red (w/v)เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วย 1N NaCl เป็นเวลา 15 นาที วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้ คำนวนค่า hydrolysis capacity (HC value) คือ เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (George et al., 2001)

2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อกระดาษกรอง (filter paper activity for cellulase) ใส่กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 0.5×3 เซนติเมตร ลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 0.1 M sodium phosphate buffer ปริมาตร 2. 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 2.5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่มีกระดาษกรองผสมให้เข้ากันนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปิเปตสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่เติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) 0.5 มิลลิลิตร และต้มในน้ำเดือดทันที 15 นาที เมื่อครบเวลาทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการแช่ในน้ำผสมน้ำแข็ง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละกิจกรรมของเอนไซม์ไปหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากสูตรตามหลักของ international unit (IU) โดย 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ (Miller, 1959)

2.5 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของจุลินทรีย์ที่แยกได้

นำจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส 4 ไอโซเลท (BFC8, BDS31, ACSI และ FFC2) ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในการทดลองนี้ โดยคัดเลือกไว้เพื่อนำไปตรวจสอบการกระตุ้นการงอกของเมล็ด ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการศึกษาทางชีวโมเลกุลของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทที่คัดแยกได้เพื่อระบุสายพันธุ์ โดยการเพิ่มขยายลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของจีนในบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรีย และในบริเวณ 28 S rRNA ของเชื้อรา ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในโปรแกรม NCBI (National Center for Biotechnology Information) ในรูปแบบของ FASTA (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

2.6 ทดสอบการเร่งการงอกรากของเมล็ดพันธุ์พืชโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ (Sava et al., 2011)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth และเชื้อราในอาหารเหลว potato dextrose broth จากนั้นนำเมล็ดพืช (ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และข้าวโพดหวานพันธุ์ข้าวโพดหวานบุรี) มาทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอก โดยการแช่ด้วย 95% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์แช่ในฟลาส์กที่มีเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท และดูดด้วยปั๊มสูญญากาศ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำเมล็ดพันธุ์ไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษทิชชูจานละ 10 เมล็ด ปิเปตน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตรลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำชุดควบคุม โดยแช่เมล็ดพันธุ์พืชในน้ำกลั่น ทำการบ่มเป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดสอบด้วยวิธีวัดดัชนีการงอกของเมล็ด (germination index, GI) (Tiquia et al., 1996)

ดัชนีการงอกของเมล็ดพืช (GI)

$$= \frac{\%\ \text{ความงอกในจานที่มีหัวเชื้อ} \times \text{ความยาวรากในจานที่มีหัวเชื้อ}}{\%\ \text{ความงอกในน้ำกลั่น} \times \text{ความยาวรากในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)}} \times 100$$

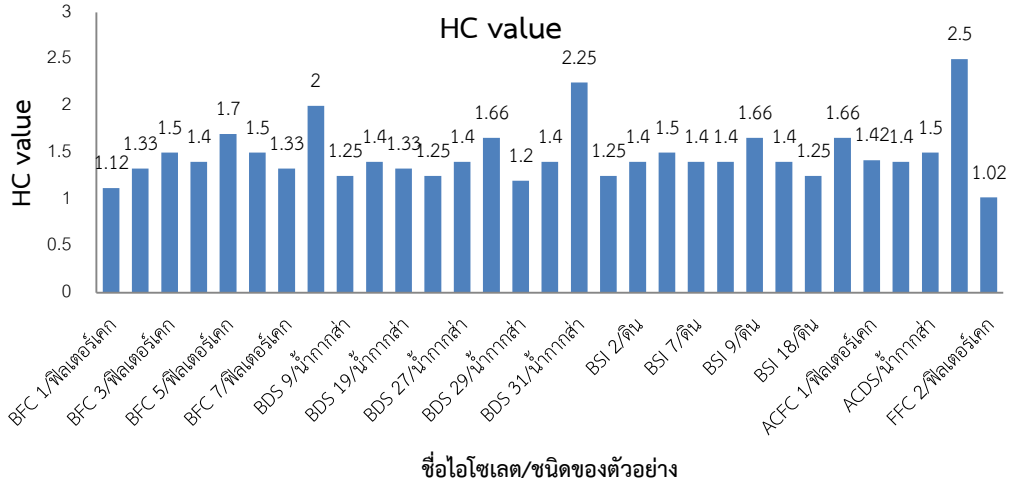
3. ผลการวิจัย

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท และเชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลส

จากการศึกษาการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดิน ฟิลเตอร์เค้ก และน้ำกากส่า ที่มีลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน และที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 26 ไอโซเลท (รหัสที่ขึ้นต้นด้วย B) เชื้อราพบจำนวน 1 ไอโซเลท (รหัสที่ขึ้นต้นด้วย F) และพบเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 4 ไอโซเลท (รหัสที่ขึ้นต้นด้วยAC)

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อย carboxy methyl cellulose (CMC)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย carboxy methyl cellulose (CMC) ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มที่แยกได้ ด้วยวิธี Congo red test โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส/เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี หรือค่า hydrolysis capacity (HC value) ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าจุลินทรีย์ที่มีค่า HC value มากกว่า 1 ประกอบด้วย แบคทีเรียทั้ง 26 ไอโซเลท เชื้อแอคติโนมัยซีท 4 ไอโซเลท เชื้อรา 1 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย CMC ได้ดีที่สุด คือแบคทีเรียไอโซเลท BDS 31 มีค่า HC value เท่ากับ 2.25 และแบคทีเรีย ไอโซเลท BFC 8 มีค่า hydrolysis capacity (HC value) เท่ากับ 2 ตามลำดับ เชื้อแอคติโนมัยซีท-ไอโซเลท ACSI มีค่า HC value สูงสุด คือ 2.50 และเชื้อราพบว่าไอโซเลท FFC 2 มีค่า HC value เท่ากับ 1.02



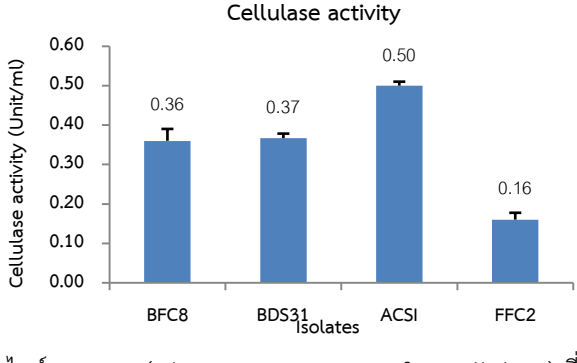
รูปที่ 1 Hydrolysis capacity (HC value) ของจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (filter paper activity for cellulase)

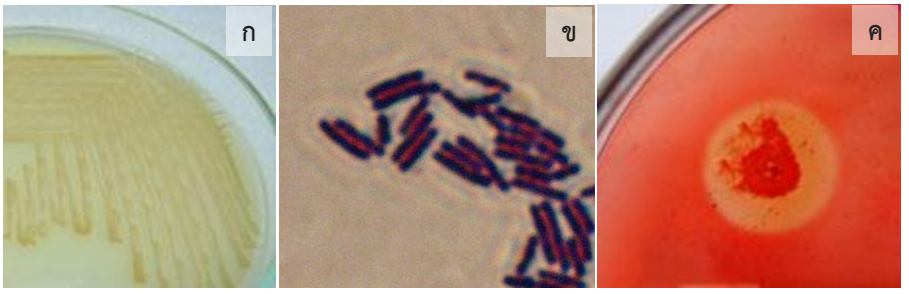
ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี filter paper activity ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท BFC8 มีค่าเท่ากับ 0.36 unit/ml ไอโซเลท BDS 31 เท่ากับ 0.37 unit/ml ผลการวิเคราะห์ในเชื้อแอคติโนมัยซีส พบว่ามีค่าสูงสุดในไอโซเลท ACSI เท่ากับ 0.50 unit/ml และเชื้อราไอโซเลท FFC2 เท่ากับ 0.16 unit/ml ตามลำดับ ดังรูปที่ 2

3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของจุลินทรีย์ที่แยกได้

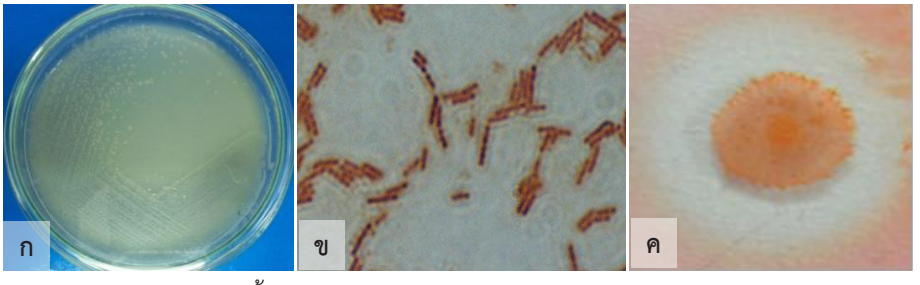
จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียไอโซเลท BFC8 แบคทีเรียไอโซเลท BDS31 เชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท ACSI และเชื้อราไอโซเลท FFC2 โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงในรูปที่ 3 4 5 และ 6 ตามลำดับ



รูปที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Filter paper activity for cellulase) ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท BDS31 (*Bacillus licheniformis*) ลักษณะเซลล์จุลินทรีย์ที่พบติดสีแกรมบวก รูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีสีน้ำตาล ผิวหน้าโคโลนีมันวาว โคโลนีขนาดเล็ก ก) ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ข) รูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ ค) การย่อยสลาย carboxy methyl cellulose บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท BFC 8 (*Cronobacter sakazakii*) ลักษณะเซลล์จุลินทรีย์ติดสีแกรมลบ เซลล์รูปท่อน เรียงตัวเป็นสายยาว ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีครีม ทึบแสง ขนาดโคโลนีประมาณ 0.5 เซนติเมตร ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่มันวาว ก) ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ข) รูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ ค) การย่อยสลาย carboxy methyl cellulose บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

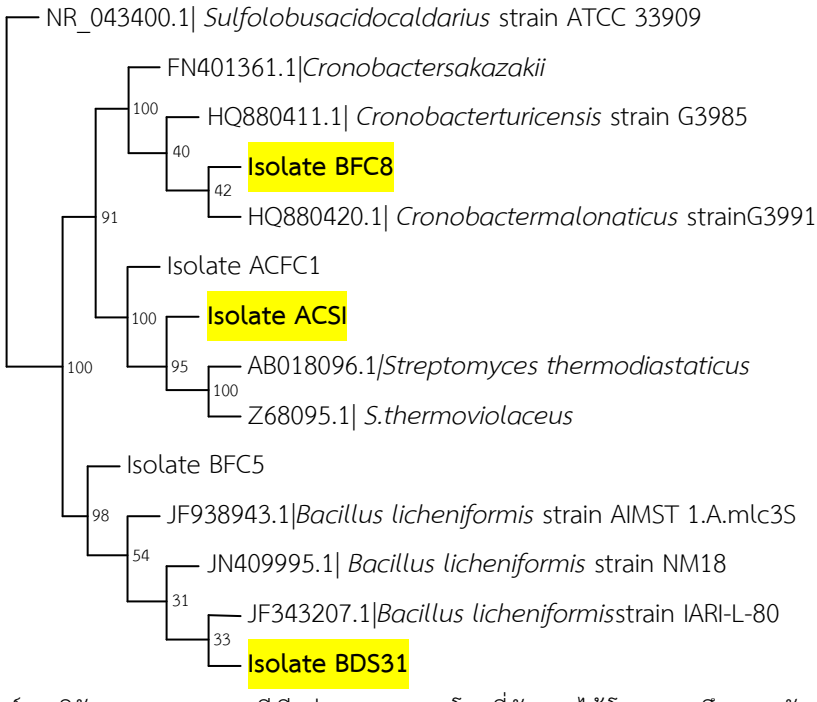
รูปที่ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท ACSI (*Streptomyces thermodiastaticus*) สายสปอร์ของแบคทีเรียในกลุ่ม actinomycetes ที่พบเป็นแบบ Rectus flexibilis [RF] หรือ Rectiflexibile สายสปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง (straight RF) ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีที่พบสีเหลือง ผิวหน้าโคโลนีด้าน ขอบโคโลนีนูน ติดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสร้างสปอร์สีเทา ก) ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ข) รูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ ค) การย่อยสลาย carboxy methyl cellulose บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท FFC2 (*Thermomyces lanuginosus*) ลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบการสร้างสปอร์สีดำ ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพบเส้นใยเจริญแผ่ลาม เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์สีดำ ก) ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ข) รูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ ค) การย่อยสลาย carboxy methyl cellulose บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

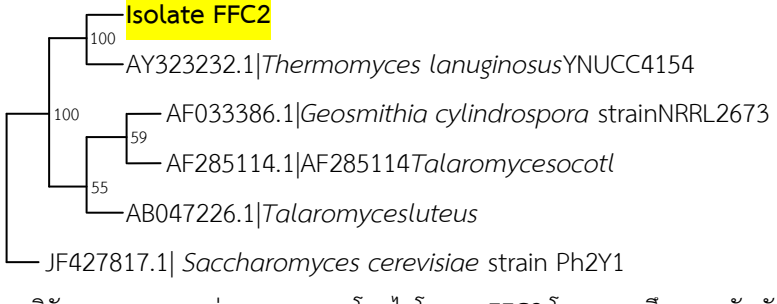
จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อไอโซเลท BFC8 BDS31 ACSI และ FFC2 ร่วมกับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (500 bp) ของ 16S rRNA สำหรับแบคทีเรีย และ 28S rRNA ของเชื้อราพบว่าเชื้อไอโซเลท BFC8 อยู่ในจีนัส *Cronobacter* และจากการทำ phylogenetic tree พบว่าเชื้อไอโซเลท BFC8 มีความใกล้เคียงกับ *Cronobacter sakazakii* ถึง 100% เชื้อไอโซเลท BDS31 อยู่ในจีนัส *Bacillus* มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus licheniformis* ถึง 98% เชื้อไอโซเลท ACSI อยู่ในจีนัส *Streptomyces* มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces thermodiastaticus* และเชื้อไอโซเลท FFC2 อยู่ในจีนัส *Thermomyces* มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ถึง 100 % ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8

3.5 ทดสอบการเร่งการงอกรากของเมล็ดพันธุ์พืชโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ผลการทดสอบการเร่งการงอกของรากเมล็ดพันธุ์ข้าวและข้าวโพดหวานเมื่อทำการกระตุ้นการงอกโดยเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท BDS31 ให้ผลทดสอบการเร่งการงอกของรากสูงสุด โดยมีค่าดัชนีการงอก 127.13% ในเมล็ดข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ส่วนเชื้อราไอโซเลท FFC2 สามารถกระตุ้นการงอกของรากเมล็ดข้าวโพดหวานพันธุ์หวานบุรี โดยมีดัชนีการงอกสูงสุด 86.9% จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนจากแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ($P<0.05$) โดยทดสอบแบบ LSD พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวโพดหวาน และเมล็ดข้าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อถูกกระตุ้นโดยใช้หัวเชื้อแต่ละไอโซเลท ผลการทดสอบการเร่งการงอกรากของเชื้อจุลินทรีย์แสดงในตารางที่ 1 และ รูปที่ 9 และ 10



รูปที่ 7 สายวงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียย่อยสลายเซลลูโลสที่คัดแยกได้ โดยแสดงถึงความสัมพันธ์กันระหว่างแบคทีเรียไอโซเลท BFC8 BDS31 และแอคติโนมัยซีทไอโซเลท ACSI ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ และแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากฐานข้อมูลของ data gene bank (NCBI) และจัดกลุ่มวงศ์วานวิวัฒนาการโดยวิธี neighbor-joining ในชุดโปรแกรม PHYLIP 3.69

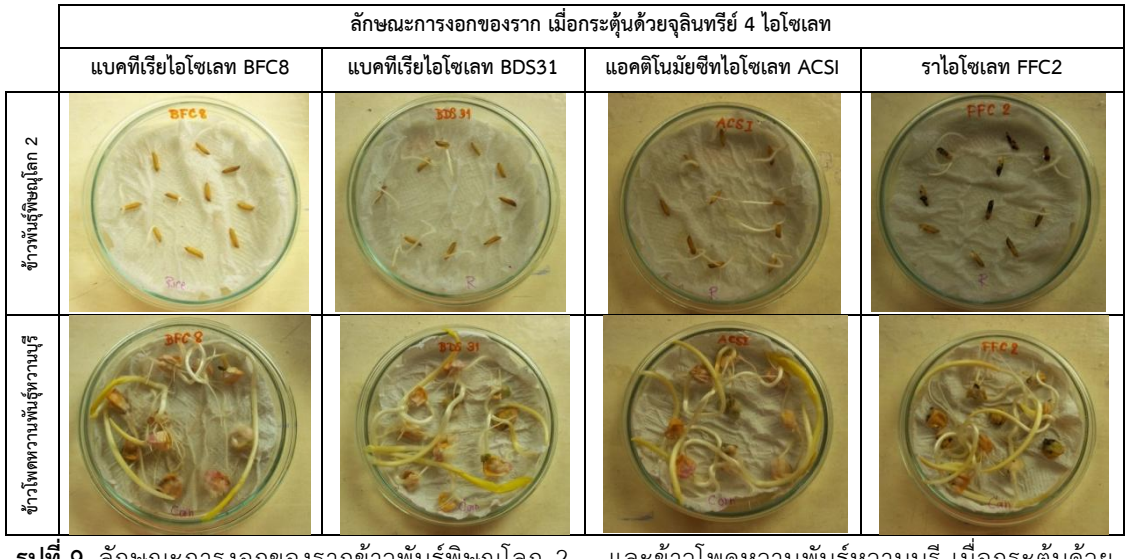


รูปที่ 8 สายวงศ์วานวิวัฒนาการของราย่อยสลายเซลลูโลสไอโซเลท FFC2 โดยแสดงถึงความสัมพันธ์กันระหว่างราที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากฐานข้อมูลของ data gene bank (NCBI) และจัดกลุ่มวงศ์วานวิวัฒนาการโดยวิธี neighbor-joining ในชุดโปรแกรม PHYLIP 3.69

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอกของรากเมล็ดพันธุ์ข้าว และข้าวโพดหวาน ใช้หัวเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทกระตุ้นการเจริญ โดยวัดผลในวันที่ 7 ของการทดสอบ

Isolate	GI(%) of sweet corn	GI(%) of rice
BFC8	38.93 d	51.28 d
BDS31	82.36 b	127.13 a
ACSI	72.28 c	114.95 b
FFC2	86.97 a	70.79 c
Mean	70.13	91.04
F-test	**	**
CV (%)	0.05	0.17

** = significant at $P < 0.01$ probability level, Mean in the same column with the same letters are not significantly different by least significant difference (LSD) (at $P < 0.05$).



รูปที่ 9 ลักษณะการงอกของรากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และข้าวโพดหวานพันธุ์หวานบุรี เมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยวัดการงอกของรากในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

รูปที่ 10 ลักษณะการงอกของรากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และข้าวโพดหวานพันธุ์หวานบุรี ในชุดทดลองควบคุม จำนวน 2 ซ้ำ

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญและย่อยสลายเซลลูโลสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar พบเชื้อแบคทีเรีย 26 ไอโซเลท เชื้อแอคติโนมัยซีท 4 ไอโซเลท และเชื้อรา 1 ไอโซเลท และจากการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อสร้างขึ้น พบค่าของกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดใน 4 ไอโซเลท ได้แก่ BFC8, BDS31, ACSI และ FFC2 ซึ่งระบุชนิดได้เป็น *Cronobacter sakazakii, Bacillus licheniformis, Streptomyces thermodiastaticus* และ *Thermomyces lanuginosus* เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทมาทดสอบกิจกรรมการเร่งการงอกของเมล็ดพืชของข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และข้าวโพดหวานพันธุ์หวานบุรี พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท BDS31 ให้ผลทดสอบดัชนีการงอกของรากสูงสุด คือ 127.13 % ในเมล็ดข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทมีความเหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อปุ๋ยจุลินทรีย์ในรูปหัวเชื้อปุ๋ยหมักได้ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถสามารถย่อยสลายเซลลูโลสกระตุ้นการงอกเมล็ดพันธุ์ข้าว และข้าวโพดได้ดี

วิจารณ์ผลการวิจัย

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เช่น ดิน น้ำกากส่า ฟิลเตอร์เค้ก ในงานวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้ง 3 กลุ่ม คือ เชื้อแบคทีเรีย เชื้อแอคติโนมัยซีท และเชื้อรา ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายปุ๋ยหมัก (Dindal, 1978) การทำปุ๋ยหมักโดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียมักจะพบในปริมาณที่มากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเสมอ ในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น การศึกษาเชื้อแบคทีเรีย เชื้อแอคติโนมัยซีท และเชื้อรา ที่ผลิตเซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสจึงมีความสำคัญมากต่อการทำปุ๋ยหมักที่ใช้เซลลูโลสเป็นวัสดุหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นเร่งการงอกของรากเมล็ดพืช ในรูปหัวเชื้อปุ๋ยหมัก ซึ่งอาจช่วยให้ระยะเวลาในการทำปุ๋ยหมักสั้นลง นอกจากนี้จากการศึกษา ของ Wang et al. (2011) ซึ่งได้ทำการศึกษาดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ผักกระหล่ำปลีที่เพาะในปุ๋ยหมักที่มีการผสมเชื้อรา *Penicillium expansum* ร่วมด้วย พบว่ามีดัชนีการงอกสูงถึง 150% ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้มีการทดสอบดัชนีการงอกของเมล็ดพืชเพื่อทดสอบการเร่งการงอกรากของเมล็ดข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และข้าวโพดหวานพันธุ์ข้าวโพดหวานบุรี โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากการทดลองนี้ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลส และสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท BDS31 กระตุ้นการงอกได้ดีโดยมีค่าดัชนีการงอก 127.13% นอกจากนี้การตรวจสอบคุณสมบัติของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่ามีคุณสมบัติในการสร้างฮอร์โมนพืช IAA ซึ่งฮอร์โมนชนิดนี้จะช่วยเร่งการงอกของรากพืช (นันทวัน, 2555) จากการทดลองของ Babalola et al. (2007) พบว่าหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินรอบรากพืช เช่น *Pseudomonas* sp., *Klebsiella oxytoca* และ *Enterobacter sakazakii* สามารถปล่อยสารกระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวฟ่างได้ ดังนั้นการนำจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสทั้ง 4 ไอโซเลทมาประยุกต์ใช้เป็นปุ๋ยจุลินทรีย์ในรูปหัวเชื้อปุ๋ยหมักจะทำให้ปุ๋ยหมักที่ผลิตขึ้นมีสารกระตุ้นการงอกดังกล่าวพร้อมทั้งหัวเชื้อจุลินทรีย์ปะปนอยู่ นอกจากนี้จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสในการทดลองนี้ยังสามารถตรึงไนโตรเจนอากาศ และละลายหินฟอสเฟตได้ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเจริญของพืชต่อไป การทดลองครั้งนี้

เป็นการศึกษาขั้นเบื้องต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติของสารที่ช่วยกระตุ้นการงอกที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น การงอกของเมล็ดพืชรวมทั้งการเก็บผลผลิตในระยะ 3 เดือน รวมทั้งการนำจุลินทรีย์ไปประยุกต์เป็นหัวเชื้อปุ๋ยจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อผลิตปุ๋ยหมัก ต้องดำเนินการในการทดลองขั้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ปีงบประมาณ 2553 และ ขอขอบคุณบริษัทขอนแก่นแอลกอฮอล์ จ. ขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างฟิลเตอร์เค้กและน้ำกากส่า พร้อมทั้งสถานที่ในการทำปุ๋ยหมัก งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้ ภายใต้คำแนะนำ และกำลังใจจากอาจารย์ ดร.นันทวัน ฤทธิ์เดช และอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตลอดจนเพื่อนๆนักศึกษาทุกท่าน ขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือในการวิจัยครั้งนี้ ทั้งที่ได้กล่าวนาม และไม่ได้กล่าวนาม

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สายเทพ. (2552). การแยกและคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสจากตัวอย่างดินปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยน้ำชีวภาพ. แหล่งข้อมูล: http://www.science.cmu.ac.th. ค้นเมื่อวันที่ 25กุมภาพันธ์ 2553.

นันทวัน ฤทธิ์เดช. (2555). การผลิตจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อเป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยหมักจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานน้ำตาล และโรงงานผลิตแอลกอฮอล์. รายงานความก้าวหน้างานวิจัยทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ปีงบประมาณ 2555.

Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M. and Khaliq, A. (2002). Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea*.L. Bio. Fertil. Soil. 35: 231-237.

Babalola, O.O., Berner, D.K. and Amusa, N.A. (2007). Evaluation of some bacterial isolates as germination stimulants of *Striga hermonthica*. Afri. J of Agri. Res. 2(1): 027-030

Bashan, Y., Holguin, G. and De-Bashan, L.E. (2004). *Azospirillum*- plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. Can. J. Microbiol. 50: 521–577.

Biswas, J.C., Ladha, L.K. and Dazzo, F.B. (2000). Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. J. Soil. Sci. 64: 1644-1650.

Dindal, D.L. (1978). Soil organisms and stabilizing waste. Compost Sci. 9: 8-11.

George, S.P., Ahmad, A and Rao, M.B. (2001). Studies on carboxy methyl cellulose produced by an Alkalothermophilic actinomycete. updated; cited 2010 Feb 25. Available from http://www.sciencedirect.com.

Ghose, T.K (1987). Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem. 59: 257-268.

Glick, b.R., Changping, L., Sibdas, G and Dumbroff, E.B. (1997). Early development of canola seedlings in The presence of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Soil Biol.Biochem. 29: 1233-1239.

Golueke, C.G (1977). The biological approach of solid waste management. Compost Sci. 8: 4-9.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.

Seiller, G. (1916). A new method of precipitating cellulose for cellulose agar. Centralblatt. Bakt. Parasitenk. Abt.II. 44: 661-663.

Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y. and Hodgkiss, I.J.. (1996). Effects of composting on phytotoxicity of spent pig manure sawdust litter. Environ. Pollut: 249-256.

Vrbničanin, S., Božić, D., Sarić, M., Pavlović, D and Raičević, V. (2011). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on *Ambrosia artemisiifolia* L. seed germination. Pestic. Phytomed. (Belgrade). 26(2): 141-146.

Wang, H.Y, Fan, B.Q , Hu, Q.X and Yin, Z.Y. (2011). Effect of inoculation with *Penicillium expansum* on the microbial community and maturity of compost. Bioresource technology 120: 11189-11193.

❑❑❑❑❑