การคัดเลือกเชื้อราย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อใช้ในการปรับปรุงดินเค็ม
Screening of cellulose degrading fungi for the improvement of salty soil

จุฑาพร แสวงแก้ว (Jutaporn Swangkeaw)[1*]

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากดินเค็มจำนวน 17 ตัวอย่าง พบเชื้อราทั้งหมด 27 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน 16 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) พบเชื้อราจำนวน 16 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบนอาหาร CMC agar ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์และพบจำนวน 8 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบน CMC agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ นำเชื้อราที่ได้มาทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว mineral salts ที่ผสม CMC และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ พบเชื้อราไอโซเลท 10aA2 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด เท่ากับ 1.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ดังนั้นสามารถนำเชื้อรา 10aA2 มาประยุกต์ใช้ในการทำปุ๋ยหมักเพื่อใช้ลดปัญหาความเค็มของดิน

Abstract

Cellulose degrading fungi were isolated from 17 salt affected soil samples. There were 27 and 16 fungal isolates found which were grown on potato dextrose agar (PDA) containing 5% and 10% sodium chloride. The ability of fungal isolates to degrade carboxymethyl cellulose (CMC) was investigated on CMC agar medium. Sixteen and eight fungal isolates displayed their ability to degrade CMC on the medium that contained 5 and 10 percent of sodium chloride, respectively. Examining cellulase production in mineral salts medium containing CMC and 10% sodium chloride revealed that fungal isolate 10aA2 was able to produce the highest cellulase activity at 1.8 U mg^{-1} of protein. Hence, fungal isolate 10aA2 could be used in the process of compost making for improvement of salt affected soils.

คำสำคัญ: เซลลูโลส, ดินเค็ม, เชื้อรา
Keywords: cellulose, salty soil, fungi

[1]*อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**Corresponding author, e-mail: sjutap@kku.ac.th*

บทนำ

ดินเค็มหมายถึงดินที่มีปริมาณเกลือละลายอยู่ในสารละลายดินมากเกินไปจนมีผล กระทบต่อการเจริญเติบโตและผลิตผลของพืช เนื่องจากทำให้พืชเกิดอาการขาดน้ำ และมีการสะสมไอออนที่เป็นพิษในพืชมากเกินไป นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความไม่สมดุลของธาตุอาหารพืชด้วย (รังสรรค์, 2547) ดินเค็มเป็นปัญหาที่สำคัญต่อสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อการเกษตร ส่งผลให้ไม่สามารถใช้พื้นที่ดังกล่าวมาใช้ในงานเกษตรกรรมได้ (Chen et al., 2001; Principe et al., 2007) ดินเค็มในประเทศไทยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและแถบชายทะเล นอกจากนั้นยังพบปัญหาดินเค็มในภาคกลางด้วยเช่นกัน พื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีทั้งสิ้น 17.8 ล้านไร่ แบ่งเป็นดินเค็มจัด 1.5 ล้านไร่ ดินเค็มปานกลาง 3.7 ล้านไร่ และดินเค็มน้อย 12.6 ล้านไร่ และมีดินที่มีศักยภาพในการเกิดการแพร่กระจายดินเค็มอีก 19.4 ล้านไร่ ดินเค็มชายทะเลมี 2.3 ล้านไร่ ดินเค็มภาคกลาง 1.13 ล้านไร่ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2524) ปัญหาของดินเค็มที่เกิดขึ้นมีทั้งด้านการขยายพื้นที่เพิ่มขึ้นก่อให้เกิดความรุนแรงเพิ่มขึ้น ทำให้เกษตรกรมีรายได้ต่ำลง เนื่องจากผลผลิตน้อยลง มนุษย์เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของดินเค็ม เช่น ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการตัดไม้ทำลายป่า การทำนาเกลือ การสร้างอ่างเก็บน้ำบนดินเค็ม ทำให้เกิดการแพร่กระจายของดินเค็ม

ดังนั้นการดำเนินการต่างๆ ในพื้นที่ดินเค็มแต่ละแห่ง เพื่อป้องกันการแพร่กระจาย และแก้ไขปรับปรุงให้สามารถใช้ประโยชน์ได้ มีหลายวิธี เช่น วิธีทางกายภาพ ชีวภาพและเคมี ซึ่งวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดความเค็มของดินเค็มได้ ปัจจุบันได้มีการนำจุลินทรีย์หลายชนิดมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางและได้มีการนำจุลินทรีย์ที่แพร่กระจายอยู่ในดินทุกชนิดมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยนำมาใช้ร่วมกับการปรับปรุงดิน มีการวิจัยและรายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ ไรโซเบียม แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส และรา สามารถเจริญและมีชีวิตรอดได้ในดินเค็ม (Douka et al., 1983; Chen et al., 2001) แต่อย่างไรก็ตามจำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินเค็มจะมีจำนวนลดน้อยลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีปริมาณเกลือ (โซเดียมคลอไรด์) เพิ่มสูงขึ้น (Omar et al., 1994)

วิธีที่ง่ายสำหรับปรับปรุงดินเค็มคือการใช้ปุ๋ยหมัก ทำได้โดยการนำเอาเศษวัสดุที่เหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว กากถั่ว แกลบ เป็นต้น มาหมักกับจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามวัสดุดังกล่าวประกอบไปด้วยเซลลูโลส 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง (Blackwell and Marchessault, 1971) เซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตมีโครงสร้างซับซ้อนและยากต่อการย่อยสลาย ในการย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือ การย่อยสลายด้วยกรดและการย่อยด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เรียกรวมว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส การนำเอนไซม์มาใช้ในการย่อยเซลลูโลสเป็นกระบวนการที่มีความจำเพาะสูง ซึ่งจะทำหน้าที่ในการย่อยสลายพันธะบีต้า 1,4 ไกลโคซิดิก ภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ปฏิกิริยาไม่รุนแรง ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสทดสอบได้จากการย่อยสารประกอบเซลลูโลสโดยตรง เมื่อทำการแยกจุลินทรีย์จากดินเค็ม พบราสายพันธุ์ *Alternaria alternata, Aspergillus terreus, Chaetomium globosum, Curvularia lunata* และ *Drechslera australiensis* (Malik et al., 1979) และแบคทีเรียในกลุ่ม Bacillaceae, Rhizobiaceae, Actinomycetes สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ (Zahran et al., 1992; Principe et al., 2007)

แนวทางการปรับปรุงและพัฒนาสภาพของดินเค็มให้มีลักษณะดีขึ้น สามารถทำได้โดยการนำเชื้อราทนเค็มที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดี และรวดเร็วมาใช้ในการทำปุ๋ยหมักอินทรีย์ ข้อดีคือเชื้อราทนเค็มที่ใช้ในการทำปุ๋ยหมักสามารถเจริญและดำรงชีวิตอยู่ในดินเค็มได้ ดังนั้นในการทำปุ๋ยหมักอินทรีย์ครั้งต่อไป ซึ่งไม่จำเป็นต้องหมักปุ๋ยก่อนและยังสามารถนำเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและมูลสัตว์ไถกลบลงบนดินเค็มได้

เชื้อราทนเค็มกลุ่มดังกล่าวที่อยู่ในดินเค็มสามารถย่อยสารอินทรีย์ได้เองตามธรรมชาติ นอกจากนั้นเชื้อราทนเค็มบางสายพันธุ์ สามารถสร้างสารอาหารบางอย่างที่มีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อพืชได้เป็นต้น

งานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกเชื้อราบริเวณดินเค็มในจังหวัดขอนแก่น ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส และสามารถทำงานในสภาวะที่มีเกลือได้ดี การศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำเชื้อราหรือเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงดินเค็มต่อไป

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างดินเค็ม

สำรวจและเก็บตัวอย่างดินเค็มในจังหวัดขอนแก่น นำดินตัวอย่างมาละลายในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 จากนั้นนำมาวัดค่าความเค็มโดยการวัดค่าการนำกระแสไฟฟ้า

การคัดแยกเชื้อราในดินเค็ม

นำตัวอย่างดินเค็ม 1 กรัม มาเจือจางในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเกลี่ยเชื้อ (spread plate technique) ลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA: มันฝรั่ง 200 กรัม, น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม, ผงวุ้น 15 กรัม, น้ำ 1 ลิตร, พีเอช 5) ที่มี Streptomycin ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบและมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 5 วัน บันทึกลักษณะของเชื้อราที่เจริญโดยดูสีของสปอร์และเส้นใยและนับจำนวนของเชื้อที่เจริญ แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาเชื้อราไว้ใน PDA slant ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสต่อไป

การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส

นำเชื้อราที่แยกได้จากดินเค็มมา point inoculation บนอาหารเลี้ยงเชื้อ carboxymethyl cellulose agar (CMC agar: carboxymethyl cellulose 10 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, $CaCl_2$ 0.1 กรัม, $MgSO4.7H_2O$ 0.2 กรัม, KCl 0.5 กรัม, $(NH_4)2SO_4$ 0.543 กรัม, ผงวุ้น 15 กรัม, น้ำ 1 ลิตร, พีเอช 5) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อรา

การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (CMCase)

นำเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ใน PDA slant ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการย้ายเชื้อลงใน PDA slant ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 5 วัน จากนั้นทำให้สปอร์ของเชื้อราแขวนลอยอยู่ในสารละลาย Tween 80 (1 เปอร์เซ็นต์) และปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์ $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปิเปตซัสเพนชั่นของสปอร์จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร mineral salts (KH_2PO_4 1.0 กรัม, $CaCl_2$ 0.1 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, KCl 0.5 กรัม, $(NH_4)2SO_4$ 0.543 กรัม, น้ำ 1 ลิตร, พีเอช 5) ที่ผสม CMC 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวัน 0, 1, 3, 5, 7, 11, 14 วันของการเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสและศึกษาการเจริญโดยการวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (CMCase)

การแยกสารละลายเอนไซม์และเส้นใยของเชื้อราทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (CMCase) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry et al, 1951)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (CMCase) ทำได้โดย ปิเปตสารละลายเอนไซม์มา 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย CMC 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่ละลายใน acetate buffer พีเอช 5) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Sengubta et al., 2000) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ reducing sugar โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (Miller, 1959)

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายซับสเตรท(carboxymethyl cellulose) แล้วทำให้เกิดน้ำตาล reducing sugar 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

การวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้ง

นำเชื้อราที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว mineral salt มากรองเพื่อแยกเอาส่วนของเส้นใยและสปอร์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนบนกระดาษกรองจะมีเส้นใยและสปอร์ของราอยู่ นำไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส

นำเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสมาเลี้ยงในอาหาร mineral salts ที่ผสม CMC 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 2, 4, 6, 8, 10 เปอร์เซ็นต์ ตามขั้นตอนในข้อที่ 4 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส

ผลการวิจัย

ค่าการนำไฟฟ้าของตัวอย่างดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณ ตำบลบ้านเป็ด อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น จำนวน 17 ตัวอย่าง และวัดค่าความเค็มของดินโดยวัดค่าการนำไฟฟ้าของดิน ค่าการนำไฟฟ้าของดินตัวอย่างแสดงในตารางที่ 1 ตัวอย่างดินที่เก็บได้มีค่าการนำไฟฟ้าในช่วง 0.11 ถึง 9.17 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร โดยตัวอย่างดินเค็มที่นำมาศึกษาแบ่งออกเป็น 4 ระดับ (ตามผลกระทบต่อพืช, FAO, 1976) คือ ดินไม่เค็มและไม่มีผลกระทบต่อพืช (< 2 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร) ดินเค็มน้อยและมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชไม่ทนเค็ม (2-4 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร) ดินเค็มปานกลางและมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด (4-8 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร) และ ดินเค็มมากและมีเฉพาะพืชทนเค็มเท่านั้นจึงจะเจริญเติบโตให้ผลผลิตได้ (> 8 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร) ซึ่งดินตัวอย่างอยู่ในระดับดินไม่เค็มจนถึงเค็มมาก

ผลการแยกเชื้อราที่สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์

การแยกเชื้อราทั้งหมดจากดินเค็มตัวอย่าง 17 ตัวอย่างที่สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ได้เชื้อราทั้งหมด 27 ไอโซเลท และจำนวนเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 16 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อราทั้ง หมดรวม 43 ไอโซเลท มาศึกษาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

ผลการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส

เชื้อราทั้งหมด 27 ไอโซเลท ที่แยกได้จากอาหาร PDA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ จะนำมาศึกษาการย่อยสลายเซลลูเลส โดยดูจากการเจริญบนอาหาร CMC agar ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ พบเชื้อราจำนวน 16 ไอโซเลท

ที่สามารถเจริญบนอาหาร CMC agar (ตารางที่ 2) ส่วนเชื้อราจำนวน 16 ไอโซเลท ที่แยกได้จากอาหาร PDA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ พบจำนวน 8 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบน CMC agar (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลทที่สามารถเจริญบนอาหาร CMC agar ได้ มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ส่วนเชื้อราที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าว เนื่องจากเชื้อราไอโซเลทนั้นๆ ไม่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ จากนั้นเชื้อราทั้งหมดรวม 24 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบนอาหาร CMC agar จะนำมาศึกษาการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (CMCase) ในอาหารเหลว

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (CMCase)

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา 16 ไอโซเลท ในอาหาร mineral salt ที่เติม CMC และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา 8 ไอโซเลท ในอาหาร mineral salt ที่เติม CMC และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ พบเชื้อราไอโซเลท 10aA2 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร mineral salt ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิต CMCase ได้สูงสุด เท่ากับ 1.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ลักษณะของเชื้อรา 10aA2 เมื่อเจริญบนอาหาร PDA ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเส้นใยสีขาวและมีสปอร์สีขาว (รูปที่ 1ก) ลักษณะของเชื้อรา 10aA2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของเชื้อราไม่มีผนังกั้นและสปอร์อยู่ในถุงหุ้มสปอร์ (รูปที่ 1ข)

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา 10aA2 ในอาหาร mineral salt ที่เติม CMC และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราดังกล่าวเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และอัตราการเจริญของเชื้อราจะคงที่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ส่วนการผลิตเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ควบคู่ไปกับการเจริญ เมื่อเชื้อรามีอัตราการเจริญคงที่การสร้างเอนไซม์จะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากการเลี้ยง 7 วัน และเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 1.84 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน (รูปที่ 2)

ผลการศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส

เมื่อเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท 10aA2 ในอาหาร mineral salt ที่เติม CMC และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเชื้อรา 10aA2 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เมื่อเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรามีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเชื้อราเจริญในอาหารที่มีปริมาณเกลือสูงขึ้นตั้งแต่ 6 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป ซึ่งในสภาวะที่มีปริมาณเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์พบการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสได้สูงสุด (รูปที่ 3)

สรุปและวิจารณ์

ดินเค็มเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมและมีผลกระทบโดยตรงต่อการเกษตรกรรม แนวทางที่จะแก้ปัญหาดินเค็มทำได้หลายวิธี ซึ่งการใช้ปุ๋ยหมักเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำมาลดปัญหาดินเค็มได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่จะมาใช้ในการทำปุ๋ยหมัก ควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเจริญได้ในดินเค็มและมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจากวัตถุดิบในการหมักปุ๋ยจะใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ในการหมัก ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก จากการแยกเชื้อราจากดินเค็ม 17 ตัวอย่าง ได้เชื้อราทั้งหมด 27 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 16 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ในสภาพที่มีเกลือ

สูงขึ้นปริมาณเชื้อราที่แยกได้ก็จะมีปริมาณลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของนักวิทยาศาสตร์หลายๆ ท่าน โดยได้ศึกษาจำนวนของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินเค็ม พบว่าปริมาณของจุลินทรีย์จะมีจำนวนลดน้อยลง เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าความเค็มของดินมีผลต่อปริมาณของจุลินทรีย์ (Abdel-Sater, 1994; Omar et al., 1994; Chen et al., 2001; Yuan et al., 2007)

เมื่อนำเชื้อรามาทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส พบไอโซเลท 10aA2 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เมื่อเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา 10aA2 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ Malik et al. (1980) รายงานว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Aspergillus luchuensis เมื่อมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง และเอนไซม์จะมีกิจกรรมสูงสุดในสภาพที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ นอกจากนั้น Abdel-Sater (1994) รายงานว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา Aspergillus spp. ที่แยกได้จากดินเค็ม

ดังนั้นจะเห็นได้เชื้อราไอโซเลท 10aA2 มีคุณลักษณะที่เหมาะในการนำไปปรับปรุงดินเค็ม เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ และยังสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้งานควรบ่งบอกชนิดของเชื้อราตลอดจนตรวจสอบการก่อโรคต่อพืช เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงดินเค็มต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. พิสิฏฐ์ เจริญสุดใจ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างดินเค็มและเครื่องมือสำหรับวัดค่าความเค็ม นางสาวกนกกาญจน์ เดชวงศิลป์ ที่ช่วยเหลือในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเชื้อรา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ กรมพัฒนาที่ดิน จังหวัดขอนแก่น สำหรับข้อมูลดินเค็มงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยนักวิจัยใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2524. **คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐ: ความรู้เรื่องดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** ฝ่ายเผยแพร่และประชาสัมพันธ์. กรุงเทพฯ.

รังสรรค์ อิ่มเอิบ. 2547. **รายงานผลการศึกษาเรื่องการศึกษาวิเคราะห์แนวทางการจัดการดินเค็มในประเทศไทย.** กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ

Abdel-Sater M.A. 1994. Cellulase activity and succession of fungi in soil amended with sodium chloride, organic mater and Ca-superphosphate. **J Basic Microbiol** 34: 283-302.

Blackwell J. and Marchessault R.H. 1971. **Cellulase and Cellulose Derivative**, edited by N. M. Bikales and L. Segal. New York: Wiley-Interscience.

Chen D.M., Ellul S., Herdman K. and Cairney J.W.G. 2001. Influence of salinity on biomass production by Australian Pisolithus spp. isolates. **Mycorrhiza** 11: 231-236.

Douka C.E., Xenoulis A.C. and Paradellis T. 1983. Interaction between microorganisms, chemical composition and environment in salt-affected soils. **Folia Microbiol** 28: 57-61.

FAO. 1976. Prognosis of salinity and alkalinity. **FAO Soil Bulletin** 31.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J Biol Chem** 193: 265-275.

Malik K.A., Bhatti N.A. and Kauser F. 1979. Effect of soil salinity on decomposition and humification of organic matter by some cellulolytic fungi. **Mycologia** 71: 811-820.

Malik K.A., Kauser F. and Azam F. 1980. Effect of sodium chloride on the cellulolytic ability of some Aspergilli. **Mycologia** 72: 322-328.

Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem** 31: 426-428.

Omar S.A., Abdel-Sater M.A., Khalli A.M. and Abd-Alla M.H. 1994. Growth and enzyme activities of fungi and bacteria in soil salinized with sodium chloride. **Folia Microbiol** 39: 23-28.

Principe A., Alvarez F., Castro M.G., Zachi L., Fischer S.E., Mori G.B. and Jofre E. 2007. Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina. **Current Microbiol** 55: 314-322.

Sengupta S., Jana M.L., Sengupta D. and Naskar A.K. 2000. A note on estimation of microbial glycosidase activities by dinitrosalicylic acid reagent. **Appl Microbiol Biotech** 53: 732-735.

Yuan B., Li Z., Liu H., Gao M. and Zhang Y. 2007. Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. **Appl Soil Ecol** 35: 319-328.

Zahran H.H., Moharram A.M. and Mohammad H.A. 1992. Some ecological and physiology studies on bacteria isolated from salt-affected soils of Egypt. **J Basic Microbiol** 32: 405-413.

ตารางที่ 1. ค่าการนำไฟฟ้าของตัวอย่างดินเค็ม

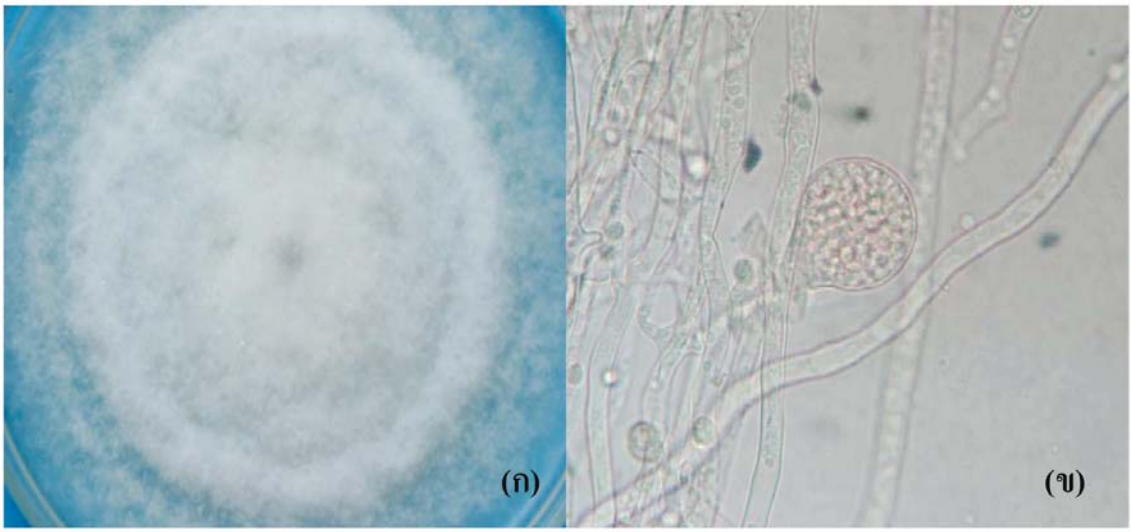
ดินตัวอย่าง	ค่าการนำไฟฟ้า (เดซิซีเมนส์ต่อเมตร)	ดินตัวอย่าง	ค่าการนำไฟฟ้า (เดซิซีเมนส์ต่อเมตร)
aA	4.67	cB	0.80
aB	9.17	cC	3.80
aC	2.77	cD	0.11
aD	3.57	dA	4.50
bA	3.00	dB	1.50
bB	0.30	dC	1.00
bC	0.90	dD	6.00
bD	1.00	dE	4.30
cA	0.14		

ตารางที่ 2. การเจริญของเชื้อราบนอาหาร CMC agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์

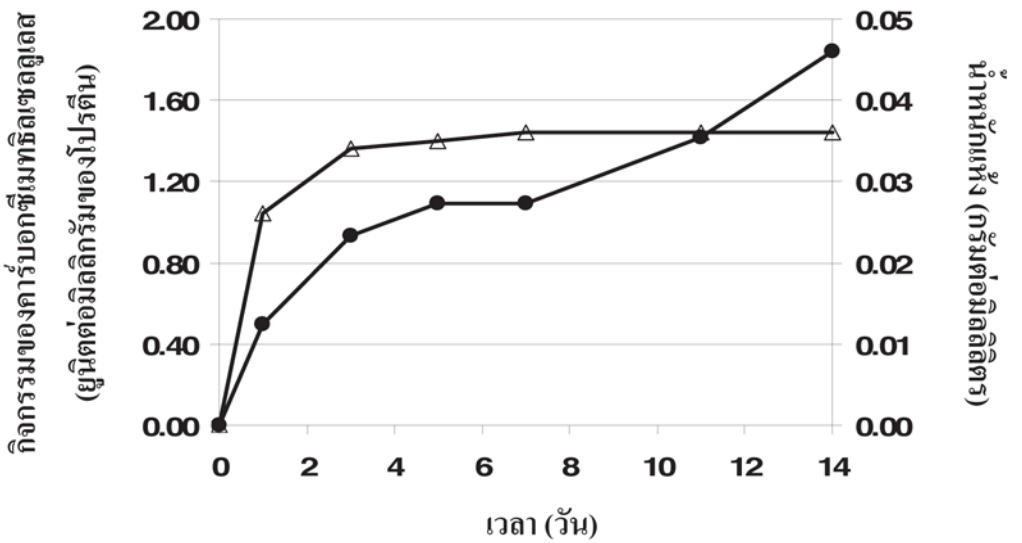
ไอโซเลท	ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)	ไอโซเลท	ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)	ไอโซเลท	ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)
5aA2	2.5	5bB4	ไม่เจริญ	5dA1	2.0
5aB1	ไม่เจริญ	5bC2	ไม่เจริญ	5dA2	1.0
5aB3	ไม่เจริญ	5bD2	ไม่เจริญ	5dA3	0.5
5aC2	2.0	5bD3	4.0	5dB1	3.0
5aC7	1.5	5cA1	1.0	5dB2	ไม่เจริญ
5aD1	1.0	5cA2	ไม่เจริญ	d5B3	1.0
5aD3	ไม่เจริญ	5cC1	1.0	5dC1	1.0
5aD4	ไม่เจริญ	5cC3	2.0	5dE1	2.0
5bA2	1.0	5cD1	ไม่เจริญ	5dE2	ไม่เจริญ

ตารางที่ 3. การเจริญของเชื้อราบนอาหาร CMC agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์

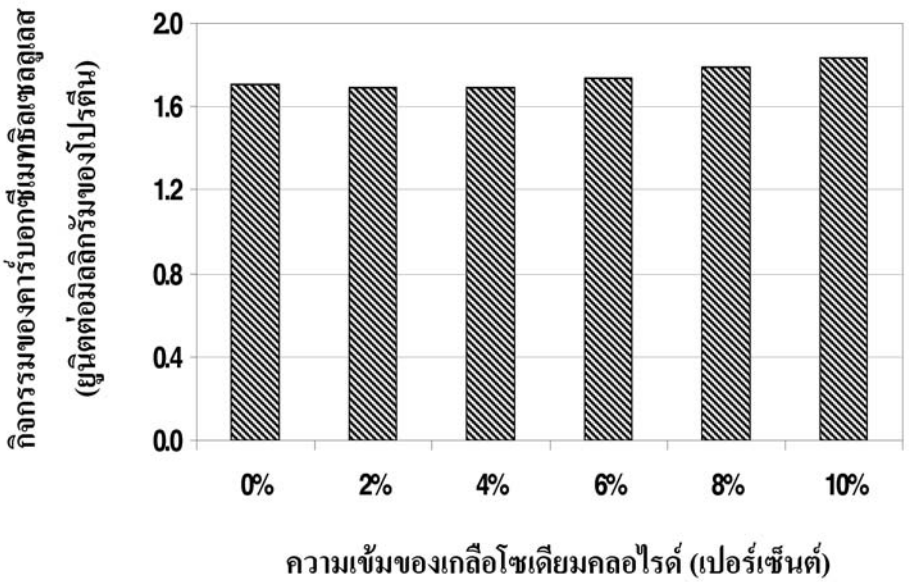
ไอโซเลท	ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)	ไอโซเลท	ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)
10aA2	2.0	10dA3	1.3
10aC3	ไม่เจริญ	10dB2	ไม่เจริญ
10bB1	ไม่เจริญ	10dB3	0.5
10bB2	ไม่เจริญ	10dC1	ไม่เจริญ
10bD1	1.5	10dC2	ไม่เจริญ
10cA1	ไม่เจริญ	10dC3	1.0
10cC1	1.0	10dE1	0.5
10dA2	ไม่เจริญ	10E2	0.5



รูปที่ 1. ลักษณะของเชื้อรา 10aA2 เมื่อเจริญบนอาหาร PDA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 วัน (ก) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (ข)



รูปที่ 2. การเจริญ (Δ) และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (●) ของเชื้อรา 10aA2 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral salt ที่เติม CMC และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3. ปริมาณเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา 10aA2 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral salt ที่เติม CMC และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน