

การแยกและศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในแอคติโนแบคทีเรียจาก มูลสัตว์กินพืช

Isolation and Assessment of Cellulase Activity in Actinobacteria from Herbivorous Animal Feces

รัชณี มิ่งมา,^{1*} จุฑาทิพย์ โพธิ์อุบล¹ และ จินตนาถ วงศ์ชวลิต¹
Ratchanee Mingma,^{1} Jutathip Poubol¹ and Jintanart Wongchawalit¹*

Received 19 September 2025, Revised 14 November 2025, Accepted 26 November 2025

ABSTRACT

Animal feces serve as a habitat for diverse microorganisms, including bacteria, fungi, and protozoa, which are essential for breaking down organic matter, and contributing to nutrient cycle. Cellulose, a complex carbohydrate prevalent in plant cell walls, is abundant in herbivore feces and is broken down by cellulase-producing microorganisms that reside in their gut as well as in soil, decaying matter, and surrounding environment. The objective of this study was to isolate actinobacteria from herbivore faeces and evaluate their cellulase-producing potential. A total of 50 actinobacterial isolates were obtained from cow, horse, and goat faeces. Among these, 33 isolates produced clear zones on carboxymethyl cellulose (CMC) agar plates, with hydrolysis capacity (HC) values ranging from 2.0 to 7.2. Out of 33 isolates, 28 isolates exhibited measurable cellulase activity, ranging from 0.37 ± 0.022 U/ml to 0.98 ± 0.046 U/ml. The five isolates with the highest enzyme activity—MG08, MG15, MH01, MH08, MH09, and MH11—were identified as *Streptomyces* sp. and demonstrated the ability to tolerate temperatures up to 45 °C. These isolates represent promising candidates for further studies on cellulase production, with potential applications in biomass degradation, bioconversion of agricultural residues, and industrial enzyme production.

Keywords: Actinobacteria, Cellulase, Animal feces

บทคัดย่อ

มูลสัตว์เป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์หลากหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ฟังไจ (fungi) และโพรโตซัว (protozoa) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์และเกี่ยวข้องกับการหมักเวียบนธาตุอาหารในระบบนิเวศ เซลลูโลส (cellulose) เป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่พบมากในผนังเซลล์ของพืชและพบในมูลสัตว์กินพืช ซึ่งถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์เหล่านี้ รวมถึงในดิน ชากพืชซากสัตว์ และในสิ่งแวดล้อมทั่วไป งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแอคติโนแบคทีเรียจากมูลสัตว์กินพืชและศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แอคติโนแบคทีเรีย 50 ไอโซเลต ถูกแยกจากมูลวัว มูลม้าและมูลแพะ ในจำนวนนี้มี 33 ไอโซเลต เกิดโซนใสบนจานอาหารแข็ง CMC โดยมีค่าการละลายอยู่ในช่วง 2.0 – 7.2 จากทั้งหมด 33 ไอโซเลตนี้ มีจำนวน 22 ไอโซเลต

^{1*}ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus,
Kamphaeng Saen, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author: Tel. 0-8695-9594, E-mail address: faasnm@ku.ac.th

มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ตรวจวัดได้ตั้งแต่ 0.37 ± 0.022 ยูนิต/มล. to 0.98 ± 0.046 ยูนิต/มล. แอคติโนแบคทีเรีย 5 ไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด ได้แก่ MG08, MG15, MH01, MH08, MH09 และ MH11 ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และสามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 45°C ไอโซเลตเหล่านี้เป็นตัวแทนที่มีศักยภาพสำหรับนำมาศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และมีความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้ย่อยสลายชีวมวล การแปรรูปวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม

คำสำคัญ: แอคติโนแบคทีเรีย เอนไซม์เซลลูเลส มุลสัตว์

บทนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า-1, 4 ไกลโคซิดิก เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติเนื่องจากเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัสดุเหลือทิ้งจากการเก็บเกี่ยว การผลิตและการบริโภคเป็นจำนวนมาก เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชีเลี้ยง มันสำปะหลัง (Jusakulvijit *et al.*, 2021) เป็นต้น วัสดุเหล่านี้สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม แต่ก็ยังมีเหลือทิ้งอีกเป็นจำนวนมาก การเผากำจัดวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ทำให้เกิดปัญหาล้างแวล้อมรวมถึงใช้ต้นทุนในการกำจัดสูง การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถลดต้นทุนในการผลิตและได้ผลิตภัณฑ์หลักคือน้ำตาลกลูโคส โดยน้ำตาลดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (ไบโอเอทานอล) ผลิตภัณฑ์อาหาร และผลิตภัณฑ์สิ่งทอ (Bhardwaj *et al.*, 2021) เป็นต้น เอนไซม์เซลลูเลสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า-1, 4-ไกลโคซิดิกจากปลายของสายเซลลูโลส จำเพาะต่อโครงสร้างของเซลลูโลสที่เรียงตัวเป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสหรือเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า-1, 4-ไกลโคซิดิกของโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่ม จำเพาะต่อโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบ และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลเซลโลไบโอส หรือเซลโลโอลิโกแซคคา

ไรด์ที่ละลายน้ำ เอนไซม์เซลลูเลสผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ ฟังไจ แบคทีเรีย และแอคติโนแบคทีเรีย ได้แก่ *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Nocardia* sp. และ *Streptomyces* sp. (Bhardwaj *et al.*, 2021; Meriem *et al.*, 2022) เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่ผลิตจากเชื้อราจำพวกต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียและแอคติโนแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ได้ดีในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง จึงเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ การแปรรูปวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นปุ๋ยหมัก ตลอดจนการใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพลังงานทดแทนในระดับอุตสาหกรรม

แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการเจริญเป็นเส้นใยและสร้างสปอร์คล้ายเชื้อรา เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะ เอนไซม์ และสารต้านมะเร็ง แอคติโนแบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วไปในดิน ในแหล่งน้ำทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม และในตะกอนใต้น้ำ รวมถึงในกองปุ๋ยหมัก โดยมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยเฉพาะสารที่ย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติ มีรายงานว่าแอคติโนแบคทีเรีย *Thermobifida fusca* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ทนอุณหภูมิสูง เอนไซม์ไซลานเนส เอนไซม์แมนนาเนส และเอนไซม์แมนโนซิเดส (Gomez del Pulgar & Saadeddin, 2014) แอคติโนแบคทีเรียสกุลอื่นที่มีรายงานผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Streptomyces*, *Nocardia*, *Kitasatospora*,

Nonomurae, *Asanoa*, *Streptosporangium* และ *Dactylosporangium* Putri & Setiawan (2019); (Saini *et al.*, 2015)

มูลสัตว์เป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย พังใจ และโปรโตซัว จุลินทรีย์เหล่านี้มีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ ภายในลำไส้ของสัตว์กินพืช และสัตว์ที่กินทั้งพืชและสัตว์จะมีจุลินทรีย์กลุ่มเซลล์โลไลติก แบคทีเรีย ได้แก่ สกุล *Fibrobacter*, *Ruminococcus* รวมถึง *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Eubacterium* และ *Clostridium* ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลล์โลสซึ่งสัตว์เหล่านี้ไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ (Froidurot & Julliard, 2022) มีรายงานการค้นพบแอคติโนแบคทีเรียจากมูลสัตว์หลายชนิด และมีรายงานว่าจุลินทรีย์ที่พบในมูลสัตว์กินพืชสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี (Ndlela & Schmidt, 2016; Singh *et al.*, 2015) ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากมูลของสัตว์กินพืช ได้แก่ วัว ม้า และแพะ และศึกษาศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูง ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างมูลสัตว์และแยกแอคติโนแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างมูลจากสัตว์กินพืช 3 ชนิด คือ วัว แพะ และม้า (Figure 1) ภายในพื้นที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เก็บมูลสัตว์ใส่ถุงพลาสติกสะอาด จากนั้นชั่งมูลสัตว์ 1 กรัม ผสมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มล. ทำการเจือจางลำดับส่วนที่ละ 10 เท่า ดูดของเหลวที่ความเจือจาง 10^5 ถึง 10^7 เกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็ง Carboxymethyl cellulose (CMC) (CMC 5 กรัม, Yeast Extract 1 กรัม, K_2HPO_4 0.7 กรัม, KH_2PO_4 0.3 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 กรัม, $ZnSO_4$ 0.001 กรัม, agar 18 กรัม, น้ำกลั่น 1 ลิตร, pH 6.0 – 7.0) ที่เติมยาปฏิชีวนะ นาลิดิซิกแอซิด (nalidixic acid) 25 ไมโครกรัม/มล. และคีโตโคนาโซล (ketoconazole) 100 ไมโครกรัม/มล. เพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราตามลำดับ ป่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 7 - 14 วัน คัดเลือกโคโลนีแอคติโนแบคทีเรีนำมาขีดลาก (cross streak) บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium 2 (ISP2) (Shirling & Gottlieb, 1966) จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวแข็ง ISP2 สำหรับการทดลองในขั้นตอนถัดไป และเก็บในรูปของสารแขวนลอยสปอร์และเส้นใยในสารละลายกลีเซอรอล 20 % (w/v) ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับการเก็บรักษาระยะยาว

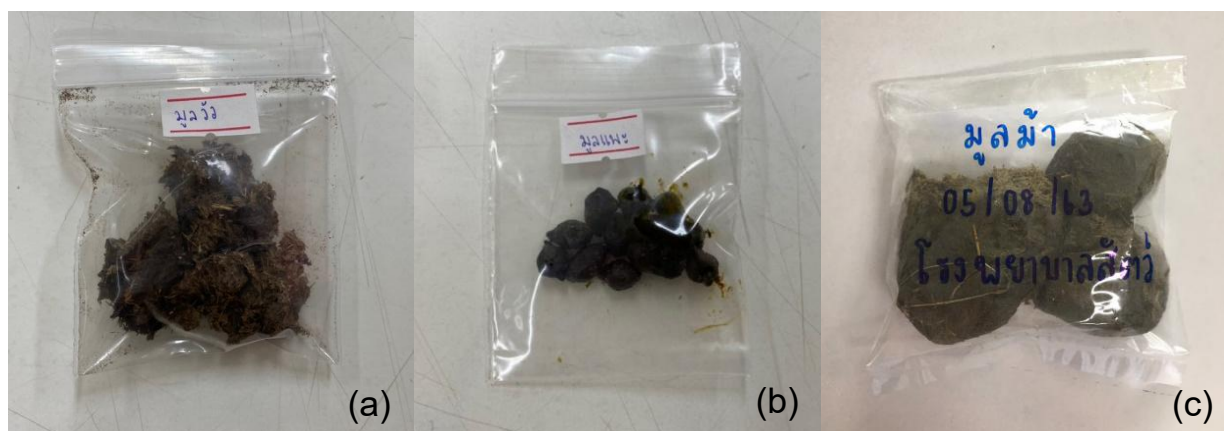


Figure 1 Animal feces collected from Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus.

Cow feces (a), goat feces (b) and horse feces (c)

2. การศึกษาความสามารถในการย่อยเซลลูโลส

เตรียมสารแขวนลอยหรือซัสเพนชัน (suspension) ของสปอร์และเส้นใย โดยเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียบนอาหาร ISP3 (Shirling & Gottlieb, 1966) เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่ ใช้ห่วงเย็บเชื่อมปลายกลม (loop) ปลอดเชื้อขูดสปอร์และเส้นใยใส่หลอดไมโครพิพิจขนาด 1.5 มล. ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.85 % (w/v) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารทดสอบ CMC agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลการย่อยเซลลูโลสโดยสังเกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนี หลังรดด้วยสารละลายคองโกเรด เข้มข้น 1 % (w/v) ท่วมจานอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที และล้างด้วยสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (Kasana *et al.*, 2008) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในหน่วยมิลลิเมตร คำนวณค่าความสามารถในการละลาย หรือ Hydrolysis capacity (HC) value (Li *et al.*, 2023) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

3. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียบนจานอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะโคโลนีแอคติโนแบคทีเรีย จำนวน 2 ชิ้นลงในใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเหลว CMC ปริมาตร 50 มล. บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ ปริมาตร 0.5 มล. ใส่หลอดทดลองที่มี 1 % CMC ใน 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ (พีเอช 4.8) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) โดยผสมตัวอย่างปริมาตร 1 มล. กับสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มล. นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการนำหลอดแช่ในน้ำแข็ง

ประมาณ 3 - 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มล. และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (OD_{540}) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (0.2 - 1.0 มก./มล.) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) โดยกำหนดให้เอนไซม์ 1 ยูนิต คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยซัสเพนชันโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล/นาที

4. การจำแนกชนิดแอคติโนแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับเบส

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียบนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 7 วัน บันทึกสปอร์ สีเส้นใยอาหารและการสร้างรงควัตถุ ศึกษาเส้นใยและการเรียงตัวของสปอร์โดยใช้วิธี scotch tape technique (Harris, 2000) นำเทปกาวยึดติดกับบนผิวหน้าโคโลนีแอคติโนแบคทีเรียอย่างเบามือ นำมาวางบนสไลด์ที่หยดสีย้อมคริสตัลไวโอเลต นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

ระบุชนิดแอคติโนแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA เริ่มต้นจากสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Také *et al.* (2015) จากนั้นเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 1F (5'-TCAACGAGAGTTTGATCCTG-3') และ 1530R (5'-AAGGAGATCCAGCCGCA-3') (Kataoka *et al.*, 1997) ตามวิธีการที่อธิบายโดย Mingma *et al.* (2023) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (FAVORGEN, Taiwan) ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลบนเว็บไซต์ <https://www.ezbiocloud.net/> (Chalita *et al.*, 2024) ฝากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล GenBank สร้างแผนภูมิต้นไม้

(Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021) โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) และกำหนดค่า bootstrap เป็น 1,000 รอบ (Felsenstein, 1985)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ซอฟต์แวร์ R เวอร์ชัน 4.4.0 โดยข้อมูลในแต่ละการทดลองจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติที่ความน่าจะเป็นน้อยกว่า 0.05 (Duncan's test, $p < 0.05$)

ผลและวิจารณ์

1. การแยกแอกติโนแบคทีเรียจากมูลสัตว์

งานวิจัยนี้ใช้อาหาร CMC agar ในการแยกแอกติโนแบคทีเรีย หลังจากบ่มจานอาหารเป็นเวลา 7 วัน พบโคโลนีแอกติโนแบคทีเรียมีขนาดเล็ก ลักษณะแข็ง ผิวหน้าโคโลนีด้าน บางโคโลนีสร้างสปอร์ซึ่งมีลักษณะคล้ายผงขอลงบนผิวหน้า โดยส่วนใหญ่เป็นสปอร์สีเทา สีน้ำตาล และสีขาว (Figure 2) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะเฉพาะของแอกติโนแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตในรูปแบบเส้นใย โดยบางส่วนของเส้นใยเหล่านี้ฝังตัวอยู่ในเนื้อวุ้น จากการแยกตัวอย่างสามารถคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียได้รวมทั้งสิ้น 50 ไอ

โซเลต โดยไอโซเลตที่ได้จากมูลม้ามีจำนวนสูงสุดถึง 21 ไอโซเลต (รหัสเชื้อ MH) ตามด้วยมูลแพะ 16 ไอโซเลต (รหัสเชื้อ MG) และมูลวัว 13 ไอโซเลต (รหัสเชื้อ MC) มีรายงานการแยกแอกติโนแบคทีเรียจากมูลสัตว์หลากหลายชนิด เช่น งานวิจัยของ Jiang *et al.* (2013) แยกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 746 ไอโซเลต จากมูลสัตว์ 31 ชนิด ในมณฑลยูนนาน ประเทศจีน ได้แก่ เชื้อโครง แป้นดำ ชะมด อัลปากา แรด นกเงือก ยีราฟ เต่ากาลาปากอส งานวิจัยของจิรพรณ์ (2549) ได้แยกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 32, 29 และ 20 ไอโซเลต จากมูลสุกร มูลวัว และมูลค่างาว ตามลำดับ งานวิจัยของ Hayakawa *et al.* (2010) แยกแอกติโนแบคทีเรียจากปุ๋ยหมักมูลสุกร ได้จำนวนทั้งสิ้น 125 ไอโซเลต ซึ่งจัดอยู่ใน 15 สกุล (genus) 22 สปีชีส์ (species) ที่แตกต่างกัน รายงานเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ามูลสัตว์เป็นแหล่งของแอกติโนแบคทีเรียที่หลากหลาย นอกเหนือจากแอกติโนแบคทีเรีย มีรายงานแบคทีเรียกลุ่ม Firmicutes และ Bacteroidetes และเชื้อราในไฟลัม Ascomycota ในมูลสัตว์กินพืช 5 ชนิด ได้แก่ กระต่าย วัว ม้า กวาง และไบซันยุโรป โดยพบแอกติโนแบคทีเรีย และบาซิลโลมากในมูลวัว (Dowd *et al.*, 2008)

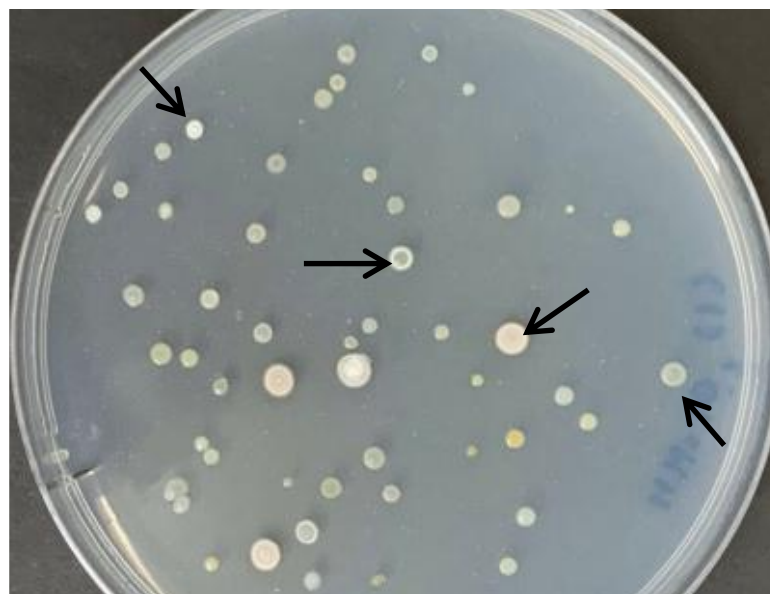


Figure 2 Colony morphology of actinobacteria (indicated by arrow) from goat feces at dilution of 10^{-7} cultured on CMC agar after incubation at 28 °C for 7 day

3. การทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลส

ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยใช้สีกองโกเรด ซึ่งจัดเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative) เพื่อตรวจกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสบนอาหาร CMC สีกองโกเรดจะจับกับสายเบต้า-(1-4)-ดีกลูแคนของคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสหรือ CMC และถูกตรึงด้วยสารละลาย 1M NaCl เห็นเป็นสีแดงเข้มล้อมรอบบริเวณใสซึ่งเป็นบริเวณที่ CMC ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ได้เป็นกลูแคนสายสั้นและไม่จับกับสีกองโกเรด (Sazci *et al.*, 1986) จากแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 50 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบ พบว่ามีจำนวน 33 ไอโซเลต (66 %) สามารถย่อย CMC ได้ โดยสังเกตจากโซนใสหลังการย้อมด้วยสีกองโกเรด (Figure 3) มีค่าความสามารถในการย่อย (HC value) อยู่ในช่วงระหว่าง 2.0 – 7.2 โดยไอโซเลต MH07 แสดงความสามารถในการย่อย CMC สูงสุด รองลงมาคือไอโซเลต MG08, MG10 และ MH16 ซึ่งมีค่า HC เท่ากับ 5.6, 5.5 และ 5.2 ตามลำดับ (Figure 4) เมื่อ

เทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าผลการศึกษานี้มีค่าความสามารถในการย่อยสลาย (HC value) สูงกว่า โดยงานวิจัยของ Putri & Setiawan (2019) ศึกษาการย่อยเซลลูโลสของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินในบริเวณต่างๆ ของเมืองสุลาเวสีตะวันตก ประเทศมาเลเซีย พบว่ามีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลต จากทั้งหมด 57 ไอโซเลต เกิดวงใสบนอาหาร CMC agar มีค่า HC อยู่ในช่วง 1.2 – 3.1 ในทำนองเดียวกัน งานวิจัยของ Khianngam *et al.* (2014) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากกากปาล์มน้ำมันและพบว่าแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตมีค่า HC จากการย่อยสลาย CMC อยู่ในช่วง 1.56 – 4.14 ซึ่งต่ำกว่าผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากแหล่งที่มาของตัวอย่าง ซึ่งมีองค์ประกอบทางสิ่งแวดล้อม เช่น ปริมาณอินทรีย์วัตถุที่แตกต่างกัน วิธีการเพาะเลี้ยง และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงชนิดและปริมาณของสารตั้งต้น เช่น CMC ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งอาจกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ในระดับที่แตกต่างกัน เป็นต้น



Figure 3 Representative positive results of isolate MH12, showing clear zones surrounding colonies indicating hydrolysis of CMC

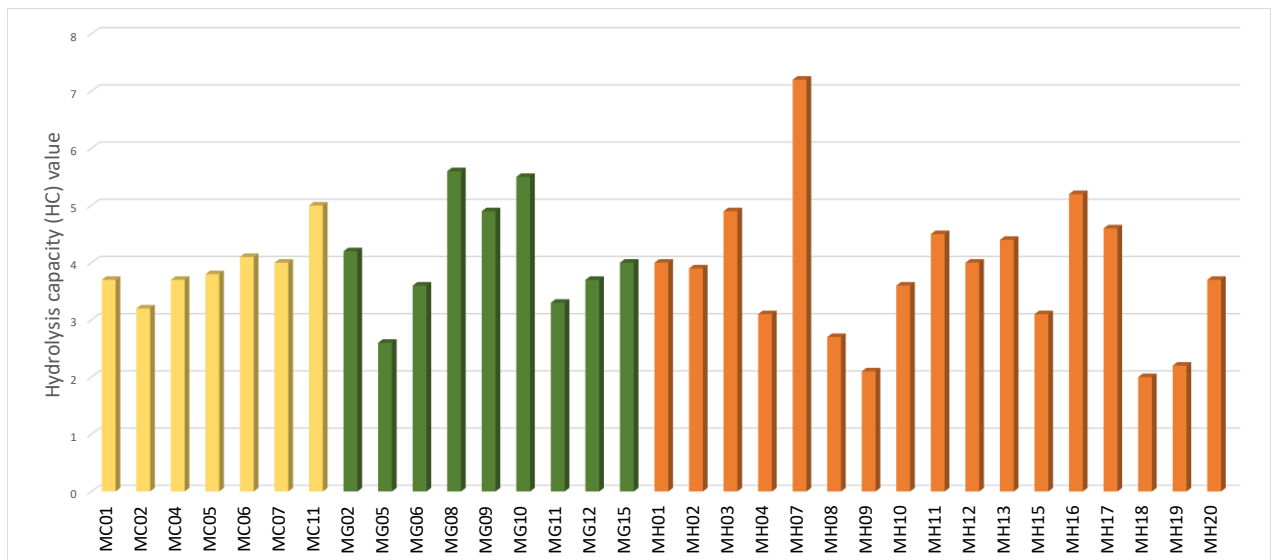


Figure 4 Hydrolysis capacity values of the isolates from cow faeces (yellow), goat faeces (green) and horse faeces (orange)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งตัวอย่างพบว่า แอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากมูลม้ามีจำนวนไอโซเลตที่ย่อย CMC มากที่สุดคือ 17 ไอโซเลต หรือคิดเป็น 51 % ของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด รองลงมาคือมูลแกะ 9 ไอโซเลต และมูลวัว 7 ไอโซเลต (Figure 5) แสดงให้เห็นว่ามูลม้าเป็นแหล่งที่สามารถแยกแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลาย CMC ได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับมูลสัตว์อื่น ๆ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางสรีรวิทยาและระบบย่อยอาหารของม้า ซึ่งเป็นสัตว์กินพืชที่มีกระเพาะเดี่ยว มีการหมักและย่อยเซลลูโลสที่บริเวณลำไส้ส่วน

ปลาย ได้แก่ ลำไส้ใหญ่และไส้ติ่ง ทำให้มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสสูงกว่าในมูลเมื่อเทียบกับสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัวหรือแกะ ซึ่งมีการย่อยเส้นใยในบริเวณรูเมนก่อนเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เหลือในมูลของสัตว์เคี้ยวเอื้องจึงมีปริมาณลดลงหลังผ่านการย่อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dowd *et al.* (2008) Costa *et al.* (2015) ที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มจุลินทรีย์ระหว่างสัตว์ที่มีกระเพาะเดียวกับสัตว์เคี้ยวเอื้อง (มีกระเพาะหลายห้อง)

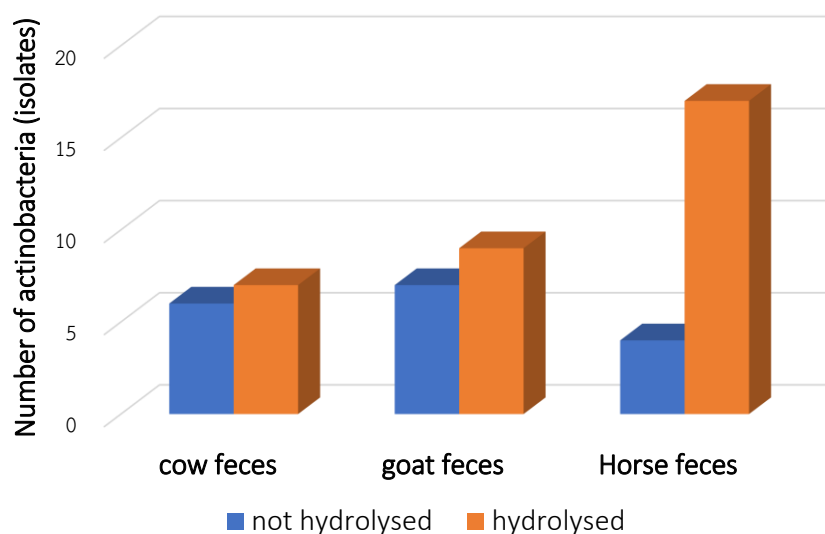


Figure 5 Number of actinobacteria from animal faeces with cellulose hydrolysis

4. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

คัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 33 ไอโซเลต ที่ให้ผลการย่อยเซลลูโลสบนจานอาหาร CMC agar เป็นบวก มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม CMC (0.5 %) เป็นซับสเตรต และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ชนิด CMCase) ด้วยวิธี DNS พบว่ามีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 28 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์ CMCase โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.98 ± 0.046 ยูนิต/มล. ถึง 0.37 ± 0.022 ยูนิต/มล. ไอโซเลต MG08 มีกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูงที่สุด รองลงมาคือ ไอโซเลต MH09, MH11 และ MH01 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.96 ± 0.087 , 0.96 ± 0.022 และ 0.92 ± 0.149 ยูนิต/มล. ตามลำดับ (Table 1) นอกจากนี้ มีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต ที่ตรวจพบวงไฮโดรไลซิสบนจานอาหาร CMC แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเหลว เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Liang *et al.* (2014) พบว่าเป็นไปในทำนองเดียวกัน คือ จากแบคทีเรียทั้งหมด 22 ไอโซเลตที่ให้ผลการย่อย CMC บนอาหารแข็งเป็นบวก พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลต ได้แก่ ME27-1, FCD1-3 และ SK3-4 ที่ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ในอาหารเหลว ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุจากปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อผลิตมีปริมาณ

น้อยมาก หรือความสามารถของเชื้อในการหลั่งเอนไซม์ออกมาได้น้อยเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว จากรายงานของ Sadhu & Maiti (2013) กล่าวว่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนไฮโดรไลซิสอาจไม่สะท้อนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่แท้จริง และพบว่าความกว้างของโซนไฮโดรไลซิสกับปริมาณเอนไซม์ไม่มีความสัมพันธ์กัน (Teather & Wood, 1982)

กิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์เซลลูเลสที่วัดได้จากงานวิจัยนี้อยู่ในระดับใกล้เคียงกับรายงานของ Abou-Dobara *et al.* (2015) ซึ่งพบว่ากิจกรรมเซลลูเลสของ *Streptomyces auranticus* เท่ากับ 0.2049 ยูนิต/มล. และงานวิจัยของ Da Vinha *et al.* (2011) ที่รายงานกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 เท่ากับ 2.00 ยูนิต/มล. อย่างไรก็ตาม กิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้ในงานวิจัยนี้ยังต่ำกว่าที่รายงานในหลายงานวิจัย (Prasad *et al.*, 2013; Sinjaroonsak *et al.*, 2020) ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดและสามารถนำไปประยุกต์ใช้เชิงอุตสาหกรรมหรือทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Table 1 Cellulase production capability of isolates

Isolate	Cellulase activity (U/ml)	Isolate	Cellulase activity (U/ml)
MC01	0.55 ± 0.072^{klm}	MH02	0.37 ± 0.013^n
MC02	0.37 ± 0.022^n	MH03	0.46 ± 0.012^{nm}
MC04	0.72 ± 0.056^{ghi}	MH04	0.79 ± 0.051^{defg}
MC05	0.39 ± 0.007^n	MH07	0.70 ± 0.084^{ghij}
MC06	0.51 ± 0.065^{lm}	MH08	0.88 ± 0.082^{abcd}
MC07	0.82 ± 0.010^{cdef}	MH09	0.96 ± 0.087^{ab}
MC11	0.51 ± 0.024^{lm}	MH10	0.59 ± 0.059^{kl}
MG02	0.54 ± 0.022^{klm}	MH11	0.96 ± 0.022^{ab}
MG05	0.72 ± 0.144^{ghi}	MH13	0.72 ± 0.002^{ghi}
MG08	0.98 ± 0.046^a	MH16	0.47 ± 0.002^{mn}
MG09	0.52 ± 0.026^{lm}	MH17	0.67 ± 0.003^{hij}
MG11	0.47 ± 0.014^{mn}	MH18	0.76 ± 0.026^{efgh}
MG15	0.86 ± 0.103^{bcde}	MH19	0.59 ± 0.001^{kl}
MH01	0.92 ± 0.149^{abcd}	MH20	0.64 ± 0.061^{jk}

This table demonstrates mean $\pm$ SD of triplicate

5. การศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

คัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูงสุด 6 อันดับแรก ได้แก่ ไอโซเลต MG08, MG15, MH01, MH08, MH09 และ MH11 โดยนำไอโซเลตเหล่านี้เลี้ยงบนอาหาร ISP2 และทำการบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่า แอกติโนแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงสุด 45 °C แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 55 °C ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความทนทานต่ออุณหภูมิในระดับปานกลางของไอโซเลตเหล่านี้ โดยมีแนวโน้มสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งในกองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30-45 °C ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพในภาคเกษตรและอุตสาหกรรม

6. การระบุชนิดของแอกติโนแบคทีเรียโดยการศึกษาทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต บนอาหาร ISP2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ 100 เท่า พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลต มีการเจริญเป็นเส้นใย สร้าง

สปอร์ขนาดเล็กต่อกันเป็นสายยาวและมีรูปร่างโค้งงอ (Figure 6) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* sp. โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% similarity) กับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูลอยู่ในช่วง 99.59 - 100 % (Table 2) ไอโซเลต MH01 (1,511 คู่เบส) และ MH11 (1,505 คู่เบส) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (similarity) 100 % กับ *S. rochei* LMG 1931^T ไอโซเลต MH08 (1,507 คู่เบส) และ MH09 (1,506 คู่เบส) มีความเหมือนกับ *S. griseoincamatus* NRRL B-1305^T เท่ากับ 100 % และ 99.52 % ตามลำดับ ไอโซเลต MG08 (1,505 คู่เบส) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 % กับ *S. daghestanicus* NRRL B-5418^T และไอโซเลต MG15 (1,507 คู่เบส) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99.86 % กับ *S. hyderabadensis* OU-40^T ผลงานวิจัยที่ได้สอดคล้องกับหลายวิจัยที่รายงานว่า *Streptomyces* หลายสปีชีส์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส รวมถึงเอนไซม์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น *Streptomyces rochei* ผลิตเอนไซม์เซลลูโลส โดยเฉพาะเอนโดกลูคาเนส และมีความสามารถในการย่อยลิกโนเซลลูโลส (Basaglia *et al.*, 1992; Perito *et al.*, 1994)

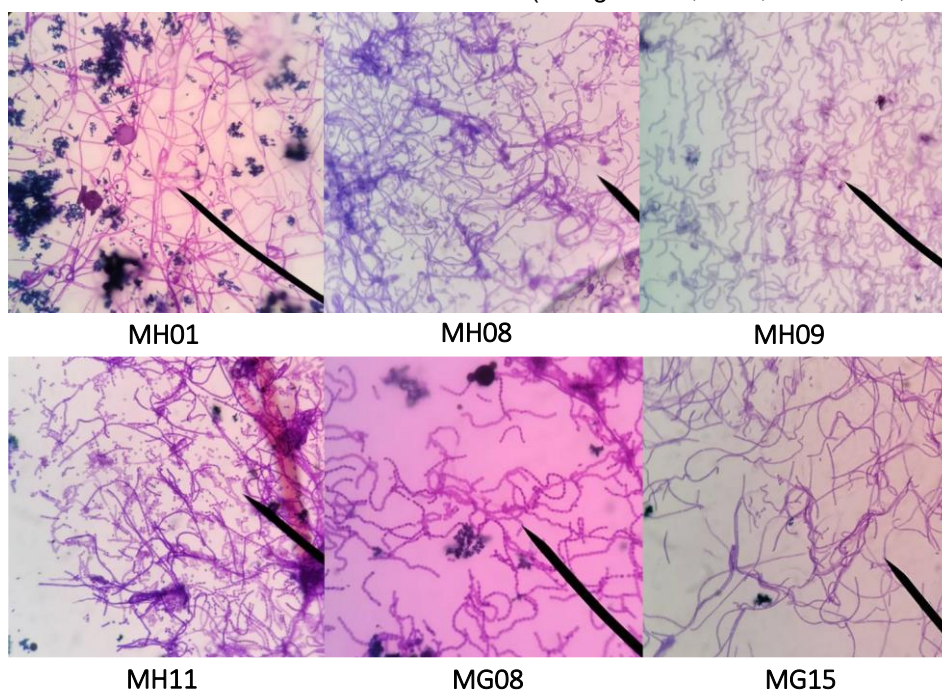


Figure 6 Mycelium and spore chain morphology under a 1,000X magnification light microscope of cellulase-producing actinobacteria after 7-10 days on ISP3 medium

Table 2 Nucleotide sequence alignment analysis of 16S rRNA gene of isolates

Isolate	Most closely related type strain	% Similarity	Accession numbers
MH01	<i>Streptomyces rochei</i> LMG 1931 ^T (AJ781321)	100.00	OQ933451
MH08	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> NRRL B-1305 ^T (AJ494865)	100.00	OQ933452
MH09	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> NRRL B-1305 ^T (AJ494865)	99.52	OQ933453
MH11	<i>Streptomyces rochei</i> LMG 1931 ^T (AJ781321)	100.00	OQ933454
MG08	<i>Streptomyces daghestanicus</i> NRRL B-5418 ^T (DQ442497)	100.00	OQ933455
MG15	<i>Streptomyces hyderabadensis</i> OU-40 ^T (FM998652)	99.86	OQ933456

นอกจากนี้ *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ยังมีความสำคัญในทางการเกษตรและถูกใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ และส่งเสริมการเจริญของพืช ตัวอย่างเช่น *S. lydicus* WYEC108 ที่วางจำหน่ายในชื่อทางการค้า Actinovate® สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสและเซลลูเลสซึ่งช่วยย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราและนำมาใช้ควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช เช่น *Fusarium* และ *Rhizoctonia* (Khan et al., 2023) ดังนั้น แอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ โดยเฉพาะ *S. rochei* MH01 และ MH11 และ *S. griseoincarnatus* MH08 และ MH09 อาจมีศักยภาพในการย่อยสลายเศษซากพืชและการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืชได้

สรุป

แอคติโนแบคทีเรีย 50 ไอโซเลต ที่แยกจากมูลม้า มูลวัว และมูลแพะ นำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสบนจานอาหารแข็ง พบแอคติโนแบคทีเรียจำนวนมากกว่า 33 ไอโซเลต มีความสามารถย่อยเซลลูโลสบนจานอาหารแข็ง CMC ได้ ในจำนวนนี้ 22 ไอโซเลต มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตั้งแต่ 0.37 ± 0.022 ยูนิต/มล. ถึง 0.98 ± 0.046 ยูนิต/มล. และพบว่า 5 ไอโซเลตที่มีศักยภาพสูงสุด ได้แก่ MG08, MG15, MH01, MH08, MH09 และ MH11 ซึ่งทั้งหมดอยู่ในสกุล

Streptomyces และสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 45 °C ไอโซเลตเหล่านี้มีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายชีวมวล การจัดการวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2565 ขอขอบคุณนางสาวชญาดา ตีละกุล และขอขอบคุณโครงการสนับสนุนการจัดตั้งห้องเรียนวิทยาศาสตร์ในโรงเรียน โดยการกำกับดูแลของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (โครงการ รว.มก.) ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

จิรพรรณ ใจอินผล. (2549). การพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพร่วมกับการใช้เชื้อแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากมูลสัตว์เพื่อต้านทานเชื้อ *Rhizoctonia solani*. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

- Abou-Dobara, M. I., El-Sayed, A. K. A., El-Fallal, A. A., & Sauf, M. A. (2015). Cellulase production by two *Streptomyces* species. *Scientific Journal for Damietta Faculty of Science* 5, 24-32. <https://doi.org/10.21608/sjdfs.2015.194460>
- Basaglia, M., Concheri, G., Cardinali, S., Pasti-Grigsby, M. B., & Nuti, M. P. (1992). Enhanced degradation of ammonium-pretreated wheat straw by lignocellulolytic *Streptomyces* spp. *Canadian journal of microbiology*, 38, 1022-1025. <https://doi.org/10.1139/m92-168>
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., & Verma, P. (2021). Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- Chalita, M., Kim, Y. O., Park, S., Oh, H. S., Cho, J. H., Moon, J., Baek, N., Moon, C., Lee, K., Yang, J., Nam, G. G., Jung, Y., Na, S. I., Bailey, M. J., & Chun, J. (2024). EzBioCloud: a genome-driven database and platform for microbiome identification and discovery. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(6), 006421. <https://doi.org/10.1099/ijse.m.0.006421>
- osta, M. C., Silva, G., Ramos, R. V., Staempfli, H. R., Arroyo, L. G., Kim, P., & Weese, J. S. (2015). Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *The Veterinary Journal*, 205(1), 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.03.018>
- Da Vinha, F. N. M., Gravina-Oliveira, M. P., Franco, M. N., Macrae, A., da Silva Bon, E. P., Nascimento, R. P., & Coelho, R. R. R. (2011). Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(3), 256-267. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9132-8>
- Dowd, S. E., Callaway, T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeethan, T., Hagevoort, R. G., & Edrington, T. S. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology*, 8, 125. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-125>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Froidurot, A., & Julliand, V. (2022). Cellulolytic bacteria in the large intestine of mammals. *Gut Microbes*, 14(1), 2031694. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2031694>
- Gomez del Pulgar, E. M., & Saadeddin, A. (2014). The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*. *Critical reviews in microbiology*, 40(3), 236-247. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.776512>
- Harris, J. L. (2000). Safe, low-distortion tape touch method for fungal slide mounts. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4683-4684. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.12.4683-4684.2000>

- Jiang, Y., Han, L., Chen, X., Yin, M., Zheng, D., Wang, Y., Qiu, S., & Huang, X. (2013). Diversity and bioactivity of cultivable animal fecal actinobacteria. *Advances in Microbiology*, 3, 1-13. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.31001>
- Jusakulvijit, P., Bezama, A., & Thrän, D. (2021). The availability and assessment of potential agricultural residues for the regional development of second-generation bioethanol in Thailand. *Waste and Biomass Valorization*, 12(11), 6091-6118. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01424-y>
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503-507. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
- Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T., & Yoshida, T. (1997). Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 151(2), 249-255. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12578.x>
- Khan, S., Srivastava, S., Kamwal, A., & Malik, T. (2023). *Streptomyces* as a promising biological control agents for plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1285543. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285543>
- Khianngam, S., Pootaeng-on, Y., Techakriengkrai, T., & Tanasupawat, S. (2014). Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(4), 90-96.
- Li, H., Zhang, M., Zhang, Y., Xu, X., Zhao, Y., Jiang, X., Zhang, R., & Gui, Z. (2023). Characterization of cellulose-degrading bacteria isolated from silkworm excrement and optimization of its cellulase production. *Polymers (Basel)*, 15(20), 4142. <https://doi.org/10.3390/polym15204142>
- 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*, 2014, 512497. <https://doi.org/10.1155/2014/512497>
- Meriem, M., Denis, F., Mohamed-Benkada, M., Gabed, N., Caruso, A., Callac, N., & Abi-Ayad, E. (2022). Characterization of actinomycetes strains isolated from Chelif Estuary in the North-West of Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(1), 7-14. <https://doi.org/10.54319/jjbs/150102>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

- Mingma, R., Innun, A., Pengrung, T., Boonsai, N., & Duangmal, K. (2023). Antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from root of mangrove plants. *Journal of Science and Technology Kasetsart University*, 12(1), 28–40.
- Ndilela, L. L., & Schmidt, S. (2016). Evaluation of wild herbivore faeces from South Africa as a potential source of hydrolytically active microorganisms. *Springerplus*, 5, 118. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1739-y>
- Perito, B., Hanhart, E., Irdani, T., Iqbal, M., McCarthy, A. J., & Mastromei, G. (1994). Characterization and sequence analysis of a *Streptomyces rochei* A2 endoglucanase-encoding gene. *Gene*, 148(1), 119-124. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90244-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90244-5)
- Prasad, P., Singh, T., & Bedi, S. (2013). Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. *Journal of King Saud University-Science*, 25(3), 245-250. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.03.003>
- Putri, A. L., & Setiawan, R. (2019). Isolation and screening of actinomycetes producing cellulase and xylanase from Mamasa soil, West Sulawesi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 308(1), 012035. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012035>
- Sadhu, S., & Maiti, T. K. (2013). Cellulase production by bacteria: A review. *British Microbiology Research Journal International*, 3(3), 235–258. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2013/2367>
- Saini, A., Aggarwal, N. K., Sharma, A., & Yadav, A. (2015). Actinomycetes: A source of Lignocellulolytic Enzymes. *Enzyme Research*, 2015, 279381. <https://doi.org/10.1155/2015/279381>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Sazci, A., Erenler, K., & Radford, A. (1986). Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology*, 61(6), 559-562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01729.x>
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(3), 313-340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Singh, S., Thavamani, P., Megharaj, M., & Naidu, R. (2015). Multifarious activities of cellulose degrading bacteria from Koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces. *Journal of Animal Science and Technology*, 57(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40781-015-0056-2>

- Sinjaroonsak, S., Chaiyaso, T., & H-Kittikun, A. (2020). Optimization of cellulase and xylanase productions by *Streptomyces thermocoprophilus* TC13W using low cost pretreated oil palm empty fruit bunch. *Waste and Biomass Valorization*, 11(8), 3925-3936. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00720-y>
- Také, A., Matsumoto, A., Ōmura, S., & Takahashi, Y. (2015). *Streptomyces lactacystinicus* sp. nov. and *Streptomyces cyslabdanicus* sp. nov., producing lactacystin and cyslabdan, respectively. *The Journal of Antibiotics*, 68(5), 322-327. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.162>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- 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(4), 777-780. <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982>