

**SELECTION OF CELLULOSE DEGRADING  
HALOBACTERIA  
A CASE STUDY OF THA CHIN SOIL SERIES**

**SIRIRAT PINROD**

**A THESIS SUMMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(APPROPRIATE TECHNOLOGY FOR RESOURCES AND  
ENVIRONMENTAL DEVELOPMENT)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2007**

**COPY RIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การคัดเลือกและศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียทนเค็ม กรณีศึกษาในชุดดินท่าจีน  
(SELECTION OF CELLULOSE DEGRADING HALOBACTERIA: A CASE STUDY OF THA CHIN SOIL SERIES)

ศิริรัตน์ ปิ่นรอด 4536461 ENAT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชาลี นาวานุเคราะห์, Ph.D., อัจฉราพร ขำโสภณ, Ph.D.,  
พิทยากร ลิ่มทอง, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียทนเค็มจากดินเค็มชายทะเล โดยแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณป่าชายเลนปากแม่น้ำท่าจีน อ.เมือง จ.สมุทรสาคร ที่อุณหภูมิ 25 °ซ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเค็ม 10% ได้แบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยกระดาษกรองเบอร์ 1 (FPase) ได้แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเซลลูเลสที่ย่อยกระดาษกรองสูง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ TC6 และ TC1 (1,930.16 mU/mgTP และ 1,134.06 mU/mgTP ตามลำดับ) ซึ่งได้จำแนกสกุลและสปีชีส์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA พบว่า สายพันธุ์ TC6 และ TC1 จัดจำแนกได้เป็น *Pseudoidiomarina taiwanensis* และ *Halomonas* sp. ตามลำดับ และได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการย่อย carboxymethylcellulose (CMCase) , avicel (avicelase) และสำลี (cotton cellulase) และทำการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ (°ซ) , ระดับพีเอช และความเค็ม (%) โดยได้วัดกิจกรรมของเซลลูเลสที่ย่อย carboxymethylcellulose (CMCase) พบว่า แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-40 °ซ , ระดับพีเอช 5-8 และระดับความเค็ม 3-29% โดยสายพันธุ์ TC6 สร้างเอนไซม์ CMCase สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 °ซ , ระดับพีเอช 5 และความเค็ม 29% ส่วนสายพันธุ์ TC1 สร้างเอนไซม์ CMCase ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 20 °ซ , ระดับพีเอช 5 และความเค็ม 29% จากนั้นได้ทำการศึกษาการสร้างเอนไซม์ FPase , CMCase และ cellobiase ของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในฟางข้าวที่ปราศจากเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยควบคุมสภาพความชื้น 55-65% ที่ระดับพีเอช 5 , ความเค็ม 29% และอุณหภูมิ 30 และ 20 °ซ สำหรับสายพันธุ์ TC6 และ TC1 ตามลำดับ ซึ่งพบว่า แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ตลอดระยะเวลาทดลอง 6 สัปดาห์ ส่วนค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของฟางข้าว พบว่า ไม่แตกต่างกันตลอดการทดลอง เนื่องจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียชนิดเดี่ยว (Single culture) จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งสองสายพันธุ์สามารถนำไปพัฒนาใช้ในพื้นที่ดินเค็มได้ และควรใช้เชื้อผสม (mixed culture) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายซากพืชในดิน

**SELECTION OF CELLULOSE DEGRADING HALOBACTERIA:  
A CASE STUDY OF THA CHIN SOIL SERIES**

SIRIRAT PINROD 4536461 ENAT/M

M.Sc. (APPROPRIATE TECHNOLOGY FOR RESOURCES AND  
ENVIRONMENTAL DEVELOPMENT)

THESIS ADVISORS: CHARLIE NAVANUGRAHA, Ph.D.(Soil Science and  
Environmental science), ACHARAPORN KUMSOPA, Ph.D.(Biology),  
PITAYAKON LIMTONG, Ph.D.(Soil Science)

**ABSTRACT**

This research involved with selection and study of cellulose degradation of halobacteria isolated from coastal saline soil in the estuary in mangrove forest areas of the Tha Chin river, Samutsakon province. Under the cultivating conditions (10% salinity and 25°C), eight strains of cellulolytic bacteria were isolated and the cellulase activity (mU/mgTP) was determined with hydrolyzing filter paper No.1 (FPase). Two isolates, TC6 and TC1, were selected for highly efficient cellulase production (1,930.16 mU/mgTP and 1,134.06 mU/mgTP, respectively). Using of 16S rDNA sequence, TC6 and TC1 strains were identified as *Pseudoidiomarina taiwanensis* PIT1 and *Halomonas* sp., respectively. The enzyme activity of these isolates was studied with relation to hydrolyzing of carboxymethylcellulose (CMCase), avicel (avicelase) and cotton (cotton cellulase). The, environmental factors on temperature (°C), pH value and salinity (%NaCl) and their effected on cellulase production were also studied by determination of CMCase activity. The experiment was conducted with both TC6 and TC1 strains to be growth in temperature ranges of 20-40°C, pH ranges of 5-8 and salinity ranges of 3-29%. The optimum factors to produce high CMCase activity of TC6 strain were 30°C, pH 5 and 29% salinity and for TC1 strain were 20°C, pH5 and 29% salinity. The strain was selected from the decomposition of rice straw in the laboratory (55-65% moisture content, pH 5, 29% salinity, 30°C and 20°C for TC6 and TC1, respectively) and were also investigated for FPase, CMCase and cellulase activity, including carbon/nitrogen ratio(C/N ratio) at the period of six weeks. Both TC6 and TC1 strains were growth and produced cellulase during the cultivation periods. However, C/N ratio of rice straw was shown no significant different through the experiment periods due to the decomposition was occurred by single cultural. The experiment showed that selected of such the two strains of the bacteria have potential to be developed for applying to saline soils and mixed cultural should be used for increasing decomposition efficiency in the soil.

**KEY WORDS: CELLULASE / HALOBACTERIA / THA CHIN SOIL SERIES /  
SAMUTSAKON PROVINCE**

101 P.