การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสจากดินบริเวณรากของมันสำปะหลัง

น.ส.พิชญ์วสุ เอี่ยมยั่งยืน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA FROM CASSAVA RHIZOSPHERE SOIL

Miss Pichwasu Aiemyungyuen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology and Microbial Technology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสจากดินบริเวณรากของมันสำปะหลัง
โดย	น.ส.พิชญ์วสุ เอี่ยมยั่งยืน
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. นลวัฒน์ บุญญาลัย)

พิชญ์วสุ เอี่ยมยั่งยืน : การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสจากดินบริเวณรากของมันสำปะหลัง. (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA FROM CASSAVA RHIZOSPHERE SOIL) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล

มันสำปะหลังเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่นิยมเพาะปลูกในเกือบทุกภาคของประเทศไทย ปกติหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ใบและลำต้นจะถูกทิ้งไว้เพื่อรอการไถกลบสำหรับเตรียมแปลงปลูกในครั้งถัดไป งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของพืช จากดินบริเวณที่ปลูกมันสำปะหลัง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ เกษตรศาสตร์ 50, พิรุณ 1, พิรุณ 2, ห้วยบง 60 และ ห้านาที ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดระยอง โดยคัดแยกบนอาหารแข็งที่มีสับสเตรตต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส, Avicel และเซลลูไบโอส จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 ชนิดของสับสเตรต มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ คัดเลือกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสดีที่สุด ซึ่งได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* แล้วนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมาทดสอบหาภาวะที่เหมาะสม พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่าง (pH) 7 แบคทีเรียสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดจากสับสเตรตทั้ง 3 ชนิด จากนั้นนำมาทดสอบในการย่อยกระดาษกรอง ขนาด 1.5*1.5 เซนติเมตร ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดแสดงให้เห็นว่า สภาพเส้นใยของกระดาษกรองเปลี่ยนแปลงไปมากที่สุด เมื่อเลี้ยงรวมกับ *Paenibacillus kribbensis* ในขณะที่ชุดการทดลองการย่อยใบมันสำปะหลังโดยตรง และชุดการทดลองการย่อยใบมันสำปะหลังในดิน เห็นผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของใบมันสำปะหลังมากที่สุดเมื่อใช้แบคทีเรียผสมกันทั้ง 3 ไอโซเลท หลังจากนำดินจากชุดการทดลองการย่อยใบมันสำปะหลังในดินไปวิเคราะห์คุณสมบัติ โดยศึกษาพารามิเตอร์ ความเป็นกรดด่าง, ปริมาณอินทรียวัตถุ, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม, แคลเซียม, แมกนีเซียม, ไนโตรเจน และ ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมในดิน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อย่างไรก็ดีแบคทีเรียผสมจากการทดลองนี้ มีแนวโน้มที่สามารถนำไปประยุกต์ในสภาพแวดล้อมจริงได้ แต่ควรมีการยืนยันประสิทธิภาพที่เห็นผลชัดเจนมากกว่านี้ต่อไป.

สาขา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายชื่อนิสิต...
ปีการศึกษา	2561	ลายชื่อ อ. ที่ปรึกษาหลัก..............................

5872004523 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY
KEYWORD: CELLULASE, CASSAVA, CELLULOLYTIC BACTERIA

Pichwasu Aiemyungyuen : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA FROM CASSAVA RHIZOSPHERE SOIL.
Advisor: Assoc. Prof. Wanchai Assavalapsakul, Ph.D.

Cassava is one of the economic crops which is planted in almost every region of Thailand. After harvesting, its stem and leaf are left on the farm until the next round of cultivation. This work aims to isolate and characterise the bacteria degrading cellulose, a major component of plants, from soil-growing cassava strains; Kasetsart 50 (KU 50), Pirun 1 (PR1), Pirun 2 (PR2), Huay-bong 60 (HB60) and 5-Natee (HT) at Agricultural Research Cener at Rayong province. The cellulolytic bacteria were first isolated on different culture agars containing carboxyl methyl cellulose (CMC), avicel or cellobiose. Bacterial isolates that could grow in at least two screening agars were chosen for 16S rDNA sequencing and reduced sugar measurement. The top 3 bacteria with highest activity were identified as *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus pumilus* and *Paenibacillus kribbensis*. The condition optimized for the highest activity of all 3 bacteria on all substrates was at 37^{o}C and pH7. Their activity was then evaluated by degradation of the filter paper (1.5 * 1.5 cm). The scanning electron microscopy revealed the paper's fiber was greatest changed when cultured with *Paenibacillus kribbensis*. Meanwhile, the cellulolytic activity was also monitored on either cassava leaf alone or leaf within soil. The greatest change of cassava leaf's structure was microscopically observed when using the mixture of three bacteria. At last, 8 parameters (pH, organic matter, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, total nitrogen and total organic carbon) of the soil sample from treatment group was measured. The results indicated that all values were not significantly difference between treatment and control group. However, this bacterial mixture will be very promising for applying in the field if its activity is more clearly confirmed in the future.

Field of study:	Microbiology and Microbial Technology	Student's Signature ....
Academic Year:	2018	Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของ รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ที่ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ให้ขนม แนะแนวทางต่าง ๆ มาโดยตลอด และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์จนลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ แนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย และ ดร. นลวัฒน์ บุญญาลัย เป็นอย่างสูงในความกรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ แนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในความกรุณาอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยนี้

ขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการ 2014 สำหรับคำปรึกษา ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้

ขอบคุณเจบีและน้องแบมแบมที่เป็นกำลังใจในการเขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอบคุณงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2559-2561 ที่ให้เงินสนับสนุนงานวิจัยนี้

ขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดระยอง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเพาะปลูกมันสำปะหลังทั้ง 5 สายพันธุ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา น้าเปี๊ยกและอำพล ที่คอยสนับสนุน ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญแก่ผู้วิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พิชญ์วสุ เอี่ยมยั่งยืน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ปริทรรศน์วรรณกรรม	3
2.1 มันสำปะหลัง	3
2.2 หลังการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลัง	6
2.3 เซลลูโลส	7
2.4 เซลลูเลส	9
2.5 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลสของจุลินทรีย์	11
2.5.1 แหล่งคาร์บอน	11
2.5.2 แหล่งไนโตรเจน	11
2.5.3 อุณหภูมิ	12
2.5.4 pH	13
2.5.5 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	13
2.6 เอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรีย	15

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง..........19
3.1 วัสดุและสารเคมี..........19
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย..........21
3.2.1 เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ จ. ระยอง..........21
3.2.2 คัดกรอง และแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูเลสจากดิน..........21
3.3 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง..........22
3.3.1 ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์..........22
3.3.2 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้โคโลนี..........23
3.4 หาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญจากไร่มันสำปะหลังในการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้..........24
3.4.1 แปรผันอุณหภูมิและ pH ของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสได้..........25
3.5 ย่อย Filter paper และ ใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้..........25
3.5.1 ย่อยสลาย Filter paper โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้..........25
3.5.2 ย่อยสลายใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้..........26
3.5.3 ย่อยสลายใบมันสำปะหลังในดินโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้..........28
บทที่ 4 ผลการทดลอง..........30
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูเลสจากดิน..........30
4.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทล์ 16S rDNA (16S rDNA sequencing)..........42
4.3 ผลการศึกษาการทดสอบกิจกรรมของเซลลูเลสด้วยวิธี DNS Method..........50
4.4 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีสามารถในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง..........55
4.4.1 ทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกมา..........55

4.4.2 หาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญจากไร่มันสำปะหลังในการผลิตเซลลูเลส ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้........56

4.4.2.1 แปรผันอุณหภูมิและ pH ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสได้........56

4.5 ผลการย่อย Filter paper และใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้........62

4.5.1 ย่อย Filter paper โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้........62

4.5.2 ย่อยใบมันสำปะหลังโดยตรงโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้........63

4.5.3 ย่อยใบมันสำปะหลังในดินโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้........67

4.5.4 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน........69

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง........77

5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูเลสจากดิน........77

5.2 การหาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสได้จากแบคทีเรียที่คัดเลือก........79

5.3 การย่อย Filter paper และ ใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้........80

บทที่ 6 ข้อเสนอแนะในงานวิจัย........82

บรรณานุกรม........83

ภาคผนวก........97

ภาคผนวก ก........98

ภาคผนวก ข........151

ภาคผนวก ค........155

ภาคผนวก ง........161

ประวัติผู้เขียน........163

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 15

ตารางที่ 3.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 19

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปลูกมันสำปะหลัง 5 สายพันธุ์ ทุก 3 เดือน 30

ตารางที่ 4.2 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 0 เดือน) 31

ตารางที่ 4.3 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 3 เดือน) 31

ตารางที่ 4.4 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 6 เดือน) 34

ตารางที่ 4.5 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 9 เดือน) 37

ตารางที่ 4.6 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 12 เดือน) 39

ตารางที่ 4.7 จำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 สับสเตรต 41

ตารางที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 0 เดือน 42

ตารางที่ 4.9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 3 เดือน 43

ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 6 เดือน 44

ตารางที่ 4.11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 9 เดือน 46

ตารางที่ 4.12 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 12 เดือน 48

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบลักษณะ clear zone ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส 57

ตารางที่ 4.14 ลักษณะ clear zone บนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 5, 6, 7 และ 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 59

ตารางที่ 4.15 ลักษณะของ filter paper ที่บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 28 วัน.................................. 62

ตารางที่ 4.16 ภาพ filter paper ที่บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 28 วัน ภายใต้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 200 เท่า.. 63

ตารางที่ 4.17 ภาพใบมันสำปะหลังด้านท้องใบ (abaxial surface) ที่บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่เชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU/ml โดยหยด 100 ไมโครลิตร ภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 2,000 เท่า 64

ตารางที่ 4.18 ภาพใบมันสำปะหลังด้านท้องใบ (abaxial surface) ที่ผสมลงในดินจากแปลงมันสำปะหลัง บ่ม 28 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ซ้ำการทดลอง ใส่เชื้อเริ่มต้น $8.1*10^6$ CFU/ml ภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 2,000 เท่า.. 68

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียจากงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่น 78

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมันสำปะหลังทั้ง 5 สายพันธุ์ 5

รูปที่ 2.2 หน่วยของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส 7

รูปที่ 2.3 โครงสร้างจำลองของเซลลูโลส 8

รูปที่ 2.4 กลไลการย่อยเซลลูโลสโดยเซลลูเลส 10

รูปที่ 4.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ KU 50 3 เดือน 50

รูปที่ 4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ KU 50 และ PR1 6 เดือน 51

รูปที่ 4.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ PR2, HT และ HB60 6 เดือน 52

รูปที่ 4.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ PR1 และ PR2 9 เดือน 53

รูปที่ 4.5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ PR2, HT และ HB60 12 เดือน 54

รูปที่ 4.6 ทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กันของแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* (Amy), *Bacillus pumilus* (Pu) และ *Paenibacillus kribbensis* (Pae) 55

รูปที่ 4.7 ผลวิเคราะห์ค่า pH จากดินตัวอย่าง Amy; *B. amyloliquefaciens*, Pu; *B. pumilus*, Pae; *Paenibacillus kribbensis*, A+Pu; *B. amyloliquefaciens* + *B. pumilus*, A+Pae; *B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis*, Pu+Pae; *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* และ All; *B. amyloliquefaciens* + *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* 69

รูปที่ 4.8 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินจากดินตัวอย่าง 70

รูปที่ 4.9 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณฟอสฟอรัสในดินจากดินตัวอย่าง 71

รูปที่ 4.10 ผลวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมในดินจากดินตัวอย่าง 72

รูปที่ 4.11 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณแคลเซียมในดินจากดินตัวอย่าง 73

รูปที่ 4.12 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณแมกนีเซียมในดินจากดินตัวอย่าง 74

รูปที่ 4.13 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณไนโตรเจนในดินจากดินตัวอย่าง 75

รูปที่ 4.14 ผลวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมในดินจากดินตัวอย่าง 76

บทที่ 1
บทนำ

ประเทศไทยมีประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม โดยมีพืชเพาะปลูกหลัก ได้แก่ ข้าว อ้อย มันสำปะหลัง และข้าวโพด มากกว่า 90 ล้านไร่ (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) ซึ่งมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจหลักชนิดหนึ่งในการเพาะปลูก (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2015) มันสำปะหลังเป็นพืชทนแล้ง เหมาะสมในดินร่วนปนทราย แต่สามารถปลูกได้ในดินหลายชนิด ทำให้มีการปลูกอย่างแพร่หลาย โดยปลูกมากเป็นอันดับ 3 ของประเทศ (Piyachomkwan and Tanticharoen, 2011) เมื่อเก็บเกี่ยวหัวมันสำปะหลังแล้วจะมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำพวกลำต้นและใบตกค้างอยู่บนแปลงเป็นจำนวนมาก เกษตรกรจำเป็นต้องไถกลบลงหน้าดินเพื่อให้เศษวัสดุทางการเกษตรมีการผสมกับดินเพื่อให้เกิดการย่อยสลายไปตามธรรมชาติ และสามารถใช้เตรียมดินสำหรับการลงแปลงในรอบต่อไปได้

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์พบได้ทั่วไปในผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงทุกชนิด (Juturu and Wu, 2014) ในแต่ละปีจะมีเซลลูโลสสะสมในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นถึงสี่พันล้านตัน (Sarkar et al., 2012) การย่อยสลายเซลลูโลสในธรรมชาติ รวมถึงวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จำเป็นต้องอาศัยเซลลูเลสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นเซลลูเลสที่ผลิตและปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ในอดีตมีการศึกษาเซลลูเลสเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะเซลลูเลสที่ราเป็นผู้ผลิต เนื่องจากมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงและมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ดี ราเจริญเติบโตช้า และเอนไซม์ที่ราผลิตนั้นส่วนใหญ่เกิดกิจกรรมได้ดีที่สภาวะเป็นกรด (มูรนีย์, 2557) ปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเซลลูเลสและมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงและดีเช่นกัน (Nagendran et al., 2009) นอกจากนี้ แบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่ารา ส่งผลให้อัตราการผลิตเอนไซม์นั้นสูงตามไปด้วย (Gaur and Tiwari, 2015) เช่น *Bacillus brevis* (Singh and Kumar, 1998), *B. pumilus* (Kotchoni et al., 2003), *B. amyloliquefaciens* DL-3 (Lee et al., 2008) และ *B. subtilis* YJ1 (Yin et al., 2010) นอกจากนี้เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียบางสายพันธุ์มีสมบัติทนอุณหภูมิสูง, ทนต่อความเค็ม และ ทนต่อความเป็นกรด-เป็นด่างสูง ทำให้เซลลูเลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียถูกนำไปประโยชน์ได้ด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง (Sadhu and Maiti, 2013).

แบคทีเรียที่สร้างเซลลูเลส สามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย และเนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตภูมิภาคร้อนชื้น มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทำให้มีโอกาสในการคัดแยกจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้มากยิ่งขึ้น

1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสจากดินที่มีการไถกลบหน้าดินเป็นประจำหลังการเก็บเกี่ยว และใช้พื้นที่เดิมในการเพาะปลูกมันสำปะหลังรุ่นใหม่ต่อไป

2) คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูเลสในปริมาณที่สูง และนำมาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลส

3) ศึกษาสมบัติของจุลินทรีย์ดังกล่าวโดยนำเศษใบมันสำปะหลังมาย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสในปริมาณที่สูง

2) สมบัติของแบคทีเรียในการย่อยเศษใบมันสำปะหลังเพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ใส่ลงในดินระหว่างกระบวนการไถกลบหน้าดิน

บทที่ 2
ปริทรรศน์วรรณกรรม

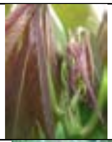
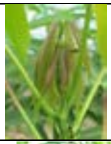
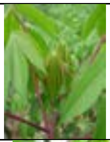
2.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง *Manihot esculenta* (L.) *Crantz* ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อสามัญ Cassava, Tapioca, Manioc, Mandioca หรือ Yuca และมีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ โดยมันสำปะหลังนั้นมีการปลูกอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนประมาณ 105 ประเทศทั่วโลก มันสำปะหลังถูกจัดให้เป็นพืชเศรษฐกิจในศตวรรษที่ 21 เนื่องจากเป็นพืชที่เป็นแหล่งอาหารให้ประชากรเกือบหนึ่งพันล้านคน (Latif and Müller, 2014) ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังเป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากประเทศไนจีเรีย แต่เป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังอันดับ 1 ของโลก เนื่องจากในทวีปแอฟริกาใช้มันสำปะหลังเป็นอาหารหลักเพื่อบริโภคภายในประเทศประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด โดยประเทศไทยมีส่วนแบ่งทางการตลาดสำหรับการส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูป ได้แก่ เส้นมันสำปะหลัง, แป้งมันสำปะหลัง และมันสำปะหลังอัดเม็ด ไปยังตลาดโลกประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังของโลก โดยมีจีนเป็นคู่ค้ารายใหญ่ (Hallam et al., 2013, Savelli et al., 2019)

มันสำปะหลังสามารถปลูกได้ในดินเกือบทุกชนิดยกเว้นดินเกลือ มีความทนทานตอสภาวะอากาศที่แหงแลงไดดี การปลูกและขยายพันธุทำไดงายและ มีตนทุนการผลิตไมสูง (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งชาติ, 2000) แหล่งปลูกมันสำปะหลังของประเทศไทย อันดับหนึ่ง คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมา คือ ภาคกลาง และ ภาคเหนือ ในประเทศไทยมันสำปะหลังมีหลากหลายสายพันธุ์ที่นิยมปลูก อาทิเช่น **เกษตรศาสตร์ 50** เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างระยอง 1 กับระยอง 90 สามารถปลูกได้ทั่วประเทศ หัวงอกดี ผลผลิตสูง ปริมาณแป้งสูง หัวเป็นกลุ่มขุดเก็บเกี่ยวสะดวก ในช่วงปี 2545-2546 เป็นพันธุ์ที่นิยมมากที่สุดในประเทศ (วิจารณ์ และคณะ, 2545), **ห้วยบง 60** เป็นพันธุ์ผสมระหว่างเกษตรศาสตร์ 50 และระยอง 5 มีผลผลิตหัวสดเฉลี่ยที่ได้สูงกว่าพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และมีปริมาณแป้งในหัวสูงกว่าพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 อยู่เล็กน้อย (สถาบันพัฒนามันสำปะหลัง, 2558), **พันธุ์ห้านาที** เป็นพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกในไทยมานาน ผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำ เป็นอีกพันธุ์หนึ่งที่สามารถรับประทานได้ คนทั่วไปจะเรียกกันว่า มันห้านาที คือ ทำให้มันสุกด้วยความร้อนเพียงห้านาทีก็สุกแล้วนำมารับประทานได้ทันที (Soclaimon, 2010; ไพบูลย์, 2554), **พิรุณ 1** เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ห้วยบง 60 และ พันธุ์ห้านาที ให้ผลผลิตหัวสดสูง ตัดหัวง่าย ใช้ปุ๋ยน้อยกว่า

พันธุ์รับรองทั่วไป, **พิรุณ 2** เกิดจากผสมพันธุ์ห้วยบง 60 กับพันธุ์ห้านาที เช่นกัน มันสำปะหลังพันธุ์นี้เป็นได้ทั้งพันธุ์รับประทานและพันธุ์อุตสาหกรรม (สถาบันการจัดการเทคโนโลยีและนวัตกรรมเกษตร) เป็นต้น (รูปที่ 2.1) นอกจากนี้สามารถแบ่งมันสำปะหลังตามปริมาณกรดไซยานิค (HCN) ได้ 2 ชนิด ได้แก่ 1) Sweet cassava; พวกที่มี HCN ต่ำ ซึ่งสามารถรับประทานได้ ได้แก่ พันธุ์ห้านาที และพิรุณ 2 พวกนี้จะเริ่มมีหัวแก พร้อมที่จะเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 6 เดือน และไมสามารถทิ้งไว้เกิน 9-11 เดือน และ 2) Bitter cassava; พวกที่มี HCN สูง ได้แก่ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50, ห้วยบง 60 และ พิรุณ 1 พวกนี้มักมีหัวมันเป็นสีเหลือง จะแกเมื่อมีอายุตั้งแต 1 ปขึ้นไป และสามารถปลอยทิ้งไวถึง 3-4 ปได้ (ประวิตร, 2554)

มันสำปะหลังทั้งห้าสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่ผู้วิจัยได้นำมาทำการวิจัยโดยได้รับความอนุเคราะห์ดินบริเวณที่ปลูกมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดระยอง

	เกษตรศาสตร์ 50	พิรุณ 1	พิรุณ 2	ห้วยบง 60	ห้านาที
สียอดอ่อน	 สีม่วง	 สีม่วงอมเขียว	สีเขียว	สีม่วงอ่อน	 สีเขียว
สีก้านใบ	สีเขียวอมม่วง	สีเขียวปนแดง	สีแดง	สีเขียวอมม่วง	สีแดงเข้ม
สีลำต้น	สีเขียวเงิน	สีเขียวเงิน	สีน้ำตาลแดง	สีเขียวเงิน	สีน้ำตาลอมเขียว
ลักษณะแผ่นใบ	ใบหอก	ใบหอก	ใบหอก	ใบหอก	ใบหอก
ลักษณะหัว	หัวมีขนาดสม่ำเสมอ	กระบอก	กรวย	ยาวเรียว	เรียวยาว

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมันสำปะหลังทั้ง 5 สายพันธุ์ **ที่มา** : ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมวิชาการเกษตร

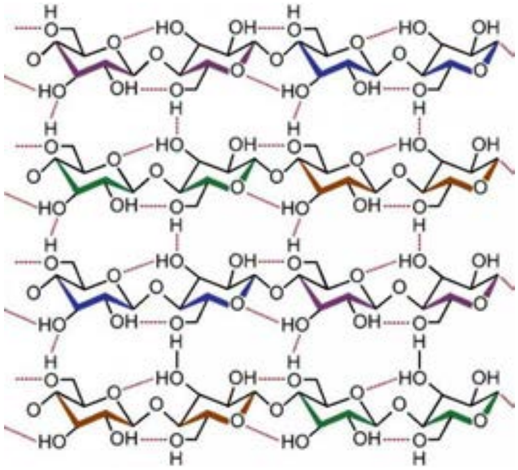
2.2 หลังการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลัง

ในการวิเคราะห์โครงสร้างของต้นมันสำปะหลังพบว่ามีเซลลูโลสประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 44 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 24 เปอร์เซ็นต์ (Pattiya, 2011) มันสำปะหลังโดยปกติจะมีการเก็บเกี่ยว 8-12 เดือนหลังการปลูก (กรมวิชาการเกษตร, 2537) สำหรับอายุการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังอาจแตกต่างไปจากนี้ได้ ขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ราคามันสำปะหลังในท้องตลาด, ความต้องการใช้เงินของเกษตรกร เป็นต้น เมื่อทำการเก็บเกี่ยวส่วนหัวไปแล้วจะทิ้งส่วนที่เหลือลงบนแปลง ได้แก่ ใบ, ลำต้น และ เหง้า ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรจำนวนมาก เกษตรกรยังคงไถกลบเข้าไปผสมในแปลงสำหรับเตรียมการปลูกในรอบต่อไป เพื่อเป็นการย่อยสลายวัสดุเหลือทางการเกษตรโดยธรรมชาติโดยปกติจะมีการพักแปลงก่อนลงปักท่อนพันธุ์ลงบนแปลงประมาณ 1 เดือน

อย่างไรก็ดีวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรดังกล่าวใช้เวลาที่ย่อยสลายนาน ปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคโนโลยีทางชีวภาพ โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ เพื่อช่วยในการกระตุ้นการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ในดินเพื่อทำหน้าที่ย่อยสลายได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณหรือจำนวนจุลินทรีย์ดินมีผลช่วยลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้น้อยลง (กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

2.3 เซลลูโลส

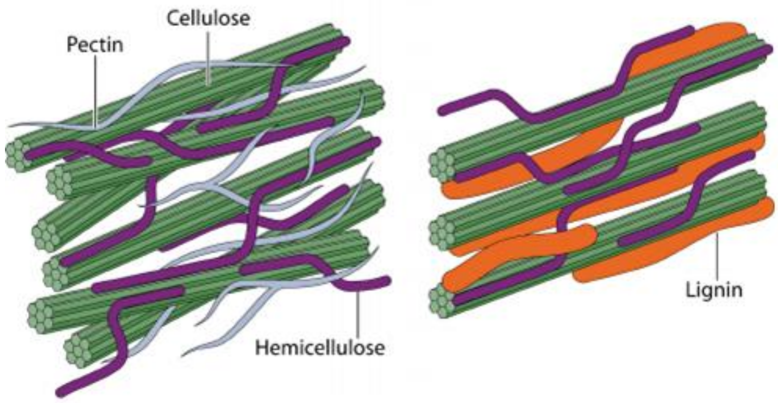
เซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) ประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ชนิดโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide) มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสที่มาต่อกันเป็นวงและเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (Glycosidic bond) ที่ตำแหน่งบีต้า 1,4 (β-1,4- glycosidic bond) (Wang et al., 2016) เซลลูโลสจะมีหน่วยซ้ำที่เรียกว่าเซลโลไบโอส (Cellobiose) แต่ทุก ๆ หน่วยที่สองของกลูโคสที่ต่อกันในโมเลกุลของเซลลูโลสจะสามารถหมุนได้ 180 องศา เกิดเป็นพันธะไฮโดรเจน (รูปที่ 2.2) ซึ่งพันธะไฮโดรเจนมีส่วนทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสซับซ้อน มั่นคง และยากต่อการย่อยสลายมากยิ่งขึ้น (เกรียงศักดิ์, 2543; โครงการเพิ่มศักยภาพฐานข้อมูลอุตสาหกรรมชีวภาพ, 2017) เซลลูโลสจะอยู่รวมกับเฮมิเซลลูโลสและเพกทินเพื่อเสริมสร้างโครงสร้างของกิ่งก้านและลำต้นพืชให้แข็งแรง



รูปที่ 2.2 หน่วยของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส

ที่มา (Summer, 2018)

เซลลูโลสในธรรมชาติจะอยู่ในรูปลิกโนเซลลูโลส โดยจะเชื่อมอยู่กับโพลีแซกคาไรด์อื่น ๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส เพกติน ลิกนิน (Lützen et al., 1983) (รูปที่ 2.3) ในธรรมชาติการย่อยสลายเซลลูโลสเกิดโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์จากจุลินทรีย์หลายชนิดรวมกันมาทำงานร่วมกันในการย่อยสลายเซลลูโลส (Zhou and Ingram, 2000) โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสายเซลลูโลสได้นั้น มีทั้งแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน โดยทั่วไปพบว่าเซลลูโลสนั้นจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน แต่มีที่สามารถย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนได้ เช่น *Acetivibrio, Clostridium* และ *Ruminococcus* เป็นต้น (Balows et al., 2013) แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนจะใช้เซลลูโลโซม ซึ่งเซลลูโลโซมเป็นกลุ่มของเอนไซม์หลายชนิดที่อยู่ร่วมกันมีความสามารถย่อยในการย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลส และผลิตโดยแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน ถูกออกแบบมาเพื่อย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ของผนังเซลล์พืช (Bayer et al., 2008) การใช้เซลลูโลโซมจะช่วยให้เอนไซม์ของเซลลูเลสทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Lynd et al., 2002)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างจำลองของเซลลูโลส
ที่มา (Rytioja et al., 2014)

2.4 เซลลูเลส

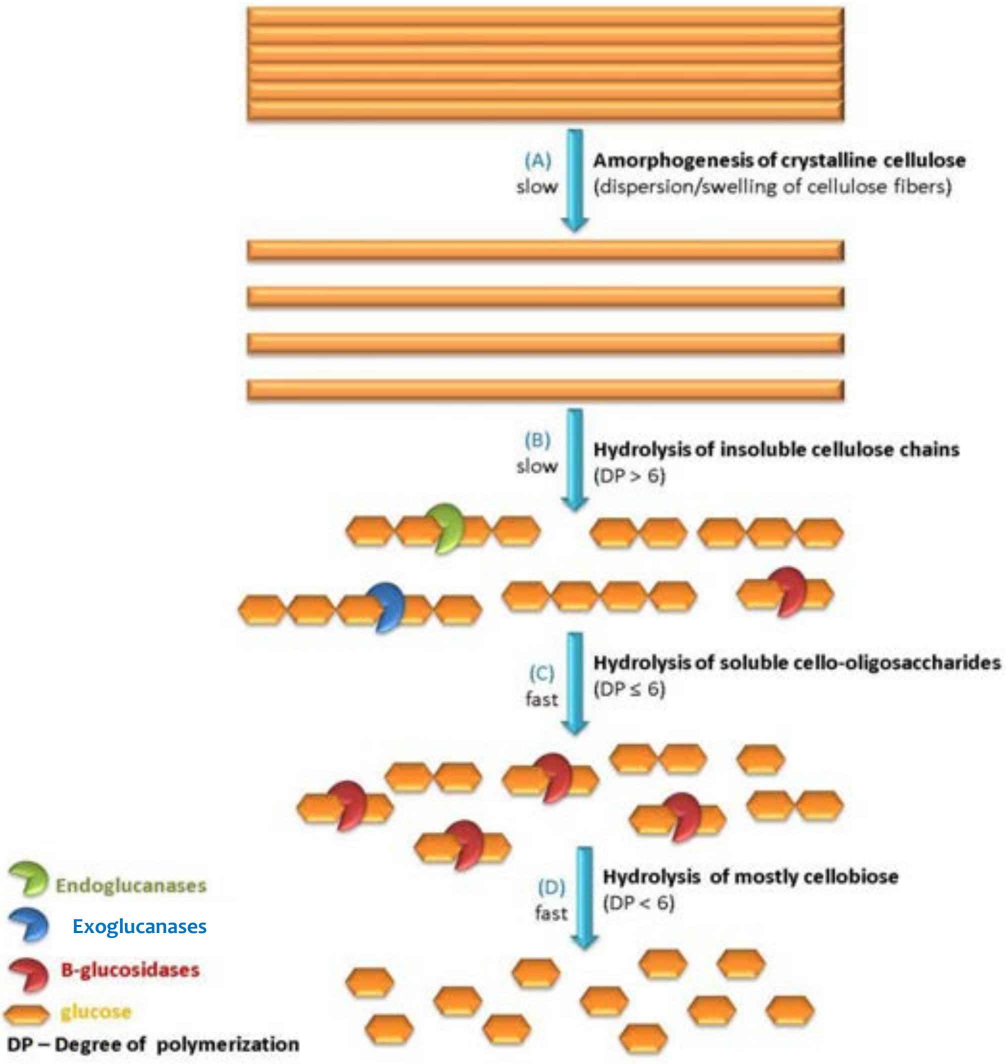
เอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มหลักตามระบบการจัดจำแนกเอนไซม์ (enzyme classification, E.C.) ได้แก่

1) เอกโซกลูคาเนส (exo-1,4-β-D-glucanase (CBH), EC 3.2 1.91) จะตัดสายของเซลลูโลสจากทางด้านปลาย ย่อยจากปลายนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) (Singh and Hayashi, 1995) โดยเอกโซกลูคาเนสจะย่อยเซลลูโลสโครงสร้างที่เป็นระเบียบ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอสและกลูโคส สามารถวัดแอคติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ Crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง, Avicel เป็นต้น (Wike et al., 1980) (รูปที่ 2.4B)

2) เอนโดกลูคาเนส (endo-1,4-β-D-glucanase (EG), EC 3.2.1.4) หรือ CMCase เป็นการตัดพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่มภายในเส้นของเซลลูโลส ทำให้เส้นของเซลลูโลสสั้นลง ได้กลูโคสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งโดยปกติเอกโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนสจะทำหน้าที่ร่วมกัน เอนโดกลูคาเนสจะเข้าไปย่อยส่วนโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบ ทำให้ลดความยาวของโพลีเมอร์ได้อย่างรวดเร็วและเกิดปลายสายของเซลลูโลสที่ยอมให้เอกโซกลูคาเนสเข้าทำงานได้ (Teeri, 1997) สามารถวัดแอคติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ carboxymethylcellulose (CMC) เป็นต้น (Wike et al., 1980)

3) บีต้า-1,4-กลูโคซิเดส (β-1,4-D-glucosidase (BG), EC 3.2.1.21) ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส โดยทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้เป็นน้ำตาลกลูโคส (Zhang et al., 2006) สามารถวัดแอคติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ Cellobiose, p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (p-NPG) เป็นต้น (Wike et al., 1980)

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 กลุ่มนี้ สามารถวัดโดยวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี DNS-method จากนั้นนำปริมาณน้ำตาลที่ได้มาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป กลไกการย่อยสลายของเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยเอนไซม์ทั้งสามชนิดแสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 กลไกการย่อยเซลลูโลสโดยเซลลูเลส A) แสดงสัณฐานของ crystalline cellulose เมื่อเกิดการกระจายตัวของเส้นใยเซลลูโลส B) แสดงการทำงานร่วมกันของเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนสในการย่อยน้ำตาลในสายโพลิเมอร์ที่มีมากกว่า 6 โมเลกุล C) แสดงการย่อยสลายอย่างรวดเร็วของเซลโลไบโอส D) บีต้า-กลูโคซิเดส เข้ามาช่วยย่อยสลายเซลโลไบโอสทำให้ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายอย่างสมบูรณ์

ที่มา (Arantes and Saddler, 2010)

2.5 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลสของจุลินทรีย์

ในการผลิตเซลลูเลสจากจุลินทรีย์ ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตของเอนไซม์ นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีก ได้แก่

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

ปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนและแหล่งคาร์บอน ส่งผลต่อการผลิตเซลลูเลสและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

Lee et al. (2008) ศึกษา *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 โดยการเปรียบเทียบการใช้แหล่งของคาร์บอน 2 ชนิด ได้แก่ แกลบ และรำข้าว พบว่ากิจกรรมของเซลลูเลสของแบคทีเรียดังกล่าวในปริมาณสูง คือ 153 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในแกลบ ในขณะที่วัดกิจกรรมของเซลลูเลสจากรำข้าวได้ 112 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Aspergillus niger* ที่ถูกศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสในสับสเตรตที่ต่างกัน 2 ชนิด คือ ฟางข้าวสาลีและฟางข้าวที่มีการแปรผันความเข้มข้นที่ 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ฟางข้าวสาลีมีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดที่ 0.1813 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Irfan et al., 2011)

Assareh et al. (2012) ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสจาก *Geobacillus* sp. T1 ในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ CMC, เซลโลไบโอส, เซลลูโลส, กระดาษ Whatman, ฟางข้าวสาลี และฟางข้าวบาร์เล่ต์ พบว่าผลิตเซลลูเลสได้มากจากที่สุดจากฟางข้าวบาร์เล่ต์ คือ 143.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

ปริมาณความเข้มข้นและแหล่งที่มาของไนโตรเจนเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญ ที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

Rai et al. (2012) ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสจาก *Candida* sp. ในอาหารเหลว โดยเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ โซเดียมไนเตรต, แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรต, โพแทสเซียมไนเตรต และ ยูเรีย พบว่าเมื่อใช้ แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถให้ค่ากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสสูงสุดที่ 867.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Sethi et al. (2013) ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสจาก *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtills*, *Escherichia coli*, และ *Serratia marcescens*

เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนในแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์นี้ได้แก่ yeast extract, แอมโมเนียมซัลเฟต, เปปโตนและยูเรีย พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดในแหล่งไนโตรเจนที่นำมาเปรียบเทียบทั้งหมด และ *Pseudomonas fluorescens* ให้ค่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงที่สุดอยู่ที่ 0.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Thaz et al. (2015) ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสจาก *Bacillus aquimaris* VITP4 โดยมีการแปรผันชนิดของไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมคลอไรด์, โซเดียมไนเตรต, โพแทสเซียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ให้ค่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดอยู่ที่ 1.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.5.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่มีการดำรงชีพแบบ mesophiles จะมี การเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่จุลินทรีย์จำพวก thermophiles อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ ตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า
(Mandels, 1985, Tansey, 1971)

Shaikh et al. (2013) ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสจาก *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. โดยทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการ ผลิตเซลลูเลส มีการแปรผันอุณหภูมิที่ 25, 35, 40, 45, 50, 55 และ 65 องศาเซลเซียส พบว่า *Pseudomonas* sp. มีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดที่ 2.56 ยูนิตต่อ มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ *Bacillus* sp. มีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุด ที่ 3.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Nandimath et al. (2016) ศึกษากิจกรรมการผลิตเซลลูเลสจาก *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. โดยทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้ในการผลิตเซลลูเลสที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. สามารถผลิตเซลลูเลสสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.5.4 pH

pH มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมี pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกันไป

El-Naggar and Abdelwahed (2012) ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสจาก *Streptomyces* sp. strain NEAE-D ที่มีการแปรผันของ pH ที่ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ CMC เป็นสับสเตรต พบว่า มีค่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงที่สุดที่ pH 6 และ pH 7 เช่นเดียวกับค่ากิจกรรมเซลลูเลสของ *S. omiyaensis* ที่ใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ CMC เป็นสับสเตรต มีค่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดที่ pH 6.5 เช่นเดียวกัน (Alam et al., 2004) ในขณะที่ *S. albogriseous* ที่ใช้ 1.5 เปอร์เซ็นต์ CMC เป็นสับสเตรต แสดงกิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสสูงสุดที่ pH 6.5 ถึง 7.0 (Van Zyl, 1985)

Ye et al. (2017) ศึกษา *Bacillus amyloliquefaciens* S1 ที่แยกจากลำไส้ใหญ่ของห่าน ในการทำกิจกรรมของเซลลูเลสที่ pH 4, 5, 6, 7 และ 8 พบว่ามี กิจกรรมของเซลลูเลสสูงที่สุดที่ pH 7 และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 12.4 เปอร์เซ็นต์ และ 23 เปอร์เซ็นต์ที่ pH 6 และ pH 8 ตามลำดับ ในขณะที่ *Bacteroides* sp. ที่แยกจากการหมักของกากสับปะรด เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเซลลูเลสที่ pH 4, 5, 6 และ 7 พบว่าที่ pH 6 มีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงที่สุด (Ponpium et al., 2000)

2.5.5 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีระยะเวลาการเลี้ยงเพื่อผลิตเซลลูเลสให้ได้มากที่สุดในเวลาที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป

Rastogi et al. (2009) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Geobacillus* sp. เป็นเวลา 0-12 วัน พบว่าในวันที่ 8 สามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงที่สุด อยู่ที่ 0.043 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ Goyal et al. (2014) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. 313SI เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง พบว่าที่ 48 ชั่วโมง สามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงสุดที่ 2.97 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลลูเลสให้ได้เอนไซม์สูงที่สุดต่างกัน

Reddy et al. (2016) ทดสอบระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* ที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมง ที่ 0.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Islam and Roy (2018) ศึกษาการผลิตเอนโดกลูคาเนสจาก *Paenibacillus* sp และ *Bacillus* sp. ที่มีการเปรียบระยะเวลาในการเลี้ยง 24-96 ชั่วโมง พบว่า *Paenibacillus* sp และ *Bacillus* sp. สามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดอยู่ที่ 0.97 ยูนิตต่อมิลลิตร และ 0.78 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจาก (Kumar et al., 2012) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus cereus* MRK1 เป็นระยะเวลา 6-72 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเซลลูเลสได้มากที่สุดที่ 58 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.6 เอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรีย

แหล่งผลิตเซลลูเลสที่สำคัญที่สุด คือ จุลินทรีย์ เซลลูเลสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตและปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายองค์ประกอบของพืชให้กลายเป็นอินทรียวัตถุที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ จุลินทรีย์จึงต้องขับออกนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำได้ แล้วจึงดูดซึมเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานต่อไป

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ที่มา
Acetobacter xylinum	Li et al. (2015)
Acidothermus cellulolyticus	Chung et al. (2015)
Bacillus amyloliquefaciens	Irfan et al. (2017)
Bacillus circulans	Baharuddin et al. (2016)
Bacillus pumilus	Shankar and Isaiarasu (2011)
Bacillus subtilis	Deka et al. (2013)
Butyrivibrio fibrisolvens	Emerson and Weimer (2017)
Caldibacillus cellovorans	Grunwald (2016)
Caldicellulosiruptor bescii	Su et al. (2012)
Cellulomonas biazotea	Saratale et al. (2010)
Cellulomonas fimi	Saxena et al. (2017)
Cellulomonas flavigena	Sánchez-Herrera et al. (2007)
Cellulomonas uda	Poulsen et al. (2016)
Cellvibrio japonicus	Gardner (2016)
Clostridium absonum	Rani and Nand (2000)
Clostridium cellulolyticum	Higashide et al. (2011)

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ที่มา
Clostridium papyrosolvens	Rani et al. (2004)
Clostridium thermocellum	Lu et al. (2006)
Eubacterium cellulosolvens	Park et al. (2018)
Fervidobacterium islandicum	Jeong et al. (2017)
Fibrobacter succinogenes	Shinkai et al. (2007)
Halocella cellulolytica	Heng et al. (2019)
Pseudomonas fluorescens	Bakare et al. (2005)
Rhodothermus marinus	Crennell et al. (2002)
Ruminococcus albus	Devillard et al. (2004)
Ruminococcus champanellensis	Chassard et al. (2012)
Spirochaeta thermophile	Cobucci-Ponzano et al. (2013)
Thermotoga maritima	Cheng et al. (2012)

เนื่องจากแบคทีเรียมีอัตราการเจริญโตที่เร็วกว่ารา และที่สำคัญแบคทีเรียสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่หลากหลายในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดด่างสูง, ความร้อนสูง และความความทนเค็มสูง (Maki et al., 2009) อาทิเช่น

Ibrahim and El-diwany (2007) เก็บตัวอย่างน้ำและดินจากน้ำพุร้อนในประเทศอียิปต์ ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนส, เอกโซกลูคาเนส และ บีต้า-กลูโคซิเดส จาก *Anoxybacillus flavithermus* EHP1 โดยมีการเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 30-85 องศาเซลเซียส และ pH 5-11 พบว่า *Anoxybacillus flavithermus* EHP1 มีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดในเอนโดกลูคาเนส คือ 65.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

Ramin et al. (2009) ได้แยกลำไส้และส่วนท้องของปลวก นำแบคทีเรียที่ได้มาทดสอบการย่อยเซลลูโลสในอาหารแข็งที่ใส่สับสเตรต CMC และเซลโลไบโอส จากนั้นศึกษาลักษณะและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Chryseobacterium kwangyangense* และ *Acinetobacter*.

Aygan et al. (2011) ศึกษากิจกรรมของเซลลูเลสของ *Bacillus licheniformis* C108 จากการหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้จากดินบริเวณทะเลสาบ ประเทศตุรกี แรกเริ่มคัดแยกเชื้อบนอาหารแข็ง CMC ได้ 33 ไอโซเลทหลังจากราดคองโกเรดเพื่อดูส่วนใสที่เกิดขึ้น และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย 16S rDNA จากนั้นทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีช่วงของอุณหภูมิ, pH และค่าความเค็มที่แตกต่างกัน ช่วงของอุณหภูมิตั้งแต่ 4-100 องศาเซลเซียส, pH ตั้งแต่ 6-12.5 และค่าความเค็ม 3-12 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ พบว่า *Bacillus licheniformis* C108 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดอยู่ที่ pH 7, 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.

Soares et al. (2012) ได้ทำการเก็บดินตัวอย่างจาก แอนตาร์กติกและเมือง Caatinga ประเทศบราซิล ขณะเก็บตัวอย่างมีอุณหภูมิ 3 และ 67 องศาเซลเซียสตามลำดับ นำมาทดสอบการย่อยเซลลูโลสด้วยเอกโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนสในสับสเตรต CMC และ Avicel บ่มแบคทีเรียที่ 4 องศาเซลเซียสและ 60 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลทจากแอนตาร์กติกสามารถย่อย CMC ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่แสดงผลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในขณะที่ไอโซเลทจากบราซิลสังเกตเห็นกิจกรรมการย่อยของ CMC เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดทั้งที่ 4 และ 60 องศาเซลเซียส สิ่งนี้บ่งชี้ว่าแบคทีเรียที่พบในดินจากบราซิลสามารถอยู่รอดได้ในอุณหภูมิที่สูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ในขณะที่บริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำอย่างต่อเนื่อง อาทิเช่น ดินจากพื้นที่ของทวีปแอนตาร์กติกา ที่อยู่ใต้สภาวะความกดดันทำให้สูญเสียความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงไป แบคทีเรียจากแอนตาร์กติกส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* ในขณะที่แบคทีเรียที่แยกได้จาก Caatinga มีหลากหลายกลุ่ม ได้แก่ *Acinetobacter, Arthrobacter, Chryseobacterium, Flavobacterium, Pedobacter* และ *Pseudomonas.*

Soares Júnior et al. (2013) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสจากตะกอนดินป่าโกงกางที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ใส่ 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ และ 1 เปอร์เซ็นต์เซลลูโลส พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อที่ย่อยด้วยเอนโดกลูคาเนส 32 ไอโซเลท และเอกโซกลูคาเนส 18 ไอโซเลท จัดจำแนกกลุ่มแล้วพบว่าเชื้อแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Microbacterium*, *Nitratireductor, Novosphingobium*, *Sphingomonas* และ *Halomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนเค็ม

Chantarasiri (2014) ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสโดยเก็บตัวอย่างอุจจาระของสัตว์เคี้ยวเอื้องจากหลายสถานที่ พบ *Bacillus subtilis* AS3, *B. licheniformis* JK7, *B.*

amyloliquefacien SS35 และ *Bacillus siamensis* พบว่า *Bacillus siamensis* มีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงที่สุดที่ 0.230±0.004 ยูนิตต่อมิลลิตร

Parveen et al. (2016) เก็บตัวอย่างน้ำจากน้ำพุร้อน ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนส พบ *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis, Stenotrophomonas maltophilia, Bacillus pumilus* และ *Bacillus* sp ศึกษาโดยมีการแปรผันอุณหภูมิการบ่มในอาหารแข็งที่ 40, 50, 60 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส และมีการแปรผันของ pH ในการทำกิจกรรมของเซลลูเลสในช่วง pH 2- 10 พบว่า *Stenotrophomonas maltophilia* ให้กิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดที่ 0.43 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ pH 7 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Rachamontree (2017) ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนส โดยเก็บตัวอย่างดินเค็ม เพื่อค้นหาแบคทีเรียทนร้อนและทนความเค็ม โดยมีการแปรผันของค่าโซเดียมคลอไรด์ที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเหลว พบว่า *Streptomyces* sp. RMU41 มีค่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.826±0.001 ยูนิตต่อมิลลิตร ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและสารเคมี

ตารางที่ 3.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและสารเคมี	แหล่งที่มา
1 kb DNA ladder	Thermo scientific
3,5-Dinitrosalicylic acid	TCI
Acetic acid	RCI Labscan
Agarose	IUAI
Agarose low EEO	P. Intertrade Equipments
Ammonium nitrate	Merck
Ammonium oxalate	Fluka
Calcium chrloride	Fluka
Carboxyl methyl cellulose sodium salt	Fluka
Chloroform	RCI Labscan
Cellobiose	TCI
Cellulose, Microcrystralline	Alfa Aesar
Congo-red	Sigma - aldich
Crystal violet	Fluka
D-glucose	TCI
Di-Potassium hydrogen phosphate anhydrous	Merck
Disodium hydrogen orthophosphate	BDH

วัสดุและสารเคมี	แหล่งที่มา
Ethidium bromide 10 mg/ml	Biobasic
Ethyl alcohol	RCI Labscan
Ferric chloride	Merck
Glycerol	Biobasic
Hydrochloric acid 37 เปอร์เซ็นต์	VWR chemical
Iodine	Merck
Magnesium sulfate	Merck
Peptone	Conda
Potassium chloride	BDH
Potassium sodium tartrate tetrahydrate	VWR chemical
Safranin O	Carlo erra
Sodium acetate anhydrous	Fisher scientific
Sodium chloride	Merck
Sodium hydroxide	Merck
Sodium nitrate	Ajax Finechem
Yeast extract	Pacific science Co., Ltd
λ-*Hind* III	Thermo scientific

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ จ.ระยอง

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ จ.ระยอง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50, พันธุ์ห้วยบง60, พันธุ์พิรุณ 1, พันธุ์พิรุณ 2 และ พันธุ์ 5 นาที ทุก 3 เดือน เป็นเวลา 12 เดือน หลังจากที่เก็บตัวอย่างมาแล้วนำมาชั่งน้ำหนักตัวอย่างดิน 5 กรัม และละลายใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) peptone 45 มิลลิลิตร โดยวิธี 10 – fold serial dilutions นำตัวอย่างที่เจือจางเรียบร้อยแล้วตั้งแต่ dilution ที่ 10^{-1}-10^{-6} มาเกลี่ยลงบน Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ค) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2 คัดกรอง และแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูเลสจากดิน

นำเชื้อจากข้อ 3.2.1 ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมา streak ลงบนอาหาร NA นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร NA ย้ายลงบนอาหารแข็งคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) (ภาคผนวก ค) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบความสามารถในการผลิตเซลลูเลส โดยเท 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) คองโกเรด 8 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็งทิ้งไว้ 15 นาที ตามด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 8 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที (Teather and Wood, 1982) สังเกตโคโลนีที่เกิดบริเวณใส ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และ clear zone ที่เกิดขึ้น พิจารณาแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูง

โดยคำนวณจากค่า Hydrolysis Capacity (HC) คือ อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone กับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี โดยกำหนดให้ (Dar et al., 2015)

HC ต่ำ มีค่าเท่ากับ 0.5-1.9

HC ปานกลาง มีค่าเท่ากับ 2.0-3.9

HC สูง มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 4

พร้อมกับศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมแกรม (Gram staining) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

นอกจากใช้ CMC เป็นสับสเตรตแล้ว จะแทน CMC ด้วย Avicel และ Cellobiose (Kiio et al., 2016) เพื่อศึกษาเซลลูเลสชนิดอื่น โดย Avicel เป็นสับสเตรตที่จำเพาะต่อการผลิตเอกโซกลู

คาเนส และ Cellobiose เป็นสับสเตรตที่จำเพาะต่อการผลิตเบต้า – กลูโคซิเดส เช่นเดียวกับ CMC ที่เป็นสับสเตรตที่จำเพาะต่อเอนโดกลูคาเนส

3.3 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง

3.3.1 ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์

คัดเลือกแบคทีเรียที่เกิดบริเวณใสบนสับสเตรต 2 ใน 3 สับสเตรต หรือ 3 ใน 3 ของสับสเตรต Avicel , CMC และ Cellobiose โดยเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบริเวณใสได้ดีที่สุดบนสับสเตรตนั้น มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวของสับสเตรตนั้น 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (140 รอบ/ นาที) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญมา 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง ที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนที่เป็นส่วนใสด้านบน เก็บไว้เป็น crude enzyme ต่อไป นำ crude enzyme ที่เก็บไว้มา 250 ไมโครลิตร เติม 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สับสเตรตใน 0.1 M โซเดียมอะซีเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5 (ภาคผนวก ค) 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เติม 625 ไมโครลิตร กรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ค) เพื่อวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นนำไปต้ม 5 นาทีในน้ำเดือด และทำให้เย็นโดยการปักในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ดูดมา 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Yang et al., 2014) แล้วนำค่า OD ของตัวอย่างไปลบกับค่า OD ของ blank โดย blank คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า จากนั้นนำผลต่างที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานกลูโคส โดย 1 หน่วย กิจกรรมเอนไซม์มีค่าเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคสที่ปลดปล่อยออกมาในหนึ่งโมลต่อนาทีที่ 65 องศาเซลเซียส

Enzyme Unit Activity (Unit/ml) =

$$\frac{\text{ปริมาณของกลูโคส}}{\text{น้ำหนักมวลโมเลกุลของกลูโคส}} \times \frac{1}{\text{5 นาที}} \times \frac{1}{\text{ปริมาตรของเอนไซม์}}$$

เช่น N44 เมื่อลบค่า blank แล้วนำไปเข้าสมการ standard glucose ได้ค่า 0.0438 mg/ml นำมาเทียบบัญญัติไตรยางค์ โดย 100 ไมโครลิตร มีค่าน้ำตาลกลูโคส 0.438 mg/ml ใน 1125 ไมโครลิตร มีน้ำตาล 4.9275 mg/ml และนำไปแทนค่าสมการ จะได้เป็น $\frac{4.9275}{180*5*0.25}$ ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็น $2.19*10^{-2}$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร

นำไปพิจารณาร่วมกับแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูง อัตราส่วนมากกว่า 4 โดยคำนวณจากค่า Hydrolysis Capacity (HC) จากข้อ 3.2.2 รวมถึงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้โคโลนี

นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร NA ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีปริมาตรน้ำ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำสารละลายแบคทีเรียดังกล่าวทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยมีส่วนผสมดังนี้

น้ำ	15.3	ไมโครลิตร
10X *Taq* buffer	2	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	1	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.2	ไมโครลิตร
10 µM Forward primer (27F)	0.2	ไมโครลิตร
10 µM Reverse primer (1492R)	0.2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 Units/µl)	0.1	ไมโครลิตร
DNA Template (สารละลายแบคทีเรีย)	1	ไมโครลิตร

หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5 - 3)

27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
800R	TACCAGGGTATCTAATCC
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
โดย	M : A หรือ C
	Y : C หรือ T

จากนั้นจึงนำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะดังนี้

Initial Denaturation	94	องศาเซลเซียส	3 นาที	
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	30 วินาที	35 รอบ
Annealing	55	องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	2 นาที	
Final extension	72	องศาเซลเซียส	10 นาที	
Hold	25	องศาเซลเซียส	∞	

จากนั้นทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วย 1 ใน 10 ของปริมาตรของ 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเทต pH 5.2 และ 2 เท่าของปริมาตรของเอทานอลบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง และล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนไปตากให้แห้ง เติมน้ำ 35 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำตัวอย่างมาตรวจสอบด้วยวิธีการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแนวนอน หาปริมาณความเข้มข้นและส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ 1st Base, ประเทศมาเลเซีย และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank

3.4 หาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญจากไร่มันสำปะหลังในการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

3.4.1 แปรผันอุณหภูมิและ pH ของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสได้

หาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณสูงจากดินบริเวณที่ปลูกมันสำปะหลังที่คัดเลือกมา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* ที่โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นอันดับแรก จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสในปริมาณสูงในอุณหภูมิที่เหมาะสม มาทดสอบในอาหารแข็ง Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC ที่ปรับ pH ในอาหารเป็น 5, 6, 7 และ 8 เป็นลำดับที่สอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดสอบในลำดับแรก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณส่วนใสที่เกิดขึ้น แล้วทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตามข้อ 3.2.2 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี Two-way ANOVA

3.5 ย่อย Filter paper และ ใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

3.5.1 ย่อยสลาย Filter paper โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ 140 รอบ/นาที ในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนของเชื้อที่ได้ละลายด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมคลอไรด์ เพื่อปรับจำนวนของเชื้อให้ได้เท่ากับ 10^6 CFU/ml จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว CFMM (ภาคผนวก ค) ที่มีเชื้อ $3*10^6$ CFU/3 ml และมี filter paper ขนาด 1.5 * 1.5 cm ที่ทำการชั่งน้ำหนักแล้วอยู่ในหลอดทดลอง โดยมีการแบ่งชุดการทดลองเป็น 8 การทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลอง	**อาหาร** CFMM	*Bacillus amyloliquefaciens* $3*10^6$ CFU	*Bacillus pumilus* $3*10^6$ CFU	*Paenibacillus kribbensis* $3*10^6$ CFU	filter paper **ขนาด** **1.5*1.5 cm** **2 ชิ้น**
ชุดควบคุม	✓				✓
1	✓	✓			✓
2	✓		✓		✓
3	✓			✓	✓
4	✓	✓	✓		✓
5	✓	✓		✓	✓
6	✓		✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓

บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (140 รอบ/ นาที) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน เพื่อทดสอบการย่อย filter paper โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว จากนั้นนำ filter paper ไปอบให้แห้ง ทำการชั่งน้ำหนัก และสำรวจการเปลี่ยนแปลงของ filter paper ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) จากนั้นนำอาหาร CFMM ของแต่ละชุดการทดลองมา spread ลงบนอาหารแข็ง NA เพื่อนับจำนวนเชื้อที่เกิดขึ้นหลังการทดลอง ศึกษาโดยทำการทดลอง 3 ครั้งและแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3.5.2 ย่อยสลายใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำใบมันสำปะหลังสดมาตัดให้มีขนาด 2.5*2.5 cm ล้างทำความสะอาดด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จากนั้นล้างด้วยน้ำเปล่าแล้วตามด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำเปล่าอีกหนึ่งรอบ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ 140 รอบ/นาที ในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไป

ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนของเชื้อที่ได้ละลายด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ เพื่อปรับจำนวนของเชื้อให้ได้เท่ากับ 10^7 CFU/ml หยดลงบนใบ 100 ไมโครลิตร (10^6 CFU) โดยมีการแบ่งชุดการทดลองเป็น 8 การทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลอง	**0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl**	***Bacillus amyloliquefaciens*** **10^6 CFU**	***Bacillus pumilus*** **10^6 CFU**	***Paenibacillus kribbensis*** **10^6 CFU**	**ใบมันสำปะหลัง ขนาด 2.5*2.5 cm 2 ชิ้น**
ชุดควบคุม*	✓				
1	✓	✓			✓
2	✓		✓		✓
3	✓			✓	✓
4	✓	✓	✓		✓
5	✓	✓		✓	✓
6	✓		✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓

* ใส่โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แทนปริมาตรเชื้อ *

บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน เพื่อทดสอบการย่อยในใบมันสำปะหลัง โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และนำใบมันสำปะหลังไปดูการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้อง SEM ทุก ๆ 7 วัน จนครบ 28 วัน จากนั้นนำใบมันสำปะหลังของแต่ละชุดการทดลองมา spread ลงบนอาหารแข็ง NA เพื่อนับจำนวนเชื้อที่เกิดขึ้นหลังการทดลอง ศึกษาโดยทำการทดลอง 3 ครั้งและแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ก)

3.5.3 ย่อยสลายใบมันสำปะหลังในดินโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำดินจากบริเวณที่ปลูกมันสำปะหลัง 2.5 กิโลกรัม มาอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำใบมันปะหลัง มาอบให้แห้งที่ 65 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน แบ่งดินใส่ภาชนะทดลองกล่องละ 100 กรัม จากนั้นเลี้ยงเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* ในอาหารเหลว NB บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนของเชื้อที่ได้ละลายด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ เพื่อปรับจำนวนของเชื้อให้ได้เท่ากับ $8.1*10^7$ CFU/ml แล้วใส่ลงไปในดินทั้งหมด 8.1 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยให้ดินมีความชื้นที่ 30 เปอร์เซ็นต์ (Devêvre and Horwáth, 2000) ด้วยการนำดิน 100 กรัมที่อบแห้งแล้วใส่ลงใน filter paper ที่พับเป็นรูปกรวย ค่อย ๆ หยดน้ำลงไป จนมีน้ำหยดลงมา ดูปริมาตรที่ใส่ลงไป จนทำให้ดินอิ่มตัว แล้วคำนวณกลับจนได้ความชื้นที่ 30 เปอร์เซ็นต์ เช่นปริมาณน้ำ 24.3 มิลลิลิตร ทำให้ดิน 100 กรัม เกิดความอิ่มตัวที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นต้องการความชื้นที่ 30 เปอร์เซ็นต์ จึงต้องใส่ปริมาตรน้ำลงไป 8.1 มิลลิลิตร โดยการเทียบบัญญัติไตรยางค์ จากนั้นนำใบมันสำปะหลังที่อบแห้งแล้วนำมาตัดให้มีขนาดความยาว 10 เซนติเมตร ใส่ลงไปในดิน 1 ชิ้น โดยให้ดินปกคลุมใบมันสำปะหลังทั้งหมดโดยมีการแบ่งชุดการทดลองเป็น 8 การทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลอง	**ดิน 100 กรัม**	***Bacillus amyloliquefaciens*** **10^6 CFU**	***Bacillus pumilus*** **10^6 CFU**	***Paenibacillus kribbensis*** **10^6 CFU**	**ใบมันสำปะหลัง 1 ชิ้น**
ชุดควบคุม*	✓				✓
1	✓	✓			✓
2	✓		✓		✓
3	✓			✓	✓
4	✓	✓	✓		✓
5	✓	✓		✓	✓
6	✓		✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓

***** ใส่โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แทนปริมาตรเชื้อ *

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน โดยทุก ๆ 4 วันจะมีการเติมน้ำลงไปเพิ่ม 50 เปอร์เซ็นต์ จากครึ่งหนึ่งจากความชื้นเริ่มต้นที่ใส่ลงไป 8 มิลลิลิตร คือ 4 มิลลิตร จากการคำนวณปริมาตรของน้ำด้านบน เพื่อเป็นรักษาความชื้นในดิน จากนั้น

1) นำดินส่งวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน โดยพารามิเตอร์ที่วิเคราะห์ได้แก่ ค่า pH, ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน, ปริมาณโพแทสเซียม, ฟอสฟอรัส, แคลเซียมและแมกนีเซียม, ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมในดิน ทั้งหมด 8 พารามิเตอร์ ที่คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey

2) นำดินที่เหลือมานับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total count) จากดินที่ใส่ใบมันสำปะหลัง โดยนำไป spread ลงบนอาหารแข็ง NA เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และ

3) นำใบมันสำปะหลังไปศึกษาภายใต้กล้อง SEM โดยทำการทดลอง 3 ครั้งและแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูเลสจากดิน

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรากมันสำปะหลัง 5 สายพันธุ์จากดินที่เพาะปลูกในศูนย์วิจัยพืชไร่ ทุก ๆ 3 เดือน เป็นเวลา 12 เดือน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยคัดเลือกจากลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 499 ไอโซเลท แจกแจงได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปลูกมันสำปะหลัง 5 สายพันธุ์ ทุก 3 เดือน

	0 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
KASETSART 50	-	81	24	28	21
PIRUN 1	-	-	49	27	21
PIRUN 2	-	-	42	27	28
5 NATEE	8	-	40	19	9
HUAY-BONG 60	7	-	23	24	21

* KU 50, PR1, PR2 0 เดือน และ PR1, PR2, HT, HB 60 3 เดือน ไม่ได้ทำการคัดแยก เนื่องจากดินตัวอย่างเกิดการปนเปื้อนจากรา *

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาทดสอบความสามารถในการผลิตเซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC เพื่อเป็นการคัดเลือกแบคทีเรียเบื้องต้น โดยสังเกตโคโลนีที่เกิดบริเวณใสจากการทดสอบด้วย Congo red (วิธีการทดลองที่ 3.2.2) จากนั้นนำแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้มาศึกษารูปร่างและลักษณะของแบคทีเรีย โดยแยกผลตามระยะเวลาที่แยกแบคทีเรีย สามารถแบ่งขนาดของแบคทีเรียได้โดยแบคทีเรียที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-0.9 เซนติเมตร เป็นแบคทีเรียที่มีขนาดเล็ก และแบคทีเรียที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป เป็นแบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งได้ผลดังตาราง 4.2-4.6

ตารางที่ 4.2 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 0 เดือน)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
5 นาที (5 Natee)	N4	เหลืองอ่อน	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N8	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Umbonate	Mucoid
ห้วยบง 60 (HB 60)	N3	เหลืองอ่อน	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N5	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid

ตารางที่ 4.3 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 3 เดือน)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
เกษตรศาสตร์ 50 (KU50)	N1	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N2	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N4	ขาว	เล็ก	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N5	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N6	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N7	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N11	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N12	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N13	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N14	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N16	ขาว	ใหญ่	irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N17	ขาว	ใหญ่	irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N22	ขาว	ใหญ่	irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N23	ขาว	ใหญ่	irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N24	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N25	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid

ตารางที่ 4.3 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 3 เดือน) (ต่อ)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
เกษตรศาสตร์ 50 (KU50)	N26	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N27	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N34	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Flat	Smooth
	N35	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N36	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N38	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N40	เหลืองอ่อน	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N41	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N42	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N44	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N45	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P1	ขาว	เล็ก	Irregular	Undulate	Convex	Smooth
	P3	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P4	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P5	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P6	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P7	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P8	ขาว	เล็ก	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P13	เหลืองอ่อน	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P15	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P16	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P18	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P19	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P20	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P21	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Convex	Dull
	P22	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth

ตารางที่ 4.3 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 3 เดือน) (ต่อ)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
เกษตรศาสตร์ 50 (KU50) ต่อ	P23	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P24	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P25	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P26	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P27	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P28	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P30	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Umbonate	Mucoid
	P32	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Dull
	P33	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Umbonate	Mucoid
	P34	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Dull
	P36	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Umbonate	Smooth

ตารางที่ 4.4 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 6 เดือน)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
เกษตรศาสตร์ 50 (KU50)	N10	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N12	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P1	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P3	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Convex	Mucoid
	P5	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Mucoid
	P8	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
พิรุณ 1 (PR 1)	N1	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N3	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N5	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N6	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N7	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N11	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N12	ขาว	เล็ก	Circular	Undulate	Convex	Smooth
	N16	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N17	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N18	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N19	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N20	เหลืองอ่อน	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N21	เหลืองอ่อน	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N23	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P3	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P4	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P5	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P6	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Dull
	P7	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid

ตารางที่ 4.4 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 6 เดือน) (ต่อ)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สีโคโลนี (Colour)	ขนาดโคโลนี (Size)	รูปแบบโคโลนี (Form)	ขอบโคโลนี (Margin)	ลักษณะโคโลนี (Elevation)	ลักษณะเนื้อโคโลนี (Texture)
พิรุณ 1 (PR 1) **ต่อ**	P9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P11	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P12	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P13	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P14	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P15	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P16	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P17	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P21	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P24	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
พิรุณ 2 (PR 2)	N15	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Dull
	N17	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N20	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N23	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P1	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P6	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Convex	Dull
	P9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P13	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P14	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P16	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P17	ขาว	ใหญ่	irregular	Undulate	Convex	Dull
	P18	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P19	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P20	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P21	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P22	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid

ตารางที่ 4.4 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 6 เดือน) (ต่อ)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
ห้วยบง 60 (HB 60)	N5	เหลืองอ่อน	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N11	เหลืองอ่อน	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P5	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Umbonate	Mucoid
	P6	ขาว	ใหญ่	irregular	Undulate	Convex	Smooth
5 นาที (5 Natee)	N5	เหลืองอ่อน	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N7	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N10	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Dull
	N13	ขาว	เล็ก	Irregular	Undulate	Umbonate	Dull
	N36	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N39	ขาว	เล็ก	Irregular	Undulate	Convex	Dull
	P6	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P9	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Dull
	P10	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P11	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P13	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P14	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P16	ขาว	เล็ก	irregular	Undulate	Umbonate	Dull
	P17.1	ขาว	เล็ก	irregular	Undulate	Umbonate	Dull
	P17.2	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Dull

ตารางที่ 4.5 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 9 เดือน)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
เกษตรศาสตร์ 50 (KU50)	N1	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N2	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N3	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N6	เหลืองอ่อน	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N10	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Dull
	N15	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P2	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P3	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P5	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P11	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P12	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
พิรุณ 1 (PR 1)	N1	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N2	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N8	เหลืองอ่อน	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N11	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N14	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Convex	Dull
	P2	เหลืองอ่อน	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P3	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P6	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P7	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P11	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid

ตารางที่ 4.5 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 9 เดือน) (ต่อ)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
พิรุณ 1 (PR 1) ต่อ	P12	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
พิรุณ 2 (PR 2)	N10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Lobate	Umbonate	Smooth
	N11	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P3	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P4	เหลืองอ่อน	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P5	เหลืองอ่อน	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P11	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Dull
	P12	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P14	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
ห้วยบง 60 (HB 60)	N1	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N7	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P1	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P6	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P11	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P12	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
5 นาที (5 Natee)	N4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N5	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P1	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid

ตารางที่ 4.6 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 12 เดือน)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
เกษตรศาสตร์ 50 (KU50)	N5	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P1	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P5	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P6	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P7	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
พิรุณ 1 (PR 1)	N2	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N5	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N6	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N9	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P1	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P2	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P3	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P11	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
พิรุณ 2 (PR 2)	N5	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N6	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N7	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N12	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N13	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N14	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P2	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid

ตารางที่ 4.6 ไอโซเลทแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปลูกมันสำปะหลัง (ระยะเวลา 12 เดือน) (ต่อ)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สี โคโลนี (Colour)	ขนาด โคโลนี (Size)	รูปแบบ โคโลนี (Form)	ขอบ โคโลนี (Margin)	ลักษณะ โคโลนี (Elevation)	ลักษณะ เนื้อโคโลนี (Texture)
พิรุณ 2 (PR 2) ต่อ	P7	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P11	ขาว	ใหญ่	Circular	Entire	Convex	Smooth
	P12	ขาว	เล็ก	Circular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P13	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
ห้วยบง 60 (HB 60)	N4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N7	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	N9	ขาว	เล็ก	Circular	Entire	Convex	Smooth
	N11	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P1	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P5	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P6	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P8	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P10	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
5 นาที (5 Natee)	N2	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P1	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P3	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P4	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid
	P7	ขาว	ใหญ่	Irregular	Undulate	Umbonate	Mucoid

จากนั้นนำแบคทีเรียที่ที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC นำไปทดสอบในสับสเตรต Avicel และ เซลโลไบโอส ตามวิธีการทดลองที่ 3.2 โดยสรุปได้ผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 4.7 จำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 สับสเตรต

	0 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
KU 50	-	26	6	11	5
PR 1	-	-	15	7	8
PR 2	-	-	8	7	10
5 NATEE	1	-	7	2	3
HB 60	2	-	2	2	3

ภาพแบคทีเรียบนอาหารแข็ง CMC, เซลโลไบโอส และ Avicel เพิ่มเติมที่ภาคผนวก ก

จากตารางที่ 4.7 ได้นำไอโซเลทแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 สับสเตรต มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทล์ 16S rDNA พร้อมทั้งทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดนวิธี DNS Method

4.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA (16S rDNA sequencing)

นำโคโลนีแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกและมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 สับสเตรต จำนวน 125 ไอโซเลท มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส บริเวณ 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R จากนั้นทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์ ส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 4.8 – 4.12

ตารางที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 0 เดือน

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No.	Identities
5 นาที (5 Natee) 0 เดือน	N4	*Bacillus amyloliquefaciens*	JX315321.1	99%
ห้วยบง 60 (HB 60) 0 เดือน	N3	*Bacillus amyloliquefaciens*	KU317799.1	96%
	N8	*Bacillus amyloliquefaciens*	KC793259.1	96%

ตารางที่ 4.9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณราก มันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 3 เดือน

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No.	Identities
เกษตรศาสตร์50	N2	*Bacillus amyloliquefaciens*	KJ767360.1	98%
(KU50)	N5	*Bacillus amyloliquefaciens*	KY681451.1	98%
3 เดือน	N7	*Bacillus velezensis*	MH628438.1	100%
	N8	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH144253.1	98%
	N12	*Bacillus subtilis*	KX179630.1	89%
	N16	*Bacillus subtilis*	HQ738505.1	98%
	N17	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH144253.1	100%
	N22	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH144253.1	98%
	N23	*Bacillus amyloliquefaciens*	KY773617.1	99%
	N24	*Bacillus amyloliquefaciens*	KY378894.1	99%
	N34	*Bacillus amyloliquefaciens*	KY681451.1	99%
	N40	*Bacillus safensis*	MH820175.1	98%
	N41	*Bacillus amyloliquefaciens*	JN851189.1	98%
	N42	*Bacillus subtilis*	KC152654.1	100%
	N44	*Bacillus amyloliquefaciens*	JN661699.1	97%
	N45	*Bacillus amyloliquefaciens*	KF811045.1	97%
	P3	*Bacillus amyloliquefaciens*	JN382250.1	98%
	P5	*Bacillus pumilus*	MH260924.1	99%
	P10	*Bacillus amyloliquefaciens*	KY685066.1	95%
	P13	*Bacillus safensis*	KY020051.1	100%
	P15	*Bacillus amyloliquefaciens*	JN851189.1	99%
	P24	*Bacillus amyloliquefaciens*	KM015452.1	98%
	P30	*Bacillus amyloliquefaciens*	KC17346.1	98%
	P32	*Bacillus subtilis*	HQ825324.1	97%
	P33	*Bacillus subtilis*	KF815527.1	96%
	P34	*Bacillus velezensis*	MG733622.1	99%

ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 6 เดือน

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No.	Identities
เกษตรศาสตร์50 (KU50) 6 เดือน	N10	*Bacillus pumilus*	KU851152.1	98%
	N12	*Bacillus amyloliquefaciens*	KM015452.1	98%
	P1	*Bacillus amyloliquefaciens*	KM091696.1	99%
	P3	*Bacillus velezensis*	KX242452.1	98%
	P5	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH144247.1	98%
	P8	*Paenibacillus kribbensis*	AB489140.1	98%
พิรุณ 1 (PR 1) 6 เดือน	N1	*Bacillus subtilis*	JX504009.1	99%
	N5	*Bacillus amyloliquefaciens*	KY773617.1	99%
	N6	*Bacillus subtilis*	KF032710.1	99%
	N9	*Bacillus amyloliquefaciens*	KM091696.1	99%
	N12	*Bacillus aerophilus*	KY933476.1	99%
	N19	*Bacillus amyloliquefaciens*	JF899255.1	95%
	N23	*Bacillus amyloliquefaciens*	AB301022.1	96%
	P4	*Bacillus subtilis*	CP020023.1	98%
	P5	*Bacillus amyloliquefaciens*	JN851189.1	99%
	P6	*Bacillus pumilus*	EF491624.1	99%
	P8	*Bacillus amyloliquefaciens*	KX058503.1	94%
	P9	*Bacillus subtilis*	HM631977.1	99%
	P11	*Bacillus amyloliquefaciens*	KP001322.1	97%
	P13	*Paenibacillus kribbensis*	NR025169.1	98%
	P15	*Paenibacillus kribbensis*	NR025169.1	99%
พิรุณ 2 (PR 2) 6 เดือน	N15	*Bacillus pumilus*	EF491624.1	97%
	N17	*Bacillus amyloliquefaciens*	JQ936683.1	99%
	N23	*Bacillus safensis*	JF411308.1	98%
	P1	*Bacillus amyloliquefaciens*	KM488322.1	98%

ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 6 เดือน (ต่อ)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No.	Identities
พิรุณ 2 (PR 2) 6 เดือน (ต่อ)	P8	*Bacillus amyloliquefaciens*	KJ572221.1	99%
	P9	*Pseudomonas flurescens*	JX127246.1	98%
	P17	*Bacillus subtilis*	GU250819.1	100%
	P20	*Bacillus amyloliquefaciens*	HQ407277.1	99%
ห้วยบง 60 (HB 60) 6 เดือน	N11	*Bacillus safensis*	GU332638.1	97%
	P5	*Bacillus subtilis*	MG386481.1	99%
5 นาที (5 Natee) 6 เดือน	N10	*Bacillus pumilus*	JX860616.1	99%
	N36	*Bacillus subtilis*	KX161426.1	99%
	P9	*Bacillus pumilus*	KJ888102.1	99%
	P14	*Bacillus subtilis*	KF683170.1	96%
	P16	*Bacillus cereus*	JX317637.1	98%
	P17.1	*Bacillus cereus*	MF496242.1	98%
	P17.2	*Bacillus pumilus*	EU321229.1	96%

ตารางที่ 4.11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณราก มันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 9 เดือน

สายพันธุ์	**ไอโซเลท**	**สายพันธุ์**	**Accession No.**	**Identities**
เกษตรศาสตร์50 (KU50) 9 เดือน	N1	*Bacillus amyloliquefaciens*	KU551169.1	98%
	N3	*Bacillus velezensis*	KX242452.1	99%
	N4	*Bacillus amyloliquefaciens*	KU321523.1	100%
	N6	*Bacillus safensis*	MG705592.1	99%
	N10	*Bacillus pumilus*	AB301018.1	96%
	N15	*Bacillus amyloliquefaciens*	KP059106.1	96%
	P2	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH769182.1	99%
	P9	*Bacillus amyloliquefaciens*	JF826293.1	96%
	P10	*Bacillus subtilis*	KP685408.1	97%
	P11	*Bacillus amyloliquefaciens*	KP059106.1	99%
	P12	*Bacillus amyloliquefaciens*	KT324616.1	96%
พิรุณ 1 (PR 1) 9 เดือน	N2	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH144310.1	100%
	N8	*Bacillus safensis*	MK100921.1	99%
	N14	*Bacillus pumilus*	JQ798393.1	98%
	P3	*Bacillus subtilis*	KJ123713.1	96%
	P4	*Bacillus amyloliquefaciens*	KY681451.1	100%
	P6	*Paenibacillus kribbensis*	AB489140.1	99%
	P12	*Paenibacillus kribbensis*	NR025169.1	99%
พิรุณ 2 (PR 2) 9 เดือน	N11	*Bacillus amyloliquefaciens*	JQ936683.1	99%
	P3	*Paenibacillus kribbensis*	AB489140.1	98%
	P4	*Bacillus subtilis*	KF270351.1	96%
	P5	*Bacillus velezensis*	LC414171.1	98%
	P8	*Bacillus amyloliquefaciens*	KU321523.1	99%
	P11	*Bacillus pumilus*	EF491624.1	96%
	P12	*Bacillus amyloliquefaciens*	KM853035.1	98%

ตารางที่ 4.11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 9 เดือน (ต่อ)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No.	Identities
ห้วยบง 60 (HB 60) 9 เดือน	N1	*Bacillus safensis*	KU605230.1	98%
	P6	*Bacillus subtilis*	MF417491.1	98%
5 นาที (5 Natee) 9 เดือน	N4	*Bacillus siamensis*	KU605231.1	98%
	P8	*Bacillus amyloliquefaciens*	KJ126909.1	99%

ตารางที่ 4.12 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 12 เดือน

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No.	Identities
เกษตรศาสตร์50 (KU50) 12 เดือน	N5	*Bacillus subtilis*	HQ143563.1	98%
	N10	*Lysinibacillus fusiformis*	KF475851.1	99%
	P1	*Bacillus amyloliquefaciens*	JN851189.1	99%
	P8	*Bacillus siamensis*	KU605231.1	98%
	P9	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH188056.1	97%
พิรุณ 1 (PR 1) 12 เดือน	N2	*Bacillus amyloliquefaciens*	KM015452.1	98%
	N5	*Bacillus subtilis*	MF417491.1	98%
	N6	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH144253.1	98%
	N9	*Bacillus amyloliquefaciens*	JN851189.1	99%
	N10	*Bacillus amyloliquefaciens*	MG705576.1	99%
	P2	*Bacillus subtilis*	KF530832.1	99%
	P4	*Bacillus amyloliquefaciens*	KF933622.1	99%
	P8	*Bacillus amyloliquefaciens*	FJ685773.1	99%
พิรุณ 2 (PR 2) 12 เดือน	N5	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH211585.1	98%
	N6	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH910175.1	100%
	N12	*Bacillus subtilis*	MG706013.1	99%
	N14	*Bacillus subtilis*	FJ644629.1	99%
	P2	*Bacillus amyloliquefaciens*	MH144273.1	100%
	P4	*Bacillus subtilis*	MG706013.1	100%
	P7	*Bacillus velezensis*	MF471767.1	100%
	P8	*Bacillus amyloliquefaciens*	KM853035.1	98%
	P11	*Bacillus amyloliquefaciens*	KP059106.1	99%
	P13	*Bacillus amyloliquefaciens*	HQ259953.1	97%
ห้วยบง 60 (HB 60) 12 เดือน	N7	*Bacillus subtilis*	EU294413.1	98%
	P1	*Bacillus amyloliquefaciens*	KF578137.1	98%

ตารางที่ 4.12 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทแบคทีเรียคัดแยกได้จากบริเวณรากมันสำปะหลังเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ระยะเวลา 12 เดือน (ต่อ)

สายพันธุ์	ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No.	Identities
ห้วยบง 60 (HB 60) 12 เดือน (ต่อ)	P5	*Bacillus subtilis*	JX406822.1	98%
5 นาที (5 Natee) 12 เดือน	N2	*Bacillus subtilis*	MF062627.1	97%
	P4	*Bacillus amyloliquefaciens*	JN851189.1	99%
	P7	*Bacillus amyloliquefaciens*	KF850148.1	97%

จะเห็นได้ว่าในสายพันธุ์ของมันสำปะหลังเดียวกันอาจมีสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มี Accession number เดียวกัน เช่น KU50-N5 และ KU50-N34 รอบ 3 เดือน เทียบลำดับนิวโอไทด์ ได้เป็น *Bacillus amyloliquefaciens* ที่มี Accession number KY681451.1 เหมือนกัน แม้ว่าตอนคัดแยกแบคทีเรียมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกัน และมีบางสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มี Accession number เดียวกัน แต่มาจากคนละสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง เนื่องจากพันธุ์ของมันสำปะหลังทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ปลูกในแปลงเดียวกัน เช่น PR1-P6 และ PR2-P3 รอบ 9 เดือน ที่มี Accession number AB489140.1 เหมือนกัน เทียบลำดับนิวโอไทด์ ได้เป็น *Paenibacillus kribbensis*, HT-N4 รอบ 9 เดือน และ KU-P8 รอบ 12 เดือน มี Accession number KU605231.1 เหมือนกัน เทียบลำดับนิวโอไทด์ ได้เป็น *Bacillus siamensis* เป็นต้น

4.3 ผลการศึกษาการทดสอบกิจกรรมของเซลลูเลสด้วยวิธี DNS Method

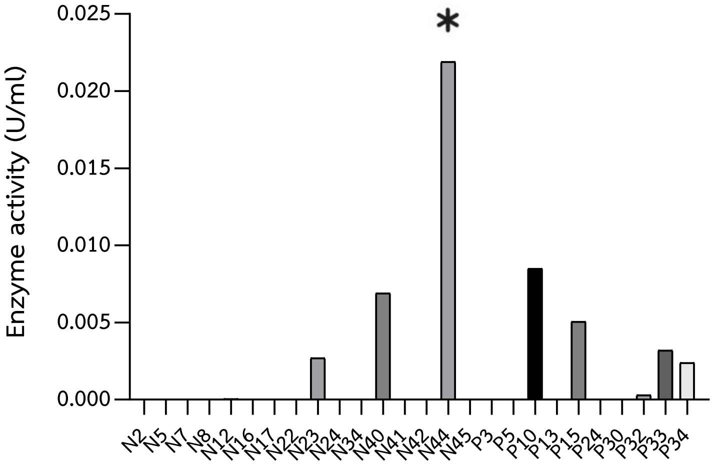
จากนั้นนำไอโซเลทแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 สับสเตรต จากตารางที่ 4.8-4.12 มาทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี DNS Method

<u>รอบ 0 เดือน</u>

รอบ **HT และ HB รอบ 0 เดือน** มีแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 3 ตัว พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0 เนื่องจากเมื่อคำนวณจากสมการแล้ว ไม่สามารถคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ได้

<u>รอบ 3 เดือน</u>

KU 50 3 เดือน



รูปที่ 4.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ KU 50 3 เดือน

จากรูป 4.1 แบคทีเรียที่คัดแยกได้ จาก KU 50 รอบ 3 เดือน พบทั้งหมด 26 ตัว สามารถคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 9 ตัว ดังต่อไปนี้

N12; $5.51*10^{-5}$ U/ml, **N23**; $2.7*10^{-3}$ U/ml, **N40**; $6.9*10^{-3}$ U/ml,

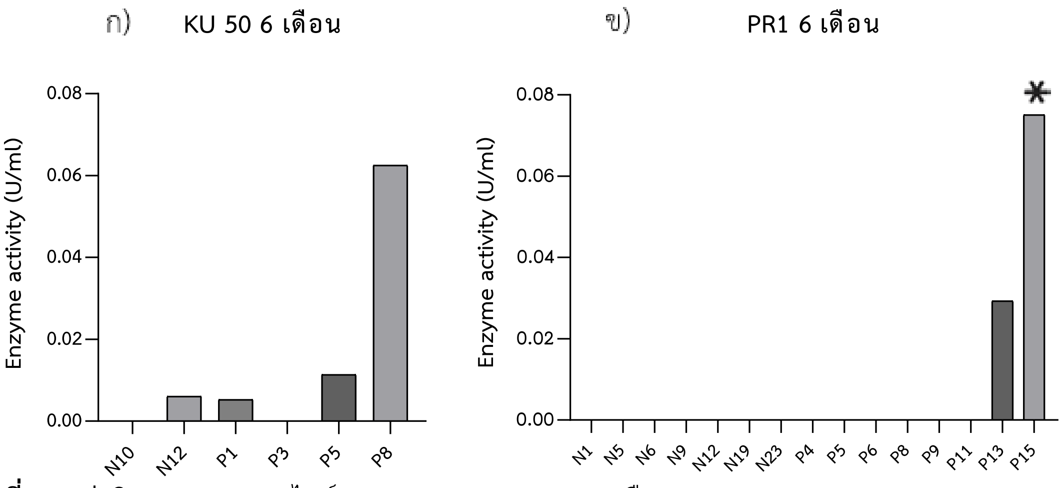
N44; $2.19*10^{-2}$ U/ml, **P10**; $8.5*10^{-3}$ U/ml, **P15**; $5.05*10^{-3}$ U/ml,

P32; $3*10^{-4}$ U/ml, **P33**; $3.2*10^{-3}$ U/ml, **P34**; $2.4*10^{-3}$ U/ml.

ในรอบ 3 เดือน พบว่า มันสำปะหลังพันธุ์ KU50 มีแบคทีเรียไอโซเลท **N44** มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $2.19*10^{-2}$ U/ml

- KU50-N44 เป็น 1 ใน 3 ไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 3 ใน 3 สับสเตรตและมีกิจกรรมของเอนไซม์**เท่ากับ** $2.19*10^{-2}$ U/ml

<u>รอบ 6 เดือน</u>



รูปที่ 4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ KU 50 และ PR1 6 เดือน

จากรูปที่ 4.2 ก) KU50 รอบ 6 เดือน พบแบคทีเรียทั้งหมด 6 ตัว สามารถคำนวณค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ได้ 4 ตัว ดังนี้

N12; $6.1*10^{-3}$ U/ml, **P1**; $5.3*10^{-3}$ U/ml,

P5; $1.14*10^{-2}$ U/ml **P8**; $6.25*10^{-2}$ U/ml

จากที่รูปที่ 4.2 ข) PR1 รอบ 6 เดือน พบแบคทีเรียทั้งหมด 15 ตัว สามารถคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 2 ตัว ได้แก่

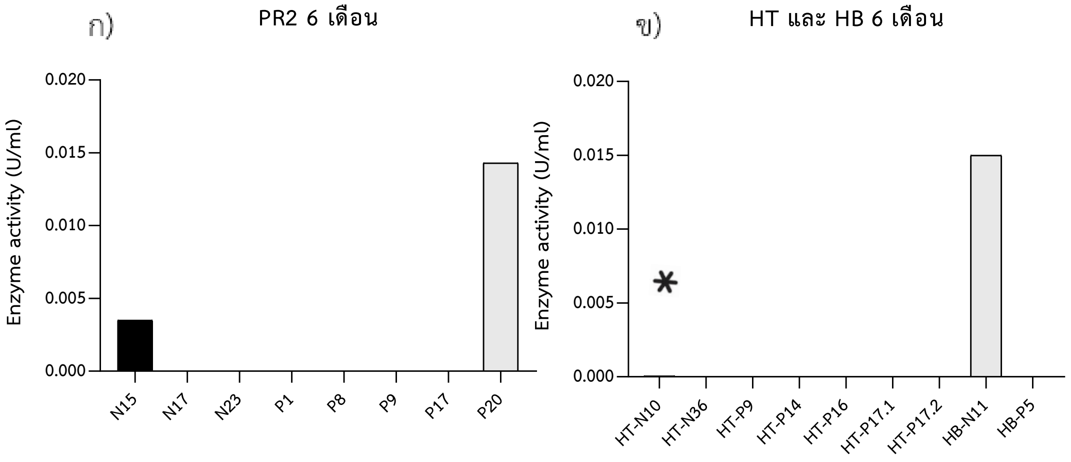
P13; $2.93*10^{-2}$ U/ml **P15**; $7.51*10^{-2}$ U/ml

ในรอบ 6 เดือน พบว่า

- มันสำปะหลังพันธุ์ KU50 มีแบคทีเรียไอโซเลท **P8** มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $6.25*10^{-2}$ U/ml

- มันสำปะหลังพันธุ์ PR1 มีแบคทีเรียไอโซเลท **P15** มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $7.51*10^{-2}$ U/ml

- PR1-P15 เป็น 1 ใน 3 ไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 3 ใน 3 สับสเตรตและมีกิจกรรมของเอนไซม์**เท่ากับ** $7.51*10^{-2}$ U/ml



รูปที่ 4.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ของ PR2, HT และ HB60 6 เดือน

จากรูป 4.3 ก) แบคทีเรียที่คัดแยกได้ จาก PR2 รอบ 6 เดือน พบทั้งหมด 8 ตัว ตัว สามารถคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 2 ตัว ดังต่อไปนี้

N15; $3.5*10^{-3}$ U/ml, และ **P20**; $1.43*10^{-2}$ U/ml

จากรูปที่ 4.3 ข) HT 6 เดือน มี 7 ตัว และ HB 6 เดือน มี 2 ตัว ซึ่งมีแบคทีเรีย 2 ตัวที่สามารถคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ดังนี้

HT-N10; $5.02*10^{-5}$ U/ml และ **HB-N11**; $1.5*10^{-2}$ U/ml

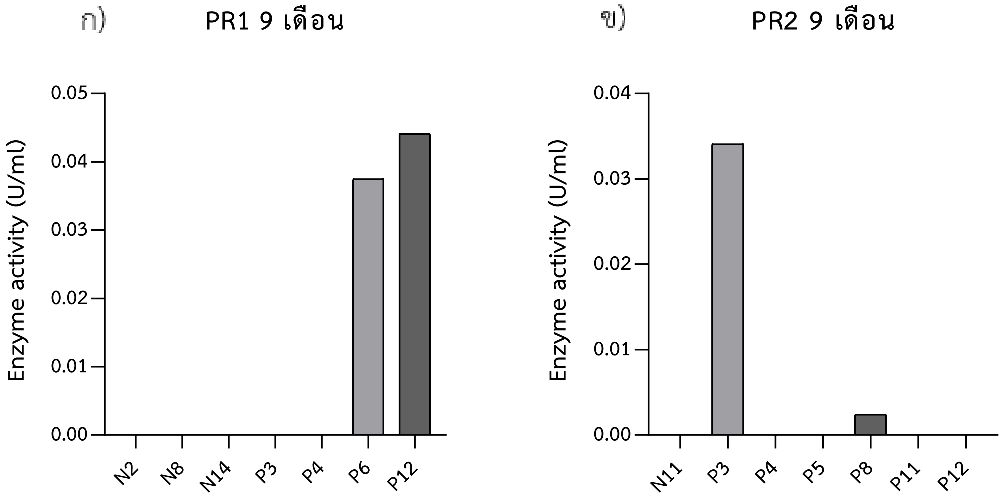
ในรอบ 6 เดือน พบว่า

- มันสำปะหลังพันธุ์ PR2 มีแบคทีเรียไอโซเลท **P20** มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $1.43*10^{-2}$ U/ml

- มันสำปะหลังพันธุ์ HB มีแบคทีเรียไอโซเลท **N11** มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $1.5*10^{-2}$ U/ml

- HT-N10 เป็น 1 ใน 3 ไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 3 ใน 3 สับสเตรตและมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ $5.02*10^{-5}$ U/ml

รอบ 9 เดือน



รูปที่ 4.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ PR1 และ PR2 9 เดือน

จากรูปที่ 4.4 ก) PR1 รอบ 9 เดือน พบแบคทีเรียทั้งหมด 7 ตัว สามารถคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 2 ตัว ดังนี้

P6; $3.75*10^{-2}$ U/ml และ **P12**; $4.41*10^{-2}$ U/ml

จากรูปที่ 4.4 ข) PR2 รอบ 9 เดือน พบแบคทีเรียทั้งหมด 7 ตัว คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 2 ตัว ได้แก่

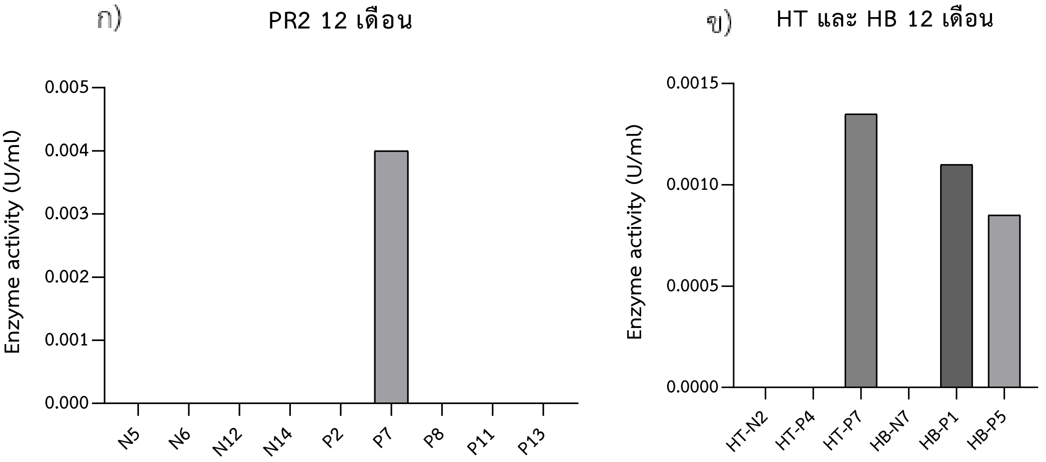
P3; $3.41*10^{-2}$ U/ml และ **P8**; $2.4*10^{-3}$ U/ml

ในรอบ 9 เดือน พบว่า

- มันสำปะหลังพันธุ์ PR1 มีแบคทีเรียไอโซเลท **P12** มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $4.41*10^{-2}$ U/ml
- มันสำปะหลังพันธุ์ PR2 มีแบคทีเรียไอโซเลท **P3** มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $3.41*10^{-2}$ U/ml

ในขณะที่ KU 50 รอบ 9 เดือน พบแบคทีเรีย 11 ตัว, HT 9 เดือน พบ 2 ตัว และ HB 9 เดือน พบแบคทีเรีย 2 ตัว เช่นเดียวกัน ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 15 ตัวนี้ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0 เนื่องจากเมื่อคำนวณจากสมการแล้ว ไม่สามารถคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ได้

<u>รอบ 12 เดือน</u>



รูปที่ 4.5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของ PR2, HT และ HB60 12 เดือน

จากรูปที่ 4.5 ก) PR2 รอบ 12 เดือน พบแบคทีเรียทั้งหมด 10 ตัว สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 1 ตัว คือ

P7 มีค่า $4*10^{-3}$ U/ml

จากรูป 4.5 ข) HT 12 เดือน พบแบคทีเรีย 3 ตัว และ HB 12 เดือน พบ 3 ตัวเช่นกัน ซึ่งสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 3 ตัว ได้แก่

HT-P7; $1.35*10^{-3}$ U/ml, **HB-P1**; $1.1*10^{-3}$ U/ml **HB-P5**; $8.5*10^{-4}$ U/ml

ในรอบ 12 เดือน พบว่า

- มันสำปะหลังพันธุ์ PR2 มีแบคทีเรียไอโซเลท **P7** มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $4*10^{-3}$ U/ml

- มันสำปะหลังพันธุ์ HT และ HB มีแบคทีเรียไอโซเลท **P7** มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $1.35*10^{-3}$ U/ml

ในขณะที่ KU50 รอบ 12 เดือน พบแบคทีเรียทั้งหมด 5 ตัว และ PR1 รอบ 12 เดือน พบแบคทีเรียทั้งหมด 8 ตัว ซึ่งทั้งหมดนี้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0 เนื่องจากเมื่อคำนวณจากสมการแล้ว ไม่สามารถคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ได้

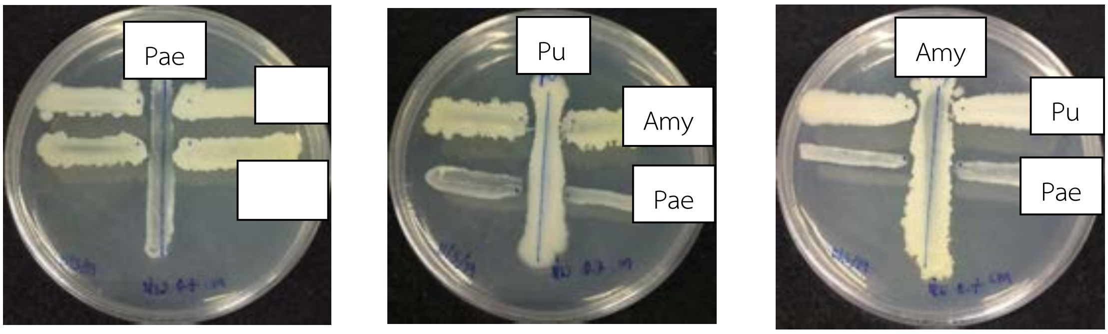
เมื่อพิจารณาจากไอโซเลทแบคทีเรียที่สร้างส่วนใสได้กว้าง (HC) ได้ในทุกสับสเตรต (ภาคผนวก ก) พบว่าไอโซเลทแบคทีเรียนั้นจะมีค่าทางกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงเช่นกัน จึงได้คัดเลือกไอโซเลทแบคทีเรียที่มีการสร้างส่วนใสในบริเวณกว้าง (HC) และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงมาทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลท KU50-N44 รอบ 3 เดือน, ไอโซเลท HT-N10 รอบ 6 เดือน และไอโซเลท PR1-P15 รอบ 6 เดือน เมื่อพิจารณาจาก 16S rDNA แล้วพบว่าเป็น *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* ตามลำดับ ซึ่งทั้งสามไม่เป็นแบคทีเรียก่อโรค โดยนำมาศึกษาการเป็นปฏิปักษ์กันของแบคทีเรีย, ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ และ ศึกษาการย่อย filter paper และใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือก

4.4 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง

4.4.1 ทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกมา

เนื่องจากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากต่างสายพันธุ์กัน จึงนำมาทดสอบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมาสามารถอยู่ร่วมกันได้หรือไม่ (รูปที่ 4.6) โดยจากการทดสอบพบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus pumilus* สามารถยับยั้งซึ่งกันและกันได้เล็กน้อย ในขณะที่ *Paenibacillus kribbensis* สามารถเจริญร่วมกันกับ *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus pumilus* โดยไม่เป็นปฏิปักษ์กัน จึงสามารถนำไปใช้ต่อในการทดลองต่อไปได้

ก) ข) ค)



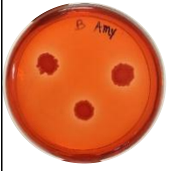
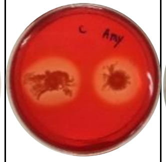
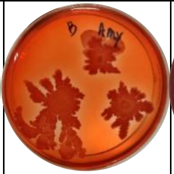
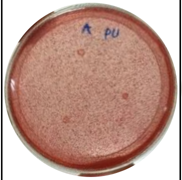
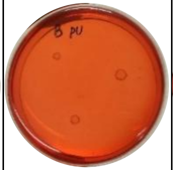
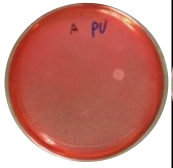
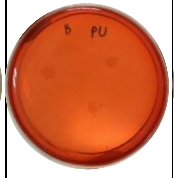
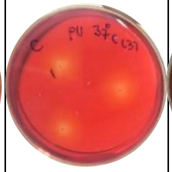
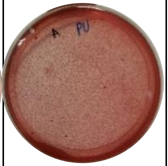
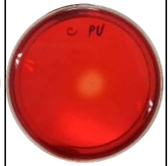
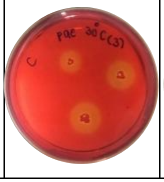
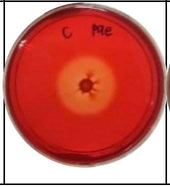
รูปที่ 4.6 ทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กันของแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* (Amy), *Bacillus pumilus* (Pu) และ *Paenibacillus kribbensis* (Pae)

4.4.2 หาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญจากไร่มันสำปะหลังในการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

4.4.2.1 แปรผันอุณหภูมิและ pH ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสได้

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* มาทดสอบในอาหารแข็ง Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบลักษณะ clear zone ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

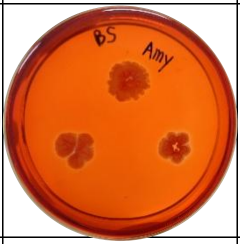
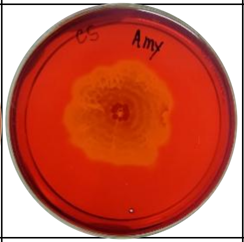
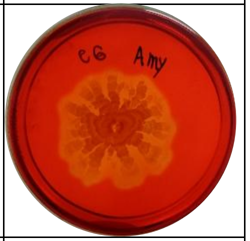
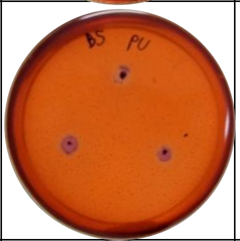
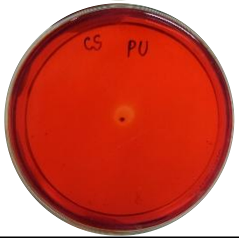
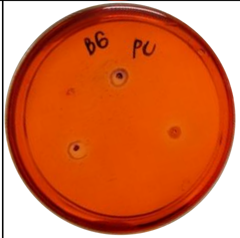
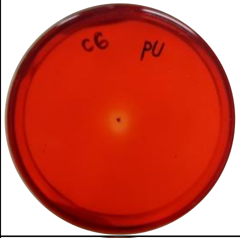
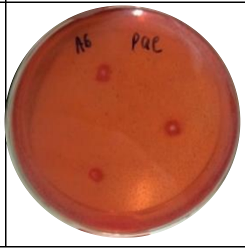
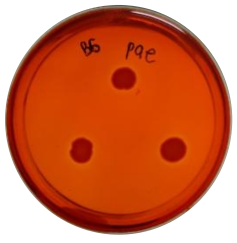
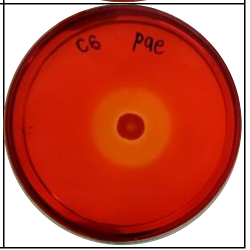
	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส			37 องศาเซลเซียส			40 องศาเซลเซียส		
	Avicel	Cellobiose	CMC	Avicel	Cellobiose	CMC	Avicel	Cellobiose	CMC
Bacillus amyloliquefaciens									
Bacillus pumilus									
Paenibacillus kribbensis									

จากตารางที่ 4.13 ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสับสเตรต Avicel *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* พบว่า ไม่เกิดการสร้างส่วนใส สับสเตรตเซลโลไบโอส *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Paenibacillus kribbensis* สร้างส่วนใสบาง ๆ รอบโคโลนี และในสับสเตรต CMC พบการสร้างส่วนใสกว้างที่สุดใน *Paenibacillus kribbensis* รองลงมาคือ *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus pumilus* ตามลำดับ

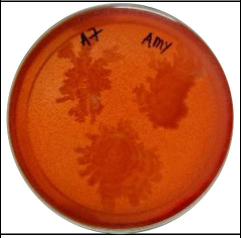
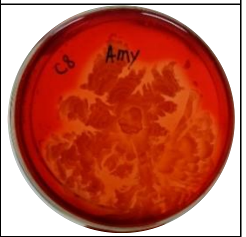
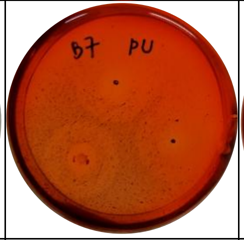
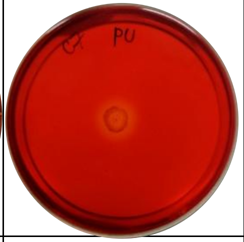
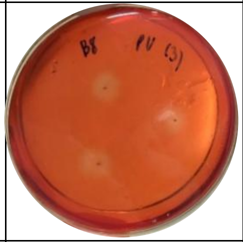
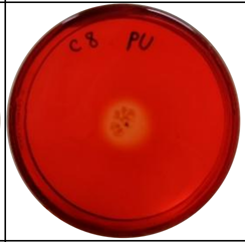
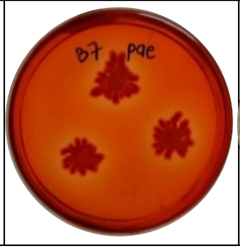
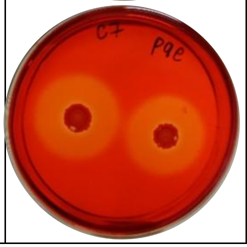
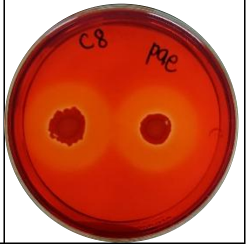
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสับสเตรต Avicel *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Paenibacillus kribbensis* สังเกตเห็นส่วนใสบาง ๆ รอบโคโลนี สับสเตรตเซลโลไบโอส *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Paenibacillus kribbensis* สร้างส่วนใสบาง ๆ รอบโคโลนี และในสับสเตรต CMC พบการสร้างส่วนใสกว้างที่สุดใน *Paenibacillus kribbensis* รองลงมาคือ *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus pumilus* ตามลำดับ

Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus pumilus และ *Paenibacillus kribbensis* มีการเจริญที่ดีและสามารถสร้างส่วนใสได้มากจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับการบ่มที่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ก) นำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยการใช้ Two-way ANOVA พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p value <0.0001) เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมแล้ว นำมาทดสอบบนอาหารที่มีการปรับ pH เป็น 5, 6, 7 และ 8 โดยมีสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.14 ลักษณะ clear zone บนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 5, 6, 7 และ 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

	pH 5			pH 6		
	Avicel	Cellobiose	CMC	Avicel	Cellobiose	CMC
Bacillus amyloliquefaciens						
Bacillus pumilus						
Paenibacillus kribbensis						

ตารางที่ 4.14 ลักษณะ clear zone บนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 5, 6, 7 และ 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ต่อ)

	pH 7			pH 8		
	Avicel	Cellobiose	CMC	Avicel	Cellobiose	CMC
Bacillus amyloliquefaciens						
Bacillus pumilus						
Paenibacillus kribbensis						

จากตารางที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่าในอาหารที่ปรับเป็น pH 5 *Bacillus amyloliquefaciens* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC ในส่วนของ *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* นั้นเห็นส่วนใสที่ชัดเจนในสับสเตรต CMC ในขณะที่อาหารที่ปรับเป็น pH 6 *Bacillus amyloliquefaciens* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรต CMC ในส่วนของ *Bacillus pumilus* นั้นเห็นส่วนใสบาง ๆ ในสับสเตรตเซลโลไบโอสและ CMC ในขณะที่ *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสเล็กน้อยรอบโคโลนีในสับสเตรตเซลโลไบโอส และเห็นชัดเจนในสับสเตรต CMC

อาหารที่ปรับเป็น pH 7 *Bacillus amyloliquefaciens* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรต CMC ในส่วนของ *Bacillus pumilus* นั้นเห็นส่วนใสบาง ๆ ในทั้ง 3 สับสเตรต ในขณะที่ *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสชัดเจนในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC และในอาหารที่ปรับเป็น pH 8 *Bacillus amyloliquefaciens* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรต CMC ในขณะที่สับสเตรตเซลโลไบโอส เห็นส่วนใสบาง ๆ รอบโคโลนี ในส่วนของ *Bacillus pumilus* นั้นเห็นส่วนใสชัดเจนในสับสเตรต CMC ในขณะที่ *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสเล็กน้อยในสสับสเตรต Avicel และเห็นส่วนใสได้ชัดเจนในสับสเตรต CMC

จากการเปรียบเทียบในอาหารทั้ง 3 สับสเตรต ใน pH 5, 6, 7 และ 8 พบว่า ในสับสเตรต Avicel ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p< 0.0001$) และจากการแสดงส่วนใสในการเปรียบเทียบนี้พบว่า ที่ pH 7 เป็น pH ที่สามารถสร้างส่วนใสในแต่ละสับสเตรตได้มากที่สุด และสร้างส่วนใสได้กว้างที่สุดอีกด้วย เมื่อเทียบกับ pH อื่น ๆ ในแต่ละสับสเตรต (ภาคผนวก ก)

เมื่อได้อุณหภูมิ และ pH ที่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* สามารถเจริญเติบโตและสร้างส่วนใสได้มากที่สุดคือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH 7 แล้ว นำไปศึกษาการย่อยใน filter paper และใบมันสำปะหลัง ต่อไป

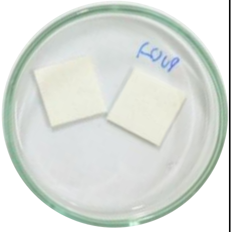
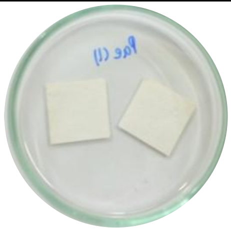
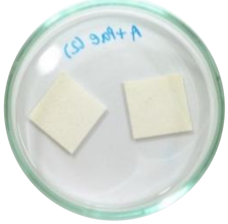
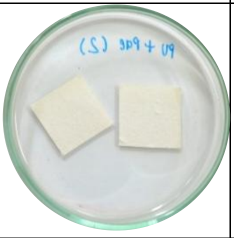
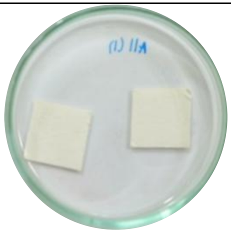
ในการทดลองการย่อยใน filter paper และใบมันสำปะหลัง มีการเลี้ยงเชื้อแบบผสม (co-culture) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* ในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงสุด

4.5 ผลการย่อย Filter paper และ ใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

4.5.1 ย่อย Filter paper โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

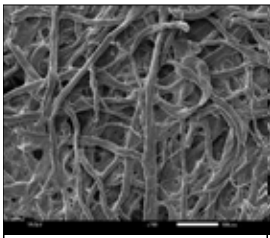
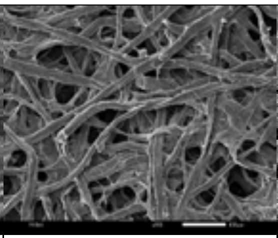
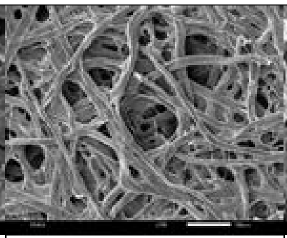
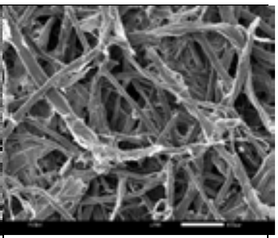
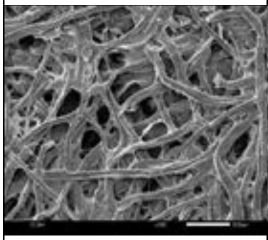
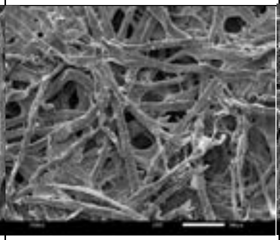
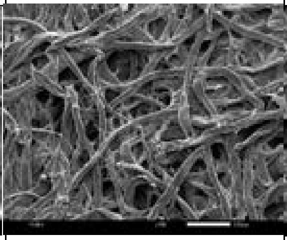
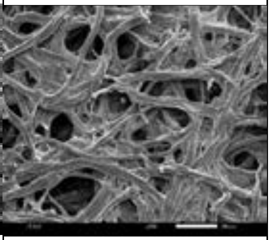
สภาพของ filter paper หลังจากผ่านการบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ที่เชื้อเริ่มต้น $3*10^6$ CFU/ml ในอาหารเหลวปริมาตร 3 มิลลิลิตรแสดงในตารางที่ 4.15 โดยนำไปส่องกล้อง SEM และหาน้ำหนักของ filter paper ที่เปลี่ยนแปลงไป (ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4.15 ลักษณะของ filter paper ที่บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 28 วัน

			
control	*B. amyloliquefaciens*	*B. pumilus*	*Paenibacillus kribbensis*
			
B. amyloliquefaciens + *B. pumilus*	*B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis*	*B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis*	*B. amyloliquefaciens* + *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis*

จากตารางที่ 4.15 เมื่อเทียบน้ำหนักกับชุดควบคุมและน้ำหนักเริ่มต้นก่อนนำไปบ่ม พบว่า filter paper จาก *B. amyloliquefaciens* มีน้ำหนักที่ลดลงมากที่สุด 3.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ filter paper จาก *Paenibacillus kribbensis* และ *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* ที่ filter paper มีน้ำหนักลดลง 3.2 เปอร์เซ็นต์ และ 3.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.16 ภาพ filter paper ที่บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 28 วัน ภายใต้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 200 เท่า

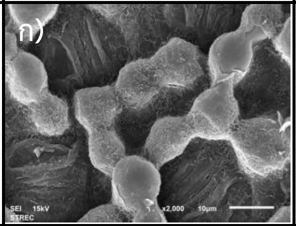
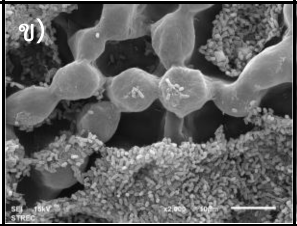
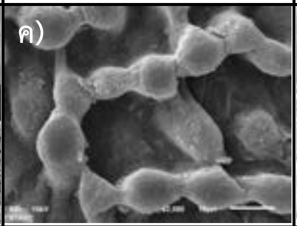
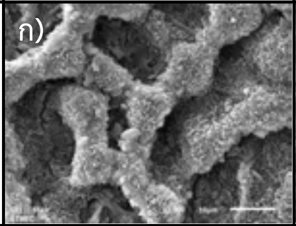
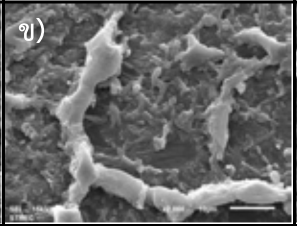
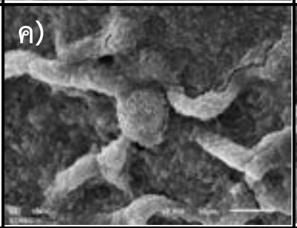
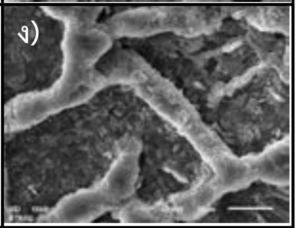
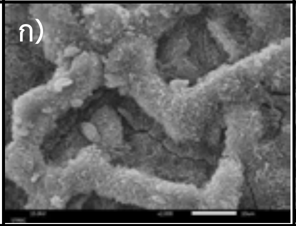
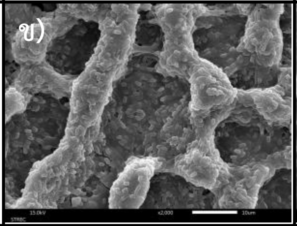
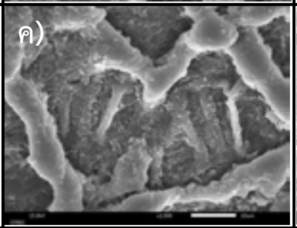
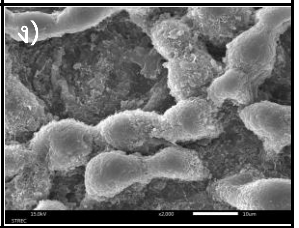
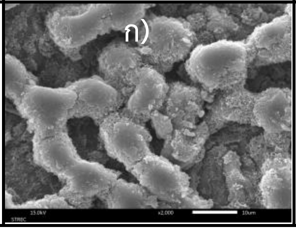
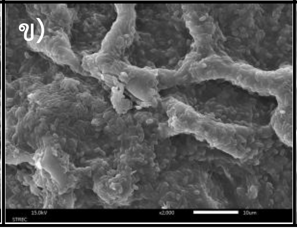
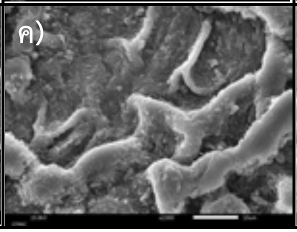
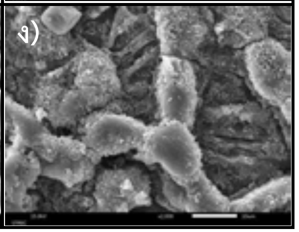
			
control	*B. amyloliquefaciens*	*B. pumilus*	*Paenibacillus kribbensis* ❶
			
B. amyloliquefaciens + *B. pumilus*	*B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* ❷	*B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* ❸	*B. amyloliquefaciens* + *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis*

จากตารางที่ 4.16 จะเห็นได้ว่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ❶ *Paenibacillus kribbensis* แสดงการย่อยสลายของ filter paper เห็นภาพชัดเจนที่สุด รองลงมาคือ ❷ *Bacillus amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* และ ❸ *Bacillus pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* ตามลำดับ จากการทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบซึ่งให้ผลเช่นเดียวกัน

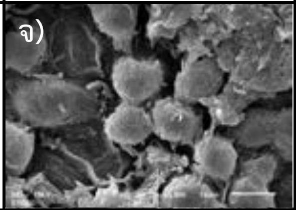
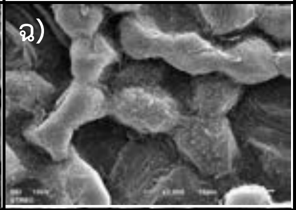
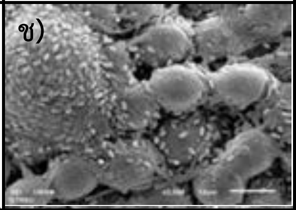
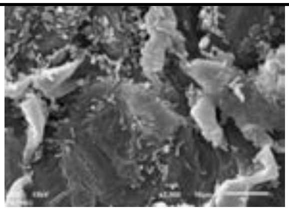
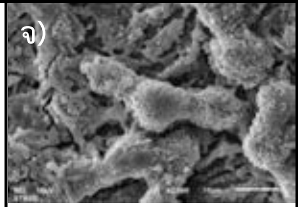
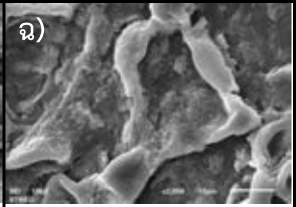
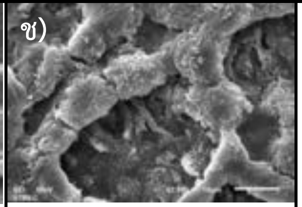
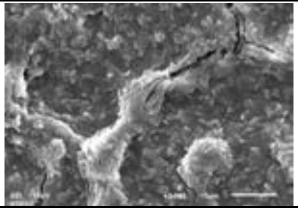
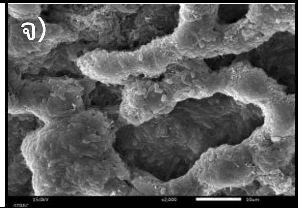
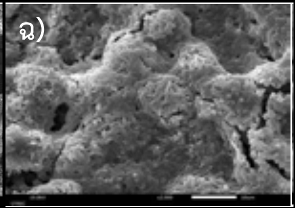
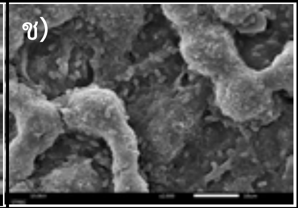
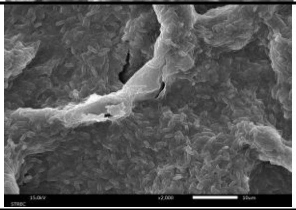
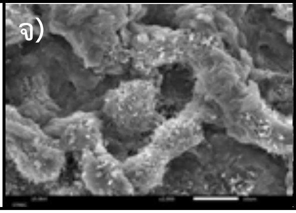
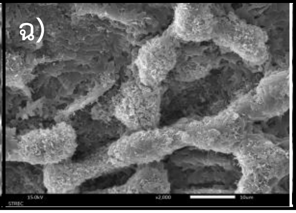
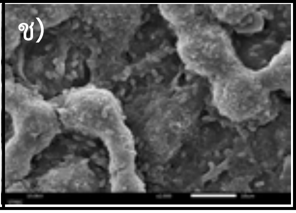
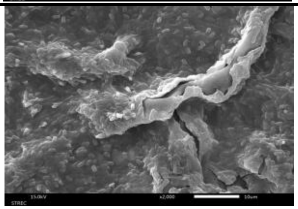
4.5.2 ย่อยใบมันสำปะหลังโดยตรงโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

เมื่อทำการศึกษาใน filter paper แล้ว ทำการศึกษาต่อในใบมันสำปะหลัง โดยใช้กลุ่มเชื้อเหมือนกับการทดลองข้างต้น (ผลการทดลอง 4.5.1) เพื่อเป็นการทดลองกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากสภาพแวดล้อมจริง ก่อนนำไปปรับใช้ในแปลงมันสำปะหลังหรือสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ได้ต่อไป

ตารางที่ 4.17 ภาพใบมันสำปะหลังด้านท้องใบ (abaxial surface) ที่บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่เชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU/ml โดยหยด 100 ไมโครลิตร ภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 2,000 เท่า

	control	*B. amyloliquefaciens*	*B. pumilus*	*Paenibacillus kribbensis*
7 วัน				
14 วัน				
21 วัน				
28 วัน				

ตารางที่ 4.17 ภาพใบมันสำปะหลังด้านท้องใบ (abaxial surface) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่เชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU/ml โดยหยด 100 ไมโครลิตร ภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 2,000 เท่า (ต่อ)

	B. amyloliquefaciens + *B. pumilus*	*B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis*	*B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis*	*B. amyloliquefaciens* + *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis*
7 วัน	จ) 	ฉ) 	ช) 	ญ) 
14 วัน	จ) 	ฉ) 	ช) 	ญ) 
21 วัน	จ) 	ฉ) 	ช) 	ญ) 
28 วัน	จ) 	ฉ) 	ช) 	ญ) 

พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน เชื้อผสมทั้งสามสายพันธุ์พบการย่อยสลายทางโครงสร้างของ epidermis มากที่สุด โดยพบเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* $2.6*10^5$ CFU/ml, *Bacillus pumilus* $1.06*10^6$ CFU/ml และ *Paenibacillus kribbensis* $2*10^4$ CFU/ml (ตารางที่ 4.17 ภาพ ญ) เมื่อบ่มใบมันสำปะหลังกับเชื้อในแต่ละชุดการทดลองเทียบกับชุดควบคุม พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเชื้อมีจำนวนลดลงในทุกการทดลอง โดยเฉพาะในภาพ ค) เมื่อนำมาเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง ไม่พบ *Bacillus pumilus* จึงอาจเป็นสาเหตุให้ไม่เกิดการย่อยสลาย (ภาคผนวก ก)

เมื่อบ่มผ่านไป 14 วันพบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* (ภาพ ข) มีการย่อยสลายของโครงสร้างของ epidermis ที่เปลี่ยนไปได้ชัดเจนที่สุด และมีจำนวนเชื้อเพิ่มมากขึ้นจากเชื้อเริ่มต้นเป็น $4.6*10^6$ CFU/ml แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากใบมันสำปะหลังได้ ในขณะที่การทดลองอื่น ๆ เชื้อมีการลดลงจากเชื้อเริ่มต้น เช่น *Bacillus pumilus* เชื้อลดลงเหลือ $8.1*10^5$ CFU/ml, *Paenibacillus kribbensis* เชื้อลดลงเหลือ $3*10^4$ CFU/ml เป็นต้น แต่ยังสามารถพบการย่อยสลายได้บ้างเล็กน้อย จากการบ่ม 14 วัน เชื้อเดี่ยว *Bacillus amyloliquefaciens* (ภาพ ข) และเชื้อผสม (ภาพ ญ) สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้มากที่สุดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เมื่อบ่มผ่านไป 21 วันพบว่า เชื้อผสมแบบ 3 ตัว (ภาพ ญ) พบการเปลี่ยนแปลงของ epidermis มากที่สุด โดยพบเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* $2.4*10^5$ CFU/ml, *Bacillus pumilus* 10^4 CFU/ml และ *Paenibacillus kribbensis* $5*10^4$ CFU/ml ในขณะที่ *Bacillus amyloliquefaciens* (ภาพ ฉ) พบเชื้อมากกว่าเชื้อเริ่มต้นเป็น $2.4*10^6$ CFU/ml ส่วนชุดการทดลองอื่น มีการลดลงของเชื้อเริ่มต้นในทุกการทดลอง และในตารางที่ 4.17 ชุดทดลอง ง ไม่พบเชื้อ *Paenibacillus kribbensis* แต่ในการทดลองอื่นยังพบการเปลี่ยนแปลงของ epidermis ได้บ้างเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

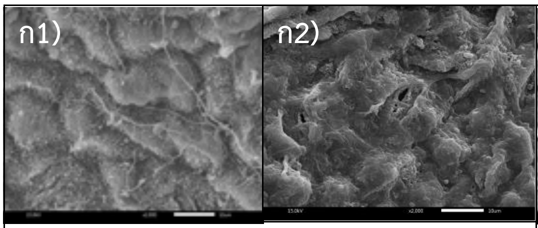
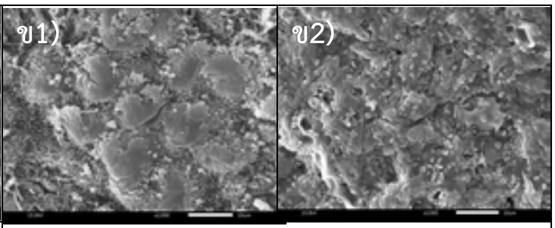
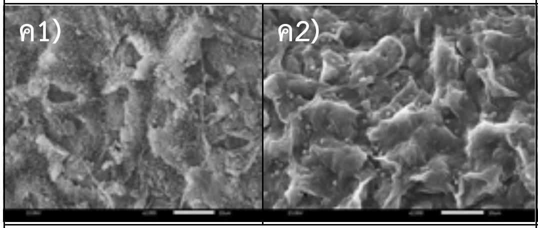
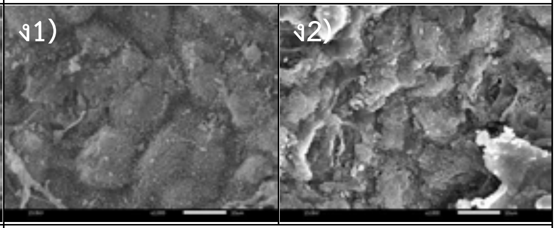
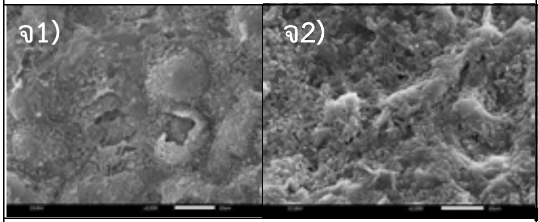
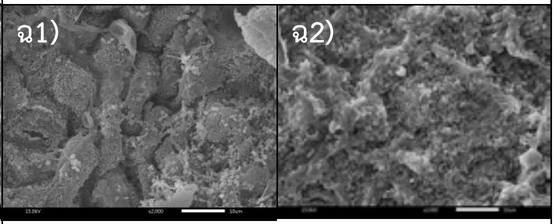
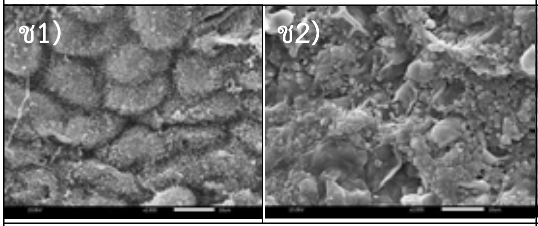
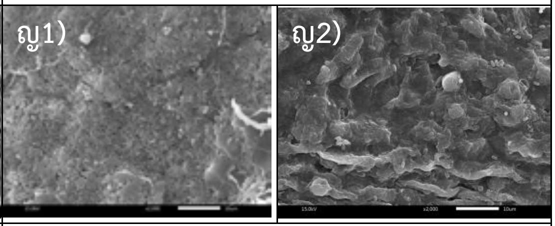
เมื่อบ่มผ่านไป 28 วัน เชื้อผสมแบบ 3 ตัว (ภาพ ญ) พบการเปลี่ยนแปลงของ epidermis มากที่สุด โดยพบเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* $2.9*10^5$ CFU/ml, *Bacillus pumilus* ไม่พบเชื้อ และ *Paenibacillus kribbensis* 10^4 CFU/ml ในภาพ ง และ ช ไม่พบเชื้อ *Paenibacillus kribbensis* และ *Bacillus pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* ตามลำดับ ในขณะที่ภาพ จ) *Bacillus amyloliquefaciens* มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจากเชื้อเริ่มต้นเป็น $3.8*10^6$ CFU/ml ส่วนการทดลองอื่นเชื้อลดลงจากเชื้อเริ่มต้น เช่น *Bacillus pumilus* เชื้อลดลงเหลือ $2*10^4$ CFU/ml เป็นต้น และจากตารางที่ 4.17 ภาพ ข, ค และ ง จะเห็นได้ว่ารูปร่างของ epidermis บนผิวใบ มีลักษณะ

ที่เปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่า เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้บางส่วน

จากการทดลองการย่อยเซลลูโลสในใบมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* ที่นำมาทำเป็นเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมพบว่า ในการบ่มที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน เชื้อแต่ละตัวมีความสามารถในการย่อยสลายของโครงสร้าง epidermis ที่ได้ผลแตกต่างกันออกไป เมื่อศึกษาดูภาพรวมแล้ว พบว่า เมื่อนำมาเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มารวมกันเป็นเชื้อผสม สามารถย่อยสายเซลลูโลสได้มากที่สุด รองลงมา คือ เชื้อเดี่ยว *Bacillus amyloliquefaciens* ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสเห็นภาพได้ชัดเจนที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

4.5.3 ย่อยใบมันสำปะหลังในดินโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

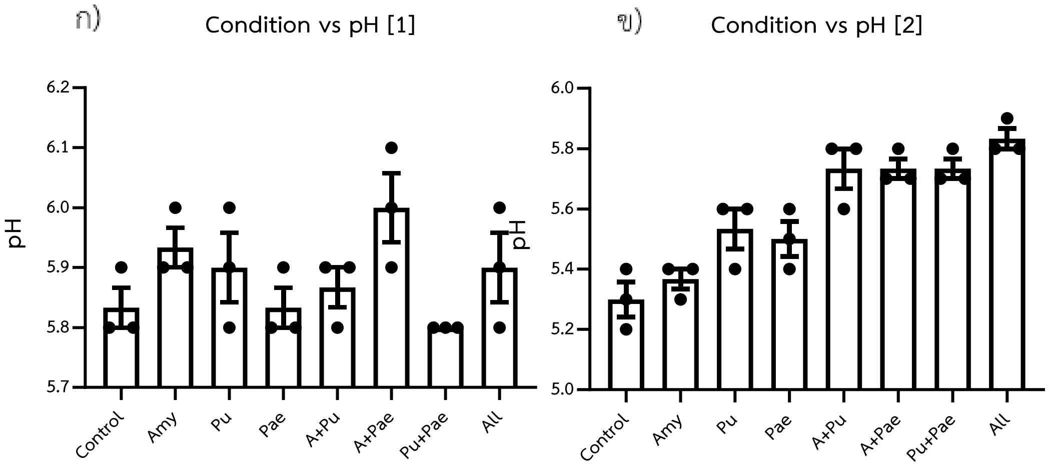
เมื่อศึกษาความสามารถในการย่อยใบมันสำปะหลังของแบคทีเรียโดยตรงแล้ว ศึกษาต่อโดยทดลองในสภาวะแวดล้อมจำลอง โดยนำใบมันสำปะหลังขนาด 10 เซนติเมตรที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาคลุกเคล้าลงในดินจากแปลงมันสำปะหลังที่มีความชื้น 30 เปอร์เซ็นต์ ใส่เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น $8.1*10^6$ CFU/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 28 วัน จึงนำไปส่องกล้อง SEM (ตารางที่ 4.18) โดยภาพรวมพบว่า เชื้อผสม *Bacillus amyloliquefaciens* + *Bacillus pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* ปุ่มใบ (papillae) มีความตื้นขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 4.18 ภาพ ญ) แสดงว่าเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด สามารถย่อยสลายใบมันสำปะหลังได้ดีที่สุด และกลุ่ม *Bacillus amyloliquefaciens* + *Bacillus pumilus* สามารถย่อยใบมันสำปะหลังที่มีประสิทธิภาพรองลง (ภาพ จ) ซึ่งผลสอดคล้องกับการย่อยสลายใบมันสำปะหลังในกลุ่มเชื้อผสม 3 สายพันธุ์

	
control	*B. amyloliquefaciens*
	
B. pumilus	*Paenibacillus kribbensis*
	
B. amyloliquefaciens + *B. pumilus*	*B. amyloliquefaciens*+ *Paenibacillus kribbensis*
	
B. pumilus + *Paenibacillus kribbensis*	*B. amyloliquefaciens* + *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis*

ตารางที่ 4.18 ภาพใบมันสำปะหลังด้านท้องใบ (abaxial surface) ที่ผสมลงในดินจากแปลงมันสำปะหลัง บ่ม 28 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ซ้ำการทดลอง ใส่เชื้อเริ่มต้น 8.1*10^6 CFU/ml ภายใต้กล้อง SEM กำลังขยาย 2,000 เท่า

4.5.4 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน

จากนั้นนำดินจากแปลงมันสำปะหลังที่เหลือมาวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน โดยศึกษาพารามิเตอร์ดังนี้ ค่า pH, ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน, ปริมาณโพแทสเซียม, ฟอสฟอรัส, แคลเซียมและแมกนีเซียม, ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมในดิน ในการทดลองนี้ได้ทำ 2 การทดลองและแต่ละพารามิเตอร์การวัดผล 3 ซ้ำ ได้ผลดังนี้

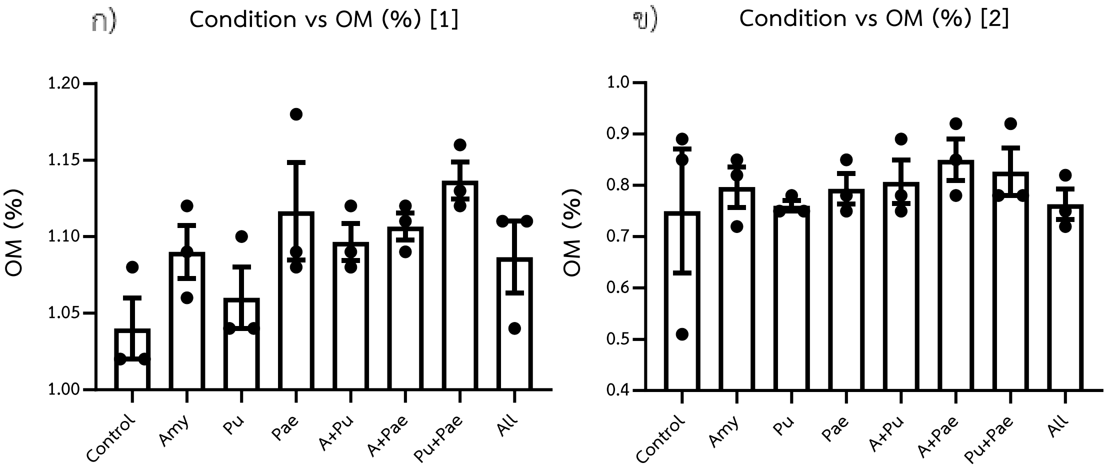


รูปที่ 4.7 ผลวิเคราะห์ค่า pH จากดินตัวอย่าง Amy; *B. amyloliquefaciens*, Pu; *B. pumilus*, Pae; *Paenibacillus kribbensis*, A+Pu; *B. amyloliquefaciens + B. pumilus*, A+Pae; *B. amyloliquefaciens + Paenibacillus kribbensis*, Pu+Pae; *B. pumilus + Paenibacillus kribbensis* และ All; *B. amyloliquefaciens + B. pumilus + Paenibacillus kribbensis*

การทดลองครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.7ก) ค่า pH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น พบค่า pH เฉลี่ยสูงขึ้นในทุกสภาวะการทดลอง ยกเว้นเชื้อผสม *B. pumilus + Paenibacillus kribbensis* และเชื้อกลุ่ม *B. amyloliquefaciens + Paenibacillus kribbensis* ให้ค่า pH สูงที่สุด

การทดลองครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.7ข) ค่า pH เฉลี่ยเพิ่มขึ้นในทุกสภาวะการทดลองเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด *B. amyloliquefaciens + B. pumilus + Paenibacillus kribbensis* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีค่า pH สูงที่สุด

ทั้งสองการทดลอง (รูปที่ 4.7ก และ 4.7ข) พบว่า ค่า pH เฉลี่ยสูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

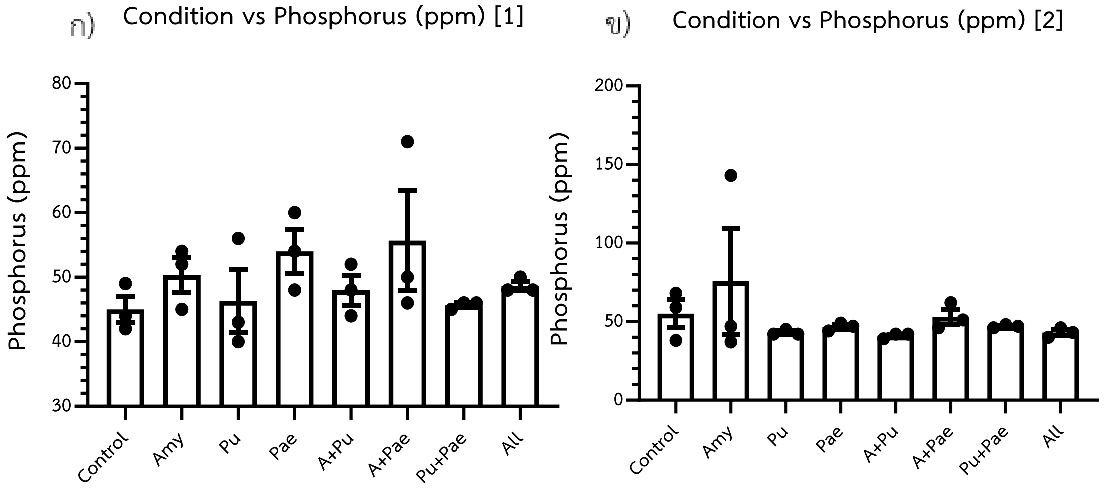


รูปที่ 4.8 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินจากดินตัวอย่าง

จากการทดลองครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.8ก) พบว่าค่าปริมาณอินทรีย์วัตถุเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมในทุกสภาวะการทดลอง โดยในเชื้อผสม *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* มีค่าเฉลี่ยปริมาณอินทรีย์วัตถุมากที่สุด

การทดลองครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.8ข) ค่าปริมาณอินทรีย์วัตถุเฉลี่ยเมื่อเทียบกับชุดควบคุมแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และใน *B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* มีค่าเฉลี่ยปริมาณอินทรีย์วัตถุสูงสุด

ทั้งสองการทดลอง (รูปที่ 4.8ก และ 4.8ข) พบว่า ค่าปริมาณอินทรีย์วัตถุเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

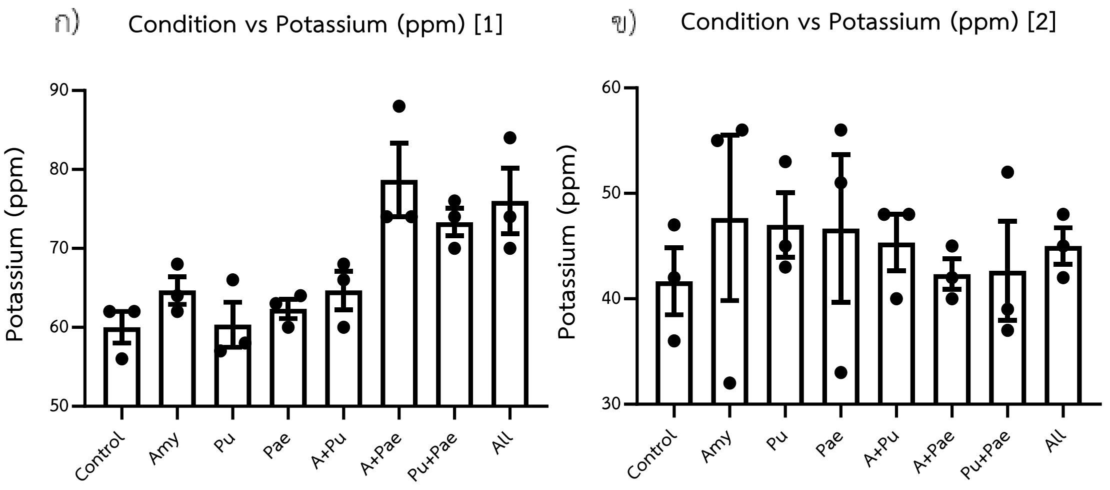


รูปที่ 4.9 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณฟอสฟอรัสในดินจากดินตัวอย่าง

การทดลองครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.9ก) ค่าปริมาณฟอสฟอรัสเฉลี่ยในแต่ละเชื้อมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเจน มีค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสฟอรัสสูงกว่าชุดควบคุมในทุกสภาวะการทดลอง และเชื้อผสม *B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสฟอรัสสูงสุด

การทดลองครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.9ข) ค่าปริมาณฟอสฟอรัสเฉลี่ยค่อนข้างอยู่ในระดับเดียวกัน พบว่าทุกสภาวะการทดลองมีค่าเฉลี่ยที่ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้น *B. amyloliquefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีค่าเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุม และเป็นแบคทีเรียที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสฟอรัสสูงสุดในการทดลองครั้งที่ 2 นี้

ทั้งสองการทดลอง (รูปที่ 4.9ก และ 4.9ข) พบว่า ค่าปริมาณฟอสฟอรัสเฉลี่ยไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

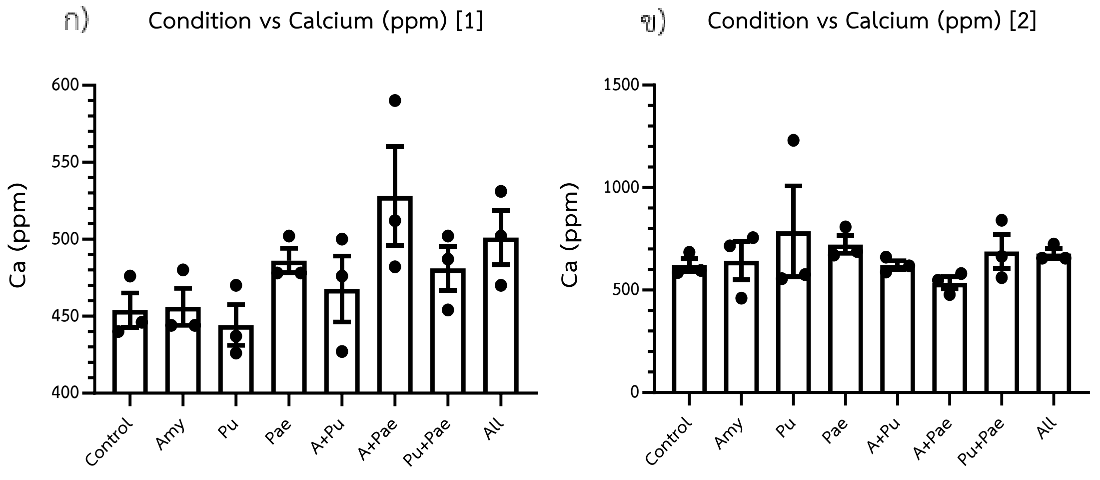


รูปที่ 4.10 ผลวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมในดินจากดินตัวอย่าง

การทดลองครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.10ก) ค่าปริมาณโพแทสเซียมเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุมในทุกสภาวะการทดลอง และ เชื้อผสม *B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณโพแทสเซียมสูงสุด

การทดลองครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.10ข) ค่าปริมาณโพแทสเซียมเฉลี่ยมีค่าสูงขึ้นในทุกสภาวะการทดลอง และ *B. amyloliquefaciens* เป็นแบคทีเรียที่ให้ผลวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมเฉลี่ยสูงสุดจากการทดลองนี้

ทั้งสองการทดลอง (รูปที่ 4.10ก และ 4.10ข) พบว่า ค่าปริมาณโพแทสเซียมเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

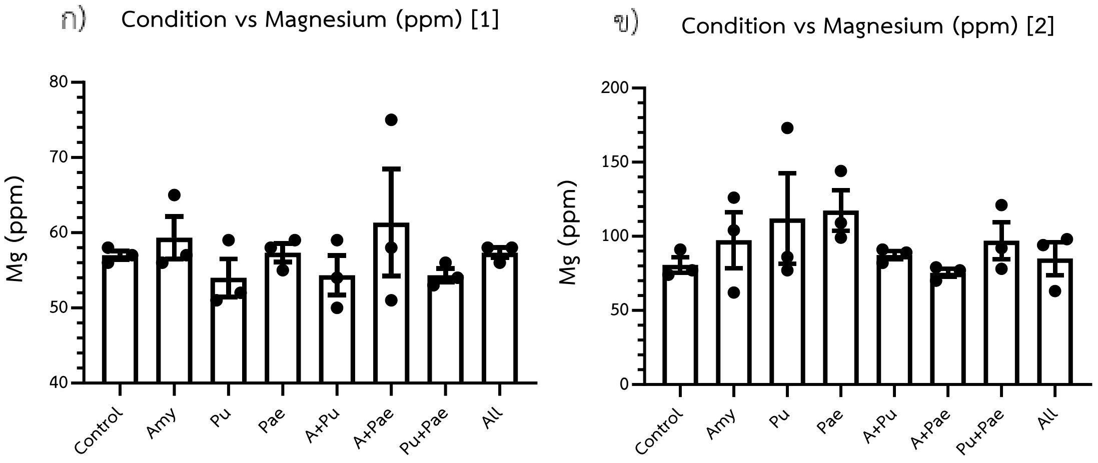


รูปที่ 4.11 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณแคลเซียมในดินจากดินตัวอย่าง

การทดลองครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.11ก) ค่าปริมาณแคลเซียมเฉลี่ยมีค่าสูงขึ้นในทุกสภาวะการทดลองยกเว้นใน *B. pumilus* ที่มีค่าปริมาณแคลเซียมเฉลี่ยลดลง และ เชื้อผสม *B. amyloliquefaciens + Paenibacillus kribbensis* มีค่าปริมาณแคลเซียมเฉลี่ยสูงสุด

การทดลองครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.11ข) ค่าปริมาณแคลเซียมเฉลี่ยมีค่าสูงขึ้นในทุกสภาวะการทดลอง ยกเว้นในกลุ่มเชื้อผสม *B. amyloliquefaciens + Paenibacillus kribbensis* มีค่าปริมาณแคลเซียมเฉลี่ยลดลง และ *B. pumilus* มีค่าปริมาณแคลเซียมเฉลี่ยสูงสุด

ทั้งสองการทดลอง (รูปที่ 4.10ก และ 4.10ข) พบว่า ค่าปริมาณโพแทสเซียมเฉลี่ยเพิ่มขึ้นบางสภาวะการทดลอง และลดลงในบางสภาวะการทดลองเช่นเดียวกันเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

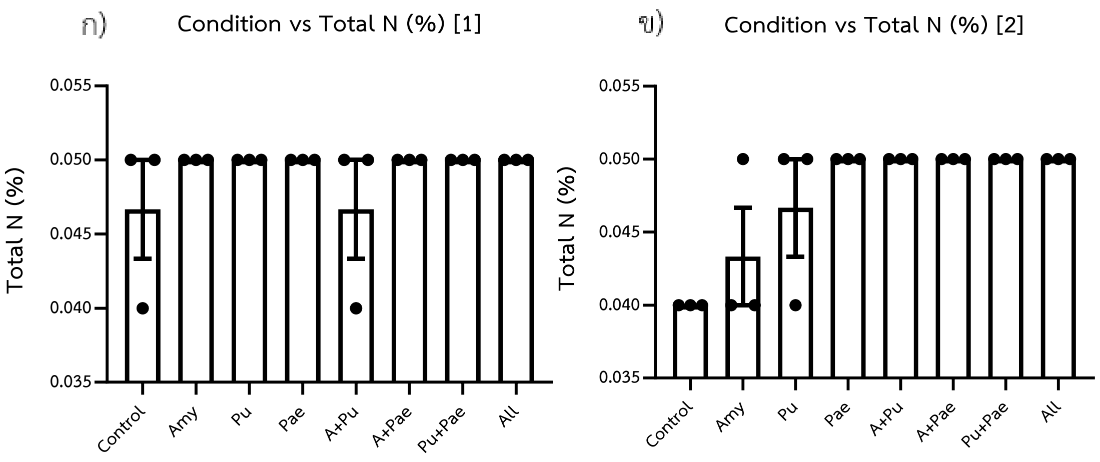


รูปที่ 4.12 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณแมกนีเซียมในดินจากดินตัวอย่าง

การทดลองครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.12ก) พบว่าค่าปริมาณแมกนีเซียมเฉลี่ยสูงขึ้นใน 4 สภาวะการทดลองเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ได้แก่ *B. amyloliquefaciens, Paenibacillus kribbensis*, เชื้อผสม *B. amyloliquefaciens + Paenibacillus kribbensis* และ *B. amyloliquefaciens + B. pumilus + Paenibacillus kribbensis* ค่าเฉลี่ยลดลง 3 การทดลอง ได้แก่ *B. pumilus*, กลุ่มเชื้อ *B. amyloliquefaciens + B. pumilus* และ *B. pumilus + Paenibacillus kribbensis*

จากการทดลองครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.12ข) ค่าปริมาณแมกนีเซียมเฉลี่ยสูงขึ้นในทุกสภาวะการทดลองเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้น กลุ่มเชื้อ *B. amyloliquefaciens + Paenibacillus kribbensis* ที่มีค่าเฉลี่ยลดลง

ทั้งสองการทดลอง (รูปที่ 4.12ก และ 4.12ข) พบว่า ค่าปริมาณแมกนีเซียมเฉลี่ยเมื่อเทียบกับคอนโทรลแล้วค่อนข้างแปรผัน ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

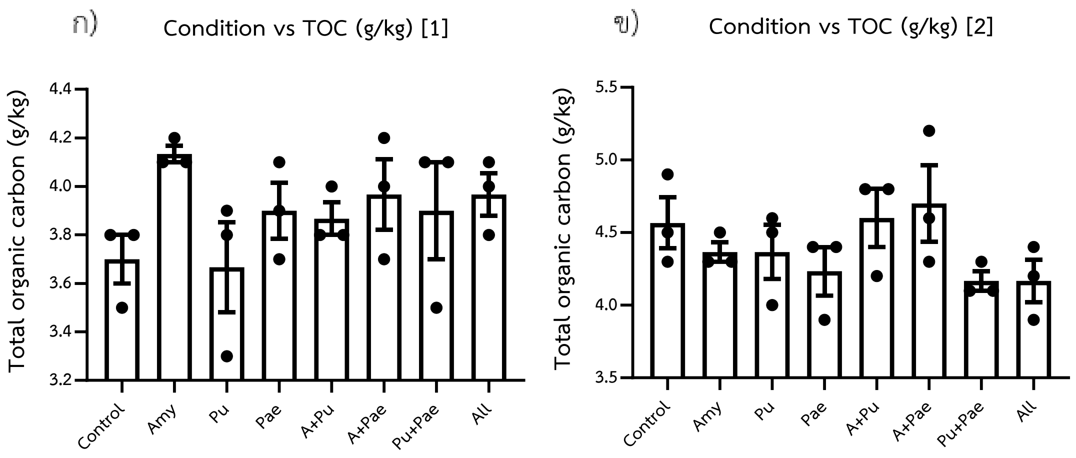


รูปที่ 4.13 ผลวิเคราะห์ค่าปริมาณไนโตรเจนในดินจากดินตัวอย่าง

การทดลองครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.13ก) ปริมาณไนโตรเจนมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.05 เกือบทุกกลุ่มสภาวะการทดลอง ยกเว้น เชื้อผสม *B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* ที่มีค่าเฉลี่ยลดลง

การทดลองครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.13ข) ปริมาณไนโตรเจนมีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มสภาวะการทดลองเมื่อเทียบกับชุดควบคุม มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุดใน *Paenibacillus kribbensis*, กลุ่มเชื้อ *B. amyloliquefaciens* + *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis*, *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* และเชื้อผสมทั้ง 3 ตัว *B. amyloliquefaciens* + *B. pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* โดยมีค่าเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 0.05 เปอร์เซ็นต์

ทั้งสองการทดลอง (รูปที่ 4.13ก และ 4.13ข) พบว่า ค่าปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ยมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับชุดควบคุมในแต่ละสภาวะการทดลอง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)



รูปที่ 4.14 ผลวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมในดินจากดินตัวอย่าง

จากการทดลองที่ 1 (รูปที่ 4.14ก) ค่าปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมเฉลี่ยมีค่าสูงขึ้นเกือบทุกกลุ่มสภาวะการทดลองเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้น *B. pumilus* ที่มีค่าเฉลี่ยลดลง และ *B. amyloliquefaciens* มีค่าปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมเฉลี่ยสูงสุด

การทดลองที่ 2 (รูปที่ 4.14ข) ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมเฉลี่ยลดลงเกือบทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้น ในกลุ่มเชื้อผสม *B. amyloliquefaciens* + *B. pumilus* และ *B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* โดยกลุ่ม *B. amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* มีค่าปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมเฉลี่ยสูงสุด

ทั้งสองการทดลอง (รูปที่ 4.14ก และ 4.14ข) พบว่า ค่าปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมเฉลี่ยเมื่อเทียบกับชุดควบคุมแล้วค่อนข้างแปรผัน ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูเลสจากดิน

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสในงานวิจัยนี้มีมากมายหลากหลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus kribbensis*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* เป็นต้น ซึ่งพบว่ามีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยอื่น อาทิเช่น งานวิจัยของ Korpole et al. (2011) ซึ่งคัดแยก *Bacillus pumilus* ได้จากดินในประเทศอินเดีย นำมาทดสอบกิจกรรมเอนโดกลูคาเนส พบว่าผลิตได้สูงสุด 4.8 ยูนิตต่อมิลลิตร ในงานวิจัยของ (Kim et al., 2012) แยกแบคทีเรียจากดินในแปลงการเกษตร ประเทศเกาหลี พบ *Bacillus licheniformis, Bacillus pumilus, Bacillus subtilis, Bacillus amylolicheniformis* ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ นำมาทดสอบกิจกรรมของเอนโดกลูคาเนส พบว่า *Bacillus subtilis* ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ 0.28 ยูนิตต่อมิลลิตร

ในขั้นตอนแรกของงานวิจัยนี้จึงศึกษาความสามารถในการผลิตเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ นำมาทดสอบการย่อยใน 3 สับสเตรต ได้แก่ Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสับสเตรตได้ 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 สับสเตรต ดีที่สุด 3 สายพันธุ์ นั่นคือ KU50-N44 รอบ 3 เดือน, HT-N10 รอบ 6 เดือน และ PR1-P15 รอบ 6 เดือน ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์นี้สามารถย่อยได้ทั้ง 3 สับสเตรต หลังจากนำไปเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* ตามลำดับ และเมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมของเซลลูเลสด้วยวิธี DNS Method พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ มีค่ากิจกรรมของเซลลูเลสที่สูงที่สุดเช่นเดียวกัน คือ $2.19*10^{-2}$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร, $5.02*10^{-5}$ ยูนิตต่อมิลลิตร และ $7.51*10^{-2}$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการทดสอบบนอาหารแข็งทั้ง 3 สับสเตรต จะพบว่า บนสับสเตรต Avicel จะไม่ค่อยพบการเปลี่ยนแปลงมากนัก เนื่องจากโดยปกติแล้วเอกโซกลูคาเนสจะทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส (รุสนี, 2552) ทำให้ผลของค่าเอนไซม์ที่แสดงออกมานั้นไม่มีประสิทธิภาพมากนัก และจากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS Method จะพบว่ามีแบคทีเรียบางตัวไม่สามารถวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้ เนื่องจากแบคทีเรียปล่อยเอนไซม์มาย่อยสลายเซลลูโลสมีน้อยหรือเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสแต่ละชนิดอาจมีเวลาไม่มากพอ ทำให้ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้หรือค่ากิจกรรมที่ได้นั้นมีค่าต่ำ

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียจากงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่น

แบคทีเรีย	จำนวนชั่วโมงที่เลี้ยง	แหล่งคาร์บอน	บัฟเฟอร์ที่ใช้	ปริมาณเอนไซม์ที่ได้	อ้างอิง
Bacillus amyloliquefaciens	24 ชั่วโมง	0.5% CMC	Sodium acetate buffer (pH 5.5)	$2.19*10^{-2}$ U/ml	งานวิจัยนี้
Bacillus pumilus	24 ชั่วโมง	0.5% CMC	Sodium acetate buffer (pH 5.5)	$5.02*10^{-5}$ U/ml	งานวิจัยนี้
Paenibacillus kribbensis	24 ชั่วโมง	0.5% CMC	Sodium acetate buffer (pH 5.5)	$7.51*10^{-2}$ U/ml	งานวิจัยนี้
Bacillus amyloliquefaciens DL-3	72 ชั่วโมง	2% รำข้าว	Tris-HCl buffer (pH 7)	102.0 U/ml	Jo et al. (2008)
Bacillus amyloliquefaciens NBRC3035	48 ชั่วโมง	2% CMC	Phosphate buffer (pH 7.0)	0.079 U/ml	Singh et al. (2013)
Bacillus pumilus MGB05	72 ชั่วโมง	1% CMC	citrate buffer (pH 5.0)	0.262U/ml	Bhuyan et al. (2018)
Bacillus pumilus	72 ชั่วโมง	1% CMC	phosphate citrate buffer (pH 5.0)	0.331 U/ml	Lisdiyanti et al. (2012)
Paenibacillus sp.	24 ชั่วโมง	1% CMC	Sodium citrate buffer (pH 4.8)	0.154 U/ml	de Castro et al. (2011)
Paenibacillus elgii	72 ชั่วโมง	1% CMC	Phosphate buffer (pH 8.0)	15.75 U/ml	Lisdiyanti et al. (2012)
Paenibacillus terrae ME27-1	60 ชั่วโมง	2% CMC	Sodium citrate buffer (pH 5.5)	0.17 U/ml	Liang et al. (2014)

จากตารางการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียจากงานวิจัยนี้ ผลิตเซลลูเลสได้ค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่น ประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูเลสนั้นอาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการเลี้ยง, จำนวนเชื้อเริ่มต้น, บัฟเฟอร์ที่ใช้, pH, อุณหภูมิ, อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ซึ่งการเลือกความเข้มข้นและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมนั้นมีความสำคัญต่อแบคทีเรียเช่นเดียวกัน โดยอัตราการเจริญของแบคทีเรียในงานวิจัยนี้พบว่า *Paenibacillus kribbensis* มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าเมื่อเปรียบเทียบกับ *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus pumilus* เมื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงและหาจำนวนแบคทีเรียพบว่า *Paenibacillus kribbensis* ได้จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่น้อย เมื่อเทียบกับ *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus pumilus* (ภาคผนวก ง) ซึ่งส่งผลต่อการการย่อย Filter paper และ ใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้การวิจัยต่อไป

5.2 การหาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสได้จากแบคทีเรียที่คัดเลือก

ผลการทดลอง พบว่าอุณหภูมิที่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* สามารถเจริญเติบโตและย่อยสลายสับสเตรตแต่ละชนิดได้มากที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส และที่ pH 7 เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับ Ray et al. (2007) ที่เพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CY5 และ *Bacillus circulans* TP3 พบว่าช่วง pH 7-7.5 แบคทีเรียสามารถผลิตเซลลูเลสได้มากที่สุด ในขณะที่ Karim et al. (2015) ศึกษากิจกรรมของเอนโดกลูคาเนสจาก *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB2 พบว่ามีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH 6 เช่นเดียวกับ Shankar and Isaiarasu (2011) ที่ศึกษากิจกรรมของเซลลูเลสจาก *Bacillus pumilus* EWBCM1 พบว่ามีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ pH 6 เช่นเดียวกัน ทางด้านของ Akhtar et al. (2013) พบว่าที่ pH 7 *Bacillus pumilus* สามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงสุด เช่นเดียวกับ Immanuel et al. (2006) ที่ศึกษาการผลิตเอนโดกลูคาเนสจาก *Bacillus* spp. พบว่าที่ pH 7 สามาถผลิตเซลลูเลสได้สูงสุด คือ 0.0165 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ในงานวิจัยของ Rasul et al. (2015) ที่ศึกษากิจกรรมของเซลลูเลสพบว่า *Bacillus* sp. มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 7 ส่วนทาง Lee et al. (2008) พบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* มีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส

5.3 การย่อย Filter paper และ ใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อเดี่ยวนั้น ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* เมื่อนำไปทดสอบการย่อยใน filter paper แล้วพบว่าสามารถย่อยสลาย filter paper ได้บางส่วน ซึ่งใน *Paenibacillus kribbensis* สามารถย่อยได้ดีที่ที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว จะเห็นได้ว่าเชื้อผสม *Bacillus amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* มีการย่อยสลายได้ดีรองลงมา ตามด้วย *Bacillus pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* ตามลำดับ การใช้แบคทีเรียผสมที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันของแต่ละแบคทีเรีย อาจจะช่วยส่งเสริมและเพิ่มประสิทธิ ภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสเพิ่มขึ้นได้จากนั้นทำการศึกษาต่อในใบมันสำปะหลัง เพื่อเป็นการทดลองกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พบว่าในกลุ่มเชื้อผสมของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายใบมันสำปะหลังได้เห็นภาพชัดเจนมากที่สุด เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่น ๆ อาทิเช่น Abdel-Rahman et al. (2016) ทำการย่อยฟางข้าวที่ใส่มูลของสัตว์ ด้วยเชื้อ *Bacillus licheniformis* 1-1v และ *Bacillus sonorensis* 7-1v ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.8×10^7 cfu/ml และ 3.6×10^7 cfu/ml ตามลำดับ ละลายเชื้อ 20 เท่าและพ่นลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ บนกองฟางขนาด 10 กิโลกรัม พ่นวันที่ 1, 11 และ 23 ทิ้งไว้ 110 วัน พบว่าลดระยะเวลาในการทำปุ๋ยหมักลง 40-43 เปอร์เซ็นต์ และยังช่วยเพิ่มค่าไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมอีกด้วย

รองลงมา คือ เชื้อเดี่ยว *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งพบว่าเชื้อเดี่ยวมีความสามารถฝนการย่อยสลายได้ดีเช่นเดียวกัน ดังเช่นในงานวิจัยของ Akhtar et al. (2013) ทำการย่อยใบของต้นยางพารา, ยูคาลิปตัส, อโศกอินเดีย, สัก และ มะม่วง ที่ตัดให้มีขนาด 2-3 เซนติเมตร ทั้งหมด 1 กิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. ใส่เชื้อเริ่มต้น 7×10^9 cfu/ml 1 kg of biomass บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 วัน ศึกษาเซลลูโลสคงเหลือ, คาร์บอน และสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่าปริมาณเซลลูโลสลดลง 7 เปอร์เซ็นต์, คาร์บอนลดลง 25 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนลดลง 47 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นนำใบมันสำปะหลังมาทดสอบในสภาวะแวดล้อมจำลอง โดยนำใบมันสำปะหลังขนาด 10 เซนติเมตรที่ผ่านการอบแห้งแล้ว มาคลุกเคล้าลงในดินจากแปลงมันสำปะหลังที่มีความชื้น 30 เปอร์เซ็นต์ ใส่เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น 10^6 CFU/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 28 วัน หลังจากสำรวจภายใต้กล้อง SEM แล้วพบว่า กลุ่มเชื้อผสม *Bacillus amyloliquefaciens* + *Bacillus pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* พบการเปลี่ยนแปลงของใบมันสำปะหลังมากที่สุด แสดงว่าเชื้อผสมทั้ง 3

ชนิดสามารถย่อยสลายใบมันสำปะหลังได้ดีที่สุด รองลงมา คือกลุ่ม *Bacillus amyloliquefaciens + Bacillus pumilus* เมื่อเอนไซม์ทั้งสามชนิดทำงานร่วมกัน แต่ละเอนไซม์จะทำงานเกื้อหนุนซึ่งกันและกัน ส่งผลให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ผลที่ได้จากการทดสอบการย่อยใบมันสำปะหลังในดินและ ใบมันสำปะหลังเปล่า ๆ เพียงอย่างเดียวนั้น จะเห็นได้ว่า ส่วนใหญ่ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน อาจจะแตกต่างบ้างเล็กน้อย เนื่องจากเมื่อทำการทดลองในดินแล้ว ปัจจัยในดินต่าง ๆ อาจจะมีผลต่อปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินด้วย (Tourna et al., 2008) อย่างไรก็ดีความสามารถในการย่อยสลายชีวมวลต่าง ๆ นั้น ขึ้นอยู่กับความซับซ้อนของโครงสร้างพันธะระหว่างเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่เชื่อมต่อกัน (Hon, 2017) โดยการย่อยสลายบนใบที่เกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยของแบคทีเรียซึ่งจะนำไปสู่การย่อยที่เพิ่มมากขึ้นในอนาคต (Naik et al., 2010)

ผลการวิเคราะห์เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน โดยศึกษา 8 พารามิเตอร์ คือ ค่า pH, ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน, ปริมาณโพแทสเซียม, ฟอสฟอรัส, แคลเซียมและแมกนีเซียม, ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวมในดิน พบว่าในแต่ละสภาวะมีค่าแตกต่างกันออกไป เนื่องจากมีปัจจัยภายนอกที่ทำให้ผลการทดลองไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน อาทิ ค่าความผิดพลาดจากการทำงานของคน หรือค่าความคลาดเคลื่อนทางเครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพ ซึ่งส่งผลต่อผลการวิเคราะห์ทำให้ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8 ด้วยวิธี One-way ANOVA แบบ Tukey พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

บทที่ 6
ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

1. ในขั้นตอนงานวิจัยการย่อย filter paper, ใบมันสำปะหลัง และใบมันสำปะหลังในดิน ควรใช้เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นปริมาณที่มากขึ้น อาทิ 10^8 CFU/ml เพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพของการย่อยสลายได้มากยิ่งขึ้น

2. เพิ่มปริมาณน้ำหนักของใบมันสำปะหลังในขั้นตอนการย่อยใบมันสำปะหลังในดิน เป็น 1-5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ซึ่งจะทำให้เห็นผลของการทดลองได้ชัดเจนและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

3. ศึกษาความแปรผันของปัจจัยอื่น เช่น เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสับสเตรตเริ่มต้น หรือช่วง pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในวิธี DNS assay เพื่อศึกษาประสิทธิภาพที่แบคทีเรียสามารถผลิตเซลลูเลสได้มากที่สุด

4. ศึกษาและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียให้มีปริมาณเท่ากัน และให้มีปริมาณมากพอก่อนนำมาทดสอบหาค่ากิจกรรมของเอน ไซม์ด้วยวิธี DNS assay เพื่อให้ผลการทดลองมีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

กรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ไถกลบตอซัง สร้างดินยั่งยืน ฟื้นสิ่งแวดล้อม (ออนไลน์) แหล่งที่มา www.ldd.go.th/WEB_Bio/PDF/Plow.pdf เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 1 มิถุนายน 2562

กรมวิชาการเกษตร. 2537. มันสำปะหลัง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เกรียงศักดิ์ ศรีวิจิตรกมล. 2543. การเตรียมและศึกษาสมบัติบางประการของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส. คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โครงการเพิ่มศักยภาพฐานข้อมูลอุตสาหกรรมชีวภาพ. 2017. บทที่ 32 เซลลูโลส (Cellulose). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

ประวิตร โสภโณดร. 2554. มันสำปะหลัง. (ออนไลน์) แหล่งที่มา http://www.natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/510-211/lecturenote/document/cassava.pdf เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 1 มิถุนายน 2562

ไพบูลย์ แสงเงิน. 2554. มันอะไรเอ่ย? ปลูกกินก็ได้ ปลูกขายก็ดี. (ออนไลน์) แหล่งที่มา http://info.matichon.co.th/techno/techno.php เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 1 มิถุนายน 2562

มูรนีย์ บริบูรณ์สุข. 2557. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งชาติ. 2550. การเตรียมดิน. (ออนไลน์) แหล่งที่มา https://www.tapiocathai.org/pdf/Tapioca%20Plan/a_soil.pdf เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 1 มิถุนายน 2562

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. 2558. มันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2558

รุสนี โตะกีเล. 2552. คุณสมบัติเพื่อการประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมของเอนไซม์ผสมที่ผลิตจากจุลินทรีย์ สารเร่ง พด.1 โดยใช้ชานอ้อย และเปลือกถั่วลิสง เป็นแหล่งคาร์บอน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิจารณ์ วิชชุกิจ, เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, เอ็จ สโรบล และ ประภาส ช่างเหล็ก. 2545. เกษตรศาสตร์ 50 พันธุ์มันสำปะหลังที่นิยมปลูกมากที่สุดในประเทศไทย. (ออนไลน์) แหล่งที่มา http://agron.agri.kps.ku.ac.th/index.php/th/research-argon/53-kasetsart-50-the-most-popular-cassava-cultivar-in-thailand เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 1 มิถุนายน 2562

ศูนย์พัฒนาความรู้การซื้อขายสินค้าเกษตรล่วงหน้า. มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจ. (ออนไลน์) แหล่งที่มา http://www.aftc.or.th/itc/products_analyze.php?id=86&fgrp_id=6&fmnu_id=31. เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 2 มิถุนายน 2562

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้าปี 2561. สำนักงานเศรษฐกิจ การเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สถาบันการจัดการเทคโนโลยีและนวัตกรรมเกษตร (สท.). มันสำปะหลังพันธุ์ พิรุณ2. (ออนไลน์) แหล่งที่มา https://www.nstda.or.th/agritec/cassava-plant/261-cassava-pirun2 เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 3 มิถุนายน 2562

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2015. มันสำปะหลัง : ความสำคัญของมันสำปะหลัง. (ออนไลน์) แหล่งที่มา https://www3.rdi.ku.ac.th/?p=17872 เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 3 มิถุนายน 2562

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมวิชาการเกษตร. จำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง. (ออนไลน์) แหล่งที่มา http://at.doa.go.th/cassvar/index.html เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 1 มิถุนายน 2562

Soclaimon. 2010. มันสำปะหลัง มันห้านาที. (ออนไลน์) แหล่งที่มา https://soclaimon.wordpress.com/2010/06/11/มันสำปะหลัง-มันห้านาที/ เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 2 มิถุนายน 2562

Summers Vincent. 2018. Saccharides: Difference Between Starches, Sugars and Cellulose (ออนไลน์) แหล่งที่มา https://www.decodedscience.org/saccharides-difference-starches-sugars-cellulose/63414 เข้าถึงล่าสุดเมื่อ วันที่ 1 มิถุนายน 2562

ABDEL-RAHMAN, M. A., EL-DIN, M. N., REFAAT, B. M., ABDEL-SHAKOUR, E. H., EWAIS, E. E.-D. & ALREFAEY, H. M. 2016. Biotechnological application of thermotolerant cellulose-decomposing bacteria in composting of rice straw. *Annals of Agricultural Sciences,* 61, 135-143.

AKHTAR, N., SHARMA, A., DEKA, D., JAWED, M., GOYAL, D. & GOYAL, A. 2013. Characterization of cellulase producing *Bacillus* sp. for effective degradation of leaf litter biomass. *Environmental Progress Sustainable Energy,* 32, 1195-1201.

ALAM, M., MANCHUR, M. & ANWAR, M. 2004. Isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by the isolate *Streptomyces omiyaensis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences,* 7, 1647-1653.

ARANTES, V. & SADDLER, J. N. 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels,* 3, 4.

ASSAREH, R., SHAHBANI ZAHIRI, H., AKBARI NOGHABI, K., AMINZADEH, S. & BAKHSHI KHANIKI, G. 2012. Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource Technology,* 120, 99-105.

AYGAN, A., KARCIOGLU, L. & ARIKAN, B. 2011. Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. *African Journal of Biotechnology,* 10, 789-796.

BAHARUDDIN, M., AHMAD, A., LA NAFIE, N. & ZENTA, F. 2016. Cellulase enzyme activity of *Bacillus circulans* from larvae *Cossus cossus* in lignocellulosic substrate. *American Journal of Biomedical and Life Sciences,* 4, 21-25.

BAKARE, M., ADEWALE, I., AJAYI, A. & SHONUKAN, O. 2005. Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology,* 4.

BALOWS, A., TRüPER, H. G., DWORKIN, M., HARDER, W. & SCHLEIFER, K.-H. 2013. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Springer Science & Business Media.

BAYER, E. A., LAMED, R., WHITE, B. A. & FLINT, H. J. 2008. From cellulosomes to cellulosomics. *The Chemical Record,* 8, 364-377.

BHUYAN, P. M., SANDILYA, S. P., NATH, P. K., GANDOTRA, S., SUBRAMANIAN, S., KARDONG, D. & GOGOI, D. K. 2018. Optimization and characterization of extracellular cellulase produced by *Bacillus pumilus* MGB05 isolated from midgut of muga silkworm (*Antheraea assamensis Helfer*). *Journal of Asia-Pacific Entomology,* 21, 1171-1181.

CHANTARASIRI, A. 2014. Novel halotolerant cellulolytic *Bacillus methylotrophicus* RYC01101 isolated from ruminant feces in Thailand and its application for bioethanol production. *KMUTNB: International Journal of Applied Science Technology,* 7, 63-68.

CHASSARD, C., DELMAS, E., ROBERT, C., LAWSON, P. A. & BERNALIER-DONADILLE, A. 2012. *Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 62, 138-143.

CHENG, Y.-S., KO, T.-P., HUANG, J.-W., WU, T.-H., LIN, C.-Y., LUO, W., LI, Q., MA, Y., HUANG, C.-H. & WANG, A. H.-J. 2012. Enhanced activity of *Thermotoga maritima* cellulase 12A by mutating a unique surface loop. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 95, 661-669.

CHUNG, D., YOUNG, J., CHA, M., BRUNECKY, R., BOMBLE, Y. J., HIMMEL, M. E. & WESTPHELING, J. 2015. Expression of the *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in Caldicellulosiruptor bescii enhances its ability to deconstruct crystalline cellulose. *Biotechnology for Biofuels,* 8, 113.

COBUCCI-PONZANO, B., IONATA, E., LA CARA, F., MORANA, A., FERRARA, M. C., MAURELLI, L., STRAZZULLI, A., GIGLIO, R. & MORACCI, M. 2013. Extremophilic (hemi) cellulolytic microorganisms and enzymes. *Lignocellulose Conversion.* Springer.

CRENNELL, S. J., HREGGVIDSSON, G. O. & KARLSSON, E. N. 2002. The structure of *Rhodothermus marinus* Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology,* 320, 883-897.

DAR, M. A., PAWAR, K. D., JADHAV, J. P. & PANDIT, R. S. 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation. *International Biodeterioration,* 98, 73-80.

DE CASTRO, A. L., VOLLú, R. E., PEIXOTO, R. S., GRIGOREVSKI-LIMA, A. L., COELHO, R. R., BON, E. P., ROSADO, A. S. & SELDIN, L. 2011. Cellulolytic potential of a novel strain of *Paenibacillus* sp. isolated from the armored catfish *Parotocinclus maculicauda* gut. *Brazilian Journal of Microbiology,* 42, 1608-1615.

DEKA, D., DAS, S. P., SAHOO, N., DAS, D., JAWED, M., GOYAL, D. & GOYAL, A. 2013. Enhanced cellulase production from *Bacillus subtilis* by optimizing physical parameters for bioethanol production. *ISRN Biotechnology,* 2013.

DEVêVRE, O. C. & HORWáTH, W. R. 2000. Decomposition of rice straw and microbial carbon use efficiency under different soil temperatures and moistures. *Soil Biology Biochemistry,* 32, 1773-1785.

DEVILLARD, E., GOODHEART, D. B., KARNATI, S. K., BAYER, E. A., LAMED, R., MIRON, J., NELSON, K. E. & MORRISON, M. 2004. *Ruminococcus albus* 8 mutants defective in cellulose degradation are deficient in two processive endocellulases, Cel48A and Cel9B, both of which possess a novel modular architecture. *Journal of Bacteriology,* 186, 136-145.

EL-NAGGAR, N. E.-A. & ABDELWAHED, N. A. 2012. Optimization of process parameters for the production of alkali-tolerant carboxymethyl cellulase by newly isolated *Streptomyces* sp. strain NEAE-D. *African Journal of Biotechnology,* 11, 1185-1196.

EMERSON, E. L. & WEIMER, P. J. 2017. Fermentation of model hemicelluloses by prevotella strains and *Butyrivibrio fibrisolvens* in pure culture and in ruminal enrichment cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 101, 4269-4278.

GARDNER, J. G. 2016. Polysaccharide degradation systems of the saprophytic bacterium *Cellvibrio japonicus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 32, 121.

GAUR, R. & TIWARI, S. 2015. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnology,* 15, 1-12.

GOYAL, V., MITTAL, A., BHUWAL, A. K., SINGH, G., YADAV, A. & AGGARWAL, N. K. 2014. Parametric optimization of cultural conditions for carboxymethyl cellulase production using pretreated rice straw by *Bacillus* sp. 313SI under stationary and shaking conditions. *Biotechnology Research International,* 2014, 1-7.

GRUNWALD, P. 2016. *Handbook of Carbohydrate-Modifying Biocatalysts*, Jenny Stanford Publishing, New York

HALLAM, D., CALPE, C. & ABBASSIAN, A. 2013. Food outlook: Biannual report on global food markets. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

HENG, S., SUTHEEWORAPONG, S., PROMMEENATE, P., CHEEVADHANARAK, S., KOSUGI, A., PASON, P., WAEONUKUL, R., RATANAKHANOKCHAI, K. & TACHAAPAIKOON, C. 2019. Complete genome sequence of *Halocella* sp. strain SP3-1, an extremely halophilic, glycoside hydrolase-and bacteriocin-producing bacterium isolated from a salt evaporation pond. *Microbiology Resource Announcements,* 8, e01696-18.

HIGASHIDE, W., LI, Y., YANG, Y. & LIAO, J. C. 2011. Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose. *Applied and Environmental Microbiology,* 77, 2727-2733.

HON, D.-S. 2017. *Chemical modification of lignocellulosic materials*, Routledge.

IBRAHIM, A. S. S. & EL-DIWANY, A. I. 2007. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences,* 1, 473-478.

IMMANUEL, G., DHANUSHA, R., PREMA, P. & PALAVESAM, A. 2006. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *International Journal of Environmental Science Technology,* 3, 25-34.

IRFAN, M., IRFAN, U., RAZZAQ, Z., SYED, Q. & NADEEM, M. 2011. Utilization of agricultural wastes as a substrate for carboxymethyl cellulase production from *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine,* 5, 464-471.

IRFAN, M., TAYYAB, A., HASAN, F., KHAN, S., BADSHAH, M. & SHAH, A. A. 2017. Production and characterization of organic solvent-tolerant cellulase from *Bacillus amyloliquefaciens* AK9 isolated from hot spring. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 182, 1390-1402.

ISLAM, F. & ROY, N. 2018. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. *BMC Research Notes,* 11, 445-450.

JEONG, W. S., SEO, D. H., JUNG, J. H., JUNG, D. H., LEE, D.-W., PARK, Y.-S. & PARK, C.-S. 2017. Enzymatic characteristics of a highly thermostable β-(1-4)-glucanase from *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (KCTC 4680). *Journal of Microbiology and Biotechnology,* 27, 271-276.

JO, K.-I., LEE, Y.-J., KIM, B.-K., LEE, B.-H., CHUNG, C.-H., NAM, S.-W., KIM, S.-K. & LEE, J.-W. 2008. Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering,* 13, 1-7.

JUTURU, V. & WU, J. C. 2014. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renewable Sustainable Energy Reviews,* 33, 188-203.

KARIM, A., NAWAZ, M. A., AMAN, A. & QADER, S. A. U. 2015. Hyper production of cellulose degrading endo (1, 4) β-d-glucanase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB2. *Journal of Radiation Research Applied Sciences,* 8, 160-165.

KIIO, I. K., JACKIM, M. F., MUNYALI, W. B. & MUGE, E. K. 2016. Isolation and Characterization of a Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* Strain Vic Isolated from Geothermal Wells in the Kenyan Rift Valley. *The Open Biotechnology Journal,* 10, 198-207.

KIM, Y.-K., LEE, S.-C., CHO, Y.-Y., OH, H.-J. & KO, Y. H. 2012. Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. *ISRN Microbiology*, 1-9.

KORPOLE, S., SHARMA, R. & VERMA, D. 2011. Characterization and phylogenetic diversity of carboxymethyl cellulase producing *Bacillus* species from a landfill ecosystem. *Indian Journal of Microbiology,* 51, 531-535.

KOTCHONI, O. D., SHONUKAN, O. & GACHOMO, W. 2003. *Bacillus pumilus* BpCRI 6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. *African Journal of Biotechnology,* 2, 140-146.

KUMAR, D. M., POOVAI, P., PUNEETH KUMAR, C., SAROJA, Y. S., MAINMARAN, A. & KALAICHELVAN, P. 2012. Optimization of *Bacillus cereus* MRKI cellulase production and its bio stoning activity. *Scholars Research Library,* 4, 881-888.

LATIF, S. & MüLLER, J. 2014. Cassava–How to explore the "all-sufficient". *Ruralia,* 21, 30-31.

LEE, Y.-J., KIM, B.-K., LEE, B.-H., JO, K.-I., LEE, N.-K., CHUNG, C.-H., LEE, Y.-C. & LEE, J.-W. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology,* 99, 378-386.

LI, Z., WANG, L., HUA, J., JIA, S., ZHANG, J. & LIU, H. 2015. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers,* 120, 115-119.

LIANG, Y.-L., ZHANG, Z., WU, M., WU, Y. & FENG, J.-X. 2014. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *BioMed Research International*, 1-13.

LISDIYANTI, P., SUYANTO, E., GUSMAWATI, N. F. & RAHAYU, W. 2012. Isolation and characterization of cellulase produced by cellulolytic bacteria from peat soil of Ogan Komering Ilir, South Sumatera. *International Journal of Environment and Bioenergy,* 3, 145-153.

LU, Y., ZHANG, Y.-H. P. & LYND, L. R. 2006. Enzyme–microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 103, 16165-16169.

LüTZEN, N., NIELSEN, M., OXENBOELL, K., SCHüLEIN, M. & STENTEBJERG-OLESEN, B. 1983. Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences,* 300, 283-291.

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, 506-577.

MAKI, M., LEUNG, K. T. & QIN, W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences,* 5, 500-516.

MANDELS, M. 1985. Applications of cellulases. *Biochemical Society Transactions,* 13, 414–419.

NAGENDRAN, S., HALLEN-ADAMS, H. E., PAPER, J. M., ASLAM, N. & WALTON, J. D. 2009. Reduced genomic potential for secreted plant cell-wall-degrading enzymes in the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera*, based on the secretome of *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology,* 46, 427-435.

NAIK, S., GOUD, V. V., ROUT, P. K., JACOBSON, K. & DALAI, A. K. 2010. Characterization of Canadian biomass for alternative renewable biofuel. *Renewable Energy,* 35, 1624-1631.

NANDIMATH, A. P., KHARAT, K. R., GUPTA, S. G. & KHARAT, A. S. 2016. Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. *African Journal of Microbiology Research,* 10, 410-419.

PARK, T., SEO, S., SHIN, T., CHO, B.-W., CHO, S., KIM, B., LEE, S., HA, J. K. & SEO, J. 2018. Molecular cloning, purification, expression, and characterization of β-1, 4-endoglucanase gene (Cel5A) from *Eubacterium cellulosolvens* sp. isolated from Holstein steers' rumen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,* 31, 607-615.

PARVEEN, A., ARCHANA, D., GUNAJIT, G., MADHUMITA, B. & CHANDRA, B. 2016. Cellulase producing thermophilic bacteria from hot spring of Assam. *International Journal of Microbiology Research* 8, 776-780.

PATTIYA, A. 2011. Thermochemical characterization of agricultural wastes from Thai cassava plantations. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, Environmental Effects,* 33, 691-701.

PIYACHOMKWAN, K. & TANTICHAROEN, M. 2011. Cassava Industry in Thailand: Prospects. *The Journal of the Royal Institute of Thailand,* 3, 160-170.

PONPIUM, P., RATANAKHANOKCHAI, K. & KYU, K. L. 2000. Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic *Bacteroides* sp. strain P-1. *Enzyme and Microbial Technology,* 26, 459-465.

POULSEN, H. V., WILLINK, F. W. & INGVORSEN, K. 2016. Aerobic and anaerobic cellulase production by *Cellulomonas uda*. *Archives of Microbiology,* 198, 725-735.

RACHAMONTREE, P. 2017. Screening of thermophilic and halophilic cellulase – producing bacteria from saline soil samples. *Pawarun Agriculture Journal,* 14, 285-294.

RAI, P., TIWARI, S. & GAUR, R. 2012. Optimization of process parameters for cellulase production by novel thermotolerant yeast. *BioResources,* 7, 5401-5414.

RAMIN, M., ALIMON, A. & ABDULLAH, N. 2009. Identification of cellulolytic bacteria isolated from the termite *Coptotermes curvignathus* (Holmgren). *Journal of Rapid Methods Automation in Microbiology,* 17, 103-116.

RANI, D. S. & NAND, K. 2000. Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702. *Process Biochemistry,* 36, 355-362.

RANI, D. S., THIRUMALE, S. & NAND, K. 2004. Production of cellulase by *Clostridium papyrosolvens* CFR-703. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 20, 629-632.

RASTOGI, G., MUPPIDI, G. L., GURRAM, R. N., ADHIKARI, A., BISCHOFF, K. M., HUGHES, S. R., APEL, W. A., BANG, S. S., DIXON, D. J. & SANI, R. K. 2009. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 36, 585-598.

RASUL, F., AFROZ, A., RASHID, U., MEHMOOD, S., SUGHRA, K. & ZEESHAN, N. 2015. Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry. *International Journal of Biosciences,* 6, 230-236.

RAY, A., BAIRAGI, A., GHOSH, K. S. & SEN, S. 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica et Piscatoria,* 1, 47-53.

REDDY, K., LAKSHMI, T., REDDY, A., BINDU, V. & NARASU, M. 2016. Isolation, screening, identification and optimized production of extracellular cellulase from *Bacillus subtilis* sub. sps using cellulosic waste as carbon source. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,* 5, 442-451.

RYTIOJA, J., HILDEN, K., YUZON, J., HATAKKA, A., DE VRIES, R. P. & MAKELA, M. R. 2014. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 78, 614-649.

SADHU, S. & MAITI, T. K. 2013. Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiology Research Journal,* 3, 235.

SáNCHEZ-HERRERA, L. M., RAMOS-VALDIVIA, A. C., DE LA TORRE, M., SALGADO, L. M. & PONCE-NOYOLA, T. 2007. Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 77, 589-595.

SARATALE, G. D., SARATALE, R. G., LO, Y. C. & CHANG, J. S. 2010. Multicomponent cellulase production by *Cellulomonas biazotea* NCIM□2550 and its applications for cellulosic biohydrogen production. *Biotechnology Progress,* 26, 406-416.

SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S. & AIKAT, K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy,* 37, 19-27.

SAVELLI, C. J., BRADSHAW, A., BEN EMBAREK, P. & MATEUS, C. 2019. The FAO/WHO international food safety authorities network in review, 2004-2018: Learning from the past and looking to the future. *Foodborne Pathogens and Disease*, 480-488.

SAXENA, H., HSU, B., DE ASIS, M., ZIERKE, M., SIM, L., WITHERS, S. G. & WAKARCHUK, W. 2017. Characterization of a thermostable endoglucanase from *Cellulomonas fimi* ATCC484. *Biochemistry and Cell Biology,* 96, 68-76.

SETHI, S., DATTA, A., GUPTA, B. L. & GUPTA, S. 2013. Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN biotechnology,* 2013, 1-7.

SHAIKH, N., PATEL, A., MEHTA, S. & PATEL, N. 2013. Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. *Universal Journal of Environmental Research Technology,* 3, 39-49.

SHANKAR, T. & ISAIARASU, L. 2011. Cellulase production by *Bacillus pumilus* EWBCM1 under varying cultural conditions. *Middle-East Journal of Scientific Research,* 8, 40-45.

SHINKAI, T., MATSUMOTO, N. & KOBAYASHI, Y. 2007. Ecological characterization of three different phylogenetic groups belonging to the cellulolytic bacterial species *Fibrobacter succinogenes* in the rumen. *Animal Science Journal,* 78, 503-511.

SINGH, A. & HAYASHI, K. 1995. *Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties, and biosynthesis*, Elsevier, New York.

SINGH, S., MOHOLKAR, V. S. & GOYAL, A. 2013. Isolation, identification, and characterization of a cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 from rhinoceros dung. *ISRN Microbiology,* 2013, 1-7.

SINGH, V. K. & KUMAR, A. 1998. Production and purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis* VS-1. *Biochemistry and Molecular Biology International,* 45, 443-452.

SOARES, F. L., JR., MELO, I. S., DIAS, A. C. & ANDREOTE, F. D. 2012. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 28, 2195-2203.

SOARES JúNIOR, F. L., DIAS, A. C. F., FASANELLA, C. C., TAKETANI, R. G., LIMA, A. O. D. S., MELO, I. S. & ANDREOTE, F. D. 2013. Endo-and exoglucanase activities in bacteria from mangrove sediment. *Brazilian Journal of Microbiology,* 44, 969-976.

SU, X., MACKIE, R. I. & CANN, I. K. 2012. Biochemical and mutational analyses of a multidomain cellulase/mannanase from *Caldicellulosiruptor bescii*. *Applied and Environmental Microbiology,* 78, 2230-2240.

TANSEY, M. R. 1971. Isolation of thermophilic fungi from self-heated, industrial wood chip piles. *Mycologia,* 63, 537-547.

TEATHER, R. M. & WOOD, P. J. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology,* 43, 777-780.

TEERI, T. T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology,* 15, 160-167.

THAZ, C. J., LAVANYA, B., KUMAR, P. & JAYARAMAN, G. 2015. Production and characterization of a halotolerant cellulase from *Bacillus aquimaris* VITP4 strain. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences,* 5, 412-424.

TOURNA, M., FREITAG, T. E., NICOL, G. W. & PROSSER, J. I. 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology,* 10, 1357-1364.

VAN ZYL, W. H. 1985. A study of the cellulases produced by three mesophilic actinomycetes grown on bagasse as substrate. *Biotechnology Bioengineering,* 27, 1367-1373.

WANG, S., LU, A. & ZHANG, L. 2016. Recent advances in regenerated cellulose materials. *Progress in Polymer Science,* 53, 169-206.

WIKE, C. R., MAIORELLA, B., SCIAMANNA, A., TANGNU, K., WILEY, D. & WONG, H. 1980. *Enzymatic hydrolysis of cellulose: theory and applications*, Noyes Data Corporation, New Jersey.

YANG, W., MENG, F., PENG, J., HAN, P., FANG, F., MA, L. & CAO, B. 2014. Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the Tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology,* 17, 262-267.

YE, M., SUN, L., YANG, R., WANG, Z. & QI, K. 2017. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed. *Royal Society Open Science,* 4, 1-12.

YIN, L.-J., LIN, H.-H. & XIAO, Z.-R. 2010. Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Marine Science Technology,* 18, 466-471.

ZHANG, Y.-H. P., HIMMEL, M. E. & MIELENZ, J. R. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances,* 24, 452-481.

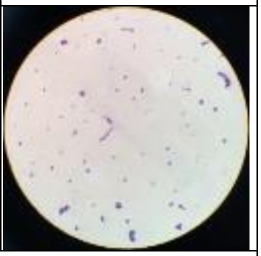
ZHOU, S. & INGRAM, L. O. 2000. Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (celz and cely) from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology,* 182, 5676-5682.

ภาคผนวก

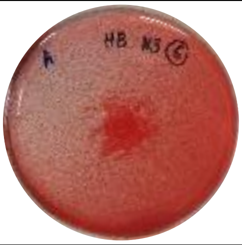
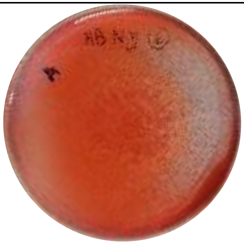
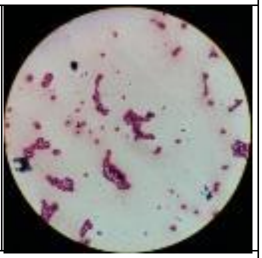
ภาคผนวก ก

- แสดงผลการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนสับสเตรต Avicel, Cellobiose และ CMC และลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- แสดงค่าสัดส่วน ratio ระหว่างโคโลนีแบคทีเรียและส่วนใสที่เกิดขึ้นในสับสเตรตทั้ง 3 ชนิด
- แสดงค่าสัดส่วน ratio ระหว่างโคโลนีแบคทีเรียและส่วนใสที่เกิดขึ้น เมื่อบ่มที่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส
- แสดงค่าสัดส่วน ratio ระหว่างโคโลนีแบคทีเรียและส่วนใสที่เกิดขึ้น เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในอาหารที่ปรับ pH เป็น 5, 6, 7, 8
- แสดงผลน้ำหนักของ Filter paper ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อผ่านการบ่ม 28 วัน
- ผลการนับเชื้อแบคทีเรียบนใบมันสำปะหลังที่ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์
- แสดงค่าดูดกลืนแสงของแบคทีเรียที่ 540 nm

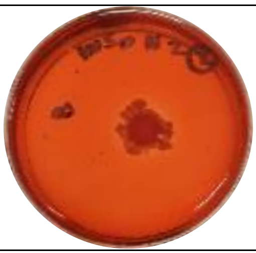
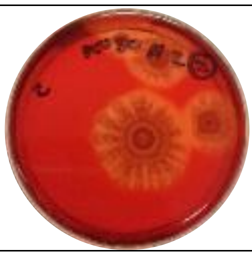
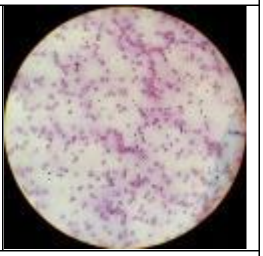
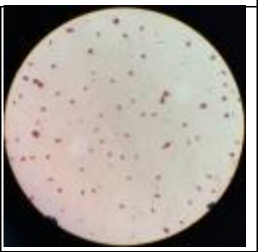
HT 0 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N4; *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

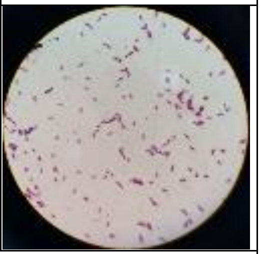
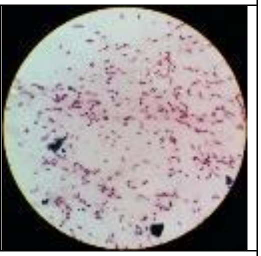
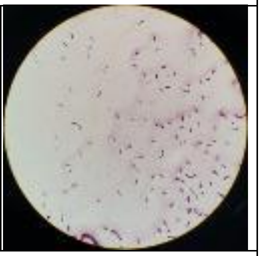
HB 0 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N3 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
N5 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

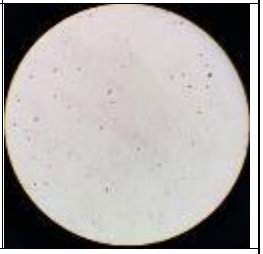
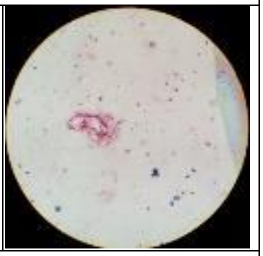
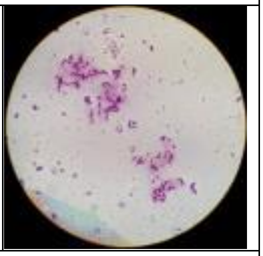
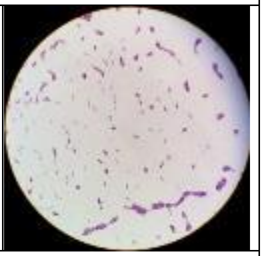
KU 50 3 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N2 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
N5 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
N7 : *Bacillus velezensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
N8 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

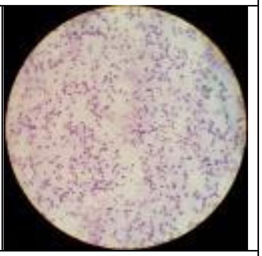
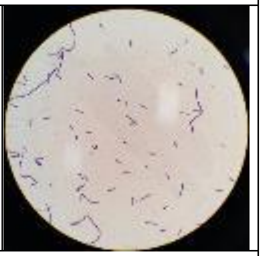
KU 50 3 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N12 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
N16 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, และ CMC			
			
N17 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N22 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

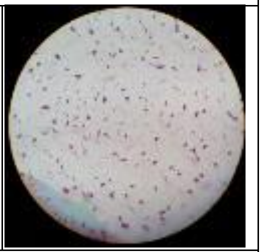
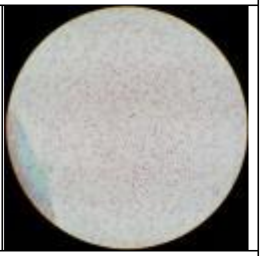
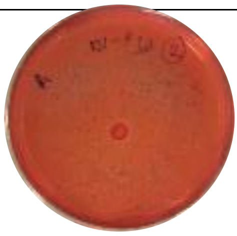
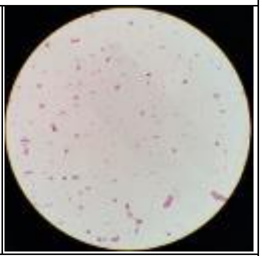
KU 50 3 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N23 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N24 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
N34 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
N40 : *Bacillus safensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

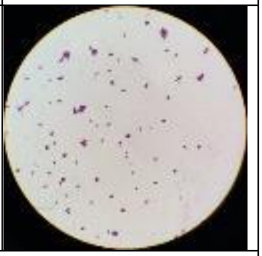
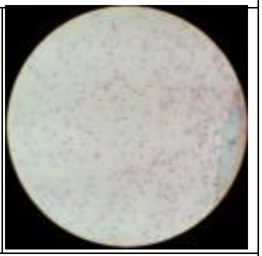
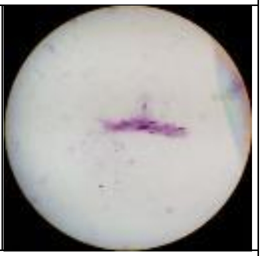
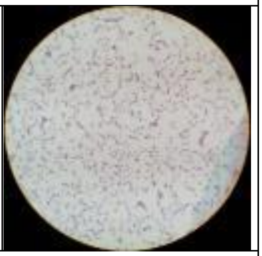
KU 50 3 เดือน (ต่อ)

<table>
<tr><td>Avicel</td><td>Cellobiose</td><td>CMC</td><td>Gram staining</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr>
<tr><td colspan="4">N41: Bacillus amyloliquefaciens เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">N42 : Bacillus subtilis เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr>
<tr><td colspan="4">N44: Bacillus amyloliquefaciens เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">N45: Bacillus amyloliquefaciens เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
</table>

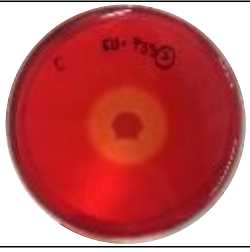
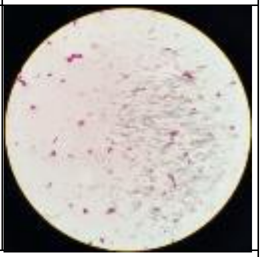
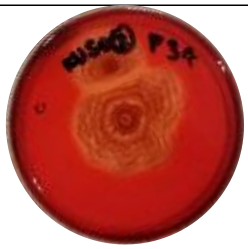
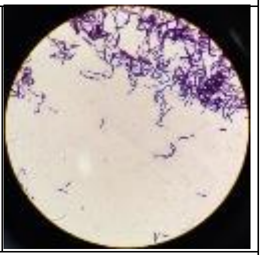
KU 50 3 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
P3 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P5 : *Bacillus pumilus* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P10 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P13 : *Bacillus safensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

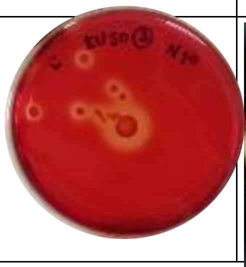
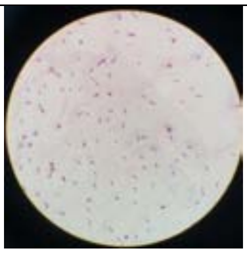
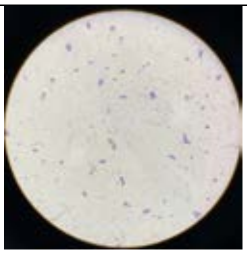
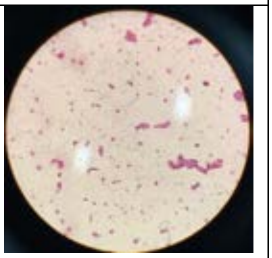
KU 50 3 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P15 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P24 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel และ CMC			
			
P30 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P32 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

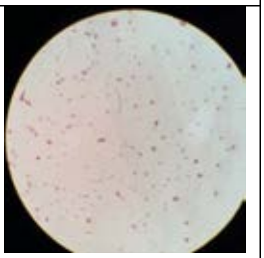
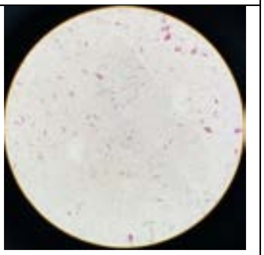
KU 50 3 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P33 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P34 : *Bacillus velezensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

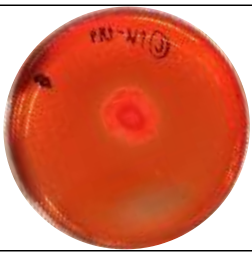
KU 50 6 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N10 : *Bacillus pumilus* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N12 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P1 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P3 : *Bacillus velezensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

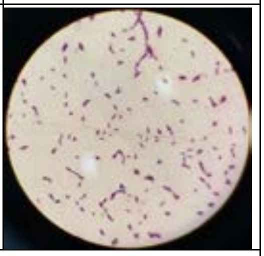
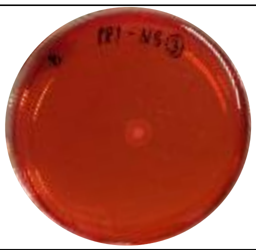
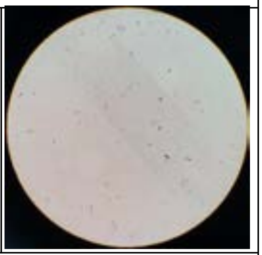
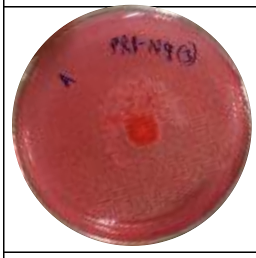
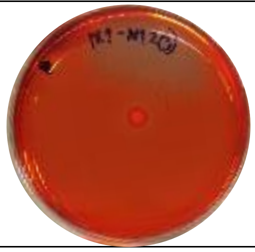
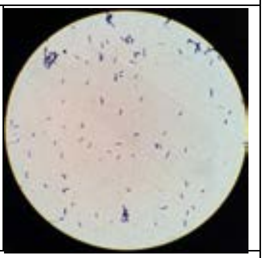
KU 50 6 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P5 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P8 : *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

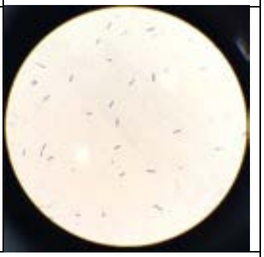
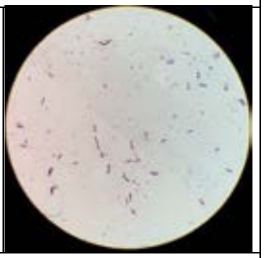
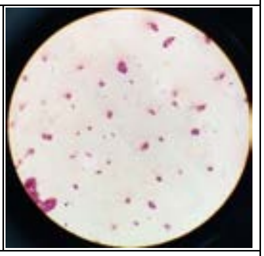
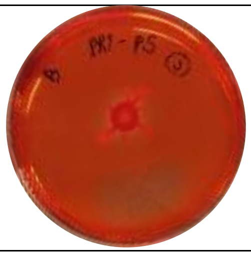
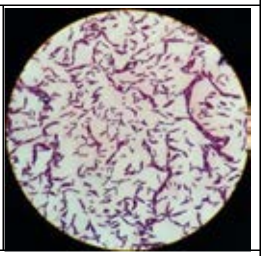
PR 1 6 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N1 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

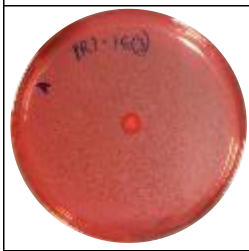
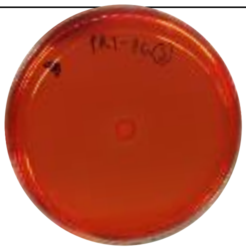
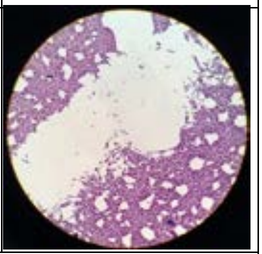
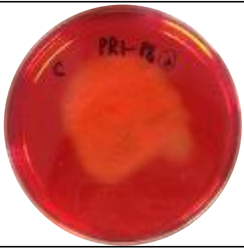
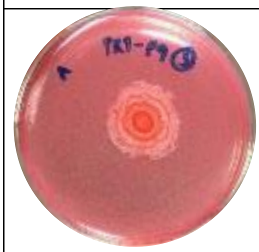
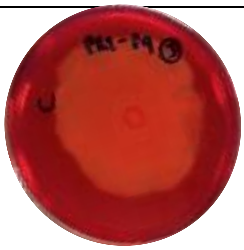
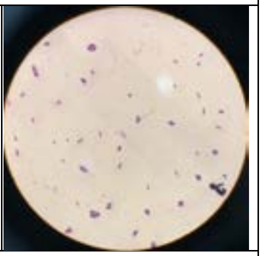
PR 1 6 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N5 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
N6 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N9 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N12 : *Bacillus aerophilus* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

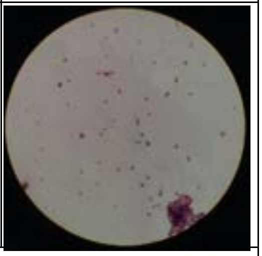
PR 1 6 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N19 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N23 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P4 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P5 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

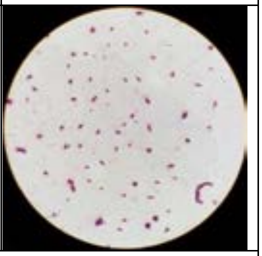
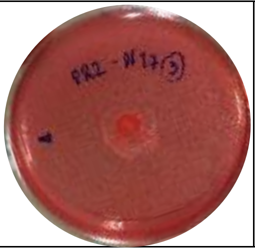
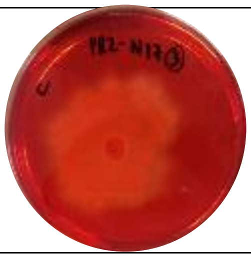
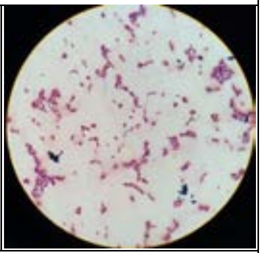
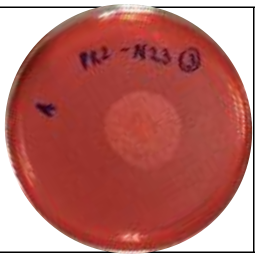
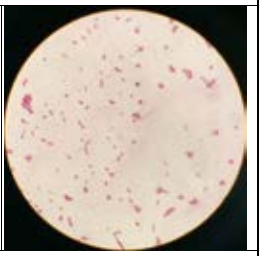
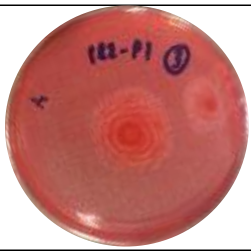
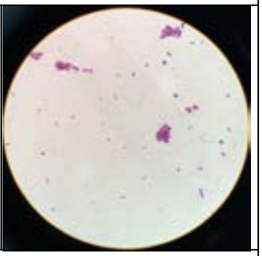
PR 1 6 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P6 : *Bacillus pumilus* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P8 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P9 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P11 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

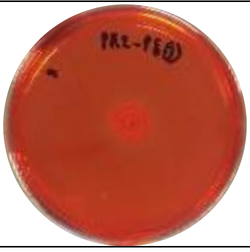
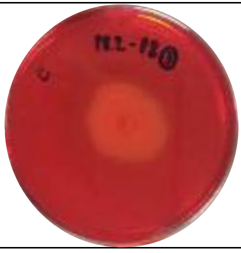
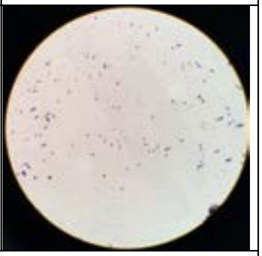
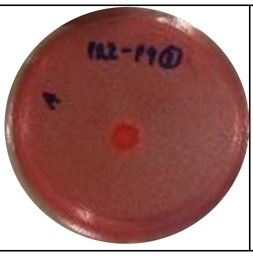
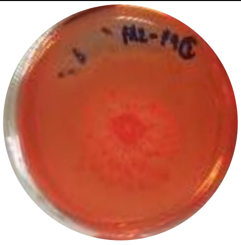
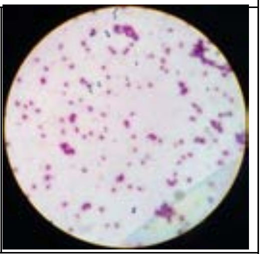
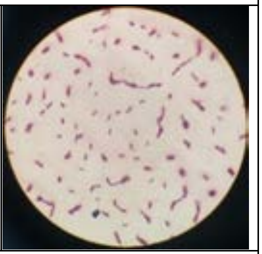
PR 1 6 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P13 : *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
P15 : *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

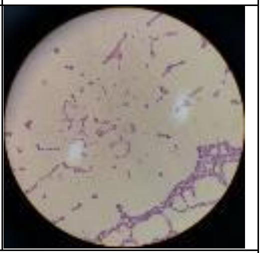
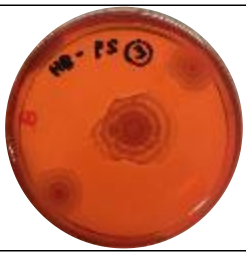
PR 2 6 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N15 : *Bacillus pumilus* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N17 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N23 : *Bacillus safensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P1 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

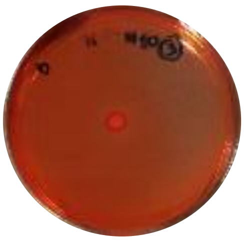
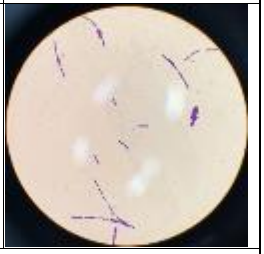
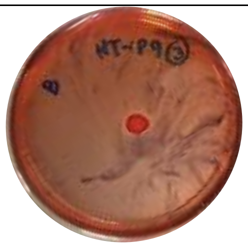
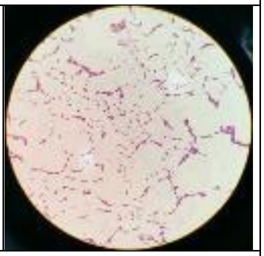
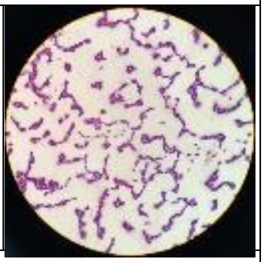
PR 2 6 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P8 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P9 : *Pseudomonas fluresсens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel และ CMC			
P17 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P20 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

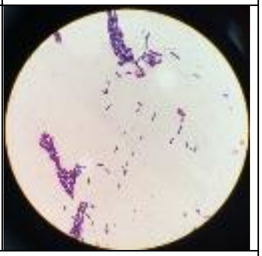
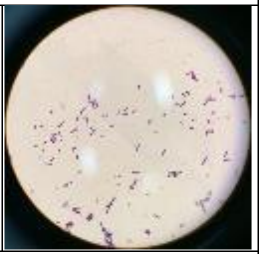
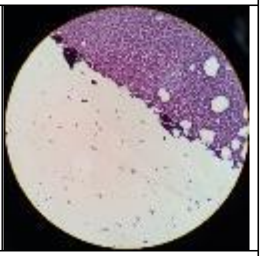
HB 60 6 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N11 : *Bacillus safensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P5 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

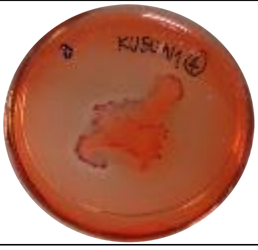
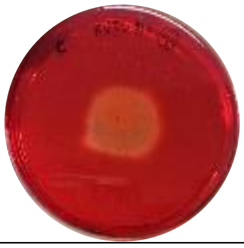
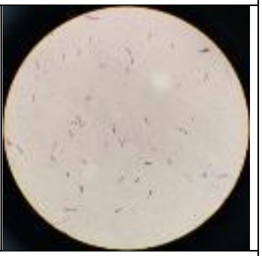
HT 6 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N10 : *Bacillus pumilus* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
N36 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P9 : *Bacillus pumilus* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P14 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

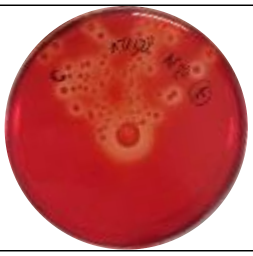
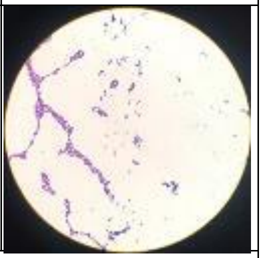
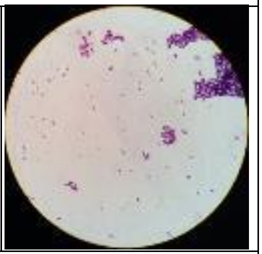
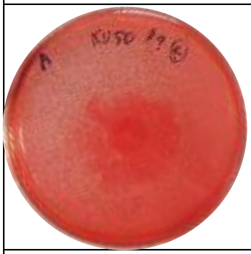
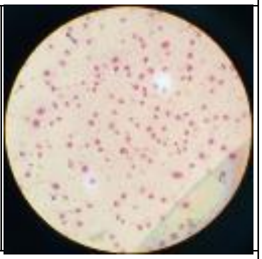
HT 6 เดือน (ต่อ)

<table>
<tr><td>Avicel</td><td>Cellobiose</td><td>CMC</td><td>Gram staining</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">P16 : Bacillus cereus เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">P17.1 : Bacillus cereus เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">P17.2 : Bacillus pumilus เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
</table>

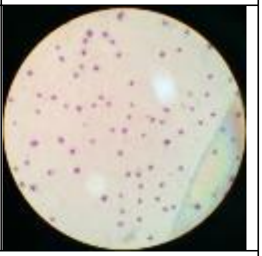
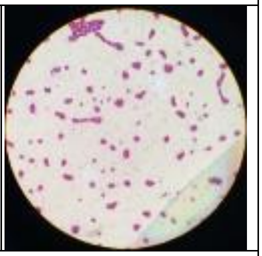
KU 50 9 เดือน

<table>
<tr><td>Avicel</td><td>Cellobiose</td><td>CMC</td><td>Gram staining</td></tr>
<tr><td> </td><td></td><td></td><td> </td></tr>
<tr><td colspan="4">N1 : Bacillus amyloliquefaciens เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr>
<tr><td colspan="4">N3 : Bacillus velezensis เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">N4 : Bacillus amyloliquefaciens เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr>
<tr><td colspan="4">N6 : Bacillus safensis เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
</table>

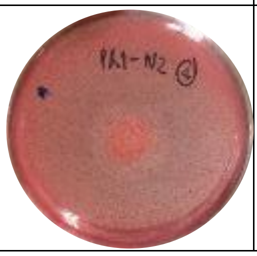
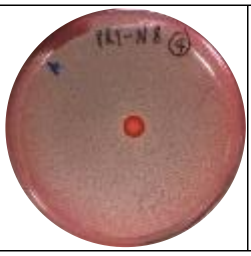
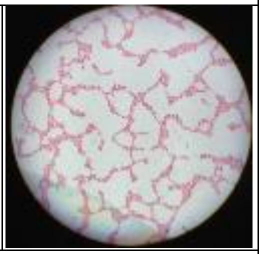
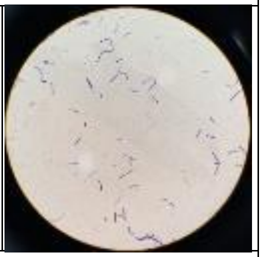
KU 50 9 เดือน (ต่อ)

<table>
<tr><td>Avicel</td><td>Cellobiose</td><td>CMC</td><td>Gram staining</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">N10 : Bacillus pumilus เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">N15 : Bacillus amyloliquefaciens เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr>
<tr><td colspan="4">P2 : Bacillus amyloliquefaciens เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
<tr><td></td><td> </td><td> </td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">P9 : Bacillus amyloliquefaciens เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC</td></tr>
</table>

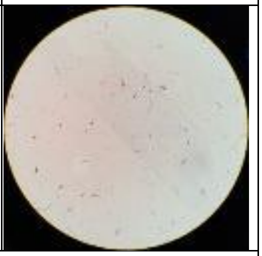
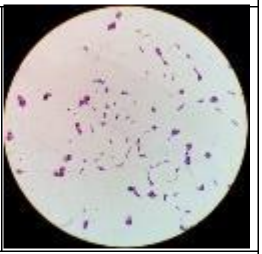
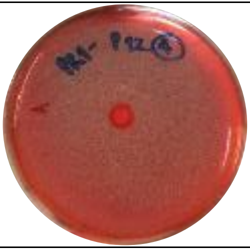
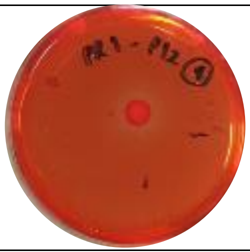
KU 50 9 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P10 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P11 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
P12 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

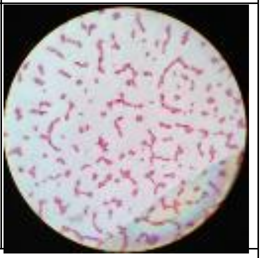
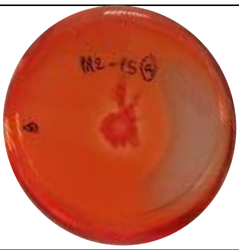
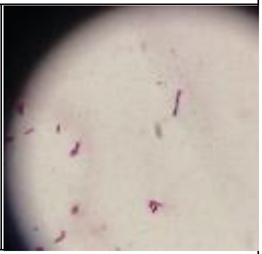
PR1 9 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N2 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel และ CMC			
			
N8 : *Bacillus safensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
N14 : *Bacillus pumilus* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P3 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

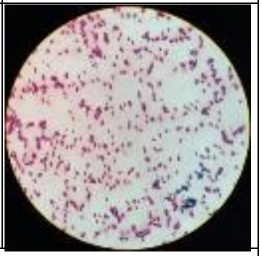
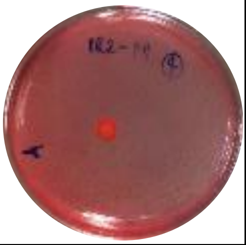
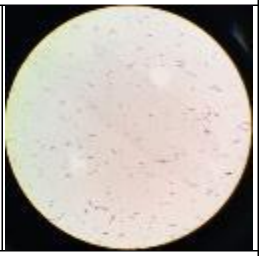
PR1 9 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P4 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P6 : *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P12 : *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

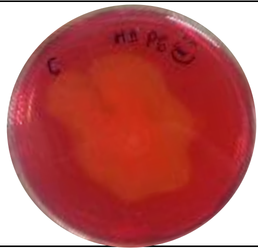
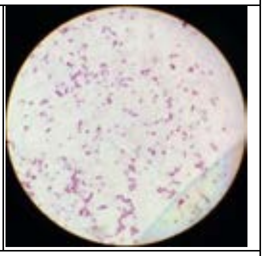
PR2 9 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N11 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
P3 : *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
P4 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P5 : *Bacillus velezensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

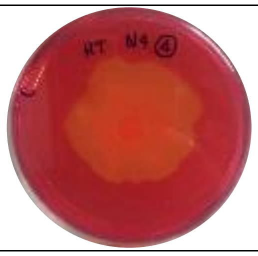
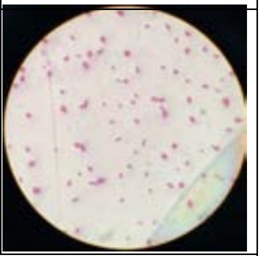
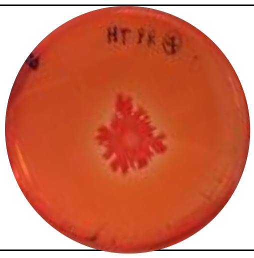
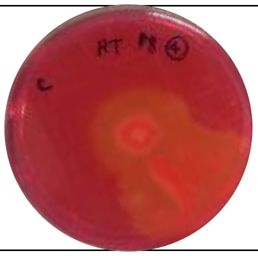
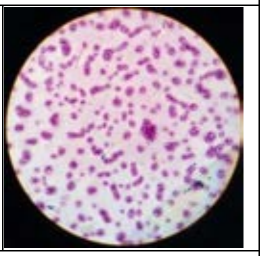
PR2 9 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P8 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P11 : *Bacillus pumilus* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
P12 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

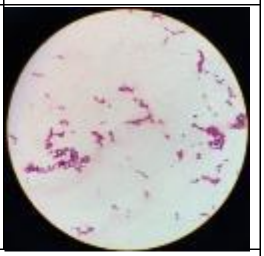
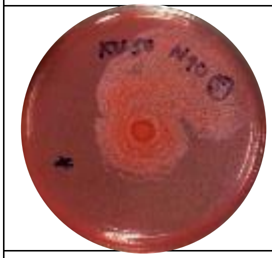
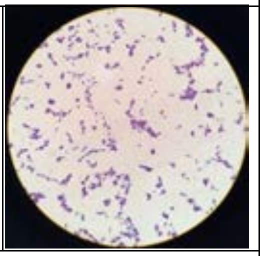
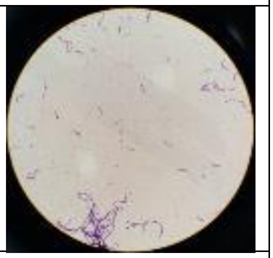
HB 9 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
N1 : *Bacillus safensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P6 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

HT 9 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N4 : *Bacillus siamensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P8 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

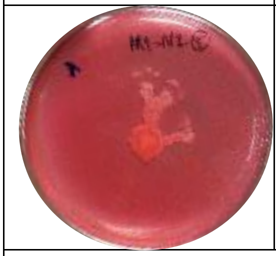
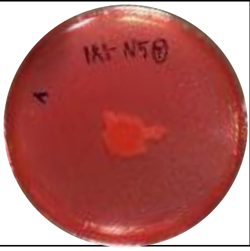
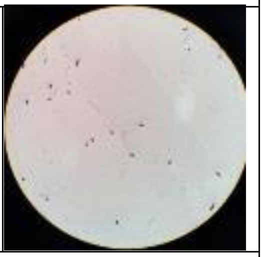
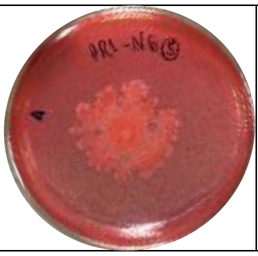
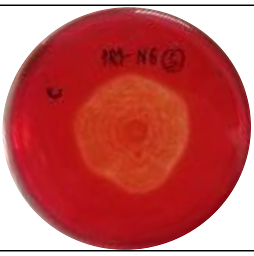
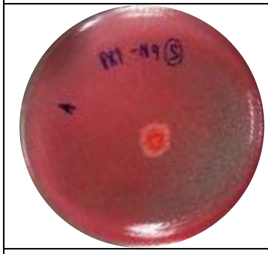
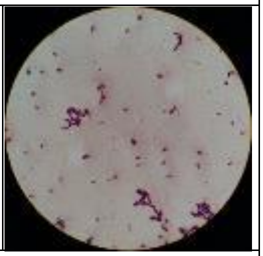
KU 50 12 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N5 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N10 : *Lysinibacillus fusiformis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
P1 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P8 : *Bacillus siamensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

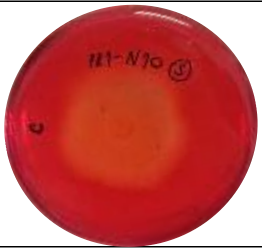
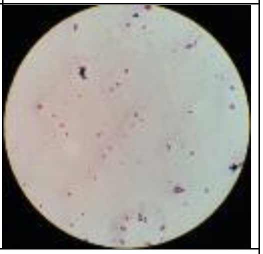
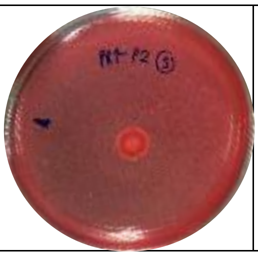
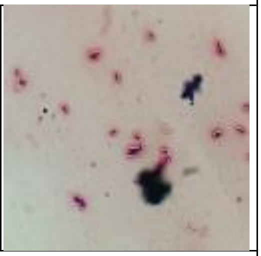
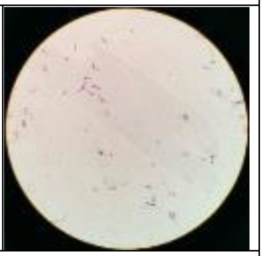
KU 50 12 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
P9 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

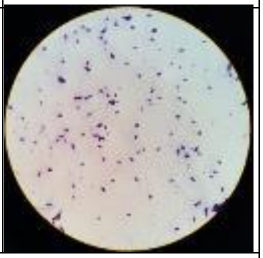
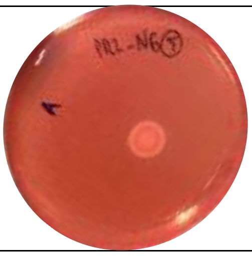
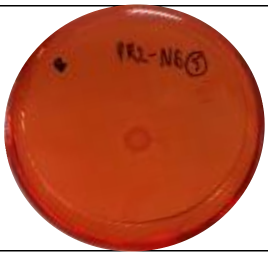
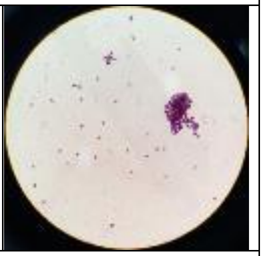
PR1 12 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N2 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel และ CMC			
			
N5 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
N6 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
N9 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

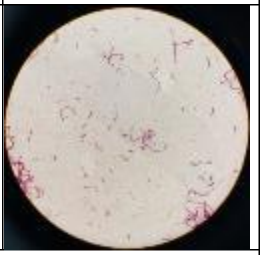
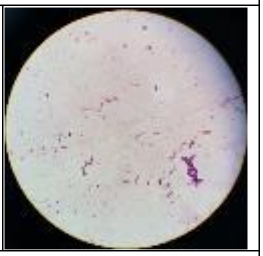
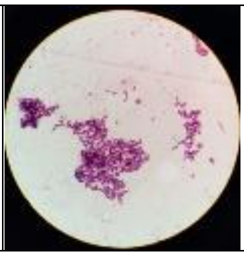
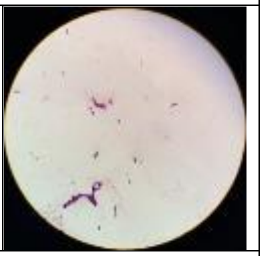
PR1 12 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N10 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P2 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel และ CMC			
P4 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P8 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

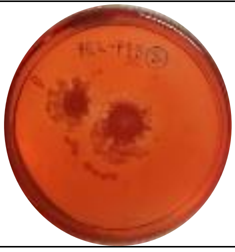
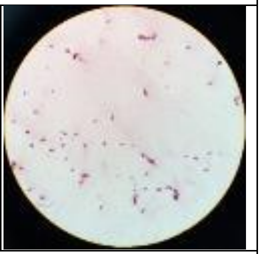
PR2 12 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N5 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
N6 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
N12 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
N14 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

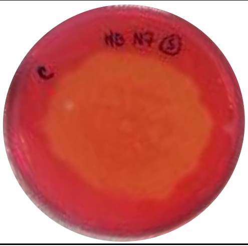
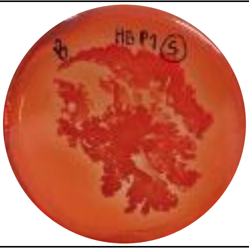
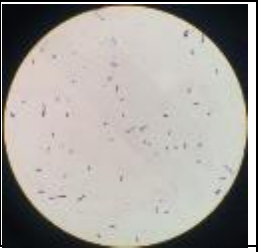
PR2 12 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
P2 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			
			
P4 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P7 : *Bacillus velezensis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P8 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

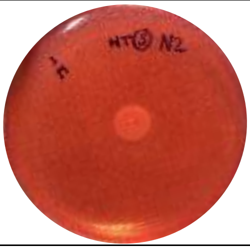
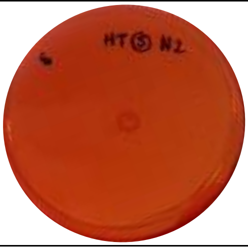
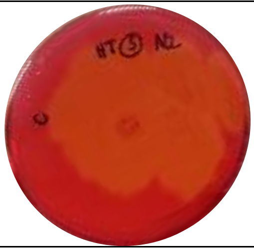
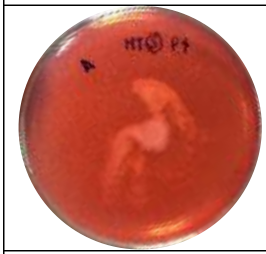
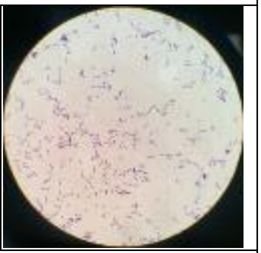
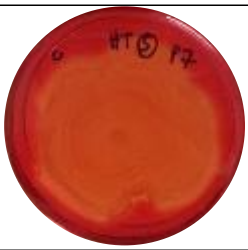
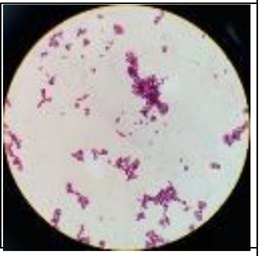
PR2 12 เดือน (ต่อ)

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
P11 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P13 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

HB 12 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N7 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P1 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P5 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			

HT 12 เดือน

Avicel	Cellobiose	CMC	Gram staining
			
N2 : *Bacillus subtilis* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel และ CMC			
			
P4 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรตเซลโลไบโอส และ CMC			
			
P7 : *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสในสับสเตรต Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC			

ตารางแสดงค่าสัดส่วน ratio ระหว่างโคโลนีแบคทีเรียและส่วนใสที่เกิดขึ้นในสับสเตรตทั้ง 3 ชนิด

รอบ 0 เดือน

ไอโซเลทแบคทีเรีย	Ratio ในอาหาร Avicel	Ratio ในอาหารเซลโลไบโอส	Ratio ในอาหาร CMC
HT-N4	ไม่มี	1	1
HB-N3	ไม่มี	1	1
HB-N5	ไม่มี	1	1

รอบ 3 เดือน

ไอโซเลทแบคทีเรีย	Ratio ในอาหาร Avicel	Ratio ในอาหารเซลโลไบโอส	Ratio ในอาหาร CMC
KU50-N2	1.46	1	1
KU50-N5	ไม่มี	1	1
KU50-N7	ไม่มี	1	1
KU50-N8	ไม่มี	1	1
KU50-N12	ไม่มี	1	1
KU50-N16	1.33	ไม่มี	1
KU50-N17	1	1	1
KU50-N22	ไม่มี	1	1
KU50-N23	1.43	1	1
KU50-N24	ไม่มี	1	1
KU50-N34	ไม่มี	1	1
KU50-N40	1	1.17	1.3
KU50-N41	1	1	1
KU50-N42	1	1	1
KU50-N44	1.18	1	1
KU50-N45	1	1	1
KU50-P3	1	1	1.3

รอบ 3 เดือน (ต่อ)

ไอโซเลทแบคทีเรีย	Ratio ในอาหาร Avicel	Ratio ในอาหารเซลโลไบโอส	Ratio ในอาหาร CMC
KU50-P5	1	1	1.8
KU50-P10	ไม่มี	1	1
KU50-P13	1.25	1	1.1
KU50-P15	1	1	1
KU50-P24	1.54	ไม่มี	1
KU50-P30	1	1	1.27
KU50-P32	1.33	1	1
KU50-P33	1.12	1.13	2.29
KU50-P34	1.47	1	1

รอบ 6 เดือน

ไอโซเลทแบคทีเรีย	Ratio ในอาหาร Avicel	Ratio ในอาหารเซลโลไบโอส	Ratio ในอาหาร CMC
KU50-N10	1	1	2
KU50-N12	ไม่มี	1	1
KU50-P1	ไม่มี	1	1
KU50-P3	1	1	1
KU50-P5	1	1	1
KU50-P8	1	1.5	2.8
PR1-N1	1	1	1.14
PR1-N5	ไม่มี	1	1
PR1-N6	1	1	1
PR1-N9	1	1	1
PR1-N12	1	1	2
PR1-N19	1	1	1
PR1-N23	ไม่มี	1	1
PR1-P4	ไม่มี	1	1.26
PR1-P5	1	1	1
PR1-P6	1	1.2	2.2
PR1-P8	ไม่มี	1	1
PR1-P9	ไม่มี	1.4	1
PR1-P11	1	1.25	1.7
PR1-P13	1.16	1	3
PR1-P15	1	1.4	3

รอบ 6 เดือน (ต่อ)

ไอโซเลทแบคทีเรีย	Ratio ในอาหาร Avicel	Ratio ในอาหารเซลโลไบโอส	Ratio ในอาหาร CMC
PR2-N15	1	1.2	1.8
PR2-N17	1	1	1
PR2-N23	1	1	1
PR2-P1	1	1	1
PR2-P8	1	1.1	1
PR2-P9	1	ไม่มี	1
PR2-P17	ไม่มี	1	1.2
PR2-P20	1	1	1
HB-N11	1	1	2.6
HB-P5	1.33	1	1
HT-N10	1	1	2
HT-N36	ไม่มี	1.1	1
HT-P9	1	1.2	2
HT-P14	1.38	1	1
HT-P16	2	ไม่มี	1
HT-P17.1	6.6	ไม่มี	1.25
HT-P17.2	1	1.33	1.5

รอบ 9 เดือน

ไอโซเลทแบคทีเรีย	Ratio ในอาหาร Avicel	Ratio ในอาหารเซลโลไบโอส	Ratio ในอาหาร CMC
KU50-N1	ไม่มี	1	1
KU50-N3	1	1	1
KU50-N4	1	1	1
KU50-N6	1	1	1.8
KU50-N10	1	1	2.4
KU50-N15	1	1	1
KU50-P2	ไม่มี	1	1
KU50-P9	ไม่มี	1	1
KU50-P10	1	1	1
KU50-P11	1	1	1
KU50-P12	ไม่มี	1	1
PR1-N2	1.6	ไม่มี	1
PR1-N8	1.4	1	2
PR1-N14	1	1	2
PR1-P3	1.75	1	1
PR1-P4	ไม่มี	1	1
PR1-P6	2.67	1	2.43
PR1-P12	1	2	2.71
PR2-N11	ไม่มี	1	1
PR2-P3	1	1.2	2.25
PR2-P4	1	1	1
PR2-P5	ไม่มี	1	1
PR2-P8	1	1	1.13

รอบ 9 เดือน (ต่อ)

ไอโซเลทแบคทีเรีย	Ratio ในอาหาร Avicel	Ratio ในอาหารเซลโลไบโอส	Ratio ในอาหาร CMC
PR2-P11	1.25	1.4	1
PR2-P12	1	1	1
HB-N1	1	1	2.2
HB-P6	ไม่มี	1	1
HT-N4	1	1	1
HT-P8	1	1	1.8

รอบ 12 เดือน

ไอโซเลทแบคทีเรีย	Ratio ในอาหาร Avicel	Ratio ในอาหารเซลโลไบโอส	Ratio ในอาหาร CMC
KU50-N5	1	1	1
KU50-N10	ไม่มี	1	1
KU50-P1	1	1	1.1
KU50-P8	1	1	1.09
KU50-P9	ไม่มี	1	1
PR1-N2	1	ไม่มี	1
PR1-N5	1	1	1
PR1-N6	ไม่มี	1	1
PR1-N9	ไม่มี	1	1
PR1-N10	ไม่มี	1.22	1
PR1-P2	1	ไม่มี	1
PR1-P4	1	1	1
PR1-P8	ไม่มี	1	1
PR2-N5	ไม่มี	1	1
PR2-N6	1	1.14	1
PR2-N12	1	1	1.14
PR2-N14	1	1	1
PR2-P2	1	1.11	1.5
PR2-P4	ไม่มี	1	1.3
PR2-P7	ไม่มี	1	1
PR2-P8	ไม่มี	1	1
PR2-P11	ไม่มี	1	1
PR2-P13	ไม่มี	1	1

รอบ 12 เดือน (ต่อ)

ไอโซเลทแบคทีเรีย	Ratio ในอาหาร Avicel	Ratio ในอาหารเซลโลไบโอส	Ratio ในอาหาร CMC
HB-N7	ไม่มี	1	1
HB-P1	ไม่มี	1	1
HB-P5	ไม่มี	1	1
HT-N2	1	ไม่มี	1
HT-P4	ไม่มี	1	1
HT-P7	1	1	1

แสดงค่าสัดส่วน ratio ระหว่างโคโลนีแบคทีเรียและส่วนใสที่เกิดขึ้น เมื่อบ่มที่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

สับสเตรต Avicel

	B. *amyloliquefaciens*			B. *pumilus*			*Paenibacillus kribbensis*		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
30°c	1	1	1	0	0	0	1	1	1
37°c	1.2	1.2	1.2	1.25	1.25	1.25	1.2	1.2	1.2
40°c	1	1	1	1	1	1	1	1	1

สับสเตรต cellobiose

	B. *amyloliquefaciens*			B. *pumilus*			*Paenibacillus kribbensis*		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
30°c	1.2	1.2	1.2	0	0	0	1	1	1
37°c	1	1	1	1.2	1.2	1.2	3.75	3.75	3.75
40°c	1	1	1	2.5	2.5	2.5	2	2	2

สับสเตรต CMC

	B. *amyloliquefaciens*			B. *pumilus*			*Paenibacillus kribbensis*		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
30°c	1.3	1.3	1.3	1.5	1.5	1.5	2	2	2
37°c	1.14	1.14	1.14	1.33	1.33	1.33	3.0	3.0	3.0
40°c	1.5	1.5	1.5	1.25	1.25	1.25	2.375	2.375	2.375

แสดงค่าสัดส่วน ratio ระหว่างโคโลนีแบคทีเรียและส่วนใสที่เกิดขึ้น เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ปรับ pH เป็น 5, 6, 7, 8

<u>สับสเตรต Avicel</u>

	B. *amyloliquefaciens*			B. *pumilus*			*Paenibacillus kribbensis*		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
pH 5	0	0	0	1	1	1	3	3	3
pH 6	0	0	0	0	0	0	1.4	1.4	1.4
pH 7	0	0	0	2.2	0	0	1.5	1.5	1.5
pH 8	0	0	0	0	0	0	1	1	1

<u>สับสเตรต cellobiose</u>

	B. *amyloliquefaciens*			B. *pumilus*			*Paenibacillus kribbensis*		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
pH 5	1	1	1	1	1	1	1.25	1.25	1.25
pH 6	1	1	1	1	1	1	1.33	1.38	1.33
pH 7	1	1	1	2.5	2.5	2.5	1.7	1.7	1.7
pH 8	1	1	1	1.3	1.3	1.3	1	1	1

<u>สับสเตรต CMC</u>

	B. *amyloliquefaciens*			B. *pumilus*			*Paenibacillus kribbensis*		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
pH 5	1.15	1.2	1.16	1.125	1	1	3.3	3.2	3.2
pH 6	1.04	1.05	1.05	1	1	1	2.69	2.69	2.69
pH 7	1.13	1.05	1.05	1.5	1.5	1.5	2.8	2.8	2.9
pH 8	1.05	1.05	1.05	1.1	1.1	1.1	2.375	2.570	2.375

ตารางแสดงผลน้ำหนักของ Filter paper ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อผ่านการบ่ม 28 วัน

ชนิดของแบคทีเรีย	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2	
	0 วัน	28 วัน	0 วัน	28 วัน
Control 1	0.0216	0.0216	0.0221	0.2220
Control 2	0.0203	0.0202	0.0208	0.0208
Amy 1	0.0218	0.0212	0.0217	0.0209
Amy 2	0.0214	0.0209	0.0201	0.0200
Pu 1	0.0206	0.0210	0.0208	0.0212
Pu 2	0.0208	0.0209	0.0209	0.0209
Pae 1	0.0212	0.0212	0.0220	0.0213
Pae 2	0.0213	0.0213	0.0210	0.0209
A + Pu 1	0.0217	0.0215	0.0223	0.0221
A + Pu 2	0.0209	0.0207	0.0208	0.0202
A + Pae 1	0.0215	0.0210	0.0214	0.0208
A + Pae 2	0.0210	0.0210	0.0206	0.0206
Pu + Pae 1	0.0229	0.0222	0.0205	0.0200
Pu + Pae 2	0.0201	0.0200	0.0221	0.0219
All 1	0.0214	0.0212	0.0210	0.0208
All 2	0.0214	0.0214	0.0212	0.0212

ผลการนับเชื้อแบคทีเรียบนใบมันสำปะหลังที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน (CFU/ml)

	Control	A	Pu	Pae	A+Pu	A+Pae	Pu+Pae	A+Pu+Pae
7 วัน	0	$9.5*10^5$	0	$3*10^4$	A; $6*10^4$ Pu; $2.5*10^4$	A; $3*10^4$ Pae; $4.5*10^4$	Pu; $3*10^5$ Pae; 0	A; $2.6*10^5$ Pu; $1.06*10^6$ Pae; $2*10^4$
14 วัน	0	$4.6*10^6$	$8.1*10^5$	$3*10^4$	A; $3.2*10^5$ Pu; 10^4	A; $2*10^4$ Pae; 10^4	Pu; $3*10^5$ Pae; 0	A; $4.8*10^5$ Pu; $1.5*10^4$ Pae; 0
21 วัน	0	$6.3*10^5$	$1.6*10^5$	0	A; $2.4*10^6$ Pu; -	A; $6.5*10^4$ Pae; $6*10^4$	Pu; $2*10^4$ Pae; 0	A; $2.4*10^5$ Pu; 10^4 Pae; $5*10^4$
28 วัน	0	$4.5*10^5$	$2*10^4$	0	A; $3.8*10^6$ Pu; $2.5*10^4$	A; $1.2*10^5$ Pae; 0	Pu; 0 Pae; 0	A; $2.9*10^5$ Pu; 0 Pae; 10^4

แสดงค่าดูดกลืนแสงของแบคทีเรียที่ 540 nm

HT รอบ 0 เดือน	
N4	0.062
HB รอบ 0 เดือน	
N3	0.057
N5	0.090
KU50 รอบ 3 เดือน	
N2	0.083
N5	0.130
N7	0.076
N8	0.093
N12	0.134
N16	0.078
N17	0.113
N22	0.076
N23	0.144
N24	0.103
N34	0.117
N40	0.160
N41	0.108
N42	0.088
N44	0.217
N45	0.111
P3	0.124
P5	0.095
P10	0.166
P13	0.112
P15	0.153

KU50 รอบ 3 เดือน (ต่อ)	
P24	0.077
P30	0.110
P32	0.135
P33	0.146
P34	0.143
KU50 รอบ 6 เดือน	
N10	0.115
N12	0.157
P1	0.154
P3	0.090
P5	0.177
P8	0.371
PR1 รอบ 6 เดือน	
N1	0.055
N5	0.064
N6	0.106
N9	0.075
N12	0.103
N19	0.051
N23	0.095
P4	0.106
P5	0.060
P6	0.092
P8	0.094
P9	0.126
P11	0.095

แสดงค่าดูดกลืนแสงของแบคทีเรียที่ 540 nm (ต่อ)

PR1 รอบ 6 เดือน (ต่อ)	
P13	0.245
P15	0.419
PR2 รอบ 6 เดือน	
N15	0.147
N17	0.076
N23	0.116
P1	0.117
P8	0.082
P9	0.119
P17	0.078
P20	0.188
HB รอบ 6 เดือน	
N11	0.191
P5	0.120
HT รอบ 6 เดือน	
N10	0.134
N36	0.116
P9	0.129
P14	0.080
P16	0.003
P17.1	0.014
P17.2	0.085

KU50 รอบ 9 เดือน	
N1	0.08
N3	0.076
N4	0.071
N6	0.084
N10	0.104
N15	0.075
P2	0.068
P9	0.109
P10	0.066
P11	0.077
P12	0.082
PR1 รอบ 9 เดือน	
N2	0.104
N8	0.101
N14	0.106
P3	0.115
P4	0.109
P6	0.276
P12	0.301
PR2 รอบ 9 เดือน	
N11	0.093
P3	0.263
P4	0.097
P5	0.120
P8	0.143
P11	0.070
P12	0.129

แสดงค่าดูดกลืนแสงของแบคทีเรียที่ 540 nm (ต่อ)

HB รอบ 9 เดือน	
N1	0.101
P6	0.095
HT รอบ 9 เดือน	
N4	0.095
P8	0.095
KU50 รอบ 12 เดือน	
N5	0.101
N10	0.004
P1	0.092
P8	0.099
P9	0.075
PR1 รอบ 12 เดือน	
N2	0.103
N5	0.109
N6	0.091
N9	0.090
N10	0.085
P2	0.108
P4	0.086
P8	0.080

PR2 รอบ 12 เดือน	
N5	0.116
N6	0.103
N12	0.079
N14	0.112
P2	0.114
P4	0.132
P7	0.149
P8	0.083
P11	0.132
P13	0.103
HB รอบ 12 เดือน	
N7	0.105
P1	0.138
P5	0.137
HT รอบ 12 เดือน	
N2	0.088
P4	0.115
P7	0.139

ภาคผนวก ข

ผลวิเคราะห์ดิน จากคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ตารางที่ ข.1 ผลวิเคราะห์ดินรอบที่ 1 30 เมษายน 2561

Result	pH	EC (dS/m)	OM (%)	Available P (ppm)	Available K (ppm)	Available Ca (ppm)	Available Mg (ppm)	Total N (%)	TOC (g/kg)
Soil control	5.2	0.08	0.78	31	18	320	56	0.04	4.1
Control 1	5.3	0.41	0.80	38	26	318	54	0.04	4.6
Control 2	5.2	0.40	0.76	32	24	312	56	0.04	4.8
Control 3	5.5	0.28	0.87	37	20	300	55	0.04	4.9
Amy 1	5.6	0.33	0.72	34	16	303	54	0.04	3.9
Amy 2	5.5	0.31	0.82	46	14	270	56	0.05	4.7
Amy 3	5.2	0.36	0.80	36	18	272	51	0.04	4.3
Pu 1	5.7	0.32	1.01	45	24	328	58	0.05	4.8
Pu 2	5.5	0.35	0.71	30	16	305	58	0.04	4.5
Pu 3	5.6	0.33	0.76	31	14	239	46	0.04	4.9
Pae 1	5.5	0.32	0.77	38	13	278	55	0.05	4.7
Pae 2	5.5	0.29	0.50	32	14	251	54	0.04	4.0
Pae 3	5.7	0.34	0.76	35	15	229	50	0.04	4.6
A+Pu 1	5.7	0.30	0.94	35	11	270	52	0.05	4.6
A+Pu 2	5.7	0.33	0.73	29	9	246	46	0.04	3.9
A+Pu 3	5.6	0.41	0.78	32	9	287	60	0.05	4.1
A+Pae 1	5.6	0.35	0.76	30	10	255	49	0.05	4.8
A+Pae 2	5.7	0.35	0.77	31	13	262	52	0.05	5.8
A+Pae 3	5.7	0.37	0.76	35	8	235	47	0.05	4.3
Pu+Pae 1	5.5	0.36	0.76	35	8	265	49	0.05	3.9
Pu+Pae 2	5.6	0.32	0.76	32	7	255	52	0.04	4.7
Pu+Pae 3	5.7	0.37	0.78	32	25	267	58	0.05	3.9
All 1	5.8	0.28	0.80	36	7	268	54	0.05	3.8
All 2	5.8	0.28	0.82	34	4	234	46	0.05	5.1
All 3	5.7	0.33	0.76	32	3	264	50	0.04	4.3

ตารางที่ ข.2 ผลวิเคราะห์ดินรอบที่ 2 6 มิถุนายน 2561 (ใช้ในผลการทดลอง การทดลองซ้ำที่ 2)

Result	pH	EC (dS/m)	OM (%)	Available				Total N (%)	TOC (g/kg)
				P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)		
Soil control	5.6	0.09	0.78	31	45	945	139	0.04	4.3
Control 1	5.4	0.41	0.51	68	36	684	91	0.04	4.5
Control 2	5.2	0.41	0.85	38	42	595	77	0.04	4.3
Control 3	5.3	0.42	0.89	59	47	586	74	0.04	4.9
Amy 1	5.4	0.38	0.82	47	55	460	62	0.04	4.3
Amy 2	5.4	0.41	0.85	143	56	716	104	0.05	4.3
Amy 3	5.3	0.42	0.72	37	32	755	126	0.04	4.5
Pu 1	5.4	0.37	0.75	42	53	556	77	0.05	4.0
Pu 2	5.6	0.38	0.78	45	43	1230	173	0.05	4.5
Pu 3	5.6	0.37	0.75	42	45	575	86	0.05	4.6
Pae 1	5.5	0.39	0.78	44	56	688	99	0.05	4.4
Pae 2	5.4	0.41	0.85	47	33	808	144	0.04	3.9
Pae 3	5.6	0.40	0.75	49	51	671	109	0.04	4.4
A+Pu 1	5.6	0.41	0.78	42	40	618	91	0.05	4.8
A+Pu 2	5.8	0.37	0.89	39	48	661	89	0.05	4.8
A+Pu 3	5.8	0.38	0.75	42	48	588	82	0.05	4.2
A+Pae 1	5.8	0.42	0.92	46	45	478	70	0.05	4.3
A+Pae 2	5.7	0.41	0.78	51	40	548	77	0.05	4.6
A+Pae 3	5.7	0.36	0.85	62	42	581	79	0.05	5.2
Pu+Pae 1	5.7	0.37	0.92	48	39	840	121	0.05	4.3
Pu+Pae 2	5.7	0.36	0.78	47	37	664	92	0.05	4.1
Pu+Pae 3	5.8	0.38	0.78	46	52	561	78	0.05	4.1
All 1	5.8	0.36	0.72	40	45	656	98	0.05	3.9
All 2	5.8	0.41	0.75	46	48	724	63	0.05	4.2
All 3	5.9	0.36	0.82	43	42	655	94	0.05	4.4

ตารางที่ ข.3 ผลวิเคราะห์ดินรอบที่ 3 23 สิงหาคม 2561 (ใช้ในผลการทดลอง การทดลองซ้ำที่ 1)

Result	pH	EC (dS/m)	OM (%)	Available				Total N (%)	TOC (g/kg)
				P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)		
Soil control	5.5	0.10	0.97	48	46	434	56	0.05	4.0
Control 1	5.8	0,39	1.02	42	62	446	56	0.05	3.5
Control 2	5.9	0.38	1.08	49	62	476	57	0.05	3.8
Control 3	5.8	0.36	1.02	44	56	440	58	0.04	3.8
Amy 1	6.0	0.36	1.06	45	62	444	56	0.05	4.2
Amy 2	5.9	0.36	1.09	52	64	444	57	0.05	4.1
Amy 3	5.9	0.38	1.12	54	68	480	65	0.05	4.1
Pu 1	5.8	0.51	1.10	43	57	426	52	0.05	3.9
Pu 2	5.9	0.49	1.04	40	58	437	51	0.05	3.8
Pu 3	6.0	0.51	1.04	56	66	470	59	0.05	3.3
Pae 1	5.8	0.36	1.09	48	63	478	55	0.05	3.9
Pae 2	5.9	0.37	1.08	60	60	478	59	0.05	3.7
Pae 3	5.8	0.40	1.18	54	64	502	58	0.05	4.1
A+Pu 1	5.8	0.36	1.09	44	66	427	50	0.05	4.0
A+Pu 2	5.9	0.35	1.08	52	68	476	59	0.05	3.8
A+Pu 3	5.9	0.47	1.12	48	60	500	54	0.04	3.8
A+Pae 1	6.1	0.34	1.09	71	74	590	75	0.05	4.2
A+Pae 2	6.0	0.33	1.12	50	88	512	58	0.05	4.0
A+Pae 3	5.9	0.31	1.11	46	74	482	51	0.05	3.7
Pu+Pae 1	5.8	0.34	1.13	46	70	502	54	0.05	4.1
Pu+Pae 2	5.8	0.32	1.12	45	76	454	53	0.05	4.1
Pu+Pae 3	5.8	0.34	1.16	46	74	487	56	0.05	3.5
All 1	6.0	0.35	1.04	48	84	470	58	0.05	4.1
All 2	5.8	0.31	1.11	48	70	502	56	0.05	4.0
All 3	5.9	0.32	1.11	50	74	531	58	0.05	3.8

ภาคผนวก ค

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้น (Agar) 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium; CFMM)

สารละลายส่วนที่ 1

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \bullet 12H_2O$)	0.8	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 5 โมลาห์ จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายส่วนที่ 2

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.1	กรัม/มิลลิลิตร
เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \bullet 2H_2O$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร

กรองสารละลายแต่ละชนิดผ่านชุดกรองสำเร็จรูปเซลลูโลสอะซีเตท (CA) ขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร เติมสารละลายส่วนที่ 2 ลงในสารละลายส่วนที่ 1 ชนิดละ 1 มิลลิลิตร/ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose) (Minimal Medium)

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.5	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	1	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.5	กรัม
คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส (CMC)	5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้น (Agar) 15 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Avicel และเซลโลไบโอสมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนจาก คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส (CMC) เป็น Avicel หรือเซลโลไบโอสแทน

สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.844	กรัม
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซีเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5

สารละลาย A : สารละลายกรดอะซิติก 0.2 โมลาร์ (กรดอะซิติก 11.55 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายโซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) 0.2 โมลาร์ (โซเดียมอะซีเตต 27.22 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ปรับ pH เป็น 5.5 ด้วย 1 โมลาร์ ดังตาราง ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

pH	0.2 โมลาร์ กรดอะซิติก (มิลลิลิตร)	0.2 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตต (มิลลิลิตร)
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.5	6.8	43.2
5.6	4.8	45.2

สารละลายกรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	1.6	กรัม
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS)	1	กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมทารเตรต ($KNaC_4H_4O_6$, $4H_20$)	30	กรัม

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ลงไป จากนั้นเติมโซเดียมโปตัสเซียมทารเตรตลงไป จากนั้นนำไปอุ่นและคนใหเขากันแลวเติมน้ำใหครบ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิหอง

สีย้อมคองโกเรด (Congo red) 1 เปอร์เซ็นต์

คองโกเรด (Congo red)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

สีย้อมแกรม

1.1 สีย้อมคริสตัลไวโอเลต

สารละลาย A

คริสตัลไวโอเลต	2	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	20	มิลลิลิตร

ละลายสีจนละลายหมด

สารละลาย B

แอมโมเนียออกซาเลต ($C_2H_8N_2O_4$)	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับ B เข้าด้วยกันแล้วกรอง

1.2 สารละลายไอโอดีน

ไอโอดีน (crystal)	1.0	กรัม
โพแทสเซียม ไอโอไดด์ (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยก่อน แล้วจึงเติมน้ำให้ครบ เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

1.3 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

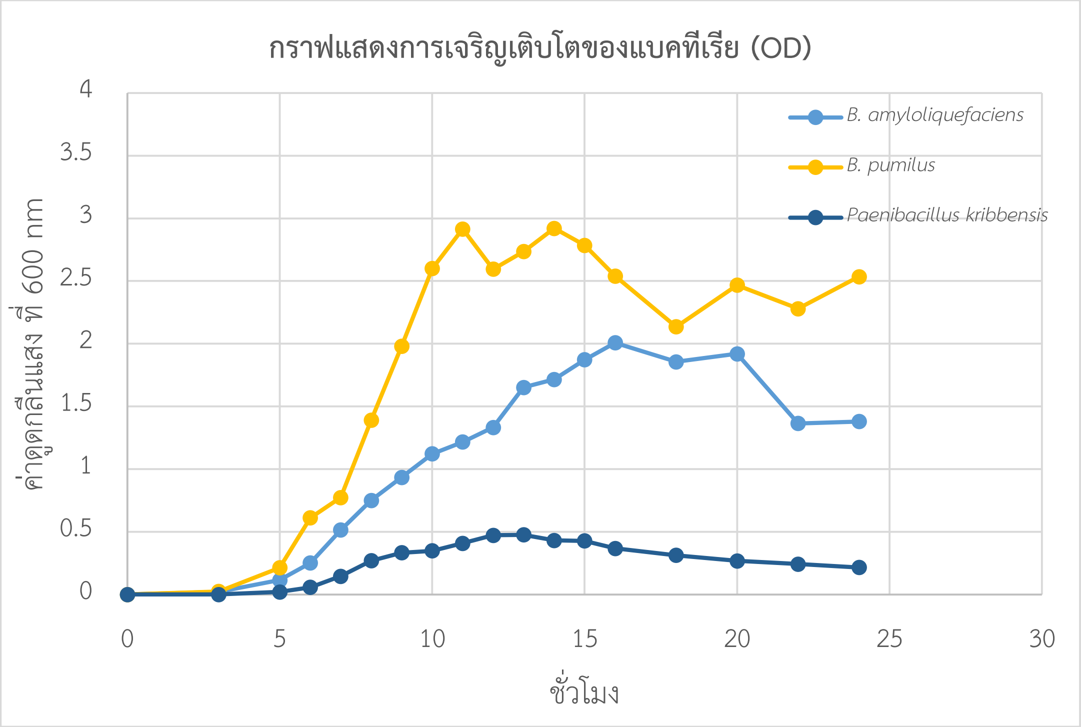
1.4 ซาฟรานิน โอ

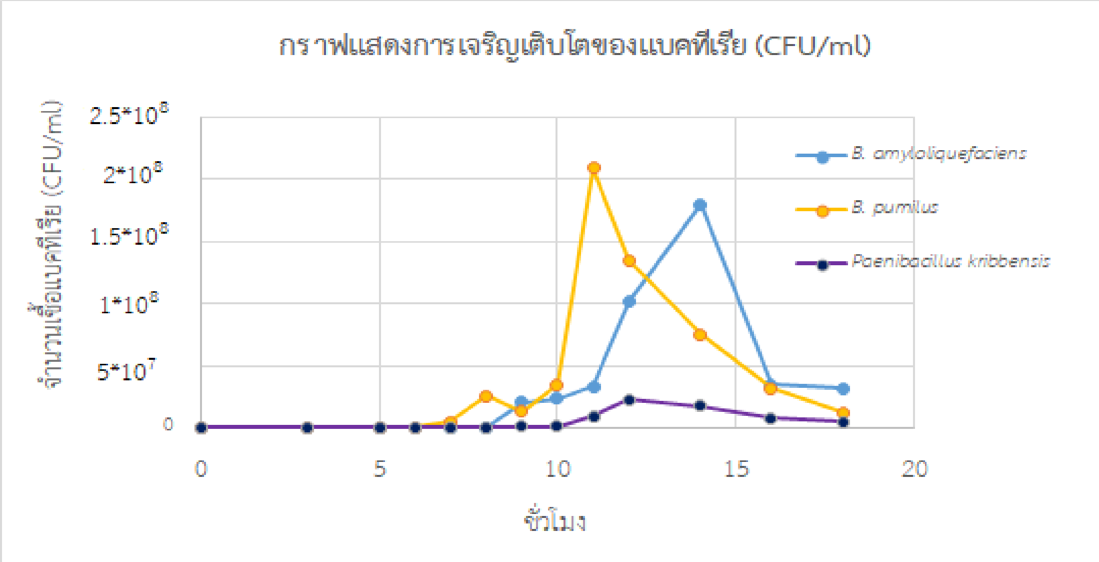
Safranin O	2.5	กรัม
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

ละลาย Safranin O ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใช้เป็น stock solution สำหรับ working solution เจือจาง stock solution จำนวน 1 ส่วนในน้ำกลั่น 9 ส่วน (1 ต่อ 10)

ภาคผนวก ง

กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย


กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (OD)
ค่าดูดกลืนแสง ที่ 600 nm
ชั่วโมง
B. amyloliquefaciens
B. pumilus
Paenibacillus kribbensis
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
0
5
10
15
20
25
30


กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (CFU/ml)
จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (CFU/ml)
ชั่วโมง
B. amyloliquefaciens
B. pumilus
Paenibacillus kribbensis
2.5*10^8
2*10^8
1.5*10^8
1*10^8
5*10^7
0
0
5
10
15
20

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวพิชญ์วสุ เอี่ยมยั่งยืน

ภูมิลำเนา จังหวัดกรุงเทพมหานคร

อีเมลล์ apissawan@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2541-2547 ระดับประถมศึกษาปีที่ 1-6 โรงเรียนวัดจันทร์ประดิษฐาราม

พ.ศ. 2547-2553 ระดับมัธยมศึกษาต้น-ปลาย โรงเรียนศึกษานารี

พ.ศ. 2553-2557 ระดับปริญญาตรี สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ.2558-2562 ระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การนำเสนอผลงาน

ผลงานวิจัยเรื่อง Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from cassava soil in Rayong province, Thailand ในงาน The International Conference on Agriculture and Natural Resources 2018 (ANRES 2018) ระหว่างวันที่ 26-28 เมษายน 2561 ณ โรงแรม Windsor Suites, กรุงเทพฯ จัดโดย Kasetsart University Research and Development Institute, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์