การคัดเลือกเชื้อราทนเกลือที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
(Screening of Efficient Cellulase Producing Salt-Tolerant Fungi)

ศจีพันธ์ เพ็งมาตร[1]* อชิรญาณ์ปวริศกร วัฒนโกศล[1]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อำเภอวารินชำราบ , จังหวัดอุบลราชธานี, 34190

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อราทนเกลือที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส สำหรับใช้ปรับปรุงคุณภาพหัวเชื้อเร่งปุ๋ยหมักจากตัวอย่างดินในพื้นที่ จ.อุบลราชธานี มาแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสม NaCl 2% ได้จำนวน 36 ไอโซเลท นำมาคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับสูง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC Agar ผสม NaCl 2 % ได้จำนวน 8 ไอโซเลท จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC Agar ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 6 ระดับ บ่มเชื้อที่ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายด้วย Gram's Iodine พบว่า ไอโซเลท SL-5 สามารถทนสภาพเกลือและผลิตเซลลูเลสสูงสุด โดยที่ NaCl 0, 2, 4, 6 ,8 และ 10% มีความสามารถในการย่อยสลายเท่ากับ 1.64, 1.84, 2.21,3.27,3.31 และ 2.89 ตามลำดับ

บทนำ

ปัญหาดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และพื้นที่ชายทะเล เกิดจากสภาพดินเดิมและการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างต่อเนื่องของเกษตรกรที่ต้องการให้พืชมีอัตราการเจริญสูงขึ้นทำให้สารเคมีสะสมในดิน ส่งผลกระทบโดยตรงต่อผลผลิต ปริมาณและคุณภาพของพืช จึงทำให้รายได้ของเกษตรกรลดลง ซึ่งการใช้ปุ๋ยหมักแทนปุ๋ยเคมีเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยในการปรับปรุงดินเค็ม โดยช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช อย่างไรก็ตาม ในดินเค็มมีเชื้อราที่สามารถทนสภาพเกลือ และมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ให้กลายเป็นธาตุอาหารพืชได้ หากสามารถคัดเลือกเชื้อราทนเกลือมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพหัวเชื้อเร่งปุ๋ยหมักสำหรับใช้ในพื้นที่ดินเค็มจะสามารถย่อยสลายวัสดุพวกเซลลูโลสให้เป็นธาตุอาหารพืชได้ในระยะเวลาสั้นลง และเชื้อราเหล่านี้สามารถเจริญและย่อยสลายอินทรียวัตถุในดินเค็ม ทำให้พืชได้รับธาตุอาหารอย่างต่อเนื่อง

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกเชื้อราทนเกลือที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส สำหรับใช้ปรับปรุงคุณภาพหัวเชื้อเร่งปุ๋ยหมัก

วิธีการศึกษา

1 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์

1.1 แยกเชื้อราจากตัวอย่างดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติม Sodium Chloride (NaCl) 2.0 % และเติม Streptomycin Sulfate 250 ppm pH 5.5 บ่ม 30 °C เป็นเวลา 3 วัน เลือกแต่ละโคโลนีของเชื้อราที่แตกต่างกัน มาแยกให้บริสุทธิ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำนวน 2 ซ้ำ

1.2 ศึกษาลักษณะสัณฐานโคโลนีของเชื้อราและตรวจสอบขนาดโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)

1.3 ตรวจสอบลักษณะสัณฐานโครงสร้างของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อรา

1.4 เก็บรักษาเชื้อราบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทใน PDA Slant ที่เติม NaCl 2.0 % pH 5.5 ที่ 4 °C

2. การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา

2.1 เตรียมเชื้อราแต่ละไอโซเลทที่เก็บรักษาไว้ในอาหาร PDA Slant โดยเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเชื้อPDA ที่เติม NaCl 2.0 % pH 5.5 เป็นเวลา 4 วัน

2.2 ย้ายชิ้นวุ้นจากบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxy Methyl Cellulose(CMC) Agar ปริมาตร 15 ml ที่เติม NaCl 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 % pH 5.5 บ่ม 30 °C เป็นเวลา 4 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นตรวจสอบลักษณะสัณฐานโคโลนีของเชื้อราและตรวจสอบขนาดโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)

2.4 ตรวจสอบบริเวณใสโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ (เซนติเมตร) โดยเท Gram's Iodine 10 ml ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วเททิ้ง จากนั้นคัดเลือกเชื้อราทนเกลือที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสระดับสูง

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพระเจ้าขอขอบพระคุณท่านอาจารย์อชิรญาปวริศกร วัฒนโกศล ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ช่วยเหลือทางด้านเครื่องมือวิทยาศาสตร์และอุปกรณ์ต่างๆ สารเคมี และขอขอบคุณเพื่อนๆที่คอยให้คำแนะนำจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เสาวภา สุราวุธ , ประสาน แสงไพบูลย์ , วิญญู ภักดี , เดือนเต็ม ทองเผือก , กาญจนา ราชสุวรรณ และวิระ ศรีมาลา. (2554). การคัดแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี. วันที่ค้นข้อมูล 8 ตุลาคม 2557, เวปไซต์: http://www.plants.rbru.ac.th/ 2012/papers/54/54_o6.pdf

ประดับ เรียนประยูร และ วรรธนะชัย อยู่ในวงศ์. (2555). การคัดเลือกเชื้อราทนร้อนที่ผลิตเซลลูเลสและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย.วันที่ค้นข้อมูล 8 ตุลาคม 2557,เวปไซต์: http://science2.srru.ac.th/science_mis/technical_document_file/30141075.pdf

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา

แยกเชื้อราจากตัวอย่างดินที่มีอินทรียวัตถุสูงทั้งหมด 15 แหล่ง สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลท

ตารางที่ 1 แสดงขนาดโคโลนีบน PDA + NaCl 2 % pH 5.5

การเจริญ	รหัส	PDAเฉลี่ย
เร็ว	SC-1	7.80
	SC-3	7.55
	SS-2	6.38
ปานกลาง	SB-1	3.95
	SB-2	3.68
	SB-3	3.68
	SQ-1	3.43
	SN-1	3.40
	SM-1	3.38
	SC-2	3.14
	SM-2	3.13
	JT-1	2.80
	AM-2	2.72
	SL-2	2.67
	PT-2	2.66
	PT-3	2.65
	TD-1	2.59
	SN-2	2.50
	SI-1	2.45
	JT-4	2.43
	SH-2	2.36
	SJ-1	2.33
	MA-1	2.27
	SL-6	2.14
ช้า	SP-1	1.93
	LK-4	1.90
	SL-3	1.85
	NA-3	1.84
	SL-5	1.67
	SA-1	1.65
	NA-1	1.63
	SH-3	1.43
	OA-1	1.40
	SH-1	1.17
	SL-4	0.78

ตารางที่ 2 แสดงลำดับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร CMC+NaCl 2% pH 5.5

ที่	รหัส	บริเวณใสบน (ซม.)CMC+NaCl 2% pH 5.5
1	SA-1	3.85
2	SL-5	2.10
3	OA-1	1.70
4	SJ-1	1.61
5	SH-2	1.48
6	TD-1	1.46
7	SC-2	1.45
8	SL-6	1.43
9	PT-2	1.43
10	SL-2	1.34
11	SL-4	1.31
12	SP-1	1.29
13	LK-4	1.28
14	NA-3	1.25
15	PT-3	1.25
16	AM-2	1.20
17	JT-4	1.18
18	SH-3	1.12
19	MA-1	1.11
20	SL-3	1.11
21	SN-2	1.10
22	SM-2	1.09
23	JT-1	1.09
24	SM-1	1.08
25	SC-1	1.07
26	SB-3	1.07
27	SI-1	1.07
28	SB-1	1.02
29	SQ-1	1.00

จากตารางที่ 2 เมื่อจัดเรียงลำดับตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราจำนวน 34 ไอโซเลทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC+NaCl 2% พบว่ามีส่วนไม่สอดคล้องกันเนื่องจากความคลาดเคลื่อนของการทดลอง จึงควรเพิ่มจำนวนซ้ำให้มากขึ้น

ตารางที่ 3 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี ของบริเวณใสบน CMC+NaCl ระดับต่างๆ pH 5.5

ที่	รหัส	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) บน CMC+%NaCl pH 5.5					
		HC 0%	HC 2%	HC 4%	HC 6%	HC 8%	HC 10%
1	SA-1	2.24	2.10	2.00	1.88	1.69	1.56
2	SL-5	1.64	1.84	2.21	3.27	3.31	2.89
3	OA-1	2.17	1.81	1.71	1.59	1.57	1.53
4	SJ-1	1.63	1.49	1.48	1.44	1.41	1.19
5	SH-2	1.76	1.47	1.37	1.37	1.34	1.19
6	TD-1	1.63	1.44	1.42	1.40	1.35	1.18
7	SC-2	1.74	1.36	1.07	1.02	1.01	0.97
8	PT-2	1.63	143	1.39	1.32	1.31	1.16

จากการนำเชื้อรา 29 ไอโซเลท มาทดสอบด้วยแกรมไอโอดีน พบว่า มีเพียง 8 ไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับสูง จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC Agar ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 6 ระดับ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า ไอโซเลท SL-5 สามารถทนสภาพเกลือและผลิตเซลลูเลสสูงสุด โดยที่ NaCl 0, 2, 4, 6 ,8 และ 10% มีความสามารถในการย่อยสลายเท่ากับ 1.64, 1.84, 2.21,3.27,3.31 และ 2.89 ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา

ตัวอย่างดิน 15 แหล่ง ในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี ที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อราทนเกลือที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส สามารถแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 36 ไอโซเลท นำมาคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับสูง ได้จำนวน 8 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท SL-5 สามารถทนสภาพเกลือและผลิตเซลลูเลสสูงสุด มีความสามารถในการย่อยสลาย เหมาะสำหรับนำไปพัฒนาต่อไปในเป็นหัวเชื้อเร่งปุ๋ยหมัก เพื่อนำไปใช้ในพื้นที่ดินเค็มและสามารถย่อยสลายได้อย่างต่อเนื่อง

NESTC2015
North Eastern Science and Technology Conference 2015