



หลักการคัดเลือก จุลินทรีย์

อาจารย์นุรอัยนี หะยียูโซะ

อาจารย์ประจำหลักสูตรจุลชีววิทยาทางการแพทย์และอุตสาหกรรม

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

เหตุผลในการคัดเลือกจุลินทรีย์

- ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิด จำเป็นต้องมีการคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมในนำไปใช้ประโยชน์ในแต่ละด้าน
- จุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาแล้ว ทำการทดสอบประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่ดีเหมาะสมสำหรับในผลิตภัณฑ์ต่อไป
- การคัดเลือกเชื้อทำให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์เพื่อนำไปทำการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อไป
- การคัดเลือกเชื้อทำให้มีโอกาสเจอเชื้อใหม่ๆที่อาจจะมีประสิทธิภาพดีกว่าตัวเชื้อที่มีอยู่เดิม

การพิจารณาคัดเลือกจุลินทรีย์ในการหมัก

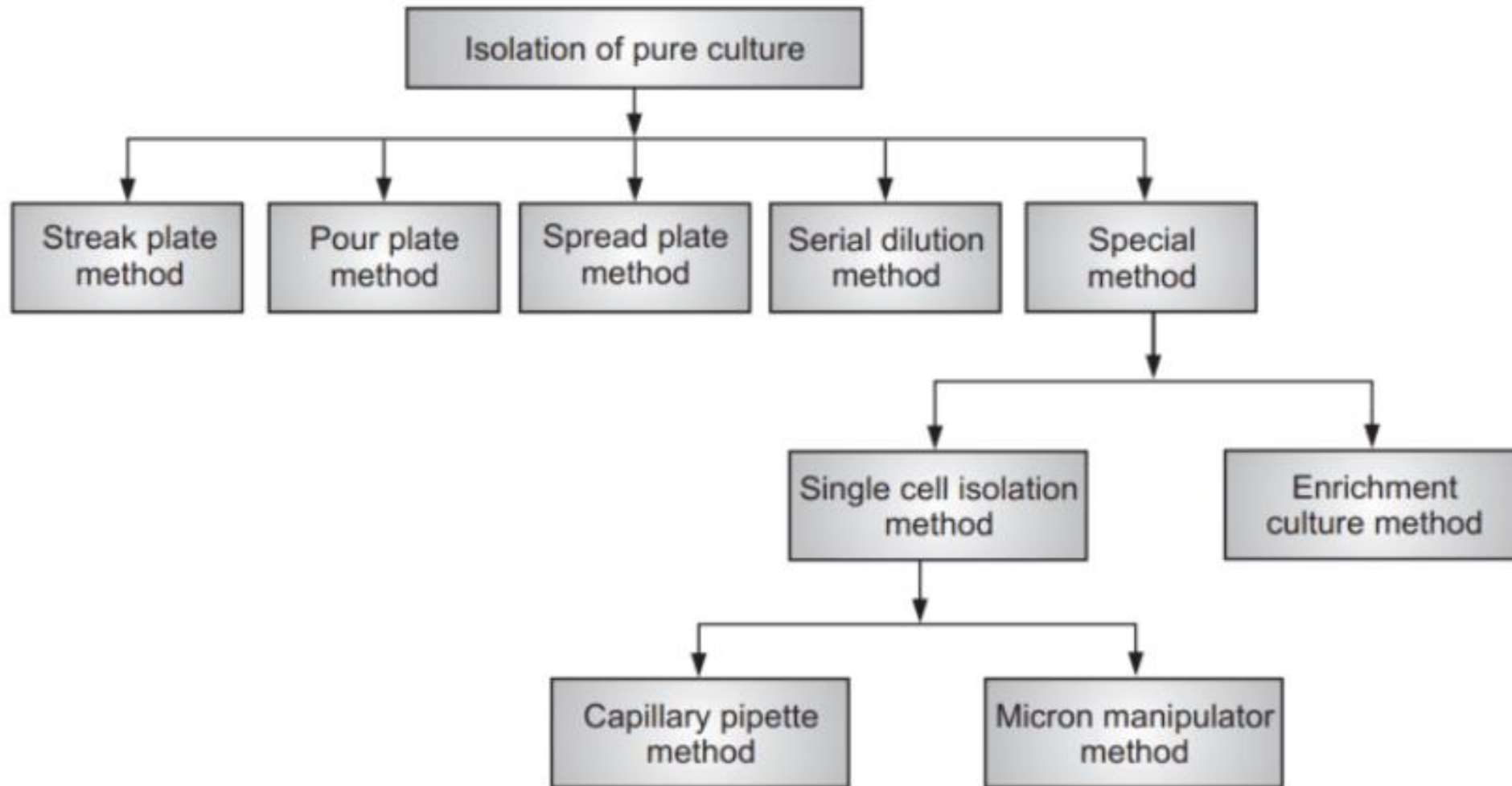
การพิจารณาคัดเลือกจุลินทรีย์ในการหมัก

ความต้องการอาหาร (ราคาถูก; อาหารที่ต้องการให้ใช้)

1. อุณหภูมิเหมาะสม
2. ไม่เกิดปฏิกิริยากับเครื่องมือ
3. ความคงตัวของจุลินทรีย์ & สามารถปรับปรุงพันธุกรรมได้
4. ความสามารถในการสร้างผลผลิต
5. การเก็บเกี่ยวผลผลิตทำได้ง่าย
6. ไม่เป็นพิษ
7. ระยะเวลาในการหมักสั้น
8. มีความต้านทานต่อไวรัส

- Serial dilution method
- Pour plate method
- Spread plate method
- Streak plate method
- Special methods:
 - Single Cell Isolation Methods
 - Enrichment Culture Method

FLOWCHART



Flowchart: Types of isolation of pure culture

- The principle of this method is that, by streaking, a dilution gradient is established across the face of the Petri plate where bacterial cells are deposited on the agar surface.
- This method is used most commonly to isolate pure cultures of bacteria where a small amount of mixed culture is placed on the tip of an inoculation loop and is streaked across the surface of the agar medium by different fashions (Fig. 1) and the plates are incubated to allow the growth of colonies and each colony is the progeny of a single microbial cell thus representing a clone of pure culture.
- Finally, the micro-organisms are separated from each other. The isolated colonies are picked up separately using a sterile inoculating loop and re-streaked onto fresh media to ensure purity. Fig1.1

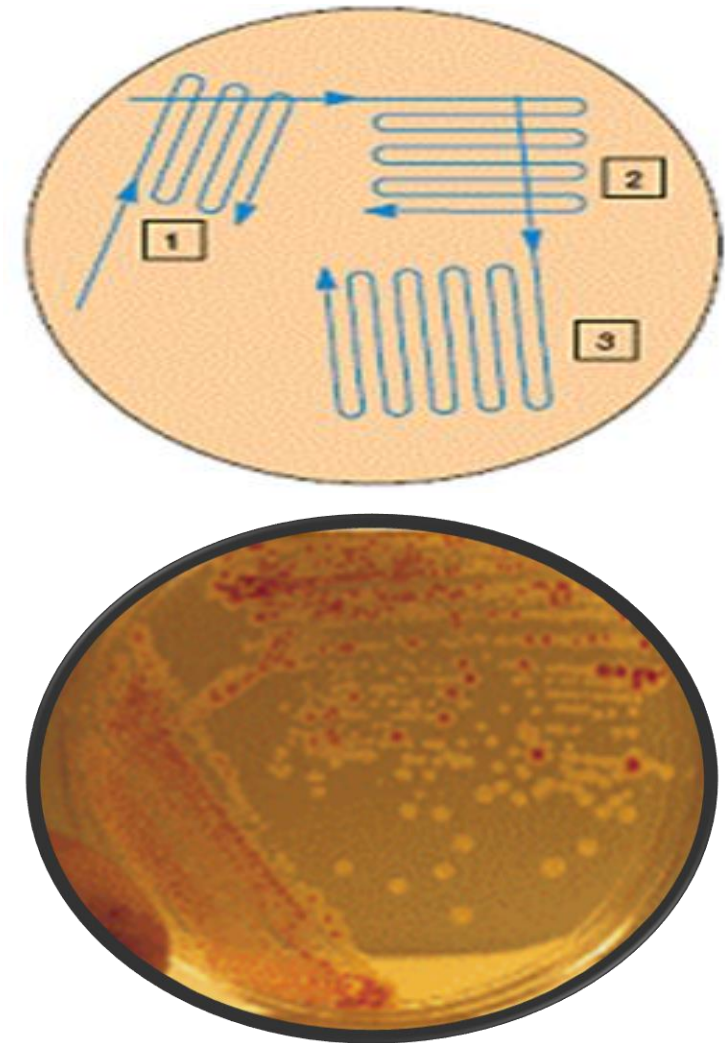


Fig. 1

ตัวอย่างการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์

การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร terephthalic acid จาก
อุตสาหกรรมสิ่งทอ

Isolation and Screening of Terephthalic Acid-Degrading Microorganisms from
Textile Industry

วีระสิทธิ์ กัลยาภฤต¹ และ เศรษฐา สุขเกษม¹

Werasit Kanlayakrit¹ and Saoraya Sookkasem¹

บทคัดย่อ

Terephthalic acid (TA) เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเส้นใยโพลีเอสเตอร์และปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียของกระบวนการผลิต ในระหว่างกระบวนการบำบัดน้ำเสียจะทำให้เกิดการตกตะกอนของสาร TA ซึ่งเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ข้อเสียของวิธีการจัดการทั่วไป เช่น การเผาและฝังกลบ ทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ และมีค่าใช้จ่ายสูง เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการบำบัดจึงนำจุลินทรีย์มาประยุกต์ในการย่อยสลายสาร TA จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA จากตัวอย่างดินแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย 5 แหล่งโดยวิธีการ enrichment technique ในอาหารเหลว nondefined medium ที่ประกอบด้วยสาร TA 1 กรัมต่อลิตร และ yeast extract 0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สาร TA ได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท เชื้อจุลินทรีย์จำนวน 7 ไอโซเลทสามารถย่อยสลายสารนี้มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ (%) ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง และสามารถย่อยได้สมบูรณ์ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไอโซเลท G1, G5, E4 และ A3 มีความสามารถย่อยสลายสารนี้เท่ากับ 69.71%, 65.75%, 59.26% และ 51.74% ตามลำดับ ผลการศึกษาสมบัติบางประการทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท สันนิษฐานเบื้องต้นว่าจัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus*.

ตัวอย่างวิธีการคัดแยกเชื้อ

1. การเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA

ตัวอย่างดินที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานสามพรานการทอ จังหวัดนครปฐม และแหล่งดินธรรมชาติจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ สาร TA ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำที่มีความเป็นกรดและด่างสูง โดยเตรียมสารละลาย TA ตามวิธีการของ Kleerebezem *et. al.* (1999) นำไปผสมกับสารเคมีชนิดอื่นในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ nondefined medium ดัดแปลงจากวิธีการของ Kimura และ Ito (2001) เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป การเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA ทำโดยเติมตัวอย่างดิน 10 กรัมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nondefined medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีองค์ประกอบของสาร TA ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำการบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทุก 7 วัน จนสังเกตเห็นความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่างวิธีการคัดแยกเชื้อ

2. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA

ภายหลังการถ่ายเชื้อแขวนลอยตามวิธีการในข้อ 1. ในครั้งที่ 3 นำเชื้อแขวนลอยมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นถ่ายสารละลายเจือจางดังกล่าวลงในจานเพาะเชื้ออาหารแข็งชนิดเดียวกันที่มีสาร TA ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จานละ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยเชื้อให้ทั่วแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเลือกเก็บโคโลนีที่มีสี รูปร่าง และลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak บนอาหารแข็งชนิดเดียวกัน

3. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร TA

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ โดยถ่ายเชื้อ 1 ลูบ ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวชนิดเดียวกัน 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวชนิดเดียวกันที่มีสาร TA 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้นำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสาร TA ที่ลดลง ณ เวลา 12 ชั่วโมง ดัดแปลงจากวิธีการของ Kimura และ Ito (2001) โดยนำตัวอย่างมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใส (supernatant) ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร เลือกเก็บเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สาร TA ในการเจริญได้เร็วที่สุดโดยเก็บในอาหารวุ้นเอียงเพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป หลักการพิจารณาความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ณ เวลา 12 ชั่วโมง คำนวณได้ดังนี้

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสาร TA

$$\text{ความสามารถในการย่อยสลายสาร TA ที่เวลา 12 ชั่วโมง (\%)} = \frac{\text{ผลต่างของค่าการดูดแสง OD 240nm ในชั่วโมงตั้งต้นและชั่วโมงที่ 12 x 100}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง OD 240nm ในชั่วโมงตั้งต้น}}$$

ตัวอย่างการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์

Science, Technology and Social Sciences Procedia

2022; 2022(4): rspg018

<https://wjst.wu.ac.th/index.php/stssp>

การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายใบยางนาเพื่อผลิตไบโอเอทานอล*

Isolation of High Efficiency Alatus Leaves Degrading Fungi for Bioethanol Production

จุฑาพร แสงแก้ว*, พลสันต์ มหาขันธ, ผุสรัตน์ สิงห์คุณ, ณัฐพร หมูปราหมณ์, ปาจริย์ โนนิล และ สุพิชชา พันธุ์คะชะ
Jutaporn Sawaengkaew*, Polson Mahakhan, Phudsarat Singkoon, Natthaporn Moopram,
Pajaree Nonil and Suphitcha Phankacha

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand

* อีเมล: sjutap@kku.ac.th

บทคัดย่อ

ยางนาเป็นพืชที่พบได้ทั่วทุกภาคในประเทศไทย และมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน รวมถึงสามารถนำไปผลิตเป็นพลังงานทดแทนได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายใบยางนา เพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล โดยเก็บตัวอย่างดินภายในสวนป่ายางนาสีฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งเลือกเก็บบริเวณรอบลำต้นยางนา และดินที่ติดบนใบยางนาที่ร่วงลงพื้น เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเซลล์ไลโลติกเอนไซม์บนอาหารแข็ง เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะ solid-state fermentation ในอาหารที่มีอัตราส่วนของรำข้าวสาลีและใบยางนาที่ต่างกัน พร้อมกับศึกษากิจกรรมของเซลล์ไลโลติกเอนไซม์ ผลการศึกษาพบว่า เชื้อราจากไอโซเลท L1-1 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดส และเอนไซม์ฟิเตอร์เปเปอร์เอสสูงที่สุดเท่ากับ 13.07 และ 87.00 IU/g solid ตามลำดับ และเชื้อราจากไอโซเลท I10-2 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 2403.24 IU/g solid เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้อัตราส่วนของรำข้าวสาลี (กรัม) ต่อใบยางนา (กรัม) เท่ากับ 8:12 (สูตร E) และจากการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดแยกได้ พบว่าเชื้อราจากไอโซเลท L1-1 และ I10-2 คือ *Penicillium citrinum* และ *Aspergillus alabamensis* ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพการปรับสภาพใบยางนาด้วยต่าง-กรดที่ความเข้มข้นต่างกัน ย่อยสลายร่วมกับเซลล์ไลโลติกเอนไซม์จากเชื้อรา *P. citrinum* L1-1 และ *A. alabamensis* I10-2 พบว่าที่ความเข้มข้น 2% NaOH ตามด้วย 2% H₂SO₄ ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ 12.29 และ 12.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำตาลที่ได้ไปหมักร่วมกับยีสต์เพื่อผลิตไบโอเอทานอล พบว่าการหมักใบยางนาที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อ *P. citrinum* L1-1 ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.40 g ethanol/g sugar คิดเป็น 78.50 เปอร์เซ็นต์ ตามทฤษฎี ดังนั้นใบยางนาจึงถือเป็นวัสดุทางการเกษตรที่น่าสนใจ เพราะสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ยางนา, เชื้อรา, เซลล์ไลโลติกเอนไซม์, การปรับสภาพ, ไบโอเอทานอล

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสไลติกเอนไซม์

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดินบริเวณรอบต้นยางนา และดินที่ติดบนใบยางนา ณ บริเวณทางเข้าสวนป่า ยางนาสีฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำตัวอย่างดิน 1 กรัม มาทำการเจือจางกับน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการ cross streak ลงในจานอาหาร PDA ที่มีส่วนผสมของใบยางนา 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คัดแยกเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร โดยเทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส (β -glucosidase) นำเชื้อราที่แยกได้มาทำการ point inoculation ลงในจานอาหาร Mineral salt medium ที่ผิวหน้าอาหาร spread ด้วย 0.04% MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผล โดยสังเกตการเรืองแสงเมื่อนำจานอาหารไปส่องภายใต้แสงยูวี คัดเลือกเชื้อราที่มีการเรืองแสงมากที่สุดเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (CMCase) นำเชื้อราที่แยกได้มาทำการ point inoculation ลงในจานอาหาร Mineral salt medium ที่มี carboxy methyl cellulose บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจความสามารถในการย่อย CMC โดยวางเกล็ดไอโอดีนลงบนผาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 10-30 นาที ไอโอดีนจะเข้าทำปฏิกิริยากับ CMC เชื้อที่สามารถย่อย CMC ได้จะเกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

ตัวอย่างการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์

การคัดเลือกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม

ประดิษฐ์ รัศมีพงศ์^{1*}

บทคัดย่อ

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันสามารถคัดเลือกเชื้อได้ทั้งสิ้น 22 ไอโซเลตจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมน้ำมันมะกอกหรือน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อทำการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียทั้ง 22 ไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเพียง 7 ไอโซเลตที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ โดยพบการสร้างวงใสรอบโคโลนี โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต E2I1 มีการสร้างวงใสรอบโคโลนีได้ขนาดใหญ่ที่สุดตามด้วยไอโซเลต B1I1, E2I2, K2I2, E2I3, E2I4 และ E2I5 ตามลำดับ จากการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA รวมทั้งการเปรียบเทียบลำดับวิวัฒนาการพบว่า ไอโซเลต B1I1 และ K2I2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas fluorescens* และ *Pseudomonas* sp. ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต E2I1, E2I2, E2I3, E2I4 และ E2I5 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Burkholderia cenocepacia*, *Acinetobacter junii*, *Rhizobium miluonense*, *Pseudoxanthomonas* sp. และ *Staphylococcus* sp. ตามลำดับ

คำสำคัญ : เอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์, น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม, การคัดเลือก

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ทำการแยกแบคทีเรียชอบเกลือดัดแปลงจากวิธีของ Chamroensaksri et al. (2009) ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารแข็ง JCM NO. 377 (NaCl 100 กรัม Casamino acid 5 กรัม Yeast extract 5 กรัม Sodium glutamic 1 กรัม KCl 2 กรัม Trisodium citrate 3 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 กรัม $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.362 กรัม $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0362 กรัม Agar 20 กรัม และ Distilled water 1,000 มล. และปรับ pH 7.2) ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 7 วัน เลือกเก็บโคโลนีเชื้อที่แตกต่างกันมาทำการศึกษาคูณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น รูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์สีโคโลนีเกร็ดสีแกรมและการสร้างเอนไซม์แคตตาลเลส (Catalase) ส่วนการแยกแบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือทำตามวิธีการของ Tanasupawat et al. (2000) โดยการนำตัวอย่างปลาร้าใส่ในอาหารเหลว MRS บ่มเชื้อที่ 30 °ซ. นาน 48 ชม. และนำน้ำหมักได้มาทำการ Streak plate บนอาหารแข็งดัดแปลง (MRS ที่ประกอบด้วย CaCO_3 0.5%) ที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 5 และ 7% บ่มเชื้อที่ 30 °ซ. นาน 3-5 วัน เลือกเชื้อที่มีการสร้างโซนใสรอบ ๆ โคโลนีไปศึกษาคูณสมบัติของเชื้อ โดยเฉพาะการสร้างแก๊สจากกลูโคส การเจริญที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.4 และ 9.6 เกลือ 5 และ 7% ในอาหารเหลว MRS (Anelsson 1998; Collins et. al. 2001)

อภิปรายข้อมูล

- แบ่งกลุ่มๆ ละ 5 คน จำนวน 3 กลุ่ม 6 คน จำนวน 1 กลุ่ม
- อ่านข้อมูลจากตัวอย่าง paper
- อ่านแล้วสรุปประเด็น
- นำเสนอหน้าชั้น

