รหัสโครงการ SUT3-304-49-36-19

รายงานการวิจัย

การติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากร PGPR ในปุ๋ยอินทรีย์ และบริเวณรากพืช โดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ (Monitoring of PGPR population changes in organic fertilizer and rhizosphere using molecular genetic approach)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-49-36-19

รายงานการวิจัย

การติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากร PGPR ในปุ๋ยอินทรีย์ และบริเวณรากพืช โดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ (Monitoring of PGPR population changes in organic fertilizer and rhizosphere using molecular genetic approach)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
รองศาสตราจารย์ ดร. สมพร ชุณหลือชานนท์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2550
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว
เมษายน 2556

บทคัดย่อ

การควบคุมการผลิตผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณภาพต้องมีการตรวจสอบทั้งชนิด และปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ตามปริมาณที่กฎหมายกำหนด อีกทั้งเมื่อนำหัวเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ผสมกับปุ๋ยอินทรีย์ควรมีการตรวจสอบการเพิ่มจำนวน รวมทั้งควรมีการติดตามเพื่อตรวจสอบการยึดเกาะกับรากพืช เมื่อนำไปใช้ในสภาพไร่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบและติดตามเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อโดยให้มีความแม่นยำและมีความรวดเร็วในการติดตามมากขึ้นกว่าวิธีดั้งเดิม จากผลการทดลองพบว่าวิธี Fluorescence Antibody (FA) เป็นวิธีการเบื้องต้นที่มีความแม่นยำในการตรวจสอบหัวเชื้อ PGPR ที่ใช้ทดสอบ คือ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. โดยสามารถใช้ตรวจสอบได้ตั้งแต่ขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในขบวนการผลิต รวมทั้งสามารถใช้ติดตามเชื้อเมื่อนำไปผสมกับปุ๋ยอินทรีย์ และใช้ในการติดตามเชื้อที่เกาะอยู่บริเวณรากพืชได้ดี ทั้งนี้พบว่าจุลินทรีย์ที่ใส่ในกองปุ๋ยอินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนจากระดับ 10^7 เซลล์ต่อกรัม เป็นระดับ 10^8 เซลล์ต่อกรัม ได้หลังจากเก็บไว้นาน 1-3 เดือน และเมื่อใช้เทคนิค FA ในการตรวจสอบการยึดเกาะของเชื้อบริเวณรากพืชพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้มักยึดเกาะบริเวณรากฝอย โดยพืชที่ปลูกในแปลงทดลองที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ติดต่อกันในพื้นที่อย่างต่อเนื่องมีความหนาแน่นของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่บริเวณรากพืชมากขึ้น ดังนั้นเทคนิค FA จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบและติดตามผลิตภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งในระดับการผลิตและเมื่อนำไปใช้ในแปลงทดลอง อย่างไรก็ตามหากต้องการตรวจสอบหรือติดตามการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชาการจุลินทรีย์อื่น ๆ บริเวณรอบรากพืช ด้วยสามารถใช้เทคนิค Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) โดยไม่ต้องมีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้การใช้เทคนิค FA และ DGGE สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบบริเวณรากพืชได้เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าทั้งเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. สามารถมีชีวิตรอดได้ในดิน โดยสามารถตรวจสอบและติดตามได้อย่างแม่นยำโดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

The quality control of microbial inoculant production must be performed to examine the correct microbial strain and concentration of cell as indicated by laws. Moreover, the amount of cells should be examine after mixed with organic fertilizer as well as the plant root colonization ability after using under field condition. This research developed the Fluorescence Antibody (FA) as a precise and rapid technique for monitoring two PGPR, *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. in the process of culturing, mixing with organic fertilizer, as well as monitoring the colonization of cell on plant roots. By using FA technique, it was found that the number of PGPR could increase from 10^7 cells/g to 10^8 cells/g after mixing with organic fertilizer for 1-3 months, and high density of PGPR was found to colonize the lateral roots of plants grown in the field with continuously use these inoculant. Therefore, FA technique is an efficient method for examination and monitoring the PGPR inoculant during production process and after inoculation to plant. However, the monitoring of other microbial population in the rhizosphere could be done by Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) without cell culturing. By using both FA and DGGE techniques, it could be concluded that *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. were persisted in the soil and these PGPR could be precisely monitored by using molecular genetic techniques.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่งทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

26 เมษายน 2556

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)		ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)		ค
กิตติกรรมประกาศ		จ
สารบัญ		ฉ
สารบัญตาราง		ซ
สารบัญภาพ		ฌ
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	1
	1.3 ขอบเขตของการวิจัย	1
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	
	3.1 การผลิตและใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique เพื่อการตรวจสอบ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp	4
	3.2 การใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique เพื่อตรวจสอบการยึดเกาะของ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในรากพืชเมื่อปลูกในหลอดทดลอง	6
	3.3 การใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique เพื่อตรวจสอบการยึดเกาะของ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในรากพืชเมื่อปลูกในกระถางและแปลงทดลอง	7
	3.4 การติดตามผล และการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ (inoculants) โดยการใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique รวมกับการวัดปริมาณเชื้อโดยวิธี plate count เพื่อติดตามหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่ในกองปุ๋ย และหัวเชื้อที่ผลิตเพื่อการจำหน่าย	8

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	3.5 การตรวจหาแบคทีเรีย PGPR โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	8
	3.6 การตรวจหาแบคทีเรีย PGPR โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	10
บทที่ 4	ผลการศึกษาวิจัย	
	4.1 การผลิตและใช้ Fluorescence Antibody (FA) Technique เพื่อการตรวจสอบ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.	12
	4.2 การใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique เพื่อการตรวจสอบ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.ในรากพืชเมื่อปลูกในหลอดทดลอง	13
	4.3 การทดสอบในระบบการควบคุมในกระถาง	15
	4.4 การทดสอบตัวอย่างพืชบริเวณพื้นที่ที่ผ่านการใช้ BOF มาเป็นเวลา 3 ปีอย่างต่อเนื่อง	17
	4.5 การติดตามผลและการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculants) โดยการใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique ร่วมกับการวัดปริมาณเชื้อโดยวิธี plate count เพื่อติดตามหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่ในกองปุ๋ย และหัวเชื้อที่ผลิตเพื่อการจำหน่าย	20
	4.6 การตรวจหาแบคทีเรีย PGPR โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	23
	4.7 การใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) เพื่อตรวจสอบการยึดเกาะของ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในรากพืช	24
บทที่ 5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
บรรณานุกรม		28
ภาคผนวก		29
ประวัตินักวิจัย		

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 Immunization Type B Injection Schedule 5

3.2 แสดงส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR 9

3.3 แสดงองค์ประกอบในการเตรียม 60% Denaturing solution 10

3.4 แสดงองค์ประกอบในการเตรียม 40% Denaturing solution 10

4.1 แสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. หลังขบวนการ compost สิ้นสุด ก่อนและหลังการใส่หัวเชื้อครั้งที่ 2 20

4.2 แสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. เมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 3 เดือนเพื่อการจำหน่าย 20

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 Immunization Type B Injection Schedule 5

3.2 แสดงส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR 9

3.3 แสดงองค์ประกอบในการเตรียม 60% Denaturing solution 10

3.4 แสดงองค์ประกอบในการเตรียม 40% Denaturing solution 10

4.1 แสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. หลังขบวนการ compost สิ้นสุด ก่อนและหลังการใส่หัวเชื้อครั้งที่ 2 20

4.2 แสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. เมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 3 เดือนเพื่อการจำหน่าย 20

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4.1 แสดงการเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter* sp. 12

4.2 แสดงการเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรีย *Azospirillum* sp. 13

4.3 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody ของเชื้อ *Azospirillum* sp. บนรากของต้นมะเขือเทศ หลังจากใส่เชื้อไปแล้ว 5 วัน ซึ่งถ่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence 14

4.4 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody ของเชื้อ *Azotobacter* sp. บนรากของต้นมะเขือเทศ หลังจากใส่เชื้อไปแล้ว 5 วันซึ่งถ่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence ภายใต้แสง Fluorescence (450-480 nm) 14

4.5 รากต้นมะเขือเทศอายุ 5 วัน ที่ไม่ใส่เชื้อ ที่ใช้การย้อม Immuno fluorescent antibody ซึ่งถ่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence 15

4.6 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของเชื้อ *Azotobacter* sp. บนรากของมะเขือเทศอายุ 1 เดือน ที่ทดลองปลูกในกระถางที่มีการผสมปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ 16

4.7 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของเชื้อ *Azospirillum* sp. บนรากของมะเขือเทศอายุ 1 เดือน ที่ทดลองปลูกในกระถางที่มีการผสมปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ 17

4.8 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของเชื้อ *Azotobacter* sp. บนรากของผักสลัดอายุ 1 เดือน ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชที่มีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพอย่างต่อเนื่อง 18

4.9 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Anitibody ของเชื้อ *Azospirillum* sp. บนรากของผักสลัดอายุ 1 เดือน ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชที่มีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพอย่างต่อเนื่อง 19

4.10 แสดงลักษณะ Colony ที่เลือกจาก plate ที่เลี้ยงในอาหาร LG ย้อมโดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของ *Azotobacter* sp. 21

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.11	แสดงลักษณะ Colony ที่เลือกจาก plate ที่เลี้ยงในอาหาร NFB ย้อมโดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของ *Azospirillum* sp.	22
4.12	แสดง DNA ของแบคทีเรีย PGPR ในแต่ละชนิด	22
4.13	แสดงรูปแบบ DNA ของแบคทีเรีย PGPR ในแต่ละชนิด	23
4.14	การติดตามหัวเชื้อจุลินทรีย์ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. บนรากของผักสลัดอายุ1 เดือน ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชที่มีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลา 3 ปี โดยใช้เทคนิค DGGE	24

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ในการตรวจสอบพฤติกรรม ความอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่สนใจในระบบนิเวศ โดยเฉพาะระบบนิเวศที่ซับซ้อน เช่น ดิน แต่เดิมใช้วิธีการทางจุลชีววิทยาทั่วไป คือ plate count ซึ่งวิธีการนี้พบว่า มีเพียงประชากรของจุลินทรีย์เพียง 1-2% เท่านั้นที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นๆ ซึ่งทำให้การศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในปัจจุบันได้พัฒนาเทคนิคทาง DNA เข้ามาช่วย โดยกระบวนการสกัด DNA จากตัวอย่างดิน จะสามารถครอบคลุมไปถึงกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารสังเคราะห์ (unculturable bacteria) จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิคด้าน PCR ต่อไป เช่นเดียวกับการที่หากมีการนำสายพันธุ์ PGPR ที่คัดเลือกไว้ ไปใส่ในปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ หรือแม้แต่นำไปใส่ในระบบการเพาะปลูก จำเป็นต้องมีการติดตามเป็นระยะ เพื่อให้ทราบว่า PGPR ที่ใส่ลงไปนั้นยังคงอยู่หรือไม่ และไปมีผลกระทบเชิงความหลากหลายทางชีวภาพต่อชุมชนจุลินทรีย์ (microbial community) หรือไม่ และจะทำให้สามารถบอกได้ว่าปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ ควรมีการจัดการเรื่องการใส่ให้กับพืช อย่างไร ซึ่งทั้งหมดนี้วิชาการด้านอณูพันธุศาสตร์จะสามารถวิเคราะห์ได้แม่นยำขึ้น โดยในโครงการนี้จะใช้กลุ่มยีนสำคัญในการบ่งชี้เชิงคุณภาพ เช่น 16S rDNA, nif ร่วมกับเทคนิค DGGE และ T-RFLP ในขณะเดียวกันวิธีการทางอิมมูน เช่น Fluorescent Antibody (FA) ก็จะนำมาร่วมใช้เพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณเช่นเดียวกัน

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาพลวัตรของประชากร PGPR ที่อยู่ในรูป multi-strain inoculum ในระบบปุ๋ยอินทรีย์ ในขณะผลิตและเก็บรักษา
2 เพื่อศึกษาพลวัตรของประชากร PGPR ที่อยู่ในรูปของปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ ในขณะที่มีการเพาะปลูก
3 เพื่อศึกษาผลกระทบเชิงความหลากหลายทางชีวภาพ อันเนื่องมาจากการใช้ PGPR ในระบบ rhizosphere
4 เพื่อศึกษาผลของ PGPR Multi-strain inoculum ต่อพืชในระบบการเพาะปลูก

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ดำเนินการศึกษาพลวัตรของประชากร PGPR (ที่อยู่ในรูป Multi-strain inoculum) ในสภาพที่ผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ และบริเวณรากพืชที่ทำการทดสอบจริงในสภาพไร่ โดยการศึกษาเชิงคุณภาพจะดำเนินการโดยเทคนิคการสกัด DNA โดยตรงจากตัวอย่าง และวิเคราะห์ด้วย PCR ร่วมกับชุดยีนสำคัญด้วยเทคนิค DGGE และ T-RFLP ส่วนการวิเคราะห์เชิงปริมาณจะใช้เทคนิค Fluorescent Antibody รวมไปถึงการประเมินผลผลิตของพืชที่เกิดจากการใช้ปุ๋ยอินทร์ชีวภาพ PGPR ในสภาพการเพาะปลูกจริง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลประชากร PGPR ที่อยู่ในรูป multi-strain inoculum ในระบบปุ๋ยอินทรีย์ในขณะผลิตและเก็บรักษา
2. ได้ข้อมูลประชากร PGPR ที่อยู่ในรูปของปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ ในขณะที่มีการเพาะปลูก
3. ได้ข้อมูลผลกระทบเชิงความหลากหลายทางชีวภาพ อันเนื่องมาจากการใช้ PGPR ในระบบ rhizosphere
4. ได้ข้อมูล PGPR Multi-strain inoculum ต่อพืชในระบบการเพาะปลูก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิธีการทาง DNA ปัจจุบันเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ และองค์ประกอบของชุมชนจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามปริมาณ และคุณภาพของ DNA ที่ได้จากการสกัดโดยตรงจากตัวอย่างตามธรรมชาติ ถือเป็นปัจจัยสำคัญของกระบวนการวิเคราะห์ วิธีที่นิยมกันทั่วไปและพบว่าให้ผลดีที่สุด คือ การสกัด DNA โดยตรง หรือเรียก Direct lysis method (Saano และคณะ, 1995) แต่ปัญหาที่ตามมาคือ การทำให้ DNA บริสุทธิ์จากตัวอย่าง โดยเฉพาะจากดิน เช่น humic acid, phenolic compounds และโลหะหนักต่างๆ ดังนั้นวิธีการในการทำให้ DNA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอ เพื่อที่จะนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยการใช้ Restriction enzyme หรือ DNA polymerase (PCR) จึงถูกพัฒนาขึ้น และได้เป็นผลสำเร็จ เช่น Hydroxyapatite column, polyvinylpyrollidone (PVPP), silica matrix เป็นต้น (Sorensen และคณะ, 2002) จากนั้นเมื่อทำการสกัด DNA ที่ได้ในปริมาณมากที่สุดแล้ว จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) หรือ Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลาย เพราะอาศัยหลักการการจำแนกลำดับเบสที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในเวลาเดียวกัน (Webster และคณะ, 2003)
กรณีศึกษาที่คล้ายคลึงกับโครงการนี้ ได้แก่ การตรวจสอบและติดตามในระบบการควบคุมคุณภาพการผลิตหัวเชื้อ Rhizobium galegae HAMBI 1774, HAMBI 1207 และ R. leguminosarum ของบริษัท Elomestari ประเทศฟินแลนด์ ซึ่งได้ใช้เทคนิคการสกัด DNA ร่วมกับ PCR ในการติดตามเชิงคุณภาพ และใช้ reporter gene ในการติดตามเชิงปริมาณ (Tas และคณะ, 1995)

การใช้เทคนิคทาง DNA และอิมมูโนวิทยา จะช่วยให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงพลวัตรประชากร PGPR ทั้งเชิงคุณภาพ และปริมาณที่อยู่ในรูปปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพในช่วงเวลาการผลิต และในระบบการเพาะปลูกจริง โดยเทคนิคการสกัด DNA โดยตรงจากตัวอย่างจะสามารถสะท้อนให้เห็นถึงการปรากฏ หรือหายไปของหัวเชื้อที่ใส่ลงไป ประกอบกับสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของชุมชนจุลินทรีย์ ณ เวลานั้นๆ ได้ ในขณะที่เทคนิคอิมมูโนวิทยาที่ใช้ FA จะทำให้สามารถตรวจสอบปริมาณที่คงอยู่ได้ ซึ่งทั้ง 2 เทคนิคนี้จะให้ผลแม่นยำทั้งในเชิง sensitivity และ specificity ได้ดีกว่าเทคนิคด้านจุลชีววิทยาทั่วไป ประกอบกับจะทำให้ทราบความสัมพันธ์ของการเจริญ คงอยู่ของ PGPR กับการเจริญของพืชกลุ่มเป้าหมาย ในระบบการเพาะปลูกจริง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพที่ผลิตได้จำเป็นจะต้องมีคุณภาพดีและสม่ำเสมอตามที่ระบุไว้ จึงมีความจำเป็นต้องมีกระบวนการควบคุมคุณภาพโดย Bio-efficiency testing คือ การทดสอบปุ๋ยกับพืชที่ปลูก เพื่อทดสอบหรือพิสูจน์ให้เห็นว่า ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพที่มีเชื้อจุลินทรีย์ BNF-PGPR ยังมีชีวิตอยู่บริเวณระบบรากพืชและก่อให้เกิดผลบวกต่อพืช โดยใช้วิธีการ ดังนี้

1) DNA Technique

ทำการสกัด DNA จากตัวอย่างดินและรากพืชโดยตรง ตามวิธีของ Teaumroong และ Boonkerd (1998) จากนั้นเพิ่มจำนวนชุดยีนเป้าหมายโดยเทคนิค PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) หรือ Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) หรือทำการตรวจสอบเซลล์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยดูจาก DNA ลายนิ้วมือที่ได้จากการใช้เทคนิค BOX-PCR (Pongsilp และคณะ, 2002)

2. Serological Technique; FA หรือ ELISA (Payakapong และคณะ, 2004)

ทำการผลิต Antibody ของทั้ง *Azotobacter* sp และ. *Azospirillum* sp. ในกระต่าย จากนั้นนำไปใช้ตรวจสอบการยึดเกาะรากของเชื้อทั้ง 2 ชนิดในพืชทดลองที่ปลูกในห้องปฏิบัติการและในแปลงทดลอง โดยใช้เทคนิค Fluorescent antibody (FA)

3.1 การผลิตและใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique เพื่อการตรวจสอบ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.

1) เลี้ยงเชื้อ *Azotobacter* sp. ในอาหาร LG และเชื้อ *Azospirillum* sp. ในอาหาร NFB โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดใน flask ขนาด 500 ml. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2) การเตรียม Antigen โดยการนำเชื้อแต่ละชนิดไปปั่นเหวี่ยง และล้างด้วยสารละลาย 0.85% NaCl หลังจากนั้นละลายเซลล์แต่ละชนิดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 10^{10} cell/ml ใช้เป็น Antigen เข้มข้น (CS) อีกส่วนหนึ่งนำไปทำให้เจือจางเท่ากับ 10^{9} cell/ml (วัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD = 0.45 ที่ A600 nm.) สำหรับใช้เป็น working suspension (WS) นำ Antigen ทั้ง 2 ส่วนไปต้มให้เดือดนาน 1 ชั่วโมง และทำให้เย็น แล้วเติม methyliodate (ความเข้มข้นสุดท้าย 1:1000) และเก็บ Antigen ไว้ในตู้เย็น
3) การฉีด Antigen (Antigen Injection and Immunization) เลือกใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand white ที่มีสุขภาพดีและมีอายุไม่เกิน 3 ปี โดยฉีดเข้าไปที่หู ดังรายละเอียดตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 Immunization Type B Injection Schedule

Day	Method	Antigen

1	Intravaneous, IV	0.5 ml WS
2	IV	1.0 ml WS
3	IV	1.5 ml WS
4	IV	2.0 ml WS
5	IV	2.0 ml WS
6-12	Rest	
13	Test bleed and perform agglutination titer	

**** WS: Working Suspension (see antigen preparation)***

4) Test bleeding หลังจากที่ฉีดกระต่ายครบตามตารางแล้ว ทำการเก็บเลือดกระต่ายแต่ละตัวอย่างจากบริเวณใบหู 3-5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 rpm ใช้เวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบน เพื่อนำไปทดสอบความเข้มข้นของ antiserum (Agglutination)
5) Agglutination ทำการเจือจาง Antiserum แต่ละชนิด (*Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.) ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl โดยทำการทดสอบที่ความเจือจางดังต่อไปนี้ 1/25, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 หลังจากนั้นใส่ Antigen ที่เป็นชนิดเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปไว้ในตู้เย็นนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาอ่านผลโดยสังเกตตะกอนที่เกิดขึ้นในแต่ละความเข้มข้น ถ้าความเข้มข้นมากกว่า 1/1,280 นำไปทำการทดลองขั้นต่อไป
6) Cardiac puncture เมื่อทดสอบความเข้มข้นของ Antiserum ได้สูงตามที่ต้องการแล้วเก็บเลือดจากกระต่ายอีกครั้ง โดยเก็บจากหัวใจซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สะดวกและไม่เป็นอันตรายต่อกระต่าย เก็บเลือดตัวละประมาณ 30 ml.
7) การเตรียม globulin fraction เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป คือ Fluorescent Antibody (FA) Technique นั้น immunoglobulin protein ต้องแยกออกจาก Antiserum เพื่อ conjugate กับ FITC (Fluorescent isothiocyanate) โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือ (salting-out) ด้วย Sodium sulfate อิ่มตัวโดยการนำ serum ใส่ในบีกเกอร์ และหยด Sodium sulfate ช้า ๆ และกวนที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 4,500 rpm นาน 10 นาที และล้างตะกอนด้วยสารละลาย 0.85% NaCl นำไปปั่นเหวี่ยง และละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.85% NaCl 2 ml นำไปฉีดใส่ในถุง dialysis และนำไป dialysis ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl หลังจากนั้นตัวอย่างที่ได้นำไปหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry's method
8) การ conjugate antibody ด้วย FITC เมื่อได้ความเข้มข้น antibody โปรตีนที่บริสุทธิ์ก็นำมา conjugate หรือ label ด้วยสารเรืองแสง FITC โดยนำโปรตีน FITC และ carbonate-bicarbonate buffer มาผสมกันในบีกเกอร์ขนาด 50 ml คนเบา ๆ ด้วย magnetic stirrer เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ในที่มืด เพื่อป้องกันไม่ให้ FITC สลายตัว และนำเข้าตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน เมื่อครบกำหนด antibody protein ทั้งหมดถูกเกาะด้วย FITC เกิดเป็น FA และในส่วนผสมก็ยังมี FITC ที่เป็นอิสระอยู่จึงต้องแยก FA ออกโดยการทำ dialysis ในสารละลาย PBS buffer

9) FA Staining นำ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มา smear บน Slide แล้วทำ heat fix หยดด้วย FA ที่เตรียมไว้ 2-3 หยด หรือพอท่วมตัวอย่างที่ต้องการ นำไปวางบนกระดาษทิชชูชุบน้ำเปียกที่อยู่ใน plate แล้วเอาฝาครอบนำไปไว้ใน incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อให้ antigen ทำปฏิกิริยากับ antibody แล้วนำ slide มาล้างด้วยน้ำเกลือโดยการแช่ไว้ในสารละลาย 0.85% NaCl ประมาณ 5-10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำ Slide มาซับน้ำออกให้แห้ง แล้วหยด FA mounting fluid ลงไปตรงตัวอย่าง 1 หยด แล้วปิดด้วย clover glass นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ Fluorescent ภายใต้แสง Fluorescent (450-480 nm)

3.2 การใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique เพื่อตรวจสอบการยึดเกาะของ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในรากพืชเมื่อปลูกในหลอดทดลอง

การเตรียมเชื้อ :เลี้ยงเชื้อ *Azotobacter* sp. ในอาหาร LG และเชื้อ *Azospirillum* sp. ในอาหาร NFB โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดใน flask ขนาด 250 ml ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและทำการเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การปลูกพืชและการเก็บตัวอย่างราก : เมล็ดของต้นมะเขือเทศนำมาทำให้ปลอดเชื้อ ดังนี้ แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 5% sodium hypochlorite เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 6 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำเมล็ดมะเขือเทศวางบนกระดาษกรองที่ชื้นในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน เมล็ดมะเขือเทศที่งอกแล้วนำไปแช่ใน suspension ของ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการแช่ในเชื้อแต่ละชนิดไปปลูกบน water agar ความเข้มข้น 0.6% (w/v) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องแสง โดยเก็บตัวอย่างรากเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน

การทดสอบตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody :แบคทีเรียที่เกาะในรากของต้นมะเขือเทศถูกนำมาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescent ภายใต้แสง Fluorescent (450-480 nm) ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้ นำรากของต้นมะเขือเทศในแต่ละหลอดมาแช่ในethanol-acetic acid (อัตราส่วน 3:1) เพื่อตรึงเชื้อที่อยู่บนรากเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำรากไปวางบนสไลด์ที่ผ่านการแช่ในอะซิโตนแล้ว 15 นาทีและหยด 100 µl primary antibodies ที่เจือจาง (1:80) โดย PBS buffer ที่เติม 1.5% BSA และ 0.1% sodium azide บ่มไว้นาน 45 นาที ล้างด้วย PBS buffer ที่เติมสารเคมีดังกล่าวไปแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นหยด 100 µl ของ Anti-Rabbit IqG (whole molecule) FITC Conjugate เจือจาง (1:400) ด้วย PBS buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะที่มีความชื้น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในที่มืด และล้างรากด้วย PBS buffer อีก 3 ครั้ง หยดตัวอย่างด้วย FA-mounting fluid นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ Fluorescent ภายใต้แสง Fluorescent (450-480 nm)

3.3 การใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique เพื่อตรวจสอบการยึดเกาะของ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในรากพืชเมื่อปลูกในกระถางและแปลงทดลอง

การเตรียมกล้าพืช : การเตรียมกระถางปลูก และการปลูกพืชดังนี้ เตรียมกล้าพืชโดยใช้ต้นมะเขือเทศเพาะ บน perrite เป็นเวลา 2 อาทิตย์ แล้วนำไปปลูกในกระถางที่เตรียมโดยการใช้ทรายที่ปลอดเชื้อผสมกับวัสดุพาหะที่ผสมกับ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในอัตราส่วนทราย:วัสดุพาหะผสมเชื้อ 1:10 นำไปวางไว้ในห้องแสง ทำการเก็บตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน โดยทำการแยกรากของต้นพืชและล้างด้วยน้ำประปา

การเก็บตัวอย่างพืชจากในแปลงที่ปลูกจริง ที่มีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพอย่างต่อเนื่องมาแล้วเป็นเวลา 3 ปี โดยเก็บตัวอย่างผักสลัดที่มีอายุประมาณ 1 เดือน นำรากมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด

การทดสอบตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody :แบคทีเรียที่เกาะในรากของต้นมะเขือเทศและผักสลัด ถูกนำมาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescent ภายใต้แสง Fluorescent (450-480 nm) ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้ นำรากของต้นมะเขือเทศและผักสลัด ซึ่งล้างทำความสะอาดแล้วมาแช่ใน ethanol-acetic acid (อัตราส่วน 3:1) เพื่อตรึงเชื้อที่อยู่บนรากเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำรากไปวางบนสไลด์ที่ผ่านการแช่ในอะซิโตนแล้ว 15 นาที และหยด 100 µl primary antibodies ที่เจือจาง (1:80) โดย PBS buffer ที่เติม 1.5% BSA และ 0.1% Sodium azide บ่มไว้นาน 45 นาที ล้างด้วย PBS buffer ที่เติมสารเคมีดังกล่าวไปแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นหยด 100 µl ของ Anti-Rabbit IqG (whole molecule) FITC Conjugate เจือจาง (1: 400) ด้วย PBS buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะที่มีความชื้น เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืด และล้างรากด้วย PBS buffer อีก 3 ครั้ง หยดตัวอย่างด้วย FA-mounting fluid นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ Fluorescent ภายใต้แสง Fluorescent (450-480 nm)

3.4 การติดตามผล และการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ (inoculants) โดยการใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique รวมกับการวัดปริมาณเชื้อโดยวิธี plate count เพื่อติดตามหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่ในกองปุ๋ย และหัวเชื้อที่ผลิตเพื่อการจำหน่าย

การใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกองปุ๋ย มีการใส่ 2 ครั้ง ได้แก่ ครั้งแรกใส่ก่อนกระบวนการ compost ส่วนครั้งที่ 2 ใส่หลังกระบวนการ compost ซึ่งเป็นระยะที่กระบวนการย่อยสลายสมบูรณ์ดีแล้ว (maturity) หรือก่อนบรรจุถุง โดยมีการเก็บตัวอย่างปุ๋ยหลังกระบวนการ compost สิ้นสุด ก่อนและหลังการใส่เชื้อ นอกจากนี้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเพื่อการจำหน่ายก็ใช้เทคนิค FA เพื่อติดตามจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ก่อนการจำหน่าย โดยการนำตัวอย่างมาวัดปริมาณเชื้อโดยวิธี plate count บนอาหาร LG และ NFB จากนั้น ทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อว่าเป็น *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ที่ใส่ลงไปโดยการใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique ตรวจสอบใต้กล้อง Fluorescent ด้วยแสง Fluorescent (450-480 nm) ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

เลือกโคโลนีจากวิธี plate count บนอาหารแต่ละชนิดมา smear บนสไลด์ นำไปผ่านความร้อนเพื่อตรึงเชื้อให้ติดบนสไลด์ หยด 100µl primary antibodies ที่เจือจาง (1:80) โดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มไว้นาน 45 นาที ล้างด้วย 0.85% NaCl 3 ครั้ง จากนั้นหยด 100µl ของ Anti-Rabbit IgG (whole molecule) FITC conjugate เจือจาง (1:400) ด้วยน้ำปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในภาชนะที่มีความชื้นเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด และล้างด้วย 0.85% NaCl 5-10 นาที แล้ว

ล้างด้วยน้ำ หยดตัวอย่างด้วย FA-mounting fluid นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ Fluorescent ภายใต้แสง Fluorescent (450-480 nm)

3.5 การตรวจหาแบคทีเรีย PGPR โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

การสกัด DNA ของแบคทีเรีย PGPR ทั้งหมด 12 ไอโซเลท

แบคทีเรีย PGPR ทั้งหมด 12 ไอโซเลท ที่ถูกคัดเลือกแล้ว นำมาสกัด DNA โดยนำเซลล์ของแบคทีเรียมาใส่ลงใน micro centrifuge tube แล้วเติม 500 ไมโครลิตร TEN buffer เขย่า และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm (รอบ/นาที) เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนที่ใสทิ้ง (ทำซ้ำอีกครั้ง) จากนั้นใส่สารละลาย ดังต่อไปนี้ 20% sucrose 200 ไมโครลิตร, 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) 100 ไมโครลิตร , 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร lysozyme 20 ไมโครลิตร , และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร RNAse 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วเติม 5 M NaCl 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีแล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารชั้นบนสุดใสในหลอดที่เตรียมไว้ ตกตะกอน DNA โดยเติม Isopropanal 500 ไมโครลิตร + 3M sodium acetate 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ล้าง DNA ด้วย 70% ethanol ปั่นเหวี่ยง และละลาย DNA ด้วย TE buffer ตรวจสอบปริมาณ DNA ใน 1.0% agarose gel

การสกัด DNA จากดินโดยตรงจากดินบริเวณ Rhizosphere

นำดินบริเวณรากของต้นสลัดปริมาณ 0.25 กรัม มาทำการสกัด DNA ของจุลินทรีย์ โดยใช้ชุดสกัด DNA ของ Ultraclean Soil DNA kit (MoBio Laboratoried) นำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณ DNA ใน 1.0% agarose gel และนำ DNA ที่สกัดได้มาใช้เป็น DNA template สำหรับการทำ PCR ต่อไป

การเพิ่มปริมาณ DNA โดยกระบวนการ PCR (Polymerase Chain Reaction)

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)
DNA template	1
5x buffer	5
25 mM $MgCl_2$	6
2.5 dNTPs	4
20 pmol PBA 338F-GC	1
20 pmol PRUN 518 R	1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

GoTaq	0.5
H_2O	31.5

คู่ Primer ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ

PBA 338F-GC (5'-GCG CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') และ PRUN 518R (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')

โดยรอบในการเพิ่มจำนวน DNA ใช้อุณหภูมิดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 53 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ (Ovreas และคณะ, 1997) จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR products โดยวิธีการ electrophoresis ที่ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.5%

3.6 การตรวจหาแบคทีเรีย PGPR โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

วิธีการเตรียม Gel โดยใช้ 40-60% Denaturing solution

ตารางที่ 3.3 แสดงองค์ประกอบในการเตรียม 60% Denaturing solution

ส่วนผสม	ปริมาตร
60 % Acrylamide/Bis	25 ml
50x TAE buffer	2 ml
Formamide (deionized)	24 ml
Urea	25.2 g

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml โดยใช้ dH_2O

ตารางที่ 3.4 แสดงองค์ประกอบในการเตรียม 40% Denaturing solution

ส่วนผสม	ปริมาตร
40 % Acrylamide/Bis	25 ml
50x TAE buffer	2 ml
Formamide (deionized)	16 ml
Urea	16.8 g

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml โดยใช้ dH_2O

ทำการ Degas สารละลายสุดท้ายจากตารางที่ 3.3 และ 3.4 นาน 10-15 นาที และใช้ 0.45 micro-filter กรอง และนำ มา set เจล โดยใช้ 40% และ 60% Denaturing solution ผสมกับ Ammonium per sulfate และ TEMED โดยใช้ชุด set เจลของ D Code (Bio-Rad) หลังจากเจลแข็งตัวประมาณ 3 ชั่วโมง จึงทำการ load ตัวอย่าง DNA ตัวอย่างละ 60 µl โดยใช้ TAE buffer กระแสไฟฟ้า 120 V อุณหภูมิ 60 ºC เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำเจลแช่ใน ethidium bromide แล้วตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้ UV

นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบผลของ PGPR ที่คัดเลือกได้อีก 2 สายพันธุ์ ที่นำไปใช้ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ ในการปลูกข้าวโพดในภาคสนาม รายละเอียดของวิธีการแสดงในผลงานตีพิมพ์ภาคผนวก (Piromyou, P., *et al*., 2011)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การผลิตและใช้ Fluorescence Antibody (FA) Technique เพื่อการตรวจสอบ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.

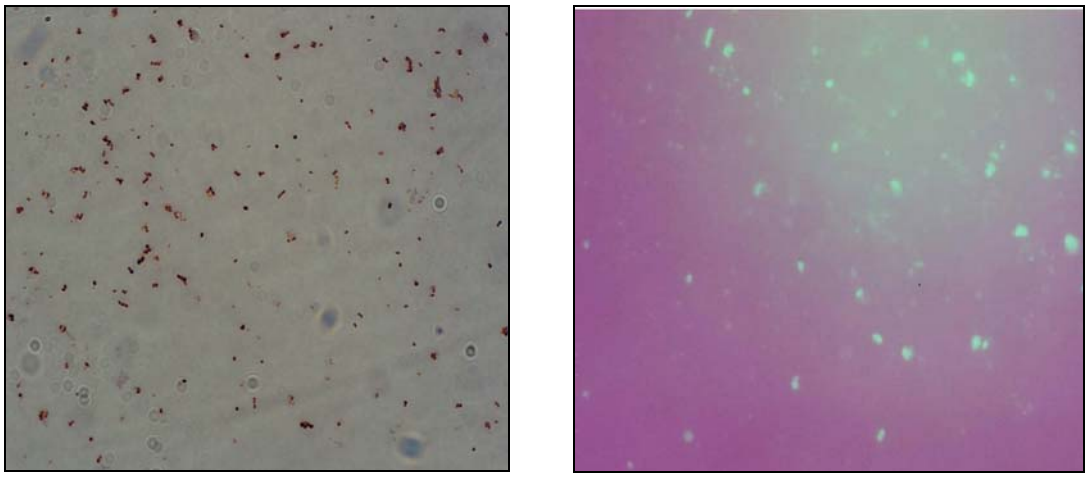
หลักการของ FA เป็นเช่นเดียวกันกับ serology คือการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง antigen และ antibody เพียงแต่ว่าวิธี FA นั้นต้อง label antibody ด้วยสารเรืองแสง ที่นิยมกันมากและใช้ได้ผลดีก็คือ fluorescence isothiocyanate (FITC) เมื่อ antibody โปรตีนทำปฏิกิริยากับสารเรืองแสงก็จะได้สาร FA ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ antigen เฉพาะของมันทำให้ antigen นั้นมีสารเรืองแสงเกาะอยู่ ซึ่งสารเรืองแสงนี้ เมื่อกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ก็จะเกิดการเรืองแสงขึ้น เช่น FITC เมื่อกระทบแสง UV ผ่าน Filter สีน้ำเงินก็จะให้แสงสีเขียวแกมเหลืองเกิดขึ้น ดังนั้นเมื่อเซลล์ของ *Azotobacter* sp. หรือ *Azospirillum* sp. ทำปฏิกิริยากับ FA ของมันแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ให้แสง UV ก็จะทำให้เซลล์เกิดเรืองแสงขึ้นจึงทำให้เห็นเซลล์ได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูป ที่ 4.1 และ 4.2

a b

รูปที่ 4.1 แสดงการเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter* sp.

a. แสดงลักษณะของเซลล์ *Azotobacter sp.* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

b. แสดงลักษณะของเซลล์ *Azotobacter sp.* ที่ถูกทำให้เรืองแสงด้วย FA technique ภายใต้กล้อง Fluorescent



a b

รูปที่ 4.2 แสดงการเรืองแสงของเชื้อแบคทีเรีย *Azospirillum* sp.

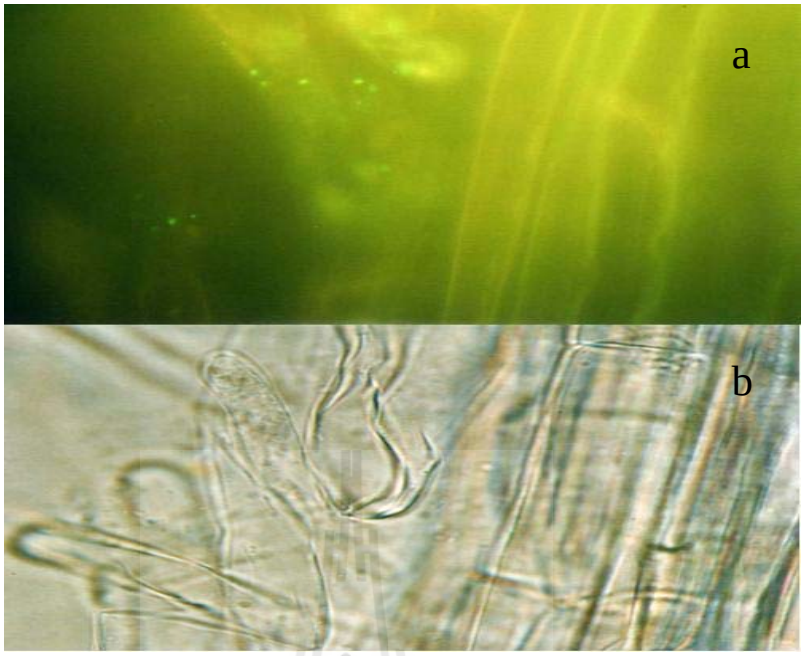
a. แสดงลักษณะของเซลล์ *Azospirillum* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศ์กำลังขยาย 1000 เท่า

b. แสดงลักษณะของเซลล์ *Azospirillum* sp. ที่ถูกทำให้เรืองแสงด้วย FA technique ภายใต้กล้อง Fluorescent

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปได้ใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้น สำหรับเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ ตรวจสอบ และติดตามการเข้าอาศัยบริเวณรากพืช (root colonization) เพื่อทำการตรวจสอบ Bioefficacy ในระดับกระถางและแปลงปลูกต่อไป

4.2 การใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique เพื่อการตรวจสอบ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp.ในรากพืชเมื่อปลูกในหลอดทดลอง

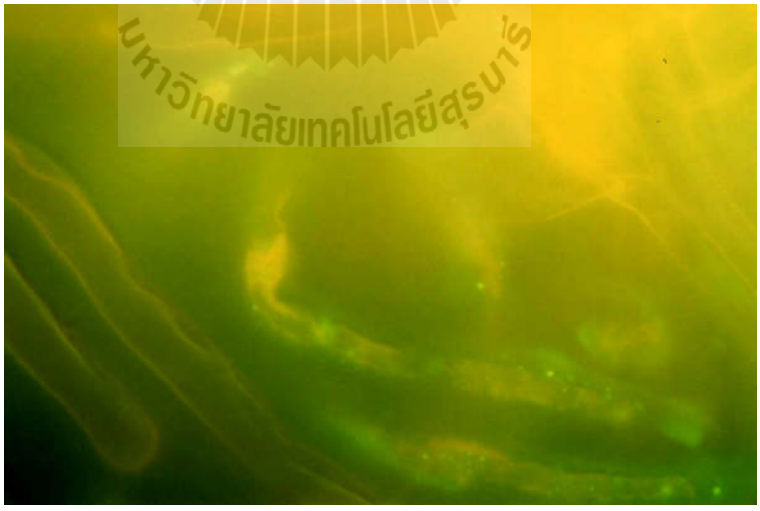
การใช้ FA Technique เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งใช้ในการติดตามและควบคุมประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ (inoculants) ของ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ที่ผลิตขึ้นมา ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3, 4.4 และรูปที่ 4.5 ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้สามารถติดตามการเข้าเกาะของ inoculants ในรากพืชที่ใช้ทดสอบ โดยเห็นการเรืองแสงของเซลล์แบคทีเรียเป็นสีเขียว ในขณะที่ถ้าไม่ใส่เชื้อเห็นเพียงสีเหลืองที่เป็น background ของภาพเท่านั้น และแสดงให้เห็นว่ายังมี inoculants ที่มีชีวิตอยู่ในระบบรากพืช



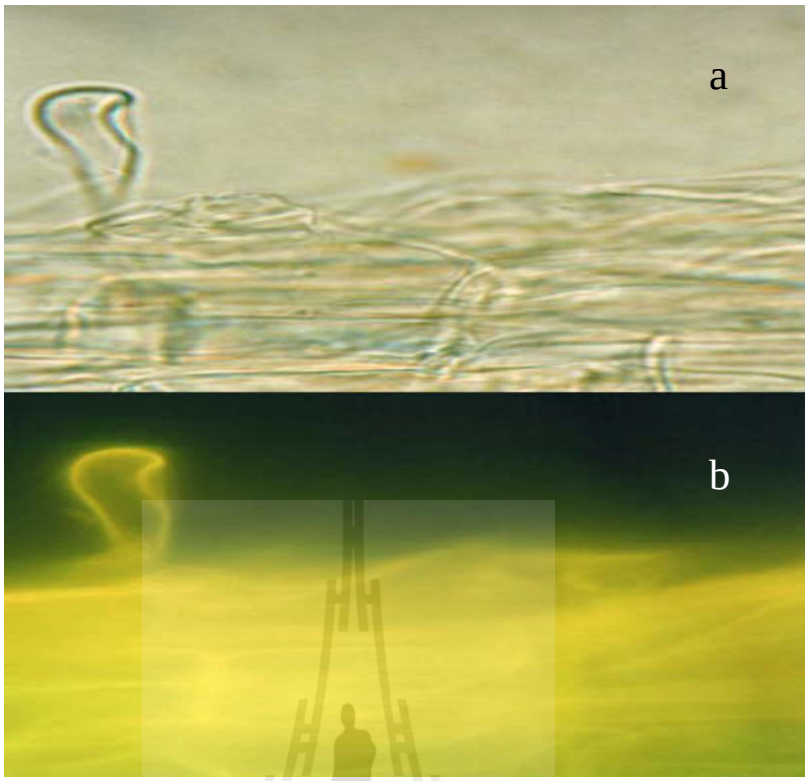
รูปที่ 4.3 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody ของเชื้อ *Azospirillum* sp. บนรากของต้นมะเขือเทศ หลังจากใส่เชื้อไปแล้ว 5 วัน ซึ่งถ่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence

a. ภายใต้แสง Fluorescence (450-480 nm)

b. ภายใต้แสงไฟธรรมดา



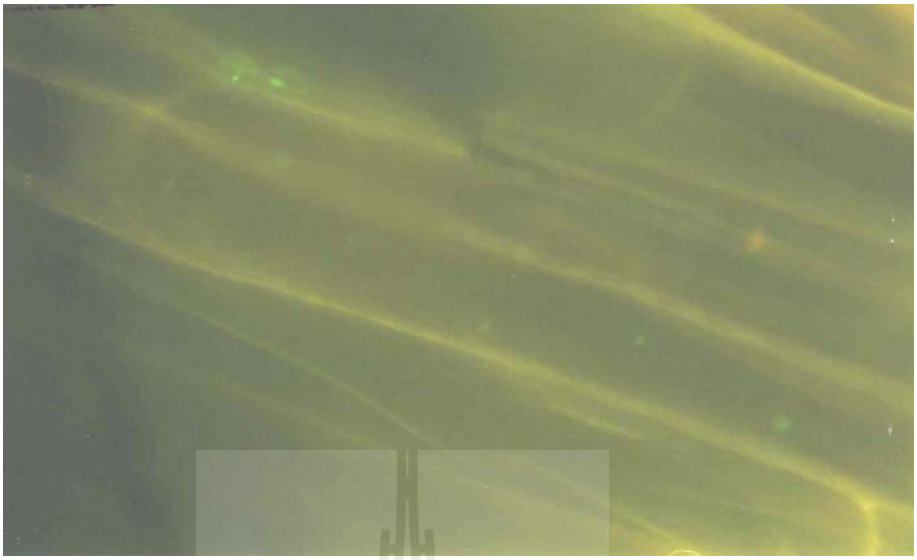
รูปที่ 4.4 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody ของเชื้อ *Azotobacter* sp. บนรากของต้นมะเขือเทศ หลังจากใส่เชื้อไปแล้ว 5 วันซึ่งถ่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence ภายใต้แสง Fluorescence (450-480 nm)



รูปที่ 4.5 รากต้นมะเขือเทศอายุ 5 วัน ที่ไม่ใส่เชื้อ ที่ใช้การย้อม Immuno fluorescent antibody ซึ่งถ่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence
a. ภายใต้แสงไฟธรรมดา
b. ภายใต้แสง Fluorescence (450-480 nm)

4.3 การทดสอบในระบบการควบคุมในกระถาง

จากการทดลองผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ที่เก็บในวัสดุพาหะที่เป็นพีทกับทราย แล้วปลูกต้นมะเขือเทศในกระถางเมื่ออายุครบ 1 เดือน นำมาตรวจสอบ ติดตามการยึดเกาะและความหนาแน่นของหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบในรากของต้นมะเขือเทศ โดยวิธี Indirect Immunolocalization โดยใช้กล้อง fluorescent ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7 จากรูปแสดงให้เห็นว่ามีการยึดเกาะของทั้ง *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในรากของต้นมะเขือเทศกระจายอยู่ทั่วไป โดยมีความหนาแน่นค่อนข้างต่ำ แต่ก็ยังสามารถตรวจพบได้

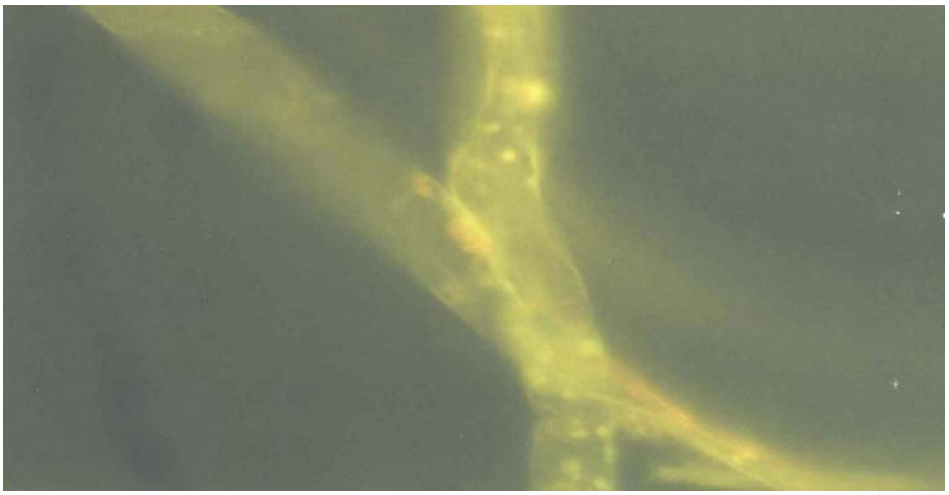


(a)

(b)

รูปที่ 4.6 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของเชื้อ *Azotobacter sp.* บนรากของมะเขือเทศอายุ 1 เดือน ที่ทดลองปลูกในกระถางที่มีการผสมปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ
(a) ภายใต้แสง Fluorescence (450-480 nm)
(b) ภายใต้แสงไฟธรรมดา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



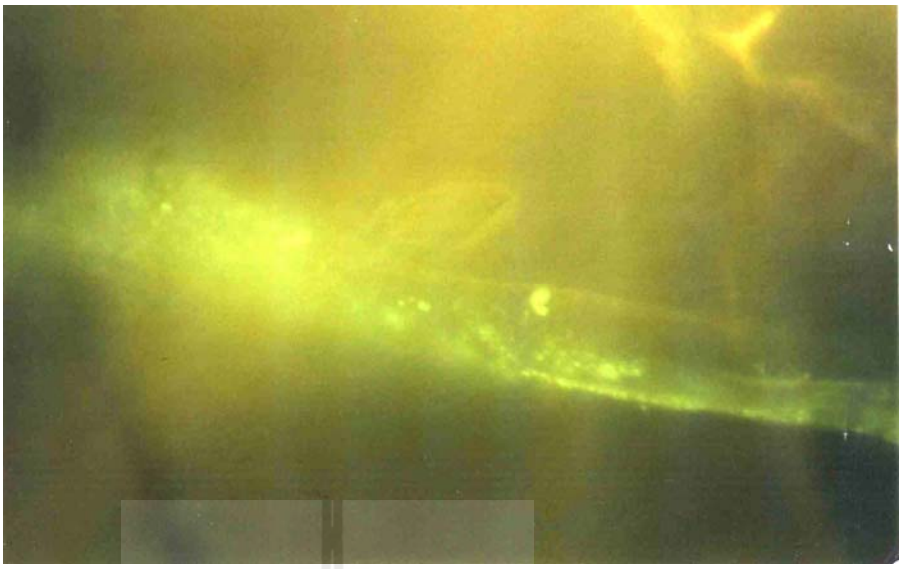
(a)

(b)

รูปที่ 4.7 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของเชื้อ *Azospirillum sp.* บนรากของมะเขือเทศอายุ 1 เดือน ที่ทดลองปลูกในกระถางที่มีการผสมปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ
(a) ภายใต้แสง Fluorescence (450-480 nm)
(b) ภายใต้แสงไฟธรรมดา

4.4 การทดสอบตัวอย่างพืชบริเวณพื้นที่ที่ผ่านการใช้ BOF มาเป็นเวลา 3 ปี อย่างต่อเนื่อง

เมื่อเก็บตัวอย่างพืชที่มีอายุ 1 เดือนจากพื้นที่ที่ผ่านการใช้ BOF มาเป็นเวลา 3 ปีอย่างต่อเนื่อง แล้วนำมาตรวจสอบติดตามการยึดเกาะและความหนาแน่นของ *Azotobacter sp.* และ *Azospirillum sp.* โดยวิธี Indirect Immunolocalization โดยใช้กล้อง fluorescent ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.8 และ 4.9 จากรูปแสดงให้เห็นว่า มีการยึดเกาะของทั้งเชื้อ Azotobacter *sp.* และ *Azospirillum sp.* ในรากของต้นสลัดที่นำมาทดสอบ มีความหนาแน่นค่อนข้างสูง

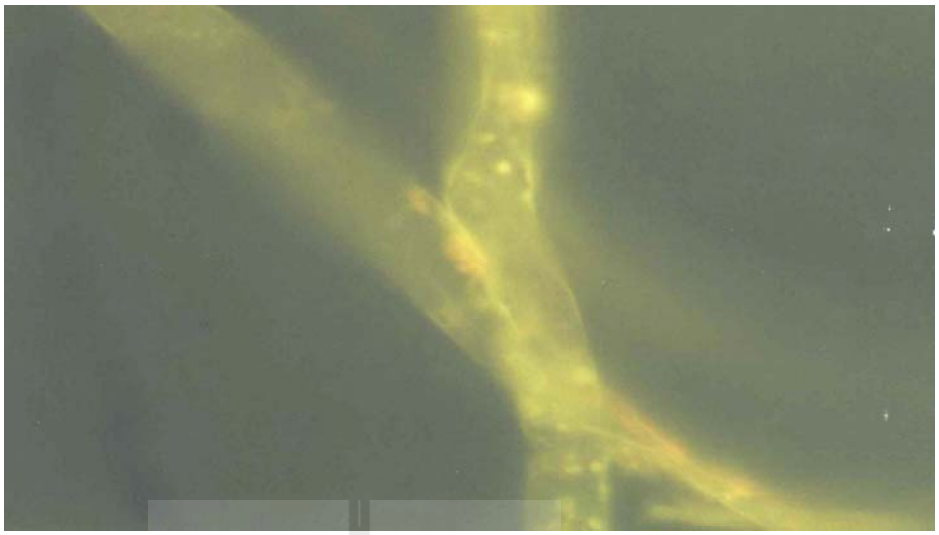


(a)

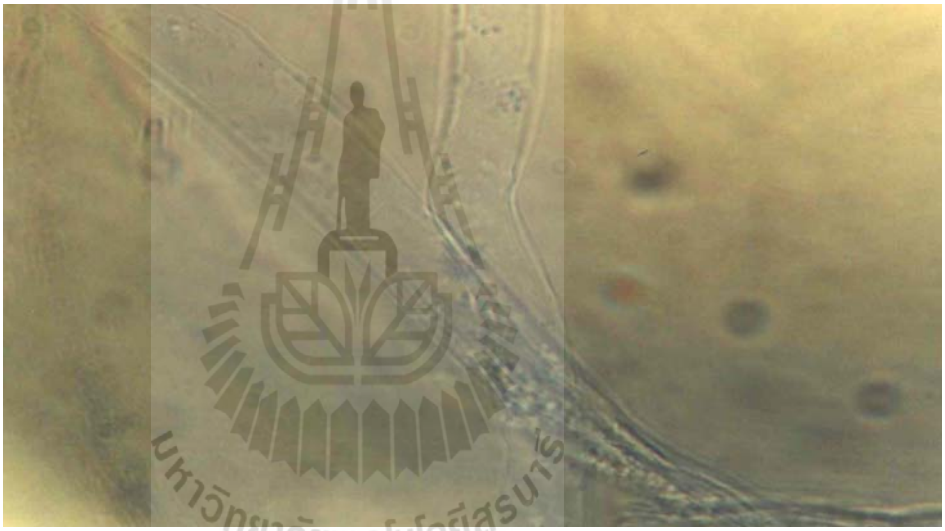
(b)

รูปที่ 4.8 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของเชื้อ *Azotobacter* sp. บนรากของผักสลัดอายุ 1 เดือน ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชที่มีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพอย่างต่อเนื่อง
(a) ภายใต้แสง Fluorescence (450-480 nm) (b) ภายใต้แสงไฟธรรมดา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



(a)



(b)

รูปที่ 4.9 แบคทีเรียที่ใช้การย้อมโดยเทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Anitibody ของเชื้อ *Azospirillum* sp. บนรากของผักสลัดอายุ 1 เดือน ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชที่มีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพอย่างต่อเนื่อง
(a) ภายใต้แสง Fluorescence (450-480 nm) (b) ภายใต้แสงไฟธรรมดา

4.5 การติดตามผลและการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculants) โดยการใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique ร่วมกับการวัดปริมาณเชื้อโดยวิธี plate count เพื่อติดตามหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่ในกองปุ๋ย และหัวเชื้อที่ผลิตเพื่อการจำหน่าย

เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ตามจำนวนที่เหมาะสม จึงได้มีการตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ครั้งแรกหลังจากกระบวนการย่อยสลายสมบูรณ์ดีแล้ว (maturity) เพื่อให้ทราบจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือในกองปุ๋ย หลังจากนั้นจึงมีการเติมหัวเชื้ออีกครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. หลังขบวนการ compost สิ้นสุด ก่อนและหลังการใส่หัวเชื้อครั้งที่ 2

เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจสอบ	**จำนวนจุลินทรีย์หลังขบวนการย่อยสลายสมบูรณ์**	**จำนวนจุลินทรีย์ก่อนการบรรจุถุง**
Azotobacter sp.	9.42×10^{4} CFU/g	1.92×10^{7} CFU/g
Azospirillum sp.	6.35×10^{3} CFU/g	5.08×10^{6} CFU/g

จากตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่าจำนวนเชื้อ *Azotobacter* sp. หลังขบวนการย่อยสลายสมบูรณ์มีจำนวน 9.42×10^{4} CFU/g และจำนวนจุลินทรีย์ก่อนบรรจุถุงหลังการใส่หัวเชื้อแล้วจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 1.92x107 CFU/g ส่วนจำนวนเชื้อ *Azospirillum* sp. หลังขบวนการย่อยสลายสมบูรณ์มีจำนวน 6.35x103 CFU/g และจำนวนจุลินทรีย์ก่อนบรรจุถุงหลังการใส่หัวเชื้อแล้วจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 5.08×10^{6} CFU/g

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. เมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 3 เดือนเพื่อการจำหน่าย

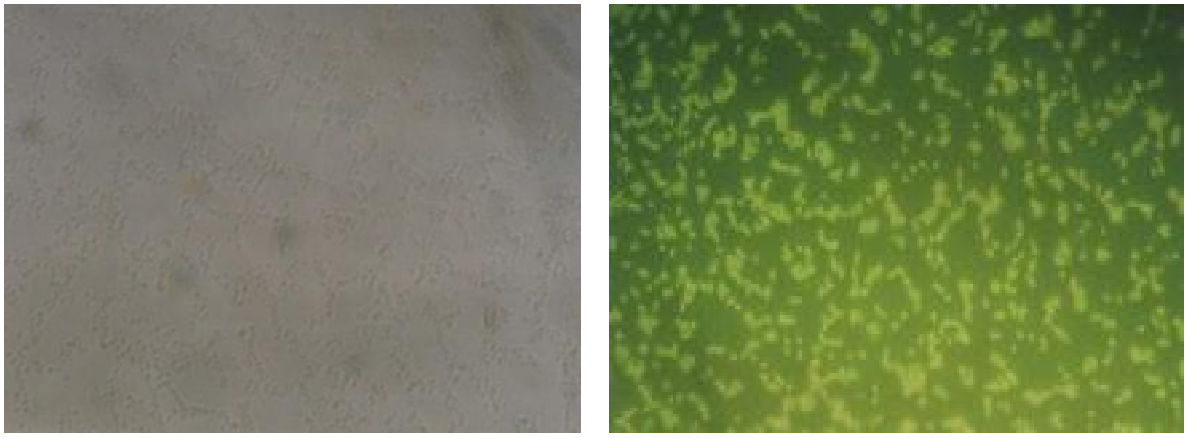
เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจสอบ	**เดือนที่ 1**	**เดือนที่ 2**	**เดือนที่ 3**
Azotobacter sp.	8.10×10^{8} CFU/ml	7.20×10^{8} CFU/ml	5.25×10^{8} CFU/ml
Azospirillum sp.	7.58×10^{8} CFU/ml	5.75×10^{8} CFU/ml	4.90×10^{8} CFU/ml

ส่วนการตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ ที่เก็บไว้เพื่อการจำหน่ายเมื่อเวลาผ่าน 3 เดือนแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่าจำนวนเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในเดือนที่ 1 มีจำนวนเชื้อ *Azotobacter* sp. 8.10×10^8 CFU/ml และ *Azospirillum* sp. 7.58×10^8 CFU/ml เดือนที่ 2 มีจำนวนเชื้อ *Azotobacter* sp. 7.20×10^8 CFU/ml และ *Azospirillum* sp. 5.75×10^8 CFU/ml ในเดือนที่ 3 มีจำนวนเชื้อ *Azotobacter* sp. 5.25×10^8 CFU/ml และ *Azospirillum* sp. 4.90×10^8 CFU/ml ตามลำดับ

หลังจากการนับปริมาณเชื้อบนอาหารแต่ละชนิด เพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อที่นับเป็นเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ที่ใส่ลงไป ได้เลือก colony ในแต่ละ plate มาตรวจสอบโดยใช้ Fluorescent Antibody (FA) Technique ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.11 จากรูปแสดงให้เห็นว่า colony ที่เลือกมาจาก plate ที่ใช้อาหาร LG เมื่อนำมาตรวจสอบกับ Antibody ของ *Azotobacter* sp. พบว่ามีการจับระหว่าง Antigen ของหัวเชื้อ และ Antibody ที่นำมาทดสอบโดยเกิดการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent ส่วน colony ที่เลือกมาจาก plate ที่ใช้อาหาร NFB เมื่อนำมาตรวจสอบกับ Antibody ของ *Azospirillum* sp. ก็เกิดเป็นผลบวกเช่นเดียวกัน

(a) **(b)**

รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะ Colony ที่เลือกจาก plate ที่เลี้ยงในอาหาร LG ย้อมโดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของ *Azotobacter* sp.
(a) ภายใต้แสงไฟธรรมดา (b) ภายใต้แสง Fluorescent (450-480 nm)



(a) (b)

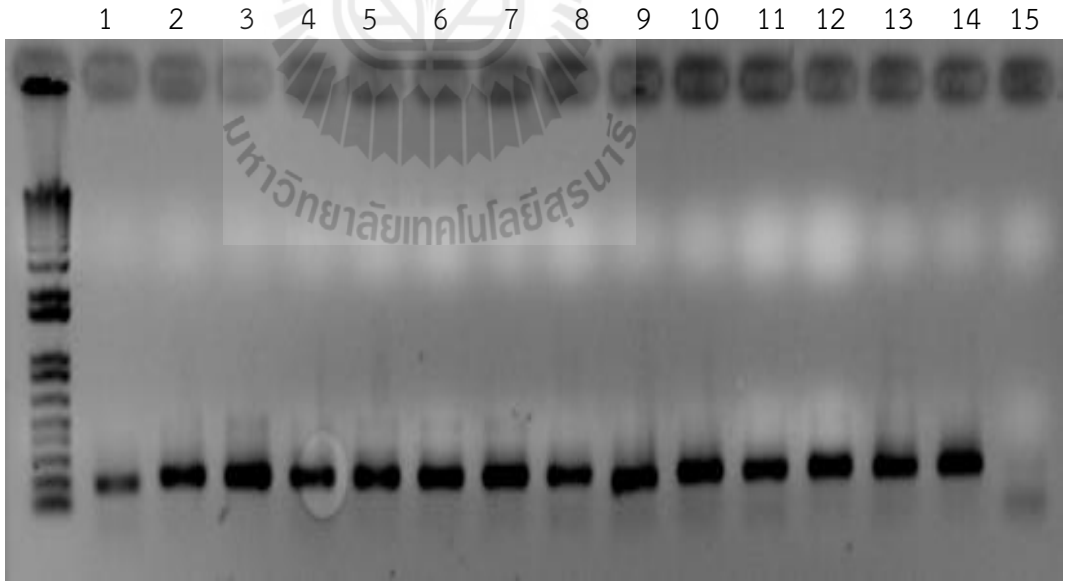
รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะ Colony ที่เลือกจาก plate ที่เลี้ยงในอาหาร NFB ย้อมโดยใช้เทคนิค Immuno fluorescent antibody โดยใช้ Antibody ของ *Azospirillum* sp.

a) ภายใต้แสงไฟธรรมดา

b) ภายใต้แสง Fluorescent (450-480 nm)

แสดงผลการตรวจหาแบคทีเรีย โดยวิธี PCR และ วิธี DGGE

แสดงผลการทดลองการตรวจหาแบคทีเรีย โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)



รูปที่ 4.12 แสดง DNA ของแบคทีเรีย PGPR ในแต่ละชนิด ได้แก่

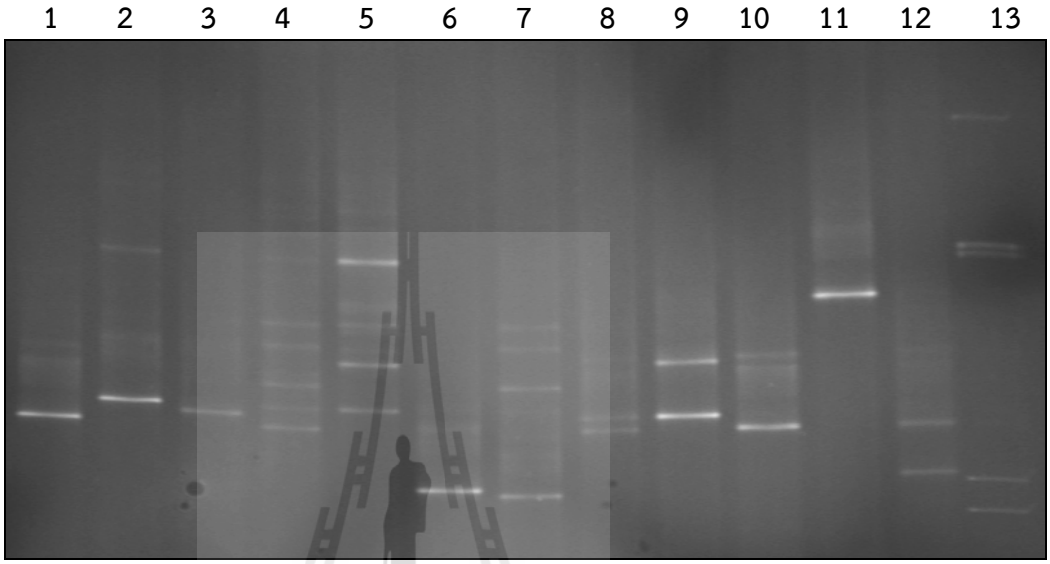
1 = *Azotobacter* sp., 2 = *Azospirillum* sp.,

3-14 = แบคทีเรียดิน ไอโซเลทต่างๆ 10 ไอโซเลท, 15 = น้ำ

จากรูปที่ 4.12 แสดงขนาดของ 16S rDNA ใน 1% Agarose gel ของเชื้อ PGPR แต่ละชนิดที่คัดเลือกมาศึกษา โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA จากกระบวนการ PCR อาศัยชุด primer 518R และ 338 FGC เมื่อเปรียบเทียบกับ marker ขนาด DNA ที่เกิดขึ้นหลังการเพิ่มปริมาณ DNA

คือ 200 bp เท่ากันทุกเชื้อ ซึ่งมีขนาดเท่ากับผลของ PCR ของ 16S rDNA ที่สกัดจากดินโดยตรง โดยใช้ชุดสกัด DNA ของ Ultra soil DNA kit

แสดงผลการตรวจหาแบคทีเรีย PGPR โดยใช้เทคนิคDenaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)



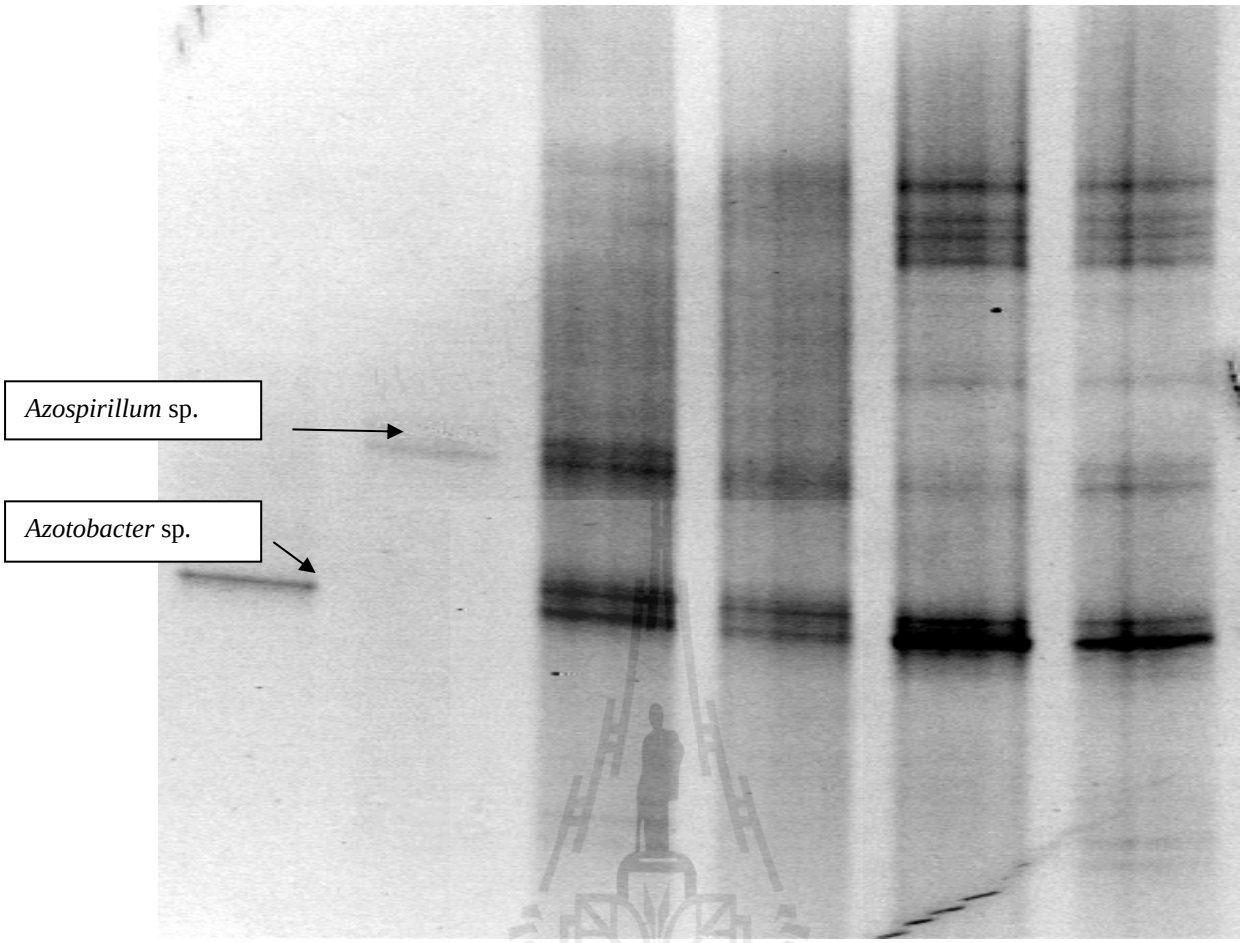
รูปที่ 4.13 แสดงรูปแบบ DNA ของแบคทีเรีย PGPR ในแต่ละชนิด
1-10 = แบคทีเรียดิน ไอโซเลทต่างๆ 10 ไอโซเลท 11= *Azospirillum* sp.,
12 = *Azotobacter* sp., 13 = Marker

4.6 การตรวจหาแบคทีเรีย PGPR โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

จากผลการทดลองการเพิ่มปริมาณ DNA โดยกระบวนการ PCR ที่แสดงในรูปที่ 36 สามารถเพิ่มจำนวนชุดของยีนเป้าหมายได้แต่การตรวจสอบโดยใช้ 1% Agarose ไม่สามารถจำแนกถึงความแตกต่างของแบคทีเรียแต่ละชนิดได้ ดังนั้นจึงใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) มาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในแต่ละชนิด ดังแสดงในรูปที่ 37 โดยอาศัยความแตกต่างของการเรียงตัวของ nitrogenous base ภายในสาย DNA ของ 16S rRNA ยีน ซึ่งสามารถใช้เทคนิคนี้เป็นแบบจำลอง (model) ในการติดตามแบคทีเรียที่ศึกษา และการศึกษาผลกระทบที่มีต่อชุมชนของแบคทีเรียเดิม ที่ทำการสกัด DNA โดยตรงจากดินบริเวณ Rhizosphere เปรียบเทียบดูว่า เมื่อใส่เชื้อแบคทีเรียทั้งสอง จะมีผลต่อโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์หรือไม่

4.7 การใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) เพื่อตรวจสอบการยึดเกาะของ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในรากพืช

1 2 3 4 5 6



รูปที่ 4.14 การติดตามหัวเชื้อจุลินทรีย์ *Azotobacter sp.* และ *Azospirillum sp.* บนรากของผักสลัดอายุ1 เดือน ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชที่มีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลา 3 ปี โดยใช้เทคนิค DGGE

Lane 1 แสดงแถบ DNA ของ *Azotobacter sp.* จาก การเพาะเลี้ยงเชื้อ

Lane 2 แสดงแถบ DNA ของ *Azospirillum sp.* จาก การเพาะเลี้ยงเชื้อ

Lane 3-4 แสดงแถบ DNA ของชุมชนจุลินทรีย์บริเวณรอบรากของสลัด วิเคราะห์จากวิธี Unculturable

Lane 5-6 แสดงแถบ DNA ของชุมชนจุลินทรีย์บริเวณรอบรากของสลัด วิเคราะห์จากวิธี Unculturable ที่ทำให้บริสุทธิ์ซ้ำโดย Phenol chloroform

จากรูปที่ 4.14 แสดงแถบ DNA ของเชื้อโดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) เลนที่ 1 และ 2 แสดงแถบของเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองชนิดเป็นเชื้อที่ใช้สำหรับทำปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ ส่วนเลนที่ 3-6 แสดงแถบ DNA ของชุมชนจุลินทรีย์บริเวณรอบๆ รากสลัดอายุ 1 เดือน ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชที่มีการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพอย่างต่อเนื่องมาแล้วเป็นเวลา 3 ปี จากผลการทดลองสามารถพบแถบ DNA ที่ตรงกับเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ทุกเลน นอกจากนี้ยังพบแถบ DNA อื่นๆ อีกหลายแถบที่แสดงถึงชุมชนจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อยู่บริเวณรอบๆ รากพืช อย่างไรก็ตามจาก

เลนที่ 3-6 ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันแต่ให้ผลแตกต่างกันเนื่องจากเลนที่ 3-4 ใช้การสกัด DNA ของแบคทีเรียดังที่กล่าวไว้ใต้รูป ส่วนเลนส์ที่ 5-6 นั้น re purify โดยใช้ Phenol chloroform

ผลการทดลองของการทดสอบกับข้าวโพดในภาคสนาม แสดงในผลงานตีพิมพ์ภาคผนวก (Piromyou, P., et al., 2011)

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculants) ที่มีคุณภาพนั้นต้องมีการควบคุมคุณภาพหลังจากผลิตแล้ว โดยสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ ปริมาณเซลล์ของเชื้อที่เราต้องการผลิตและปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนซึ่งสิ่งที่มีผลโดยตรงต่อการปนเปื้อนของหัวเชื้อก็คือ วัสดุพาหะ (carrier) ที่นำมาใช้ จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้วัสดุพาหะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ซึ่ง ได้แก่ พีทปลอดเชื้อก็คือ การใช้หม้อนึ่งความดัน (121°C 1.5 lb) นาน 60 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้ออีก 60 นาที เมื่อใช้วัสดุที่ปลอดเชื้อทำให้ลดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น และทำให้ปริมาณเชื้อที่เราต้องการมีปริมาณสูง จากผลการทดลองการตรวจสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า หัวเชื้อที่ใช้ช่วยส่งเสริมให้พืชที่นำมาทดสอบมีระบบรากที่แข็งแรงและดีกว่า รวมทั้งผลผลิตที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

ถึงแม้ว่าพีทเป็นวัสดุพาหะที่เหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อสำหรับทั้ง *Rhizobium* sp. และ *Bradyrhizobium* sp. รวมทั้งเหมาะสมเมื่อนำมาใช้ในการเป็นวัสดุพาหะสำหรับ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. อีกด้วย อย่างไรก็ตามปัจจุบันเนื่องจากพีทมีจำนวนจำกัด จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาวัสดุพาหะชนิดอื่นมาทดแทน โดยการนำ Polymer ชนิดต่าง ๆ มาทดสอบเนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสำหรับเป็นวัสดุพาหะ เพราะมีความสามารถควบคุม heat transfer มีลักษณะ rheological ที่ดีและ high water activities เป็นต้น ซึ่งสำหรับ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ได้ทำการศึกษาและคัดเลือกวัสดุพาหะเหลวที่เหมาะสมดังที่ได้กล่าวไปแล้ว เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อ หลังจากเก็บรักษาไว้ พบว่าหัวเชื้อช่วยส่งเสริมให้พืชที่นำมาทดสอบมีระบบรากที่แข็งแรง และดีกว่า รวมทั้งผลผลิตที่สูงกว่าเช่นเดียวกับการใช้พีทเป็นวัสดุพาหะ

การติดตามเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่ในกองปุ๋ย โดยการตรวจสอบปริมาณเชื้อด้วยวิธี plate count ก่อนการบรรจุถุงของปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ พบว่ามีจำนวนเชื้อ 10^6–10^7 CFU/ml ส่วนการตรวจสอบปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ เพื่อการจำหน่ายนั้นหลังจากเก็บไว้ 1, 2 และ 3 เดือน พบว่า *Azotobacter* sp. มีจำนวนเชื้อ 8.1×10^8 CFU/ml, 7.20×10^8 CFU/ml และ 5.25×10^8 CFU/ml ตามลำดับ ส่วน *Azospirillum* sp. มีจำนวนเชื้อ 7.58×10^8 CFU/ml, 5.75×10^8 CFU/ml และ 4.90×10^8 CFU/ml ตามลำดับโดยพบว่าจำนวนจุลินทรีย์เมื่อเก็บไว้ 1 เดือน มีจำนวนเพิ่มขึ้น เกิดจากจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในปุ๋ยที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายสมบูรณ์ดีแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในการนำ compost มาใช้เป็นวัสดุพาหะ เพื่อเป็นการยืนยันว่าการใช้เทคนิค plate count โดยอาหารที่มีความจำเพาะทั้งต่อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. มีความน่าเชื่อถือและถูกต้องจึงได้เลือก colony ที่ขึ้นในอาหารแต่ละชนิดมาตรวจสอบโดยใช้ FA Technique ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและถูกต้องค่อนข้างสูง จากผลการทดลองทำให้เชื่อถือได้ว่า colony ที่ขึ้นบนอาหารจำเพาะที่ใช้เป็น colony ของเชื้อที่ต้องการทดสอบ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง การใช้ทั้ง 2 เทคนิคร่วมกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการตรวจสอบปริมาณเชื้อในกองปุ๋ยที่มีจุลินทรีย์หลายชนิดรวมกัน

นอกจากนี้การติดตามผลการยึดเกาะของ Inoculants ในระบบรากพืช โดยวิธี FA technique นั้นพบว่าสามารถใช้ติดตามศึกษาการยึดเกาะของเชื้อในต้นไม้ที่ปลูกทั้งในระบบควบคุมในห้องปฏิบัติการ และในระบบแปลงทดลองจริงได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยส่วนมากพบเชื้อทั้ง 2

ชนิด เกาะที่บริเวณรากฝอย โดยเฉพาะบริเวณโคนรากฝอย นอกจากนี้ยังพบว่าความหนาแน่นของเชื้อที่พบจากรากของพืชที่เก็บมาจากแปลงทดลองจริงมีมากกว่าที่พบในห้องทดลอง ซึ่งน่าจะเกิดจากพืชที่ปลูกในห้องทดลองมีการใส่หัวเชื้อเพียงครั้งเดียว แต่ในแปลงทดลองมีการใส่เชื้อติดต่อกันมาเป็นเวลานาน จึงพบปริมาณเชื้อหนาแน่นมากกว่า เนื่องจากมีการสะสมของเชื้อในพื้นดินบริเวณนั้น

การติดตาม Inoculants บริเวณรอบๆ รากพืช (Rhizosphere) โดยวิธีที่ไม่ต้องใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อจากระบบแปลงทดลองจริงโดยใช้เทคนิค DGGE นั้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพบทั้งเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบรวมทั้งสามารถแสดงให้เห็นถึงชุมชนจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อยู่บริเวณรอบๆ รากพืชด้วย นอกจากนี้การ repurify DNA ที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพผลการทดลองให้ดียิ่งขึ้น การใช้เทคนิค DGGE ในการติดตามนั้นเป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ทำให้เกิดความถูกต้องและแม่นยำ ช่วยยืนยันในเรื่องความจำเพาะเจาะจงของวิธี FA ซึ่งอาจเกิด cross-hybridization ได้ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองทั้งการใช้ FA Technique และการใช้เทคนิค DGGE ให้ผลสอดคล้องกัน คือพบทั้งเชื้อ *Azotobacter* sp. และ *Azospirillum* sp. ที่เป็น Inoculant ของปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพที่ใช้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดที่ใช้สามารถมีชีวิตรอดและตรวจสอบได้ในแปลงทดลอง

จากการศึกษาผลของ PGPR ที่เหมาะสมสำหรับข้าวโพด ได้แก่ *Pseudomonas* sp. SUT19 และ *Brevibacillus* SUT 47 ว่ามีผลกระทบต่อโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์เดิมในบริเวณ Rhizosphere ผลของการทดลองสรุปได้ว่า เมื่อผสม PGPR ทั้ง 2 สายพันธุ์ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ส่งผลให้ได้มวลรวมของต้นข้าวโพดสูงสุด เมื่อเทียบกับตำรับการทดลองอื่น ๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA-DGGE พบว่า PGPR ทั้งสองสายพันธุ์สามารถดำรงอยู่ใน Rhizosphere ตลอดช่วงเวลาของการเพาะปลูก การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของชุมชนจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นผลมาจากระยะการเจริญของข้าวโพดเอง ไม่ได้มาจากผลการใส่เชื้อ PGPR

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

พงษ์เดช ภิรมย์อยู่ และคณะ (2553). การใช้ Bacillus subtilis เพื่อการผลิตเม็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อน. วารสารแก่นเกษตร. 38(2):155-162.

Piromyou, P et. al., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizophere of forage corn cultivated in Thailand. Eu. J. of Soil. Biol. 47:44-54.

Saano, A., Tas, E., Pippola, S, Lindstrom, K. and vas Elsas, J. D. (1995). Extraction and analysis of microbial DNA from soil. In: Trevors, J. T., van Elsas J. D. (Eds.), Nucleic Acids in the Environment. Springer, Berlin, Germany, pp. 49-67.

Sorensen, S. J., de Lipthay, J. R., Muller, A. K., Barkay, T., Hansen, L. H. and Rasmussen, L. D. (2002). Molecular methods for assessing and manipulating the diversity of microbial populations and processes. In: Burns, R. G., Dick, R. P. (Eds.), Enzymes in the Environment. Marcel Dekker, New York, pp. 363-389.

Tas, E., Saano, A., Leinonen, P. and Lindstrom, K. (1995). Identification of Rhizobium spp. In peat-based inoculants by DNA hybridization and PCR and its application in inoculant quality control. Applied and Environmntal Microbiology 61(5), 1822-1827.

Webster, G., Nweberry, C. J., Fry, J. C. and Weightman, A. J. (2003). Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. Journal of Microbiological Methods 55, 155-164.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก