การคัดเลือกแบคทีเรียในลำไส้ปลวกที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

Screening of Cellulase Producing Bacteria from Termite Gut

ปิยะนุช เนียมทรัพย์* ณัฐชา อินทา ปานไพลิน ศรีวิยศ นลิน วงศ์ขัตติยะ และศรีกาญจนา คล้ายเรือง

Piyanuch Niamsup*, Natthacha Intha, Panphailin Sriwiyot, Nalin Wongkattiya and Srikanjana Klayraung

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: piyanuch@mju.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ปลวก พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 146 ไอโซเลต หลังจากนั้นทำการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง carboxy methyl cellullose ตรวจสอบโดยการเททับด้วย congo red พบแบคทีเรียที่ให้วงใสจำนวน 15 ไอโซเลต จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลต ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก 14 ไอโซเลต โดยประกอบด้วยสกุล *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Breznakia*, *Kocuria*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Lactococcus* และสกุล *Isoptericola* และจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ 1 ไอโซเลต คือ สกุล *Dysgonomonas* โดยพบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด คือ *Staphylococcus warneri* M4-01-2 โดยให้ค่า hydrolytic capacity เท่ากับ 16.0

คำสำคัญ: แบคทีเรียลำไส้ปลวก เซลลูโลส เอนไซม์เซลลูเลส

Abstract

The objective of this study was to screen cellulase producing bacteria from termite gut. Total of 146 isolates were collected and then used to screen of cellulolytic activity by congo red test. This qualitative screening showed that 15 isolates were positive producing cellulase by degradation of carboxymethyl cellulose. The Identification of these cellulolytic bacteria from termite gut was done by 16S rDNA sequencing at full length of 1,500 bp. The results showed that 14 isolates were Gram positive bacteria which consisted of genus *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Breznakia*, *Kocuria, Staphylococcus, Streptomyces*, *Lactococcus* and *Isoptericola*. Only one isolate was found located in Gram negative bacteria which identified as genus *Dysgonomonas*. *Staphylococcus warneri* M4-01-2 showed highest cellulolytic activity at hydrolytic capacity value of 16.0.

Keywords: termite gut bacteria, cellulose, cellulase enzyme

คำนำ

ปลวกเป็นแมลงสังคม ที่ออกหากิน อยู่รวมกันและดูแลกันเป็นกลุ่ม จัดอยู่ในอันดับ Isoptera หนึ่งในผู้สร้างและผู้ทำลายที่มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในระบบนิเวศป่าไม้ มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยปลวกแต่ละรังประกอบด้วย 3 วรรณะใหญ่ๆ คือ วรรณะทหาร วรรณะกรรมกร และวรรณะสืบพันธุ์ ทั้ง 3 วรรณะอาศัยอยู่ร่วมกันภายในรัง ทุกวรรณะมีหน้าที่ที่ต้องรับผิดชอบในส่วนของตนเอง (Eggleton, 2011) โดยปลวกทำหน้าที่เป็นผู้ช่วยย่อยสลายพวกอินทรีย์วัตถุต่างๆ ที่อยู่ในป่า เช่น ซากพืช เศษไม้ ใบไม้ หรือท่อนไม้ และเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดขบวนการแลกเปลี่ยนธาตุอาหารในธรรมชาติ ทั้งธาตุไนโตรเจนและคาร์บอน ก่อให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ให้กับพื้นที่ป่านั้นๆ ด้วย และจากความสามารถในการย่อยสลายอินทรียวัตถุและเซลลูโลสในไม้ของลำไส้ปลวก พบว่ามีความสัมพันธ์กับชนิดของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ปลวก (Dillon and Dillon, 2004) ซึ่งในธรรมชาติประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ และมีไซแลนรองลงมาเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส โดยส่วนประกอบต่างๆ อยู่รวมกันอย่างซับซ้อน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติจึงต้องผลิตเอนไซม์ทั้งกลุ่มที่เป็นเซลลูโลไลติกและไซลาโนไลติกออกมาย่อยสลายเพื่อนำไปใช้ในการเจริญ

โดยในปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านการเกษตร อุตสาหกรรม และพลังงานทดแทนอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ได้แก่ การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อผลิตปุ๋ยหมักและน้ำตาลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Sreena *et al*., 2015) นอกจากนั้น มีการศึกษาแบคทีเรียทีจากลำไส้ปลวกร่วมกับเชื้อราและโปรตัวซัว ซึ่งบ่งบอกถึงการมีส่วนร่วมในการย่อยสลายเซลลูโลสในธรรมชาติ แสดงว่าในลำไส้ปลวกสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการศึกษาความหลากหลาย และโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในลำไส้ปลวกอย่างกว้างขวาง ซึ่งอาจทำให้พบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติต่างๆ และนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมต่อไปได้ในอนาคต (Ohkuma, 2003)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ปลวก และศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส พร้อมทั้งจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ปลวกและบทบาทของแบคทีเรียในระบบการย่อยสลายภายในลำไส้ปลวก โดยความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความคาดหวังที่จะสามารถนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ ทั้งทางด้านการเกษตร อุตสาหกรรม หรือใช้ในการแก้ไขควบคุมมลภาวะสิ่งแวดล้อม เช่น ใช้ในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การสร้างพลังงานทดแทนในการผลิตเอทานอล การย่อยสลายสารกำจัดศัตรูพืชที่มีฤทธิ์ตกค้างนาน หรือการกำจัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ปลวก

นำตัวอย่างปลวกงานจำนวน 5 ตัวอย่างที่เก็บจากรังปลวกในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่และพื้นที่ใกล้เคียง มาฆ่าเชื้อผิวภายนอกด้วยเอทานอล 70% จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ซับน้ำออกโดยการนำวางบนกระดาษทิชชูในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว แยกส่วนหัวและลำตัว โดยนำส่วนลำตัวใส่ในหลอด microcentrifuge ที่มี 0.85%

NaCl บดให้ละเอียดด้วยคีมคีบที่ปราศจากเชื้อ (Saptarini *et al.*, 2014) ทำการเจือจางในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, และ 10^{-6} และเพาะเลี้ยงด้วยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ De Man Rogosa and Shape (MRS) agar, Brain Heart Infusion (BHI) agar และ Tryptic Soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีอากาศ และ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะมีอากาศ ทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญขึ้นมาบนอาหารแต่ละชนิด และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยเทคนิค streak plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกับที่เพาะเลี้ยงโคโลนี ทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียเบื้องต้นโดยการย้อมสีแบบแกรม และทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียบริสุทธิ์ในสารละลาย 20% Glycerol ที่อุณหภูมิ -80°ซ.

การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี congo red test โดยการเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาทำการปลูกถ่ายบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี spot inoculation บนอาหารแข็งสูตร CMC agar ที่เติม carboxymethyl cellulose (CMC) ปริมาณ 0.5% ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 7 วัน เมื่อจุลินทรีย์เจริญ ทำการเททับด้วย 0.5% congo red (w/v) เป็นเวลา 20 นาที และ ล้างด้วย 1N NaCl เป็นเวลา 20 นาที วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้ (ทิพย์นภา และคณะ, 2556) และคำนวณหาค่า hydrolysis capacity (HC value) หรือเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Wen-Jing *et al.*, 2005)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียลำไส้ปลวกด้วยวิธีการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Geneaid, Taiwan) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยเครื่อง PCR Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany) โดยใช้ primer คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCRCCGCA-3') แล้วนำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rRNA ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA (First Base Laboratories, Malaysia) ก่อนนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย (Niamsup *et al.*, 2003)

ผลการวิจัย

จากการนำตัวอย่างปลวกงานที่เก็บจากรังปลวกจำนวน 5 ตัวอย่าง ในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่และพื้นที่ใกล้เคียงมาแยกเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ปลวกโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ De Man Rogosa and Shape (MRS) agar, Brain Heart Infusion (BHI) agar และ Tryptic Soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีอากาศ และ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะมีอากาศ จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้และทำการสุ่มโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 146 ไอโซเลต จากการย้อมสีแบบแกรมสามารถจัดกลุ่มเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างทรงกลมจำนวน 62 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อนจำนวน 28 ไอโซเลต

และแบคทีเรียรูปร่างท่อนจำนวน 56 ไอโซเลต และจากการนำแบคทีเรียลำไส้ปลวกทั้งหมดมาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตบนอาหารแข็ง CMC agar และทำการย้อมด้วยสี congo red พบว่ามีแบคทีเรียลำไส้ปลวกแสดงผลบวกในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อย CMC จนเกิดวงใสจำนวนทั้งสิ้น 15 ไอโซเลต โดยมีความกว้างวงใสตั้งแต่ 12.5-38 มม. โดยไอโซเลตที่ให้ความกว้างวงใสมากที่สุดคือ ไอโซเลต N1-05 โดยให้วงใสกว้างถึง 38 มม. ดังแสดงใน Figure 1 แต่จากการคำนวณหาค่า hydrolytic capacity (HC value) หรือ เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีพบว่าไอโซเลต M4-01-2 มีค่า HC สูงสุดเท่ากับ 16.0 (Table 1)

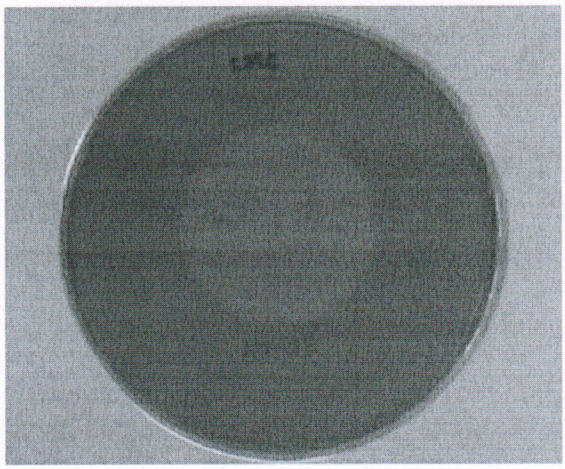

Figure 1 The hydrolysis circle of termite gut bacterial isolate N1-05 on CMC agar plate

Table 1 Hydrolytic capacity (HC value) of termite gut bacteria on CMC agar

Isolate	Colony diameter (mm)	Clear zone diameter	Hydrolytic capacity
B1-02	3.2	31.5	9.8
B1-07	4.0	20.0	5.0
T1-02-2	4.5	25.0	5.6
T1-07	4.0	34.0	8.5
T1-09	2.5	20.0	8.0
T1-10	3.0	26.0	8.7
N1-05	5.4	38.0	7.0
M4-01-2	2.0	32.0	16.0
B4-03	17.8	32.2	1.8
B4-09	12.5	31.0	2.5
N4-03	5.0	20.0	4.0
N4-06-1	3.0	26.0	8.7
N4-06-2	5.0	12.5	2.5

จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียลำไส้ปลวกทั้ง 15 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน 16S rRNA โดยหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอพบว่ามีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 1,500 bp หลังจากทำการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลต ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก 14 ไอโซเลต โดยประกอบด้วย 10 สายพันธุ์ใน 4 สกุล คือ *Paenibacillus* sp. จำนวน 3 ไอโซเลต *Bacillus thuringiensis* จำนวน 2 ไอโซเลต *Breznakia pachnodae* จำนวน 2 ไอโซเลต *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus warneri*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces misionensis* และ *Isoptericola variabilis* สายพันธุ์ละ 1 ไอโซเลต และจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ 1 ไอโซเลต คือ สายพันธุ์ *Dysgonomonas termitidis* ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Termite gut bacterial isolates representing cellulase activity and their closest relatives

Isolate	Description	Accession number	Homology	% Identity
B1-02	*Breznakia pachnodae*	AJ629069	1432/1443	99.23
B1-07	*Kocuria rhizophila*	KT387335	1406/1406	100
T1-02-2	*Bacillus cereus*	KY218863	1426/1426	100
T1-07	*Breznakia pachnodae*	AJ629069	1427/1433	99.58
T1-09	*Dysgonomonas termitidis*	AB971823	1400/1401	99.92
T1-10	*Paenibacillus* sp.	LT598560	1400/1431	97.83
N1-05	*Bacillus pumilus*	CP018574	1427/1427	100
M4-01-2	*Staphylococcus warneri*	KX588615	1430/1430	100
B4-03	*Bacillus thuringiensis*	KX301308	1424/1424	100
B4-09	*Bacillus thuringiensis*	KX301308	1427/1427	100
T4-02	*Lactococcus lactis*	EU723831	1342/1370	97.95
N4-03	*Streptomyces misionensis*	KJ571074	1392/1406	99.00
N4-06-1	*Paenibacillus* sp.	KC466210	1413/1428	99.94
N4-06-2	*Paenibacillus* sp.	KC466210	1413/1428	99.94
N5-08	*Isoptericola variabilis*	AB489221	1399/1401	99.85

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียลำไส้ปลวกจากตัวอย่างปลวกงานที่เก็บจากรังปลวกในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่และพื้นที่ใกล้เคียง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 146 ไอโซเลต โดยจากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส พบว่ามีแบคทีเรียลำไส้ปลวกจำนวน 15 ไอโซเลต ที่สามารถให้ผลบวกจากการให้วงใสบนอาหารที่มี CMC เป็นองค์ประกอบ โดยจากการตรวจสอบเบื้องต้นเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 14 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบ 1 ไอโซเลต โดยปกติพบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Bacteroides*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Pseudomonas* โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis*, *B. cereus* และ *Paenibacillus* sp. ซึ่งได้คัดแยกมาจากตัวอย่างหลายแหล่ง เช่น ดิน ลำไส้ปลา มูลโค น้ำเสียจากโรงงานทำกระดาษ เป็นต้น (Wang *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012; Shanmugapriya *et al.*, 2012) ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในสกุลที่ใกล้เคียงกันหลายไอโซเลต เช่น *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* และ *Paenibacillus* sp. นอกจากแบคทีเรียทั่วไปแล้ว ในงานวิจัยครั้งนี้ยังพบแบคทีเรียคล้ายรากลุ่มแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ ได้แก่ *Kocuria rhizophila, Streptomyces misionensis* และ *Isoptericola variabilis* โดยแบคทีเรีย *I. variabilis* ถูกรายงานครั้งแรกในชื่อของ *Cellulomonas variformis* ซึ่งแยกได้จากลำไส้ปลวก (Bakalidou *et al.*, 2002) และได้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *I. variabilis* ในภายหลังโดย Stackerbrandt *et al.* (2004) ซึ่งโดยปกติแอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายยากได้ดี (Watanabe *et al.*, 2003) โดยในการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี congo red และคำนวณหาค่า hydrolytic activity พบว่าแบคทีเรียลำไส้ปลวก *Staphylococcus warneri* M4-01-2 ให้ค่า hydrolytic activity ที่สูงที่สุด โดยปกติแบคทีเรียกลุ่ม staphylococci ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้นั้นไม่ได้มีการรายงานบ่อยครั้ง แต่อย่างไรก็ตามก็เคยพบการรายงานของการแยกเชื้อ staphylococci จากลำไส้ปลวกที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาบ้าง (Pourramezan *et al.*, 2012) นอกจากนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้ยังได้มีการพบแบคทีเรียสกุลใหม่ที่คัดแยกจากลำไส้ปลวกและมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสได้ คือ *Breznakia pachnodae* โดยแบคทีเรียสกุลนี้ได้ถูกค้นพบและตั้งชื่อโดย Tegtmeier *et al.* (2016) ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารของแมลง

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียลำไส้ปลวกจากปลวกงานที่เก็บจากรังปลวกในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ และพื้นที่ใกล้เคียง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 146 ไอโซเลต โดยจากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส พบว่ามีแบคทีเรียลำไส้ปลวกจำนวน 15 ไอโซเลต ที่สามารถให้ผลบวกจากการให้วงใสบนอาหารที่มี CMC เป็นองค์ประกอบ จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน 16S rRNA พบว่าถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก 14 ไอโซเลต โดยประกอบด้วยสกุล *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Breznakia*, *Kocuria*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Lactococcus* และสกุล *Isoptericola* และจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ 1 ไอโซเลต คือ สกุล *Dysgonomonas* โดยพบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด คือ *Staphylococcus warneri* M4-01-2 โดยให้ค่า hydrolytic capacity (HC) เท่ากับ 16.0

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ (มจ.1-59-067)

เอกสารอ้างอิง

ทิพย์นภา วงศ์คูณ โสภณ บุญลือ และนันทวัน ฤทธิ์เดช. 2556. การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวโพดหวาน (*Zea mays* L. var. saccharata). **ว. วิทย. มข.** 41(4): 954-966.

Bakalidou, A., P. Kämpfer, M. Berchtold, T. Kuhnigk, M. Wenzel and H. König. 2002. Cellulosimicrobium variabile sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite Mastotermes darwiniensis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52: 1185–1192.

Dillon R.J. and V.M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interaction. **Annu. Rev. Entomol.** 49: 71-92.

Eggleton, P. 2011. An introduction to termites: Biology, taxonomy and functional morphology. pp. 1-26. *In* Bignell, D.E., Y. Roisin and N. Lo (eds). **Biology of Termites: a Modern Synthesis.** Netherlands: Springer.

Kumar, D.J.M., P.D. Puvai, C.L.P. Kumar, Y.S. Saroja, A. Manimaran and P.T. Kalaichelvan. 2012. Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its biostoning activity. **Der Phamacia Lettre.** 4: 881-88.

Niamsup, P., I.N. Sujaya, M. Tanaka, T. Sone, S. Hamada, Y. Kamagata, S. Lumyong, A. Assavanig, K. Asano, F. Tomita and A. Yokota. 2003. *Lactobacillus thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces. **Int. J. Syst. Evol. Microbiolo.** 53: 263-268.

Ohkuma, M. 2003. Termite symbiotic systems: efficient biorecycling of lignocelluloses. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 61: 1-9.

Pourramezan, Z., G.R. Ghezelbash, B. Romani, S. Ziaei and A. Hedayatkhah. 2012. Screening and identification of newly isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagus termite *Microcerotermes diversus* (Silestri). **Microbiol.** 81(6): 736-742.

Saptarini, M.N. and W. Indriyati. 2014. Isolation of cellulolytic bacteria from termites with cellulose of corn cobs as a carbon source. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.** 6: 215-217.

Shanmugapriya, K., P.S. Saravana, M.M. Krishnapriya, A. Mythili and S. Joseph. 2012. Isolation, screening and partial purification of cellulose from cellulose producing bacteria. **Int. J. Adv. Biotechnol. Res.** 3: 509-514.

Sreena, C.P., N.K. Resna and Sebastian D. 2015. Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from the gut of termites *Odontotermes* and *Heterotermes* species. **Br. Biotechnol. J.** 9(1): 1-10.

Stackerbrandt, E., P. Schumann and X.L. Cui. 2004. Reclassification of *Cellulosimicrobium variabile* Bakalidou *et al.* 2002 as *Isoptericola variabilis* gen. nov., comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54(3): 685-688.

Tegtmeier, D., C. Riese, O. Geissinger, R. Radek and A. Brune 2016. *Breznakia blatticola* gen. nov. sp. nov. and *Breznakia pachnodae* sp. nov., two fermenting bacteria isolated from insect guts, and emended description of the family *Erysipelotrichaceae*. **Syst. Appl. Microbiol.** 39: 319-329.

Wang, C.M., C.L. Shyu, S.P. Ho and S.H. Chiou. 2008. Characterization of a novel thermophilic, cellulose-degrading bacterium *Paenibacillus* sp. Strain B39. **Lett. Appl. Microbiol.** 47: 46-53.

Watanabe, Y., N. Shinzato and T. Fukatsu. 2003. Isolation of actinomycetes from the termites' guts. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 67: 1801-2003.

Wen-Jing, L., W. Hong-Tao, Y. Shi-Jian, W. Zhi-Chao and N. Yong-Feng. 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 5: 353-360.