



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

ปริญญา

ปฐพีวิทยา สาขา ปฐพีวิทยา
ปฐพีวิทยา ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในโตรเจนเอ็นโดไฟต์จากรากข้าว
Diversity of N_2 - Fixing Endophytic Bacteria from Rice Roots

นามผู้วิจัย นางสาวเบญจมาศ รสโสภา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ภัทรพร รัตนาวรี, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิบูลย์ กังแฮ, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากรากข้าว

Diversity of N_2 - Fixing Endophytic Bacteria from Rice Roots

โดย

นางสาวเบญจมาศ รสโสภา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เบญจมาศ รศโสภา 2553: ความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากรากข้าว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา) สาขาปฐพีวิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, Ph.D.
96 หน้า

การคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากรากข้าวพบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ทั้งหมด 260 ไอโซเลต จากข้าวสายพันธุ์ต่างๆที่ปลูกในเรือนทดลองและเก็บจากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งแบคทีเรียที่พบทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และทำการวิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยใช้ simple matching binary coefficient จากข้อมูลการทดสอบการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้ในการเจริญได้ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียได้เป็น 18 กลุ่มที่ระดับความเหมือนสูงสุด 78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนจากแต่ละกลุ่มจำนวน 50 ไอโซเลต มาทำการตรวจสอบยีน *nifH* พบการปรากฏของยีน *nifH* 40 ไอโซเลต หลังจากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตัวแทนโดยใช้เทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ของยีน *nifH* โดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดสายดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งที่จำเพาะ โดยชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ได้แก่ *HaeIII* *HpaII* *HaeIII* *MboI* *RsaI* และ *HinfI* จากการศึกษาด้วยเทคนิค RFLP สามารถแบ่งแบคทีเรียได้เป็น 14 กลุ่มที่ระดับความเหมือนสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และนำแบคทีเรียตัวแทน 14 ไอโซเลต มาวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA แบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลต ได้แก่ *Bradyrhizobium yuanmingense* strain TTB5 *Bradyrhizobium* sp. *Azorhizobium caulinodans* *Burkholderia cepacia* strain BEB17 *Burkholderia vietnamiensis* และ Uncultured bacterium ที่ระดับความเหมือน 78%, 93%, 99%, 94%, 94% และ 99% ตามลำดับ โดยแบคทีเรียเหล่านี้มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.204-1.138 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อตัวอย่าง

Benjamas Rossopa 2010: Diversity of N₂ - Fixing Endophytic Bacteria from Rice Roots.
Master of Science (Soil Science), Major Field: Soil Science, Department of Soil Science.
Thesis Advisor: Assistant Professor Kannika Sajjaphan, Ph.D. 96 pages.

A total of 260 nitrogen fixing endophytic bacteria were isolated from rice roots of different varieties of rice in the greenhouse and Suphanburi Rice Experimental Station. UPGMA analysis using simple matching binary coefficient of antibiotic resistance patterns, carbon source utilization and morphology indicated that the isolated bacteria could be categorized into 18 groups, with a maximum similarity value of 78%. Complex fingerprint patterns were obtained for 50 isolates studied. 40 isolates carried *nifH* gene. Diversity of the representative bacteria was assessed by RFLP technique (restriction fragment length polymorphism). Restriction digestion with the enzymes *HahI*, *HpaII*, *HaeIII*, *MboI*, *RsaI* and *HinfI*. The results indicated that the isolated bacteria could be categorized into 14 groups, with a maximum similarity value of 100%. Sequence analysis of PCR product indicated the 16S rRNA gene in strain *Bradyrhizobium yuanmingense* strain TTB5, *Bradyrhizobium* sp., *Azorhizobium caulinodans*, *Burkholderia cepacia* strain BEB17, *Burkholderia vietnamiensis* and Uncultured bacterium with 78%, 93%, 99%, 94%, 94% and 99% sequence similarity respectively. Nitrogenase activity of these bacteria range from 0.204-1.138 nmol C₂H₄·H⁻¹·tube⁻¹.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรรณิการ์ สัจจาพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก สำหรับคำแนะนำและการให้คำปรึกษาในเรื่องการเรียน การวางแผนการทดลอง ตลอดจนเรื่องการค้าเดินชีวิต ขอขอบคุณ ดร.ภัทรพร รัตนวารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และดร.ศิริลักษณ์ จิตรอักษร ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำ การวางแผนการทดลอง ตลอดจนการแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยในการสอบประมวลความรู้ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวางแผนการทดลอง และขอขอบคุณ Professor Michael J. Sadowsky และ John Ferguson สำหรับคำแนะนำและการให้คำปรึกษาในเรื่องการวิเคราะห์ Dendrogram

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) และสำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน สำหรับการอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือสำหรับทำการทดลอง

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) ที่ให้ทุนสนับสนุนการค้นคว้าวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนในห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ดิน สำหรับการความช่วยเหลือสำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปฐพีวิทยาทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่เรียนมา

สุดท้ายขอพระขอบคุณพ่อ แม่ ป้า ที่คอยอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจให้เรื่อยมาตลอดจนทุกความห่วงใยที่ให้แก่ลูกคนนี้ ขอบใจน้องสาวที่คอยเป็นห่วงเสมอ

เบญจมาศ รสโสภา

มกราคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
อุปกรณ์	25
วิธีการ	26
ผลการทดลองและวิจารณ์	38
สรุปผลการทดลอง	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	75
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	96

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณการนำเข้าปุ๋ยเคมีประเภทต่างๆ ปี พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2550	9
2	แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ที่แยกได้จากรากข้าว	17
3	แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ที่พบบริเวณรากข้าวโดยใช้เทคนิคชีววิทยา ระดับโมเลกุล	24
4	ตำแหน่งพิกัดของบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างดินตัวแทน	27
5	คำรับการทดลองที่ใช้ในการศึกษาผลของชุดดินต่อจำนวนของแบคทีเรียตรึง ไนโตรเจนเอนไซม์ในรากข้าวภายใต้สภาพการจัดการปุ๋ยที่ต่างกัน	29
6	คำรับการทดลองที่ใช้ในการศึกษาผลของพันธุ์ข้าวต่อจำนวนของแบคทีเรียตรึง ไนโตรเจนเอนไซม์ในรากข้าวที่ปลูกในชุดดินบางเขนภายใต้สภาพการ จัดการปุ๋ยที่ต่างกัน	30
7	สารปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ	33
8	ค่าวิเคราะห์สมบัติเคมีเบื้องต้นของชุดดินและปุ๋ยหมักที่ใช้ในการศึกษา	39
9	จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ที่พบในรากข้าวสายพันธุ์ต่างกันโดย ปลูกในชุดดินสระบุรีในแปลงทดลอง ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดสุพรรณบุรี	43
10	จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ที่พบในแต่ละคำรับการทดลองที่ใช้ใน การศึกษาจำนวนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ที่แยกได้จากรากข้าวที่ ปลูกในชุดดินต่างกันในเรื่องทดลอง ภาควิชาปฐพีวิทยา	43
11	จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ที่พบในแต่ละคำรับการทดลองที่ใช้ใน การศึกษาจำนวนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ที่แยกได้จากรากข้าว สายพันธุ์ต่างกันโดยปลูกในชุดดินบางเขนในเรื่องทดลอง ภาควิชาปฐพีวิทยา	44
12	การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน <i>nifH</i> จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ตัวแทน	50
13	แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไซม์ที่แยกได้โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของอาหาร N-free solid malate-glucose medium (NFMM)	76
2	ส่วนประกอบของอาหาร N-free malate medium (Nfb)	77
3	ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาดิน	78
4	การจัดระดับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%)	79
5	การจัดระดับปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) (BrayII)	79
6	การจัดระดับปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K) (NH_4OAc)	80

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ระยะเวลาเจริญเติบโตต่างๆ ซึ่งเป็นปัจจัยกำหนดองค์ประกอบผลผลิต ของข้าวซึ่งมีอายุเก็บเกี่ยว 130-135 วัน	5
2	ปฏิกิริยารีดักชันระหว่างกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยไนโตรจินเนสของแบคทีเรีย	12
3	Transmission electron micrograph (TEM) ของ <i>Serratia</i> sp. ในการตั้งรกรากของแบคทีเรีย บริเวณaerenchyma ของรากข้าว	14
4	Dendrogram ที่สร้างโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในโพรทอซัวที่แยกได้	47
5	ผลผลิต PCR ของยีน <i>nifH</i>	49
6	ผลผลิต PCR ของยีน <i>nifH</i> ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HahI</i>	57
7	ผลผลิต PCR ของยีน <i>nifH</i> ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HpaII</i>	58
8	ผลผลิต PCR ของยีน <i>nifH</i> ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HaeIII</i>	59
9	ผลผลิต PCR ของยีน <i>nifH</i> ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>MboI</i>	60
10	ผลผลิต PCR ของยีน <i>nifH</i> ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>RsaI</i>	61
11	ผลผลิต PCR ของยีน <i>nifH</i> ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HinfI</i>	62
12	Dendrogram การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในโพรทอซัวที่แยกได้โดยใช้เทคนิค RFLP-PCR ของยีน <i>nifH</i>	63
ภาพผนวกที่		
1	Dendrogram ที่สร้างโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในโพรทอซัวที่แยกได้อย่างละเอียด	81
2	การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ไอโซเลต Sb-Pt13 กับ <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> strain TTB5	87
3	การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ไอโซเลต Bn-Pt14-0 กับ <i>Bradyrhizobium</i> sp.	88
4	การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ไอโซเลต Bn-Pt07-1 กับ <i>Azorhizobium caulinodans</i>	89

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
5 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ไอโซเลต Bn-P111-2 กับ <i>Azorhizobium caulinodans</i>	90
6 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ไอโซเลต Bn-P108-1 กับ <i>Azorhizobium caulinodans</i>	91
7 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ไอโซเลต Bn-P106-1 กับ <i>Azorhizobium caulinodans</i>	92
8 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ไอโซเลต Np-P115-1 กับ <i>Burkholderia cepacia</i> strain BEB17	93
9 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ไอโซเลต Bm-Sp17-2 กับ <i>Azorhizobium caulinodans</i>	94
10 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ไอโซเลต Ay-Pt07-2 กับ <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	95

ความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากรากข้าว

Diversity of N₂ - Fixing Endophytic Bacteria from Rice Roots

คำนำ

ประเทศไทยมีพื้นที่ทั้งหมดประมาณ 321 ล้านไร่ เป็นพื้นที่เกษตรกรรม 175 ล้านไร่ พบว่าใช้ปลูกข้าว 63 ล้านไร่ (ทัศนีย์, 2550) ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการปลูกข้าวเพื่อการบริโภคและการส่งออกปริมาณมาก ข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาและเป็นอาหารหลักสำหรับประชากรมนุษย์กว่าครึ่งโลก และพบว่าความต้องการข้าวของประชากรโลกจะเพิ่มขึ้นถึง 70 % ในอีก 30 ปีข้างหน้า ซึ่งเท่ากับว่า จะต้องเพิ่มพื้นที่และจำนวนครั้งของการปลูกข้าวในแต่ละปี (Bohloul *et. al.*, 1992) การปลูกข้าวและเก็บเกี่ยวผลผลิตออกไปจากพื้นที่โดยไม่มีการใส่ธาตุอาหารพืชทดแทน จะทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลง โดยธาตุอาหารพืชที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันทีจะอยู่ในรูปของปุ๋ยเคมี เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตปุ๋ยเคมีได้เอง ทำให้ประเทศไทยต้องนำเข้าปุ๋ยเคมีจากต่างประเทศเพื่อปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน ปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์และเกษตรกรให้ความสนใจเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ไม่ว่าจะเป็นการปรับปรุงบำรุงดิน เพื่อการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรกันมากขึ้น กลุ่มหนึ่งที่ช่วยสร้างธาตุอาหารพืช คือ กลุ่มจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน ประกอบด้วยแบคทีเรียและแอกทีโนไมซีท จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งมีหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจน (N₂) ให้เป็นแอมโมเนีย (NH₃) อากาศที่เราหายใจเข้าไปนั้นจะมีก๊าซไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 79 โดยปริมาตร ถึงแม้ว่าก๊าซไนโตรเจนจะมีมากอยู่ในอากาศ แต่เป็นรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ มีเพียงจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้มาอยู่ในรูปของแอมโมเนีย ซึ่งเป็นรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพสำหรับการปลูกข้าวจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตและลดปัญหาโลกร้อนเนื่องจากการใช้เชื้อเพลิงในการผลิตและการขนส่งปุ๋ยเคมี ในฐานะที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมผลิตผลผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศและส่งออกทั่วโลก จำเป็นต้องบำรุงรักษาทรัพยากรดินให้ยั่งยืน แต่ปัจจัยการผลิตส่วนมากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงสมควรมีการศึกษาและพัฒนาการใช้จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนเพื่อสร้างเสริมคุณภาพทรัพยากรดินที่ยั่งยืน ทำให้เกษตรกรสามารถพึ่งพาตนเองได้มากขึ้นด้วยทรัพยากรชีวภาพที่มีอยู่ในประเทศไทย

การศึกษาจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่ผ่านมาเป็นการศึกษาที่เน้นจุลินทรีย์ในกลุ่มไรโซเบียมสำหรับพืชตระกูลถั่วโดยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยกัน จากแนวความคิดที่ว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืชมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับพืชและได้ประโยชน์จากพืชอาศัย กล่าวคือพืชอาศัยจะให้แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานแก่แบคทีเรีย ขณะเดียวกันแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืชจะมีจุลินทรีย์อื่นแข่งขันแย่งแย่งแหล่งคาร์บอนหรืออาหารน้อยกว่าในสภาพภายนอกพืชอาศัย และพืชอาศัยยังช่วยป้องกันแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสำหรับการมีชีวิตรวมถึงเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ดังจะเห็นได้จากตัวอย่างความสัมพันธ์ระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วที่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน แต่การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากข้าว ซึ่งข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างยิ่งของประเทศไทย

วัตถุประสงค์

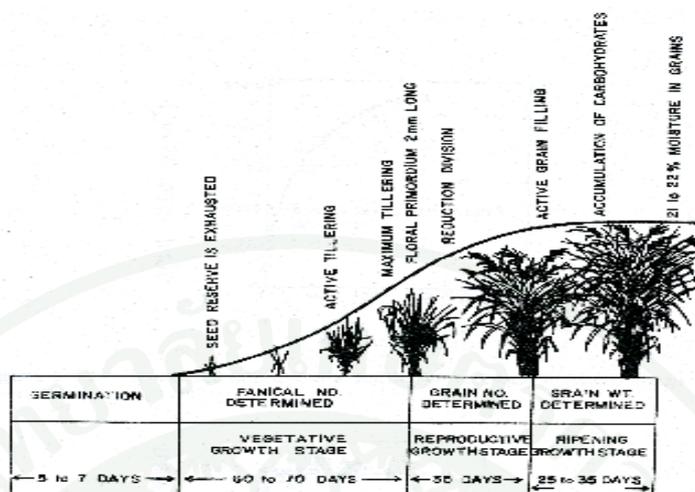
1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่มีบทบาทในการตรึงไนโตรเจนในรากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่มีบทบาทในการตรึงไนโตรเจนในรากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้

การตรวจเอกสาร

1. ข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชที่สำคัญที่สุดของโลกที่เลี้ยงประชากรโลกมากกว่า 40% (Hossain and Fischer, 1995) และเป็นอาหารหลักของคนส่วนใหญ่ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตอนใต้ ที่รวมเรียกว่าเอเชียเขตร้อน ปัจจุบันทั่วโลกมีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 961 ล้านไร่ โดยพื้นที่ส่วนใหญ่กระจายอยู่ในทวีปเอเชียคิดเป็น 87 % (FAOSTAT, 2005) ประเทศไทยในฐานะที่เป็นประเทศเกษตรกรรมมีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 63.8 ล้านไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) ทำให้ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเพื่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออกไปในตลาดโลก ในปี พ.ศ. 2550 ประเทศไทยส่งออกข้าวคิดเป็นมูลค่า 119 พันล้านบาท โดยแบ่งสินค้าออกเป็นข้าวประเภทต่าง ๆ เช่น ข้าวเจ้าขาว 37.9 พันล้านบาท ข้าวหอมมะลิไทย 47.9 พันล้านบาท ข้าวหอมปทุมธานี 6.6 พันล้านบาท ข้าวเหนียว 3.4 พันล้านบาท ข้าวกล้อง 1.3 พันล้านบาท นอกจากนี้ยังทำการผลิตข้าวหนึ่งซึ่งกำลังเป็นที่นิยมในประเทศตะวันออกกลางโดยคิดเป็นมูลค่า 21.4 พันล้านบาท นอกจากนี้ก็จะเป็นพวกปลายข้าวหนึ่ง ข้าวเปลือก และมีการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากข้าวส่งออกคิดเป็นมูลค่า 8.6 พันล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551)

วงจรการเจริญเติบโต (growth cycle) ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ นั้น ส่วนมากจะแตกต่างกันเฉพาะช่วงวัฏวนภาค (vegetative period) ส่วนช่วงเจริญพันธุ์และช่วงสุกแก่มักจะคงที่และคล้ายคลึงกัน สำหรับปัจจัยที่มีผลกระทบต่อผลผลิต คือ ภูมิอากาศ (อุณหภูมิและความชื้นแสง) ความชื้นในดิน ธาตุอาหาร (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส) ในปี ค.ศ. 2005 สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ได้อธิบายการเจริญเติบโตและพัฒนาของข้าว แบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังแสดงภาพที่ 1 คือ



ภาพที่ 1 ระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ซึ่งเป็นปัจจัยกำหนดองค์ประกอบผลผลิต ของข้าวซึ่งมีอายุเก็บเกี่ยว 130-135 วัน

ที่มา: (IRRI, 2005)

1. การเจริญเติบโตในช่วงวัฏภาค (vegetative period) เริ่มตั้งแต่การงอก (germination) จนถึงกำเนิดช่อดอก (panicle initiation)

1.1 การงอกและการเจริญเติบโตของข้าว ในเขตร้อน ชุ่มชื้น กล้าข้าวจะงอกภายใน 3 วัน หลังจากหว่านเมล็ด (เมล็ดข้าวเตรียมได้โดยการแช่เมล็ดไว้ 24 ชั่วโมง และหุ้มอีก 48 ชั่วโมง) ระยะที่เป็นต้นกล้าก็นับจากการงอกของเมล็ดข้าวจนถึงก่อนที่ข้าวแตกกอ ในระยะนี้ต้นกล้าจะมี seminal root และใช้อาหารจาก endosperm จนหมด ต่อจากนั้นก็มี adventitious root เกิดขึ้นแทน seminal root

1.2 ระยะแตกกอ (tillering stage) เริ่มจากการแตกหน่อแรกจากข้อที่ต่ำที่สุด ซึ่งเรียกว่า primary tiller หลังจากนั้นก็เกิด secondary tiller ระยะนี้ข้าวจะสูงและแตกกออย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นก็เกิด tertiary tiller เมื่อข้าวเจริญเติบโตมากขึ้น การเจริญเติบโตของ tertiary tiller มี 2 ระยะ คือ ระยะแรกแตกกอสูงสุด (maximum tillering stage) การเจริญเติบโตของ tertiary tiller จะดำเนินต่อไปจนถึงระยะแตกกอสูงสุด ระยะนี้มีกอเกิดขึ้นมากมายจนแทบไม่เห็นลำต้นเดิม หลังจากระยะนี้ กอข้าวจะตาย และมีจำนวนลดลง

1.3 ระยะยืดปล้อง (stem elongation stage) ระยะนี้เริ่มต้นก่อนกำเนิดช่อดอกในข้าวพันธุ์หนัก และเกิดขึ้นในช่วงหลังระยะแตกกอ ซึ่งมีระยะเวลาที่เรียกว่า lag vegetative period ส่วนในข้าวพันธุ์เบา ระยะแตกกอสูงสุด การยืดปล้องและกำเนิดช่อดอกจะเกิดขึ้นพร้อมกัน

2. การเจริญเติบโตใน reproductive period เริ่มตั้งแต่กำเนิดช่อดอกจนถึงออกดอก (flowering)

2.1 การกำเนิดช่อดอก (panicle initiation stage) ระยะนี้เริ่มจากการมองเห็นช่อดอก ในข้าวพันธุ์เบา ระยะนี้จะเป็น 40 วันหลังจากเพาะเมล็ด และจะมองเห็นช่อดอก 11 วันต่อมา ซึ่งช่อดอกนี้จะเกิดที่ลำต้นเดิมก่อน และในกออื่น ๆ ถัดมา แต่ในข้าวพันธุ์หนักจะมีการยืดปล้องก่อนที่จะเกิดช่อดอก ถ้ามีการขาดน้ำในช่วงนี้การเกิดช่อดอกก็อาจยืดระยะเวลาออกไป

2.2 ระยะตั้งท้อง (booting stage) ระยะนี้เกิดขึ้นหลังจากที่ช่อดอกเจริญเติบโตแล้ว อยู่ในระยะ 16 วันหลังจากที่เห็นกำเนิดช่อดอก จะเห็นกาบใบของใบธงบวม ใบจะเหี่ยวตายและเห็นกอที่ไม่มีรวง (unproductive tiller) เกิดขึ้น

2.3 ระยะช่อดอกโผล่ออกมา (heading stage) ระยะนี้เป็นระยะที่ช่อดอก (panicle) โผล่ออกมาจากกาบใบธง

2.4 ระยะออกดอก (flowering stage) เกิดขึ้นประมาณ 25 วันหลังจากมองเห็นช่อดอก ไม่ว่าจะเป็นข้าวพันธุ์เบาหรือข้าวพันธุ์หนัก จะเป็นช่วงที่ดอกบาน

3. การเจริญเติบโตใน ripening period เริ่มตั้งแต่ออกดอกจนถึงข้าวแก่ (full maturity)

เมล็ดข้าวเกิดขึ้นหลังจากที่มีการผสมเกสร เมล็ดข้าวจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นก่อนเก็บเกี่ยว ในเขตร้อนชื้น ช่วงนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 25-35 วัน ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์อะไร ส่วนในเขตอบอุ่น เช่น ออสเตรเลียและสหรัฐอเมริกา ช่วงนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 45-60 วัน ช่วง ripening นี้มี 3 ระยะด้วยกัน คือ

3.1 Milk grain stage เป็นระยะที่แป้งในเมล็ดเปลี่ยนจากสภาพของเหลวเป็นสภาพเหมือนน้ำมัน ซึ่งจะบีบออกมาได้

3.2 Dough grain stage ส่วนที่เป็นน้ำนมในเมล็ดจะเปลี่ยนสภาพแข็งขึ้น

3.3 Mature grain stage สีของรวงจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลือง ระยะนี้สิ้นสุดเมื่อ 90-100 % ของเมล็ดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจะเห็นใบบนและใบธงเหี่ยวและตายไป บางพันธุ์ต้นและใบบนอาจยังเขียวอยู่ถึงเมล็ดจะแก่แล้ว

2. แหล่งที่มาของไนโตรเจนในดิน

เนื่องจากในวัตถุกำเนิดดินนั้นไม่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นไนโตรเจนในดินเกิดขึ้นมาได้อย่างไร คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2541) ได้กล่าวถึงแหล่งที่มาของไนโตรเจนในดินมีอยู่ 3 แหล่งใหญ่ ๆ ด้วยกัน คือ

1. การตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศโดยจุลินทรีย์ การตรึงโดยชีววิธีมีความสำคัญมาก เนื่องจาก 90% ของไนโตรเจนที่ตรึงได้โดยกระบวนการตามธรรมชาติมาจากกิจกรรมการตรึงของจุลินทรีย์ดิน เอนไซม์ที่มีบทบาทในการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์เหล่านี้คือ เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase enzyme)
2. การเกิดฟ้าแลบ (Lightning) ทำให้ก๊าซไนโตรเจน (N_2) ในอากาศถูกออกซิไดส์ให้กลายเป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) และไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งจะละลายในน้ำฝนและตกลงมายังผิวดิน มีผู้คำนวณว่าปีหนึ่ง ๆ ไนโตรเจนในดินที่มาจากกระบวนการนี้มีปริมาณ 0.8 กก./ไร่/ปี ในรูปของแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และ 0.3 กก./ไร่/ปี ในรูปไนเตรตไอออน (NO_3^-)
3. การใส่ปุ๋ยให้แก่ดินและพืช ปุ๋ยเคมีซึ่งเป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นจากก๊าซไนโตรเจนในอากาศจัดว่าเป็นแหล่งที่สำคัญแหล่งหนึ่งของไนโตรเจนในดิน นอกจากนี้ยังรวมถึง ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสด และปุ๋ยอินทรีย์ไนโตรเจนอื่น ๆ

3. ปุ๋ยไนโตรเจน

ปัจจุบันอัตราการเพิ่มประชากรของโลกเป็นไปอย่างรวดเร็วดังนั้นความต้องการผลผลิตข้าวเพื่อให้ตอบสนองต่อการเพิ่มประชากรของโลกจึงมากขึ้น มีการคาดคะเนว่าในปี ค.ศ.2020 เพื่อให้ผลผลิตข้าวเพียงพอต่อการบริโภคของประชากรโลกจะต้องใช้ปุ๋ยไนโตรเจนอย่างน้อย 2 เท่า ของจำนวนปุ๋ยไนโตรเจนที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ในการปลูกข้าวนอกจากปริมาณน้ำที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวแล้วอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตข้าว คือ ปุ๋ยไนโตรเจน ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักของพืชที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของข้าว (International Rice Research Institute, 1993) โดยมีการศึกษาปริมาณธาตุอาหารหลักของพืชที่ข้าวต้องการ ในปี ค.ศ.1981 Yoshida พบว่าธาตุอาหารพืชที่จำเป็นในการผลิตข้าว 1 ตัน ในเขตร้อนชื้น คือ ไนโตรเจน 20.5 กิโลกรัม ฟอสฟอรัส 5.1 กิโลกรัมและโพแทสเซียม 44.4 กิโลกรัม ถึงแม้ว่าโพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารพืชที่ข้าวต้องการในปริมาณมาก แต่ในระบบการปลูกข้าวในประเทศไทยส่วนใหญ่ไม่ค่อยมีปัญหาเกี่ยวกับการขาดโพแทสเซียม เนื่องจากได้มาจากน้ำชลประทานและโพแทสเซียมในดิน ดังนั้นในบรรดาธาตุอาหารพืชต่างๆที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของข้าว ไนโตรเจนจัดเป็นธาตุอาหารพืชที่สำคัญที่สุดซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าในรูปของปุ๋ยเคมีประเภทต่างๆ ในปริมาณมาก ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณการนำเข้าปุ๋ยเคมีประเภทต่างๆ ปี พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2550

รายการสินค้า	2549		2550	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
ปุ๋ยที่มีธาตุไนโตรเจน	1,805,948	16,917,040	2,118,475	22,021,605
ปุ๋ยที่มีธาตุฟอสฟอรัส	51,908	391,037	15,517	164,276
ปุ๋ยที่มีธาตุโพแทสเซียม	375,251	3,336,044	481,030	4,175,222
ปุ๋ยที่มีธาตุไนโตรเจนและ ฟอสฟอรัส	305,096	2,487,017	409,871	3,829,171
ปุ๋ยที่มีธาตุไนโตรเจน, ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม	625,074	6,451,307	741,713	7,765,813
ปุ๋ยอื่น ๆ	520,902	5,795,122	561,690	7,947,626
รวม		35,377,567		45,903,712

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจ (2551)

4. ความสำคัญของไนโตรเจนกับข้าว

ในพืชทั่วไป ไนโตรเจน (N) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโน (amino acids) กรดนิวคลีอิก (nucleic acids) นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ธาตุไนโตรเจนมีผลต่อข้าวโดยทำให้ต้นมีสีเขียวเข้ม ส่งเสริมการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วทางด้านความสูง เพิ่มจำนวนแขนง เพิ่มขนาดของใบและเมล็ด เพิ่มจำนวนดอกต่อรวง เพิ่มเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวง เพิ่มปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าว (De Datta, 1981)

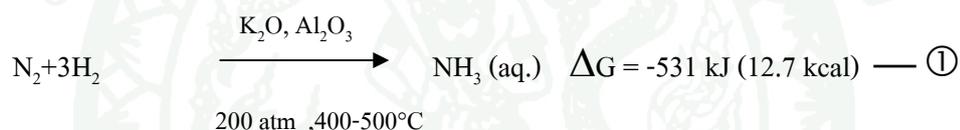
สาเหตุของการขาดไนโตรเจนในข้าวเกิดจากดินนามีระดับไนโตรเจนต่ำ การใส่ปุ๋ยไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช การใส่ปุ๋ยด้วยวิธีการและเวลาที่ไม่เหมาะสม การสูญเสียไนโตรเจนไปกับผลผลิตที่เกี่ยวเกี่ยว รวมทั้งการที่ดินมีการสูญเสียไนโตรเจนจากกระบวนการต่างๆ ได้แก่ volatilization denitrification leaching โดยไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่พบว่าขาดในนาข้าวทั่วไป โดยเฉพาะในนาข้าวที่เป็นดินทรายที่มีระดับอินทรีย์วัตถุต่ำเช่นที่พบทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้าวที่ขาดไนโตรเจนจะมีใบแก่หรือบางครั้งใบทั้งหมดเป็นสีเขียวอ่อน ปลายใบเหลือง ถ้าขาดรุนแรงใบแก่จะตายเหลือเพียงใบอ่อน ใบแคบ สั้นและตั้งตรง มีสีเขียวปนเหลือง

การขาดไนโตรเจนมักเกิดในระยะข้าวแตกกอและระยะก้านิดช่อดอก ซึ่งเป็นระยะที่ข้าวมีความต้องการไนโตรเจนสูง การขาดไนโตรเจนส่งผลให้การแตกกอลดลง ต้นข้าวแคระแกรน แตกกอน้อย มีเมล็ดดีต่อรวงลดลงทำให้ผลผลิตข้าวลดลง (De Datta, 1981)

5. กระบวนการตรึงไนโตรเจน

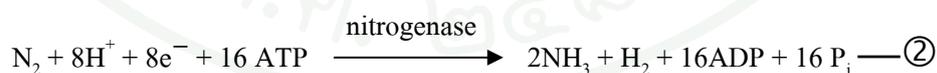
5.1 กระบวนการทางอุตสาหกรรม

การตรึงไนโตรเจนที่ได้จากกระบวนการนี้ประมาณ 85 ล้านตัน/ปี (Waggoner, 1994) เป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานสูงในการทำลายพันธะสามของก๊าซไนโตรเจน โดยกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางเคมีภายใต้ความดันสูง (200 atm) และอุณหภูมิสูง (400-500°C) มีชื่อเรียกว่ากระบวนการ Haber-Bosch process (David, 2007) ดังสมการที่ 1



5.2 กระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ

เป็นกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจน (N_2) จากบรรยากาศไปเป็นแอมโมเนียม (NH_3) ด้วย electron reduction และ protonation ของก๊าซ N_2 ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase ดังสมการที่ 2 และสามารถเปลี่ยนเป็นไนโตรเจนในรูปแบบที่เป็นประโยชน์แก่พืช เช่น NH_4^+ NO_3^- โดยอาศัยจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน (David, 2007)



ในส่วนของการตรึงไนโตรเจนโดยชีววิธีนั้น Karl Fisher และ William E. Newton (2002) ได้แบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม โดยพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียดินกับพืช คือ

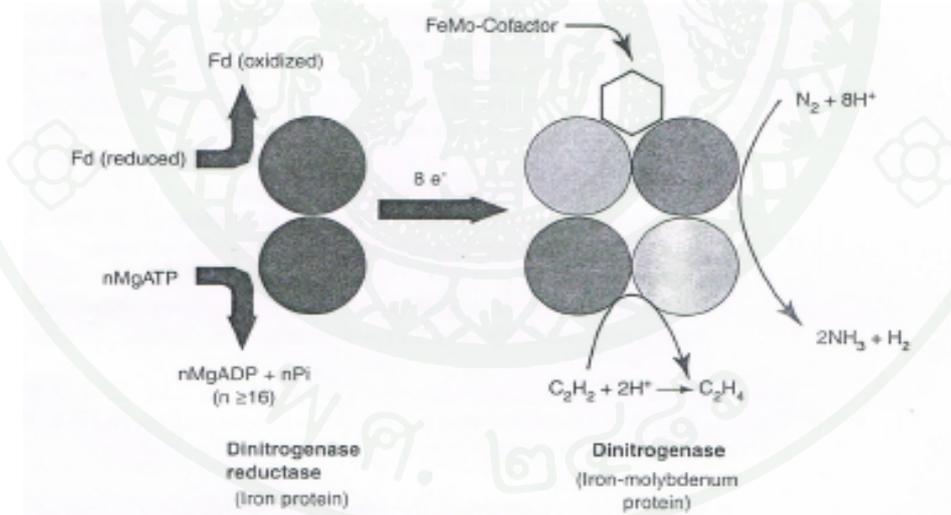
1. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีภาวะอยู่ร่วมกับรากพืช (symbiotic nitrogen-fixing bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ใช้ซูโครสและเมแทบอลิต์จากรากพืชอาศัย (host) เป็นแหล่งพลังงาน เช่น ไรโซเบียมซึ่งอยู่ร่วมกับรากพืชตระกูลถั่ว สามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณปีละ 10-60 กก.N/ไร่ เมื่อตรึงไนโตรเจนได้แล้วก็เคลื่อนย้ายสารออกมายังเซลล์รากของพืชอาศัยอย่างรวดเร็ว ในระบบนี้พืชตรึงไนโตรเจนที่ตรึงแล้วมาใช้ประมาณ 90 % จุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนเมื่ออยู่ในปมรากพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ ไรโซเบียม (*Rhizobium*) ซึ่งเจริญเติบโตเร็ว และแบรดีไรโซเบียม (*Bradyrhizobium*) ซึ่งเจริญเติบโตช้า เป็นต้น
2. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ใกล้ชิดกับรากพืช (associative nitrogen-fixing bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้ใช้สารที่ปลดปล่อยออกจากรากพืช root exudates เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *Azospirillum* และ *Azotobacter* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ประมาณปีละ 2-30 กก.N/ไร่ จุลินทรีย์เหล่านี้ไม่ได้สร้างปมรากเพียงแต่อาศัยอยู่ตามผิวรากหรือช่องระหว่างเซลล์ในชั้นคอร์เทกซ์ พืชจะได้รับประโยชน์จากไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ตรึงประมาณ 90 % เมื่อจุลินทรีย์เหล่านั้นตายแล้ว
3. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพอย่างอิสระ (free living nitrogen-fixing bacteria) มีทั้งพวกที่ใช้อินทรีย์วัตถุในดินเป็นแหล่งพลังงาน (heterotroph) สำหรับแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Azotobacter* ซึ่งอยู่ในธรรมชาติได้รับอินทรีย์สารมาเป็นอาหารน้อยจึงสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำ คือปีละ 0.15-0.3 กก./ไร่ และพวกที่สังเคราะห์แสงได้ สามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ประมาณปีละ 1.5-12 กก.N/ไร่ ในพื้นที่ของทวีปเอเชียมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน จึงช่วยเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดินนาซึ่งใช้ปลูกข้าวได้เป็นอย่างดีดินนอกจากดินนาจะมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ดำรงชีพแบบอิสระแล้วยังมี *Anabaena azollae* ซึ่งอยู่ร่วมกับเฟิร์นน้ำชื่อ *Azolla* (แห่นางดำ) ช่วยตรึงไนโตรเจนอีกด้วย

6. กลไกการตรึงไนโตรเจน

การตรึงไนโตรเจนโดยแบคทีเรียที่มีความสามารถเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศ (N_2) ให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) แบคทีเรียสามารถตรึงไนโตรเจนได้เนื่องจาก กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) กระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นถูกกระตุ้นโดย เอนไซม์ไนโตรจีเนสแสดงดังนี้



เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ชนิดคือ โปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (iron protein หรือ Fe-protein) และโปรตีนที่มีโมลิบดีนัมและเหล็กเป็นองค์ประกอบ (molybdenum-iron protein) ซึ่งในขั้นแรก Fe-protein จะถูกรีดิวซ์โดย ferredoxin ต่อมา Fe-protein ที่ถูกรีดิวซ์จะเข้าจับกับ ATP และไปรีดิวซ์ molybdenum-iron protein และให้อิเล็กตรอนกับ N_2 และเกิดเป็น $NH=NH$ และถูกรีดิวซ์ต่อไปเรื่อยๆ โดยรับอิเล็กตรอนจาก ferredoxin จนกลายเป็น $2NH_3$ โดยกลไกปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยารีดักชันระหว่างกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยไนโตรจีเนสเอนไซม์

ที่มา: David (2007)

การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน อาจทำได้หลายวิธีทั้งทางตรง และทางอ้อม (Burriss และ Wilson, 1957) ได้แก่

1. การวิเคราะห์หาไนโตรเจนรวมที่ตรึงได้โดยวิธี Kjeldahl การวิเคราะห์หาไนโตรเจนรวม (total nitrogen) จากพืชโดยวิธี Kjeldahl ได้รับความนิยมนมากเนื่องจากเป็นวิธีการวิเคราะห์หาสารประกอบไนโตรเจนโดยตรงที่ให้ผลดีพอสมควร ถึงแม้ว่าไม่สะดวกและเสียเวลามาก

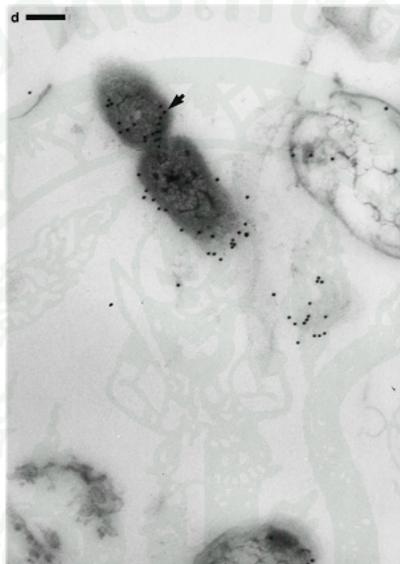
2. การวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธีไอโซโทป ในสภาพธรรมชาติไนโตรเจนปรากฏอยู่ในสภาพ 2 ไอโซโทป(isotope) ได้แก่ ^{14}N และ ^{15}N ในไนโตรเจน ทั้งสองไอโซโทปนี้อยู่ในอากาศในสัดส่วนที่คงที่ คือจะมี ^{15}N อยู่ในอัตรา 0.3663 อะตอมไนโตรเจน (โดยจะมีค่าผันแปรอยู่ระหว่าง 0.36628-0.36632 อะตอมต่อร้อยอะตอมไนโตรเจน) การวัดอัตราของ ^{15}N ซึ่งมีอยู่ในอัตราที่ต่ำมากนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีความไวและแม่นยำเป็นพิเศษในการวัดกัมมันตภาพรังสี ซึ่งได้แก่ isotope ratio mass spectrometer

3. การวิเคราะห์ด้วยอะเซทิลีนรีดักชัน (Acetylene-reduction assay) การวัดประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีนี้ เป็นการวัดความแตกต่างปริมาณของอะเซทิลีนที่ถูกรีดิวซ์หรือวัดเอทิลีนที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณกลับไปเป็นรูปของไนโตรเจนที่ถูกตรึงโดยอาศัยหลักการการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่กระตุ้นการรีดิวซ์ออกซิเจนของก๊าซไนโตรเจน(N_2) จากอากาศนั้น สามารถรีดิวซ์หรือถ่ายทอโคอิเล็กตรอนให้กับอะเซทิลีน(C_2H_2) ได้ด้วยและผลที่ได้ก็คือเอทิลีน(C_2H_4) ปัจจุบันการประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศไม่นิยมวัดปริมาณไนโตรเจนได้โดยตรง เพราะทำได้ยากและเสียเวลามาก ดังนั้นการวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สะดวก เสียเวลาน้อย และวัดได้หลาย ๆ ตัวอย่างต่อวัน

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ด้วยวิธีการ immunolabelling, in situ hybridization โดยสังเกตการทำงานของ reporter genes และ nitrogenase-encoding (*nif*) genes โดยที่มีการศึกษาพบว่า reporter genes มีความเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของ *nif* genes ที่แสดงออกมาของ *nifA* (gene expression) (Katupitiya *et al.*, 1995) และ *nifH* (Vande Broek *et al.*, 1993) ของ *A. brasilense* ที่ได้จากบริเวณผิวรากของข้าวสาลี ในกรณีของข้าว พบการแสดงออกของ *nifH* ของพวกเอนโดไฟต์ *Alcaligenes faecalis* A15 และ *Azospirillum irakense* ภายในepidermal cells ของราก (Vermeiren *et al.*, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hurek และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 พบการแสดงออกของ *nifH* ของ

Azoarcus ในรากพืช ด้วยวิธีการ in situ hybridization โดยใช้ antisense *nifH* probes ในรากหญ้า และเมื่อไม่นานมานี้สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์ *Serratia marcescens* ที่แยกได้จากพื้นที่ที่มีการทำนาข้าว จะมีการแสดงออกของ *nifH* และเอนไซม์ไนโตรจีเนส ขณะที่มีการตั้งรกรากของแบคทีเรีย บริเวณ aerenchyma และ xylem vessels ของเมล็ดข้าวที่มีการใส่แบคทีเรีย ดังแสดงภาพที่ 3

200 nm



ภาพที่ 3 Transmission electron micrograph (TEM) ของ *Serratia* sp. ในการตั้งรกรากของแบคทีเรีย บริเวณ aerenchyma ของรากข้าวโดยแบคทีเรียที่ทำการใส่ไปนั้นได้มาจากการแยกจากบริเวณผิวรากของข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นย้ายลงใน *nifH*-GUS fusion นำเนื้อเยื่อบริเวณรากมาทำการศึกษาลงหลังจากมีการบ่มเชื้อ *Serratia* sp. ที่มี *nifH*-GUS fusion เป็นเวลา 5 วัน ใช้วิธีการ immunogold-labelled ด้วย antibody ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส มีความสำคัญกับแบคทีเรียดังกล่าว ดังลูกศรที่ดำแสดง

ที่มา: James *et al.* (1999)

แต่ในทางตรงกันข้าม ในการศึกษา *Herbaspirillum* ไม่พบหลักฐานการแสดงออกของ *nif* gene หรือเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Olivares *et al.*, 1997) คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Fuentes-Ramirez และคณะ ในปี ค.ศ.1999 ซึ่งจากการตรวจสอบไม่พบการแสดงออกของ *nif* genes (gene expression) และการตรึงไนโตรเจนในพืชที่ทำการศึกษ หลังจากการใส่แบคทีเรีย *A.diazotrophicus* strain *nifH*-GUS

7. การศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในนาข้าว

นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับข้าวที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเหล่านี้มีทั้ง phototrophs และ heterotrophs (Barraquio *et al.*, 1983; Malik *et al.*, 1997; Roger and Ladha , 1992) และยังพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้บางชนิดทำหน้าที่ในการให้ไนโตรเจนแก่พืช (Jame *et al.*, 2000 ; Ladha *et al.*, 1995) จึงมีผู้ทำการศึกษาค้นคว้าความหลากหลาย heterotrophic N₂-fixing bacteria ในนาข้าวมากมาย เช่น บริเวณที่ราบลุ่มแม่น้ำ Yangtze โดยใช้อาหาร nitrogen-free solid malatesucrose medium แยก heterotrophic N₂-fixing bacteria จากดิน พบว่า 30 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมรีดักชันของ acetylene สูง 14 สายพันธุ์สามารถจำแนกอยู่ในสกุล *Bacillus Burkholderia Agrobacterium Psudomonas Derxia Alcaligenes Aeromonas Citrobacter* (Guang , 2003) และมีการทำการศึกษาด้านการจัดการนาข้าวที่แตกต่างกัน โดยทำการแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนบริเวณรากข้าว (rhizosphere) เปรียบเทียบพื้นที่ที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช กับพื้นที่ที่มีการจัดการแบบเกษตรอินทรีย์ โดยใช้ 16 S rRNA sequenencing ในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ พบว่าพื้นที่ที่มีการจัดการแบบเกษตรอินทรีย์ พบ Actinomyces α - Proteobacteria β - Proteobacteria ในขณะที่พื้นที่ที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช พบ Actinomyces α - Proteobacteria (Kiyoshi, 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (endophytic bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางช่วงอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนและเป็นประโยชน์แก่พืชนั้นได้ โดยไม่ทำอันตราย หรือก่อให้เกิดโรคแก่พืช (Wilson, 1998) โดยพบ *Serratia marcesens* ในช่องว่างระหว่างเซลล์ และ aerenchyma ของราก ใบ และลำต้นข้าว (Gyaneshwar *et al.*, 2001) และรายงานของ Minamisawa (2004) ได้พบ anaerobic nitrogen-fixing consortia (ANFICOs) ของ แบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia ที่ตรึงไนโตรเจนได้ อาศัยอยู่ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในพืชที่ไม่ใช่ตระกูลถั่ว โดยเฉพาะข้าว นั้นแสดงว่า clostridia เป็นแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืชโดยธรรมชาติในพืชพวก gramineous และตรึงไนโตรเจนได้ เมื่อมีการอาศัยอยู่ร่วมกับกลุ่มแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืชที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นอกจากนี้ยังมีการค้นพบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีความสัมพันธ์กับข้าวและสามารถเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ (culturable diazotrophs) มีความหลากหลายในระดับโมเลกุล (molecular diversity) โดยจากศึกษาระดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน พบยีน 2 ยีนที่แยกมาจากดีเอ็นเอรากข้าว คือ *nifH* และ *nifD* (Uda *et al.*, 1995a และ 1995b) อย่างไรก็ตามการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบอิสระอาจจะให้ธาตุไนโตรเจนแก่ข้าวไม่เพียงพอหรือไม่ยั่งยืนต่อผลผลิตข้าว (Ladha *et al.*, 1998) เนื่องจากมีแนวความคิดว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืชจะมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับพืชอาศัยและยังได้รับประโยชน์ในแง่มีคู่แข่งกัน แข่งแย่งแหล่งคาร์บอนหรืออาหารน้อยกว่าและพืชอาศัยยังช่วยป้องกันสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสำหรับการตรึงไนโตรเจน (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998) ดังจะเห็นได้จากความสัมพันธ์ระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วมีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (Mylona, 1995) ปัจจุบันจึงมีการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีความสัมพันธ์กับพืชอาศัย ดังเช่นการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ในข้าว โดยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ หมายถึง แบคทีเรียที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางช่วงอยู่ในเนื้อเยื่อพืชซึ่งไม่เป็นอันตรายหรือก่อกลุประโยชน์ให้กับพืชอาศัย เช่น การสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ช่วยในการตรึงไนโตรเจน และเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช จากแบคทีเรียที่ค้นพบสามารถนำมาแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน เพื่อเป็นแนวทางในการลดอัตราการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน โดยสามารถรวบรวมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากข้าว ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไฟต์ที่แยกได้จากรากข้าว

พันธุ์ข้าว	ชนิดแบคทีเรียที่แยกได้
<i>Oryza granulata</i>	<i>Klebsiella</i> sp.
<i>Oryza minuta</i>	<i>Azoarcus</i> sp.
<i>Oryza nivara</i>	<i>Gallionella</i> sp.
<i>Oryza officinalis</i>	<i>Azoarcus</i> sp. <i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>Azoarcus</i> sp. <i>Azoarcus indigens</i> <i>Azorhizobium caulinodans</i> <i>Azospirillum brasilense</i> <i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Burkholderia</i> sp. <i>Herbaspirillum</i> sp. <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Ochrobactrum</i> sp. <i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>Azospirilum irakense</i> <i>Bacillus luciferensis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Brevibacillus agri</i> <i>Burkholderia kururiensis</i> <i>Caulobacter crescentus</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Chryseobacterium taichungense</i> <i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i> <i>Enterobacter ludwigii</i> <i>Mythylocapsa acidiphila</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Mycobacterium petroleophilum</i> <i>Paenibacillus alvei</i> <i>Rhizobium loti</i> <i>Roseateles depolymerans</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Mano and Morisaki (2008)

8. การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ดิน

จุลินทรีย์ดินมีความสำคัญต่อการรักษาสุขภาพของดินทั้งตามธรรมชาติและภายใต้การจัดการดินของมนุษย์เพื่อการเกษตร เพราะจุลินทรีย์ดินเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดดิน การทับถมของอินทรีย์วัตถุ การแพร่กระจายของสารพิษและวัฏจักรของคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ในระบบนิเวศ (van Elsas และ Trevors, 1997) ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ดิน มีข้อจำกัดของวิธีการ เนื่องจากมีเพียงประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการได้ (Torsvik *et al.*, 1998) จึงมีการนำวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเข้ามาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ซึ่งจะให้ความสำคัญสูงมากขึ้น โดยทำการศึกษาในส่วนของยีน 16S rRNA และยีน 18S rRNA ของจุลินทรีย์ต่างๆ และพบว่าการกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การพัฒนาขึ้นของชุมชนเมือง การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตรและมลพิษต่างๆ ล้วนแต่ส่งผลกระทบต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ดิน ซึ่งจุลินทรีย์ดินมีอิทธิพลต่อระบบนิเวศของสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ดินจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและสมควรทำการศึกษา โดยในปี ค.ศ. 2004 Jennifer และคณะ ได้แบ่งวิธีการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ดินเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. เทคนิคทางชีวเคมี (Biochemical-based techniques)

1.1 Plate counts

เป็นวิธีการดั้งเดิม ทำการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ดินโดยการคัดเลือกและนับจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง เป็นวิธีการที่รวดเร็ว ไม่แพง และสามารถแยกจุลินทรีย์เก็บไว้ในการศึกษาครั้งต่อไปได้ ข้อจำกัดของวิธีการนี้ คือ เป็นการยากที่จะแยกแบคทีเรียบางชนิดหรือสปอร์ออกจากอนุภาคดินหรือ biofilms อีกทั้งอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงที่จำเพาะเจาะจง สภาพแวดล้อม (อุณหภูมิ pH แสง) นอกจากนี้ไม่สามารถเลี้ยงแบคทีเรียและเชื้อราจำนวนมากด้วยวิธีการนี้และแบคทีเรียอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่มีอิทธิพลต่อความหลากหลายของชนิดประชากรของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ที่ศึกษา

1.2 Sole carbon source utilization patterns/community level physiological profiling

ในปี ค.ศ.1981 Graland and Mills ได้พัฒนาเทคนิคการใช้ 96-well microtitre plate ในการประเมินความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียโดยการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (Sole source carbon utilization ger: SSCU) โดยแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกสามารถประมวลผลได้จากจากโปรแกรม BIOLOG (Hayward, CA, USA, www.biolog.com) หลังจากได้ข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ โดยใน 95 well บรรจุแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน และอีกอันหนึ่ง well เป็นชุดควบคุมไม่บรรจุแหล่งคาร์บอน วิธีการนี้ประสบความสำเร็จในการประเมินความหลากหลายของเมทาบอลิท์ของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อน บริเวณรากพืช arctic soil ดินที่มีการใช้สารเคมีหรือดินที่มีการใส่เชื้อจุลินทรีย์ เช่น ในปี ค.ศ. 2000 Roling และคณะ ใช้การทดสอบแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันร่วมกับเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ในการศึกษาของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่หายไบบแบบไม่ใช้ออกซิเจน นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1999 Gerry และคณะ ประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน Arctic ที่บ่มในระยะเวลาต่างกัน 3 ช่วง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

1.3 Fatty acid methyl ester (FAME) analysis

เทคนิคนี้สามารถให้ข้อมูลความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ โดยใช้กลุ่มของกรดไขมัน โดยที่กรดไขมันมีความสำคัญต่อชีวมวลและการส่งสัญญาณที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ โดยมีการศึกษาพบว่าการปนเปื้อนของสารเคมีและกิจกรรมทางการเกษตร ทำให้กลุ่มประชากรจุลินทรีย์เปลี่ยนไป สำหรับการวิเคราะห์ Fatty acid methyl ester (FAME) analysis โดยการสกัดกรดไขมันจากดินโดยตรงและทำการวัดกรดไขมันด้วยเครื่อง gas chromatography (Ibekwe and Kennedy, 1999)

2. เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

2.1 Guanine plus cytosine (G+C) content

ความแตกต่างของ guanine และ cytosine (G+C) ภายในดีเอ็นเอ สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในดินได้ โดยอาศัยพื้นฐานความรู้ที่ว่าในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมี G+C content แตกต่างกัน จากการจัดระบบอนุกรมวิธานจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันจะมี G+C content แตกต่างกัน อยู่ระหว่าง 3% และ 5% โดยวิธีการนี้จะให้ข้อมูลอย่างคร่าวๆ บอกเพียงระดับ

ของ G+C content แต่ข้อได้เปรียบของวิธีการนี้คือ ไม่ต้องเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR เนื่องจากใช้ดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้ (ปริมาณมาก 50 ไมโครกรัมขึ้นไป) (Tiedje *et al.*, 1999) ในปี ค.ศ.1999 Nusslein และ Tiedje ใช้ G+C content ร่วมกับวิธีการ amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) abundance patterns และ rDNA sequence analysis ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความหลากหลายของจุลินทรีย์จากดินที่ใช้ในการปลูกผัก ป่าไม้และทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ ในดินแถบ Hawaiian พบว่าทั้งสามวิธีการสามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ได้

2.2 Nucleic acid reassociation and hybridization

ดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับการตรวจวัดความซับซ้อนของพันธุกรรมของประชากรจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลาย (Torsvik *et al.*, 1996) ซึ่งเทคนิคนี้อาศัยคุณสมบัติเรื่องการจับคู่เบสอย่างจำเพาะของดีเอ็นเอระหว่าง G:C และ A:T โดยพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่างคู่เบสถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน หรือการเพิ่ม pH ของสารละลาย เมื่อพันธะไฮโดรเจนถูกทำลายดีเอ็นเอจะคลายเกลียวและเปลี่ยนสภาพโมเลกุลจากดีเอ็นเอรูปร่างเกลียวคู่เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว เรียกว่าเกิด denaturation ของดีเอ็นเอ เมื่อลดอุณหภูมิ หรือลด pH ของสารละลายดีเอ็นเอจะกลับสู่สภาพเดิม จากนั้นสายดีเอ็นเอกลับมาเข้าคู่กันใหม่ โดยอาศัยการจับคู่เบสอย่างจำเพาะ โดยอัตราการกลับมาเข้าคู่กันใหม่ของดีเอ็นเอจะขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงของลำดับดีเอ็นเอที่พบในแต่ละจุลินทรีย์ โดยความซับซ้อนหรือความหลากหลายของลำดับดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้น เมื่อความคล้ายคลึงของลำดับดีเอ็นเอลดลง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Theron and Cloete, 2000)

2.3 PCR-based approaches

2.3.1 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) / temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)

เทคนิค DGGE และ TGGE ทั้งสองวิธีการมีความคล้ายคลึงกันในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยเทคนิคนี้พัฒนามาจากการตรวจสอบ mutations ในลำดับดีเอ็นเอ หลักการของเทคนิค DGGE คือดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน จะมีความแข็งแรงต่อการแยกของสายดีเอ็นเอต่างกัน จึงทำให้แถบที่ปรากฏออกมาของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันมีลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ที่มีความแตกต่างกัน เทคนิค TGGE ใช้หลักการเดียวกันกับเทคนิค DGGE แตกต่างกันในส่วนของอุณหภูมิและสารเคมีที่ใช้ในการ denaturants โดยเทคนิค TGGE ใช้อุณหภูมิในการแยก

ดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว Muyzer และคณะ (1993) ใช้เทคนิค DGGE ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอ จากตัวอย่างดิน และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยา PCR และใช้ universal primer ในส่วนของยีน 16S rRNA หรือ 18S rRNA gene DGGE เป็นหนึ่งในเทคนิคที่สามารถบอกความแตกต่างของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดินได้ เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธีการ PCR ในสนามไฟฟ้าที่มีตัวกลางเป็น polyacrylamide gel ที่ผสมด้วยสารที่ทำให้เกิดการแยกของ ดีเอ็นเอ (denaturant) ซึ่งเป็นสารผสมของ urea และ formamide ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันจากน้อยไปมากตามลำดับจากขั้วลบไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้า ซึ่งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะหยุดเมื่อสาย DNA แยกออกเป็นสายเดี่ยว

2.3.2 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)/amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

RFLP เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดภายหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) หรือเรียกอีกอย่างว่า restriction endonuclease ซึ่งจะมีความเฉพาะเจาะจงในการตัดลำดับเบสบนเส้นดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่ใช้อาจได้จาก genomic DNA mitochondrial DNA หรือ PCR product ก็ได้ ซึ่ง PCR product ที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ PCR product ของ internal transcribed spacer (ITS) region ของ rDNA เนื่องจากเป็นบริเวณที่ลำดับเบสมีการผันแปรสูง จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมาทำการแยกด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสต่อไป ส่วน RAPD เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจหาความเหมือนหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วย primer ขนาดสั้นประมาณ 10 เบส เนื่องจากการเพิ่มจำนวนแบบสุ่ม RAPD pattern ที่ได้จึงขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน เช่น annealing temperature จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือ ความเข้มข้นของ *Taq* polymerase

2.3.3 Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

เป็นเทคนิคที่คล้ายคลึงกับ RFLP (Tiedje *et al.*, 1999) โดยอาศัยหลักการเดียวกัน แต่มี primer ที่ทำการติดฉลากโดย fluorescent dye เช่น TET (4,7,2V,7V-tetrachloro-6-carboxyfluorescein) หรือ 6-FAM (phosphoramidite fluorochrome 5-carboxyfluorescein) ในการทำปฏิกิริยา PCR จากนั้นทำการตรวจสอบที่บริเวณ terminal restriction fragment (Liu *et al.*, 1997) โดยอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ารูปแบบของ band ที่เกิดขึ้นสามารถนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้

2.3.4 Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) / automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

เป็นวิธีการที่มีหลักการคล้ายคลึงกับ เทคนิค RFLP และ T-RFLP โดย RISA หรือ ARISA ทำการศึกษาในส่วนของ ribosomal-based fingerprinting ของประชากรจุลินทรีย์ใช้ส่วน Intergenic spacer (IGS) ระหว่าง 16S และ 23S ribosomal subunits

2.3.5 Highly repeated sequence characterization or microsatellite regions

จุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็น prokaryote และ eukaryote ต่างก็มีลำดับที่มีสายดีเอ็นเอสั้นๆ ที่ซ้ำกันปริมาณมาก ซึ่งลำดับดีเอ็นเอสั้นๆ นั้นจะมีลำดับคู่เบสประมาณ 1-10 คู่เบส ภายในจีโนมของจุลินทรีย์ซึ่งขึ้นอยู่กับวิวัฒนาการของแต่ละจุลินทรีย์ โดยวิธีการนี้ใช้ร่วมกับเทคนิค rep-PCR ใช้ในการบ่งชี้แบคทีเรีย โดยใช้ genomic fingerprint ของโครงสร้างโครโมโซมของแบคทีเรียเนื่องจากโครงสร้างโครโมโซมของแบคทีเรียจะมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (Tiedje *et al.*, 1999)

จากการเทคนิคการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพดังกล่าวข้างต้น นักวิทยาศาสตร์ได้นำเอาเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการศึกษา เช่น ในปี ค.ศ. 2005 Soares และคณะ ได้ใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และการศึกษาจุลชีววิทยาแบบดั้งเดิม ในการศึกษาโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixing bacterial) ที่อาศัยกับข้าวโอ๊ต (Oat; *Avena sativa*) ในดินที่มีระบบการจัดการที่แตกต่างกันของรัฐ Rio Grande do Sul โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยาดั้งเดิมที่ใช้คือการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร selective media เพื่อแยกแบคทีเรียบางชนิด ส่วนเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลคือ PCR-RFLP โดยสกัดดีเอ็นเอจากดินบริเวณรอบ ๆ ราก (rhizosphere) บริเวณรากและใบของข้าวโอ๊ต แล้วนำมาเพิ่มปริมาณส่วนของ *nifH* gene ที่สร้างเอนไซม์ nitrogenase reductase ที่ใช้ในการตรึงไนโตรเจนโดยเทคนิค PCR จากนั้นทำการวิเคราะห์ RFLP และโคลนยีน 16S rDNA จากการทำ PCRแล้วนำไปหาลำดับเบสเพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่ศึกษาอยู่ในกลุ่ม diazotrophs และแยกได้จาก rhizosphere 9 genera และจากใบได้ 13 genera ตามลำดับ โดย 2 genera ที่พบคือ *Azospirillum* และ *Herbaspirillum* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกันและพบมากที่สุด และจากการใช้สองเทคนิคดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่ามีความแตกต่างของกลุ่มแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในดินที่มีการทำเพาะปลูกที่มีการทำปุ๋ยร่วมกับพื้นที่ที่ไม่มีการทำปุ๋ยร่วม สำหรับการศึกษาคความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็นกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ที่พบบริเวณรากข้าวโดยใช้เทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

พันธุ์ข้าว	กลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้	ชนิดแบคทีเรียที่แยกได้
<i>Oryza sativa</i>	Alphaproteobacteria	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Caulobacter</i> sp.
		<i>Kaistina koreensis</i> <i>Novosphingobium tardaugens</i>
		<i>Methylobacterium</i> sp. <i>Sinorhizobium terangae</i>
	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylooxidans</i> <i>Burkholderia</i> sp.
		<i>Acidovorax facilis</i> <i>Comamonas testosterone</i>
		<i>Burkholderia fungorum</i> <i>Curvibacter gracilis</i>
		<i>Delftia tsuruhatensis</i> <i>Duganella violaceinigra</i>
		<i>Herbaspirillum frisingense</i> <i>Gallionella ferruginea</i>
		<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> <i>Variovorax</i> sp.
		<i>Methyloversatilis universalis</i> <i>Delftia acidovorans</i>
		<i>Sterolibacterium denitrificans</i>
<i>Alkanindiges illinoisensis</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>		
<i>Methylophaga marina</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>		
<i>Pantoea</i> sp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
<i>Stenotrophomonas</i> sp.		
	Deltaproteobacteria	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> <i>Geobacter</i> sp.
	Epsilonproteobacteria	<i>Sulfurospirillum multivorans</i>
	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium frigoris</i> <i>Sphingobacterium</i> sp.
		<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
	Acidobacteria	<i>Holophaga foetida</i>

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Mano and Morisaki (2008)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 พันธุ์พิกุลโลก 2 พันธุ์สุพรรณบุรี 3 และพันธุ์ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี
2. กระถางพลาสติกสำหรับปลูกข้าว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 27.5 เซนติเมตร
3. ปุ๋ยเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ยูเรีย (Urea: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride: KCl) ทริปเปิลซูเปอร์ฟอสเฟต (Triple Superphosphate: TSP)
4. ปุ๋ยหมัก
5. แผนที่ดินของ กองสำรวจดิน กรมพัฒนาที่ดิน มาตรฐาน 1:100,000
6. เครื่องมือมาตรฐานที่ใช้ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างดินในภาคสนาม
7. อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดินเบื้องต้น
8. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำการทดลองทางจุลชีววิทยาทางดินและชีววิทยาในระดับโมเลกุล
9. เครื่อง gas chromatography

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างรากข้าว

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างรากข้าวจากแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าว และการเก็บตัวอย่างรากข้าวที่ได้จากการปลูกในเรือนทดลอง ดังนี้

1.1 การเก็บตัวอย่างข้าวจากแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่างข้าวจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ปทุมธานี 1 พันธุ์สุพรรณบุรี 1 พันธุ์ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี และพันธุ์ SPR 99007-22-1-2-2-1

1.2 การเก็บตัวอย่างรากข้าวที่ได้จากการปลูกในเรือนทดลอง โดยมีการดำเนินการดังนี้

1.2.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างดินและปุ๋ยหมักเพื่อใช้สำหรับปลูกข้าว

ทำการเก็บตัวอย่างดินที่เป็นตัวแทนของดินที่มีค่าปฏิกริยาดินเป็นกรดจัด กลางและด่าง เพื่อทำการปลูกในเรือนทดลอง โดยเก็บที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร ที่บริเวณต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตำแหน่งพิกัดของบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างดินตัวแทน

ชุดดิน	บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง	พิกัด
ค่าปฏิบัติการดินเป็นกรดจัด		
ชุดดินเสนา	บ้านไผ่หูช้าง อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	47P 0615296E 1552462N
ชุดดินอยุธยา	บ้านดอนมะกอก อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	47P 0613283E 1551115N
ค่าปฏิบัติการดินเป็นดินกลาง		
ชุดดินนครปฐม	บ้านหนองแอม อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	47P 0596756E 1595916N
ชุดดินบางเขน	กรมการข้าว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร	47P 0670352E 1531537N
ค่าปฏิบัติการดินเป็นดินด่าง		
ชุดดินลพบุรี	บ้านเกษตรสุข อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	47P 0596762E 1593622N
ชุดดินบ้านหมี่	บ้านคณทิ อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	47P 0598542E 1593116N

ปุ๋ยอินทรีย์สำหรับการทดลองปลูกในเรือนทดลอง ใช้ปุ๋ยหมักซึ่งได้จากภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน หลังจากนั้นนำดินและปุ๋ยหมักที่ต้องการศึกษามาผึ่งในที่ร่ม คัดเลือกก้อนหินและเศษซากพืชขนาดใหญ่ออก ผสมตัวอย่างดินหรือปุ๋ยหมักให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้มีความสม่ำเสมอ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

1.2.2 การวิเคราะห์ดินและปุ๋ยหมักที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างดินและปุ๋ยหมัก โดยนำตัวอย่างดินและปุ๋ยหมักมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม (air dry) แล้วบดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และ 0.5 มิลลิเมตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลัก ดังนี้

1.2.2.1 วิเคราะห์ค่าปฏิกิริยาของดิน โดยใช้เครื่อง pH meter ใช้อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1:1 โดยใช้ดิน 20 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที คนให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าด้วยเครื่อง pH meter

1.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวม (Total nitrogen) โดยวิธี Kjeldahl method นำดินหรือปุ๋ยหมักที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร ทำการย่อยด้วยกรดผสม (digestion mixture) ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 380 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส จากนั้นนำมาเติม NaOH ทำการกลั่นประมาณ 7 นาที โดยเก็บสารละลายที่ได้จากการกลั่นไว้ในสารละลาย boric acid indicator 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปไทเทรตด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.025 N (Jackson, 1965)

1.2.2.3 วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Available phosphorus) โดยนำดินหรือปุ๋ยหมักที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร สกัดด้วยน้ำยา Bray II เขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายมาวัดปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Bray and Kurtz, 1945)

1.2.2.4 วิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ (Available potassium) โดยนำดินหรือปุ๋ยหมักที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร มาสกัดด้วยสารละลาย NH_4OAc ความเข้มข้น 1 N pH 7.0 แล้ววัดปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Pratt, 1965)

1.2.3 การวางแผนการทดลองปลูกข้าวในเรือนทดลอง

ทำการแบ่งการทดลองออกเป็นสองชุดการทดลอง โดยนำดินที่ต้องการศึกษามาผึ่งในที่ร่ม คัดเลือกก้อนหินและเศษซากพืชขนาดใหญ่ออก ผสมตัวอย่างดินให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้มีความสม่ำเสมอ จากนั้นชั่งดิน 6 กิโลกรัมสำหรับใช้ปลูกข้าวซึ่งเป็นพืชทดลอง โดยแบ่งการทดลองเป็นสองชุดการทดลอง

การทดลองที่ 1 ทำการศึกษาผลของชุดดินต่อจำนวนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เอนโดไฟต์ในรากข้าวภายใต้สภาพการจัดการปุ๋ยที่ต่างกัน โดยทำการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมสำหรับการปลูกในแต่ละชุดดิน ดังนี้

- ดินตัวแทนที่ค่าปฏิกิริยาดินเป็นกรดจัด ปลูกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1
 - ดินตัวแทนที่ค่าปฏิกิริยาดินเป็นกลาง ปลูกข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2
 - ดินตัวแทนที่ค่าปฏิกิริยาดินเป็นด่าง ปลูกข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 3
- โดยแบ่งดำรับการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 5 ดำรับการทดลองละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 5 ดำรับการทดลองที่ใช้ในการศึกษาผลของชุดดินต่อจำนวนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เอนโดไฟต์ในรากข้าว ภายใต้สภาพการจัดการปุ๋ยที่ต่างกัน

ชุดดิน	พันธุ์ข้าว	ชนิดปุ๋ยที่ใช้		
		ปุ๋ยเคมี	ปุ๋ยอินทรีย์ + ปุ๋ยเคมี	ไม่ใส่ปุ๋ย
ชุดดินเสนา	ปทุมธานี 1	T1	T2	T3
ชุดดินอยุธยา	ปทุมธานี 1	T4	T5	T6
ชุดดินนครปฐม	พิษณุโลก 2	T7	T8	T9
ชุดดินบางเขน	พิษณุโลก 2	T10	T11	T12
ชุดดินลพบุรี	สุพรรณบุรี 3	T13	T14	T15
ชุดดินตากลิ	สุพรรณบุรี 3	T16	T17	T18

การทดลองที่ 2 ทำการศึกษาผลของพันธุ์ข้าวต่อจำนวนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เอนโดไฟต์ในราก ภายใต้สภาพการจัดการปุ๋ยที่ต่างกัน โดยปลูกใน ชุดดินบางเขน โดยทำการปลูก ข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ปทุมธานี 1 พันธุ์พิษณุโลก 2 พันธุ์สุพรรณบุรี 3 และพันธุ์ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี โดยแบ่งดำรับการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6 ดำรับการทดลองละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 6 ดำรับการทดลองที่ใช้ในการศึกษาผลของพันธุ์ข้าวต่อจำนวนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ในรากข้าว ที่ปลูกในชุดดินบางเขนภายใต้สภาพการจัดการปุ๋ยที่ต่างกัน

ชุดดิน	พันธุ์ข้าว	ชนิดปุ๋ยที่ใส่		
		ปุ๋ยเคมี ^{1/}	ปุ๋ยอินทรีย์ + ปุ๋ยเคมี ^{2/}	ไม่ใส่ปุ๋ย
ชุดดินบางเขน	ปทุมธานี 1	T1	T2	T3
ชุดดินบางเขน	ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี	T4	T5	T6
ชุดดินบางเขน	สุพรรณบุรี 3	T7	T8	T9
ชุดดินบางเขน	พิษณุโลก 2	T10	T11	T12

หมายเหตุ ^{1/} ปุ๋ยเคมี NPK ที่อัตรา 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม N 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม P₂O₅ 100 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม K₂O

^{2/} ปุ๋ยเคมี NPK ที่อัตรา 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม N 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม P₂O₅ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม K₂O ร่วมกับปุ๋ยหมัก ที่อัตรา 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม N

นำเมล็ดพันธุ์ข้าว แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาห่อด้วยผ้าขาวบางทิ้งไว้ 3 วัน เมื่อเมล็ดข้าวเริ่มงอก นำไปหว่านในกระบะเพาะจนกล้าอายุได้ 21 วัน และใช้สำหรับเป็นกล้าข้าวเพื่อปักดำในกระถางทดลอง และทำการผสมดินกับปุ๋ยชนิดต่างๆที่เตรียมไว้ คลุกตัวอย่างดินและปุ๋ยหมักให้เข้ากัน บ่มดินในสภาพน้ำขังเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำกล้าข้าวที่ทำการเตรียมไว้มาปักดำในกระถางทดลอง โดยทำการปักดำกล้าข้าว 4 ต้นต่อกระถาง ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นถอนแยกให้เหลือ 2 ต้นต่อกระถางโดยเลือกต้นที่สมบูรณ์ที่สุด ดูแลรักษาระดับน้ำในกระถาง ตรวจสอบโรคและแมลง ทั้งตัวอย่างข้าวจากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรีและข้าวที่ทำการปลูกในเรือนทดลองของภาควิชาปฐพีวิทยา ทำการเก็บตัวอย่างราก โดยการถอนต้นข้าวจากกระถางทดลองในระยะช่อดอกโผล่ออกมา (heading stage) เนื่องจากเป็นระยะที่มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนมาก

ที่สุด (Watanabe *et al.*,1979) โดยสังเกตจากช่อดอก (panicle) โผล่ออกมาจากกาบใบธง หลังจากนั้นก็นำรากข้าวที่ถอนได้เก็บใส่ถุงพลาสติก เพื่อนำไปแยกแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการทดลอง

2.1 การเตรียม 0.5% bromthymol blue ซึ่ง bromthymolblue 0.5 กรัม ละลายใน 53 มิลลิลิตร 95% ethanol หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 47 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วย filter sterile ขนาด 0.2 μm โดยเตรียมไว้สำหรับเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.2 การเตรียม 1% chloramine T ซึ่ง chloramine T 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใช้สำหรับฆ่าเชื้อบริเวณผิวรากและฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ใช้สำหรับบดรากข้าว

2.3 การเตรียม phosphate buffer saline (PBS) ซึ่ง NaCl 8.0 กรัม, KCl 0.2 กรัม, Na_2HPO_4 1.6 กรัม และ KH_2PO_4 0.2 กรัม จากนั้นละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C 20 นาที ใช้สำหรับล้างทำความสะอาดรากและในขั้นตอนของการทำสารละลายให้เจือจาง

3. การแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์

3.1 การแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากบริเวณรากข้าว

นำรากข้าวที่เก็บมาทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวราก โดยล้างผ่านน้ำประปาให้สะอาด ระวังอย่าให้รากขาด ชับด้วยกระดาษทิชชู ซึ่งรากข้าวหนัก 1 กรัม และ glass bead 4 กรัม หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง นำไปแช่ใน 1% Chloramine T นาน 15 นาที หลังจากนั้นล้างรากด้วย Phosphate buffer saline (PBS) 1 ครั้ง นำรากและ glass bead ใส่ขวดปากแคบขนาด 150 มิลลิลิตร ที่มี Phosphate buffer saline (PBS) 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 20 นาที โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที จากนั้นล้างรากด้วย Phosphate buffer saline (PBS) 4 ครั้ง

นำรากข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว มาทำการบดใน โกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย 1% Chloramine T นาน 1 นาที โดยบดรากข้าวใน Phosphate buffer saline (PBS) 10 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายใส่มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} ... 10^{-7} ด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread plate ในอาหารแข็ง N-free solid malate-glucose medium (NFMM) ส่วนประกอบอาหารดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ทำการนับแบคทีเรียตรงในโตรเจนเอนโดไฟต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง NFMM (ดัดแปลงมาจาก Barraquio *et al.*, 1997)

3.2 การแยกแบคทีเรียตรงในโตรเจนเอนโดไฟต์ให้บริสุทธิ์

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NFMM จากขั้นตอนที่ 4.1 มาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง NFMM นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว NFMM เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลวมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้ไว้ใน 25% glycerol และเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -21°C องศาเซลเซียส เพื่อการศึกษาในขั้นต่อไป

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียที่แยกได้

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธีการย้อมสีแบบแกรม โดยนำแบคทีเรียที่เก็บไว้มา streak บนอาหาร N-free malate medium (Nfb) ส่วนประกอบอาหารดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 2 จนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยว นำโคโลนีที่ได้มาทำการเกลี่ยให้กระจาย (smear) บนสไลด์ จากนั้นนำมาลนบนเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อติดแน่นบนสไลด์ แล้วหยด crystal violet ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า หยดไอโอดีน ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% โดยให้ไหลผ่านซ้ำๆ บนสไลด์ จนกระทั่งไม่มีสีของ crystal violet ปนไปกับแอลกอฮอล์ จากนั้นย้อมทับด้วย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำเปล่า แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการติดสีและรูปร่างของแบคทีเรียที่แยกได้

4.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาวิทยาเบื้องต้น

การศึกษาสรีรวิทยาวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียตรงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้ โดยใช้สารประเภทต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน สารที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ L-asparagine citric acid glucose lactic acid malic acid mannitol และ sorbitol ในอาหาร Nfb ที่มีปริมาณคาร์บอนในอาหารคิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นอกจากนี้ยังทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ampicillin chloramphenicol kanamycin และ tetracycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ชนิดของสารปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

ชนิดของสารปฏิชีวนะ	ระดับความเข้มข้น (mg kg ⁻¹)		
Ampicillin	5	10	20
Chloramphenicol	5	15	25
Kanamycin	5	10	15
Tetracycline	5	10	15

หลังจากนั้นทำการเก็บข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเบื้องต้น และวิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยใช้ simple matching binary coefficient เพื่อสร้าง dendrograms และนำไปใช้ในการคัดเลือกหาตัวแทนของแบคทีเรียตรงไนโตรเจนเอนโดไฟต์เพื่อนำไปศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลต่อไป

5. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์

นำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่พบมาทำการศึกษาความหลากหลายโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เพื่อแยกความแตกต่างของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลต และใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาต่อไป สำหรับความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในการทดลองครั้งนี้ใช้เทคนิค RFLP (Restriction fragment length polymorphism) โดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ตัดจำเพาะ มีขั้นตอน ดังนี้

5.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

เตรียมตัวอย่างแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาโดยนำตัวอย่างที่เก็บไว้ที่ -21 องศาเซลเซียส มา restreak อีกครั้งบนอาหารแข็ง Nfb บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยว ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อแตะโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว Nfb ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย 3% NaCl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใส่ทิ้ง จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใส่ทิ้ง เติมน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใช้ไปเปิดดูคขึ้นลงเพื่อให้แบคทีเรียกระจายเป็นเนื้อเดียวกันในน้ำ หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายแบคทีเรียที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายใส่ 25 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

สำหรับการศึกษาในส่วนนี้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจน คือ ยีน *nifH* โดยใช้ primer ที่ประกอบด้วย forward primer PolF (5' TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC 3') และ reverse primer PolR (5' ATS GCC ATC ATY TCR CCC GA 3') โดยการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 10X Taq buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (Fermentas, Canada) ความเข้มข้น 5 ยูนิต

ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร forward และ reverse ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 8 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 59.5 ไมโครลิตร

ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จำนวน 5 ไมโครลิตร มาผสมด้วย 6X loading dye ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร โหลดบน 0.8 % agarose gel ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที ทำการโหลด 100 bp ladder เป็น marker เมื่อครบเวลาแล้วนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที และแช่น้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ภายใต้อัลตราไวโอเลตพร้อมถ่ายภาพ

5. การศึกษา Restriction fragment length polymorphism โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะตัด

ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ได้แก่ *HahI* (*Hin6I* *CfoI*) *HpaII* (*MspI*) *HaeIII* *MboI* *RsaI* และ *HinfI* ในส่วนขั้นตอนการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบ ดังนี้ ผลผลิต PCR ยีน *nifH* 5 ไมโครลิตร 10X buffer 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด 1 ไมโครลิตร น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยนำผลผลิตที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผสมด้วย 6X loading dye ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร โหลดบน 2.5 % agarose gel ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ทำการโหลด 100 bp ladder เป็น marker เมื่อครบเวลาแล้วนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที และแช่น้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ภายใต้อัลตราไวโอเลตพร้อมถ่ายภาพ จากนั้นวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันถูกแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้าทำให้ได้เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอเกิดขึ้นบนเจล นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนและแตกต่าง หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย

UPGMA โดยใช้ simple matching binary coefficient เพื่อสร้าง dendrogram เพื่อคัดเลือกหาตัวแทนของแบคทีเรียที่เรียงใน โตรเจนเอนโคไฟต์เพื่อนำไปศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA และประสิทธิภาพการเรียงใน โตรเจนต่อไป

5.4 การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA

เตรียมตัวอย่างแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาโดยนำตัวอย่างที่เก็บไว้ที่ -21 องศาเซลเซียส มาตรวจสอบความบริสุทธิ์อีกครั้งบนอาหารแข็ง Nfb บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จนกระทั่งได้โคโลนีเดี่ยว ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อและโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว N-free medium (Nfb) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย 3% NaCl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใส่ทิ้ง จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใส่ทิ้ง เติมน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใช้ไปเปิดชุดขึ้นลงเพื่อให้แบคทีเรียกระจายเป็นเนื้อเดียวกันในน้ำ หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายแบคทีเรียที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายใส 25 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR

การทำปฏิกิริยา PCR นำปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.40 ไมโครลิตร 10X buffer 5 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ,universal primer forward และ reverse ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (16S 926f: AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG และ 16S 1500r: ACG GGC GGT GTG TRC) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA Polymerase (Fermentas, Canada) ความเข้มข้น 5 ยูนิต ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ทำที่ initiation denaturation 98°C เป็นเวลา 5 นาที denaturing 95°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 55°C เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72°C เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (PTC 100, MJ. Research) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 1X TAE buffer และผลผลิต PCR 40 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำข้อมูลลำดับเบสของเชื้อที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับ

เบสของจุลินทรีย์อื่นๆ ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)

6. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

จากข้อมูลเบื้องต้นในข้อ 6 สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกได้ ซึ่งจะนำตัวแทนของแต่ละกลุ่ม มาทำการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี acetylene reduction activity assay (Burris, 1975) โดยนำแบคทีเรียตัวแทนทำการแยกโคโลนีเดี่ยวในอาหารเลี้ยงเชื้อและย้ายลงหลอดทดลองโดยใช้อาหารเหลว Ntb ทิ้งไว้ 2-3 วัน เปลี่ยนจุกสำลีที่ปิดไว้ในชั้นแรกเป็นจุกยางปิดหลอดให้แน่น ดูดอากาศออก 10% และใช้เข็มฉีดยาฉีด acetylene เข้าไป 10 % โดยปริมาตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาณ ethylene โดยเครื่อง gas chromatography รุ่น HP5890 series II มีเครื่องตรวจจับ (Detector) เป็นแบบ Flame ionization คอลัมน์ (column) ที่ใช้เป็น HP Porapak N ขนาดช่อง (80/100 เมช) ความยาว 1.8 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร (1.8 m x 2 mm.) โดยกำหนดให้อุณหภูมิของ injection detector 110°C อุณหภูมิของ column 80°C โดยมีก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซตัวพา มีอัตราการไหล 30 มิลลิเมตรต่อนาที ใช้ปริมาตรของการฉีดตัวอย่าง (Inject volume) ครั้งละ 1 มิลลิลิตร คำนวณหาปริมาณ acetylene reduction activity (ARA) จากสมการดังนี้

$$\text{ARA } (\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}^{-1} \cdot \text{culture}^{-1}) = \frac{1000}{V_{st}} \times \frac{A_{sa} \times V_{tu}}{A_{st} \times H \times 22.4}$$

V_{st} = ปริมาตรของ standard gas (ml)

V_{tu} = ปริมาตรของหลอดที่ใช้ (ml)

A_{sa} = พื้นที่ใต้กราฟของ C_2H_4 ที่เกิดขึ้น (cm^2)

A_{st} = พื้นที่ใต้กราฟของ standard gas (cm^2)

H = เวลาในการบ่มเชื้อ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ดินและปุ๋ยหมักที่ใช้ในการทดลอง

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีเบื้องต้นในส่วนของค่าปฏิกิริยาดิน ปริมาณธาตุอาหารหลักของชุดดินและปุ๋ยหมักที่ใช้ในการทดลองก่อนที่จะนำมาศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับระดับความอุดมสมบูรณ์และความเป็นปัญหาของดิน (ตารางผนวกที่ 3-6) พบว่าดินทั้ง 6 ชุดดิน ได้แก่ ชุดดินเสนา ชุดดินอุรุษา ชุดดินนครปฐม ชุดดินบางเขน ชุดดินลพบุรีและชุดดินบ้านหมี่ มีค่าปฏิกิริยาดินกรดรุนแรงมากถึงค่าเล็กน้อย (pH 3.7-7.8) ปริมาณไนโตรเจนรวมอยู่ในระดับต่ำ (ร้อยละ 0.08-0.21) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับสูงมาก (43-479 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับปานกลางถึงสูงมาก (67-387 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และปุ๋ยหมักที่ใช้ในการศึกษามีค่าปฏิกิริยาดินปานกลาง (pH 5.8) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ในระดับสูงมาก (ร้อยละ 0.95) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับสูงมาก (230 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับสูงมาก (114 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ค่าวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งทั้ง 6 ชุดดินมีความเหมาะสมสำหรับนำไปทำการทดลองปลูกต้นข้าว เพื่อนำรากข้าวไปทำการศึกษากการแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากรากข้าวต่อไป

ตารางที่ 8 ค่าวิเคราะห์สมบัติเคมีเบื้องต้นของชุดดินและปุ๋ยหมักที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	pH	ปริมาณธาตุอาหารหลัก		
		ไนโตรเจนรวม (%)	ฟอสฟอรัส (mg kg ⁻¹)	โพแทสเซียม (mg kg ⁻¹)
ชุดดินเสนา	5.2	0.21	73	387
ชุดดินอยุธยา	3.7	0.26	76	293
ชุดดินนครปฐม	7.6	0.08	479	67
ชุดดินบางเขน	5.9	0.17	340	302
ชุดดินลพบุรี	7.8	0.12	407	76
ชุดดินบ้านหมี่	6.2	0.13	121	155
ปุ๋ยหมัก	5.8	0.95	230	114

2. การแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากรากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ

การแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่ได้จากตัวอย่างรากข้าวในขั้นแรกได้ทำการสำรวจข้อมูลและเก็บตัวอย่างรากข้าวจากแปลงเกษตรกร พบว่าข้อมูลเบื้องต้นของการจัดการผลผลิตและข้อมูลทั่วไป เช่น พันธุ์ข้าว, ชุดดิน, อัตราการใส่ปุ๋ย, ชนิดของปุ๋ยที่ใส่, ระยะเวลาในการใส่ปุ๋ย, มีความไม่ชัดเจนเนื่องจากเกษตรกรจะใช้ความเคยชินในการเรียกชื่อพันธุ์ข้าวจากแหล่งวัตถุดิบที่ซื้อ มาทำให้เกิดความสับสน และเมื่อนำข้อมูลแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบแล้ว มีความแตกต่างในหลายปัจจัยด้วยกัน จึงแก้ไขการทดลองโดยทำการเก็บชุดดินตัวแทนที่ต้องการศึกษามาทำการปลูกในกระถางบริเวณเรือนทดลองภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยทำการกำหนดสภาพการจัดการผลผลิตตามการทดลองที่วางแผนการทดลองไว้ และทำการเก็บตัวอย่างข้าวจากแปลงทดลองของสถานีวิจัยข้าวสุพรรณบุรีร่วมด้วย นอกจากนี้ในการปลูกข้าวในเรือนทดลองระยะแรกมีปัญหาในเรื่องของความคลาดเคลื่อนของระยะเวลาในการเจริญเติบโต ในการทดลองต้องการเก็บตัวอย่างในระยะกำเนิดช่อดอก (heading stage) ระยะเวลาประมาณ 70-90 วัน ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว แต่เมื่อทำการปลูกในเรือนทดลองข้าวจะเจริญเติบโตช้ากว่าเดิม เนื่องมีการย้ายกล้าปลูกเพื่อนำมาปลูกทำให้ข้าวต้องใช้เวลาในการฟื้นตัวเล็กน้อย ทำให้การเก็บตัวอย่างคลาดเคลื่อนจากเวลาที่วางแผนไว้ แต่เมื่อถึงเวลาก็ทำการเก็บตัวอย่างรากข้าวเพื่อนำมาแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ต่อไปได้

การแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่ได้จากตัวอย่างรากข้าวจากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดสุพรรณบุรี และเรือนทดลองภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้ที่สามารถเจริญในอาหารแข็ง NFMM นั้นเจริญเติบโตช้าใช้เวลามากกว่า 5 วัน และลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็ก จึงทำการเปลี่ยนอาหารจากสูตรอาหารเดิมมาเป็นอาหารแข็ง Nfb ที่มีส่วนประกอบของวิตามินและ trace element หลังจากนั้นทำการ re-streak บนอาหาร แข็ง Nfb พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกจากตัวอย่างรากข้าวจากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดสุพรรณบุรี และเรือนทดลองภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทั้งหมด 260 ไอโซเลต

โดย แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากตัวอย่างรากข้าวจากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดสุพรรณบุรี ประกอบด้วยข้าว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ปทุมธานี 1 พันธุ์สุพรรณบุรี 1 พันธุ์ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี และพันธุ์ SPR 99007-22-1-2-2-1 ที่ปลูกในชุดดินสระบุรี ได้ทั้งหมด 94 ไอโซเลต โดยพบจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้มากที่สุดจาก

รากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 จำนวน 68 ไอโซเลต คิดเป็น 72 % ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างรากข้าวจากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดสุพรรณบุรี ดังแสดงในตารางที่ 9

และสามารถแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากตัวอย่างรากข้าวที่ได้จากเรือนทดลองภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทั้งหมด 166 ไอโซเลต โดยในการทดลองที่ 1 ทำการศึกษาผลของชุดดินต่อจำนวนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ในรากข้าวภายใต้สภาพการจัดการปุ๋ยที่ต่างกันทั้งหมด พบจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้มากที่สุดจากรากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ที่ปลูกในชุดดินนครปฐม จำนวน 65 ไอโซเลต คิดเป็น 47 % ของแบคทีเรียที่แยกได้ดังแสดงในตารางที่ 10

สำหรับการทดลองที่ 2 ทำการศึกษาผลของพันธุ์ข้าวต่อจำนวนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ในรากข้าวที่ปลูกในชุดดินบางเขน ภายใต้สภาพการจัดการปุ๋ยที่ต่างกันทั้งหมด พบจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้มากที่สุดจากรากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 จำนวน 28 ไอโซเลต และพันธุ์พิษณุโลก 2 จำนวน 29 ไอโซเลต คิดเป็น 34 % ของแบคทีเรียที่แยกได้เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นที่ปลูกในชุดดินเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 11

สำหรับการแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากรากข้าวนั้น พบว่าในแต่ละสายพันธุ์ของแต่ละพันธุ์ข้าวให้ผลของจำนวนแบคทีเรียที่แตกต่างกัน โดยประการแรกถ้าเปรียบเทียบผลการแยกแบคทีเรียระหว่างแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรีกับเรือนทดลองของภาควิชาปฐพีวิทยา พบว่าในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี พบว่าแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวมีจำนวนของแบคทีเรียมากกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียสามารถปรับตัวดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมดังกล่าวได้มาเป็นเวลานาน และเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น

ประการที่สองหากเปรียบเทียบการจัดการปุ๋ยที่ต่างกันของดำรับการทดลองที่ปลูกในเรือนทดลองของภาควิชาปฐพีวิทยา พบว่าการจัดการปุ๋ยประเภทต่างๆ ไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนของแบคทีเรียที่แยกได้

ประการที่สามเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของชุดดินกับจำนวนแบคทีเรีย พบว่าในชุดดินที่มีค่าปฏิกิริยาดินเป็นกรดจะพบจำนวนแบคทีเรีน้อยกว่าชุดดินที่มีค่าปฏิกิริยาดินเป็นกลางและเป็นด่าง อาจเนื่องมาจากเมื่อดินอยู่ในสภาพขังน้ำทำให้อะลูมิเนียมและเหล็กละลายออกมาเป็นจำนวนมากทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย และเมื่อพิจารณาจากค่าวิเคราะห์ดินพบว่าชุดดินนครปฐมซึ่งเป็นชุดดินตัวแทนของชุดดินที่มีค่าปฏิกิริยาดินเป็นกลางมีค่า

ปริมาณไนโตรเจนรวมต่ำสุดเมื่อเทียบกับชุดดินอื่น ๆ ส่งผลให้พบจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เอนโดไฟต์ที่แยกได้มากที่สุดจากรากข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ที่ปลูกในชุดดินนครปฐม อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียทำการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศเพื่อทำให้สามารถปรับตัวดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมดังกล่าวมีจำนวนมากขึ้น

ประการที่สี่เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของพันธุ์ข้าวกับจำนวนแบคทีเรีย พบว่าในแต่ละสายพันธุ์ของแต่ละพันธุ์ข้าวให้ผลของจำนวนแบคทีเรียที่แตกต่างกัน โดยตัวอย่างรากข้าวจากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดสุพรรณบุรี พบจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้มากที่สุดจากรากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ตัวอย่างรากข้าวจากเรือนทดลองภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบจำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้มากที่สุดจากรากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์พิษณุโลก 2 ทั้งนี้อาจเกิดจากสารที่ปลดปล่อยออกมาจากรากพืช root exudates

ตารางที่ 9 จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ที่พบในรากข้าวสายพันธุ์ต่างกันโดยปลูกใน
ชุดดินสระบุรีในแปลงทดลอง ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดสุพรรณบุรี

ชุดดิน	พันธุ์ข้าว	จำนวนไอโซเลตรวม
ชุดดินสระบุรี	ปทุมธานี 1	68
ชุดดินสระบุรี	ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี	12
ชุดดินสระบุรี	สุพรรณบุรี 1	6
ชุดดินสระบุรี	SPR 99007-22-1-2-2-1	8

ตารางที่ 10 จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ที่พบในรากข้าวสายพันธุ์ต่างกันที่ปลูกใน
ชุดดินต่างกันในเรื่องทดลอง ภาควิชาปฐพีวิทยา

ชุดดิน	พันธุ์ข้าว	การจัดการปุ๋ย			จำนวน ไอโซเลตรวม
		ไม่ได้ปุ๋ย	ปุ๋ยเคมี	ปุ๋ยเคมี+ปุ๋ยอินทรีย์	
ชุดดินเสนา	ปทุมธานี 1	0	1	0	1
ชุดดินอยุธยา	ปทุมธานี 1	0	6	4	10
ชุดดินนครปฐม	พิษณุโลก 2	12	28	17	65
ชุดดินบางเขน	พิษณุโลก 2	12	8	3	29
ชุดดินลพบุรี	สุพรรณบุรี 3	1	2	2	5
ชุดดินบ้านหมี่	สุพรรณบุรี 3	7	15	2	28

ตารางที่ 11 จำนวนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ที่พบในรากข้าวสายพันธุ์ต่างกันที่ปลูกใน
ชุดดินบางเขนซึ่งเป็นชุดดินเดียวกัน ในเรือนทดลอง ภาควิชาปฐพีวิทยา

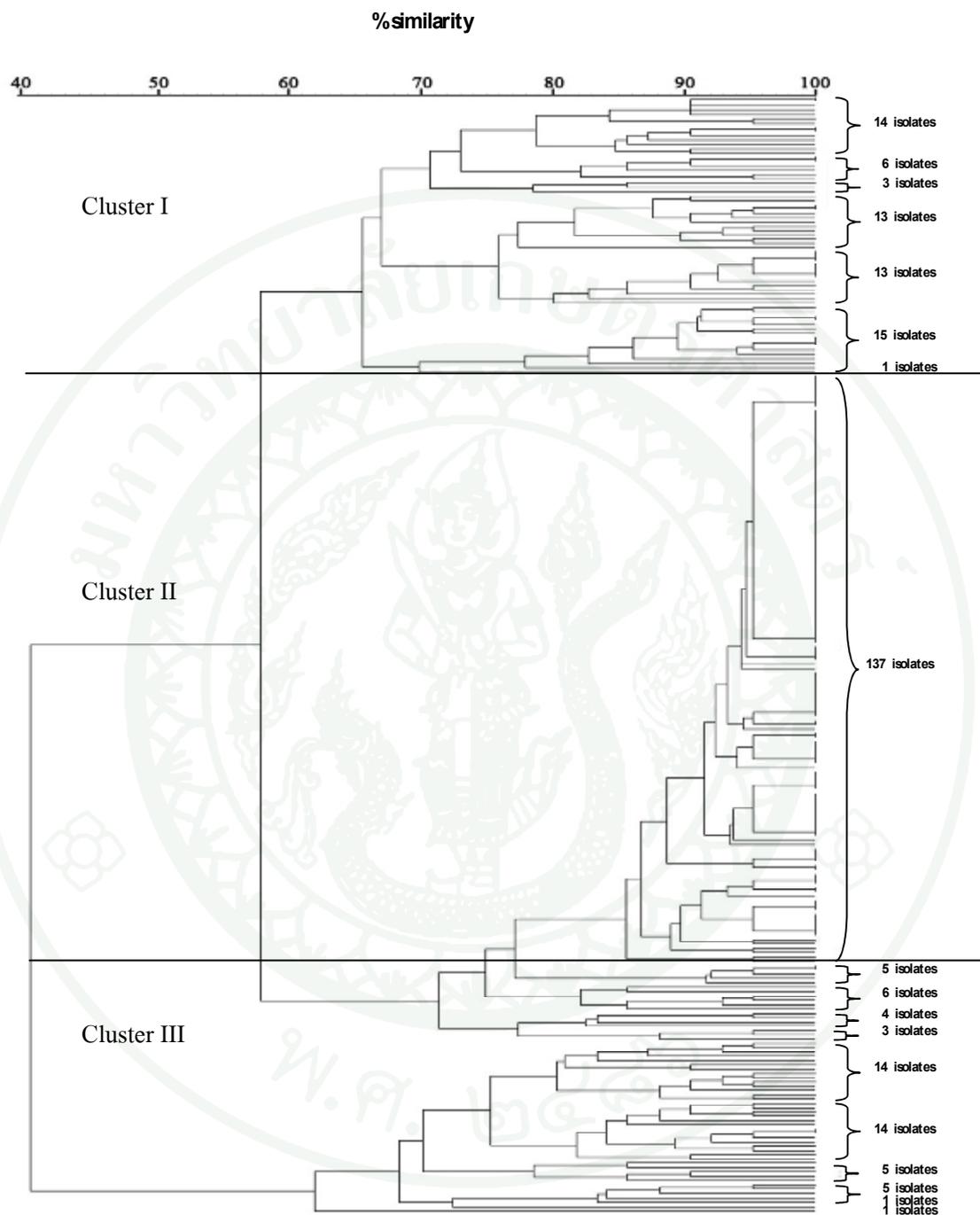
ชุดดิน	พันธุ์ข้าว	การจัดการปุ๋ย			จำนวน ไอโซเลต รวม
		ไม่ใส่ปุ๋ย	ปุ๋ยเคมี	ปุ๋ยเคมี+ปุ๋ยอินทรีย์	
ชุดดินบางเขน	ปทุมธานี 1	17	9	2	28
ชุดดินบางเขน	ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี	1	6	4	11
ชุดดินบางเขน	สุพรรณบุรี 3	1	11	1	13
ชุดดินบางเขน	พิษณุโลก 2	12	8	3	29

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาวิทยาเบื้องต้น

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียตรงในโตรเจนเอนโดไฟต์ทั้งหมด 260 ไอโซเลต ที่แยกได้จากตัวอย่างรากข้าวสาลีพันธุ์ต่างๆที่ปลูกในเรือนทดลอง และเก็บจากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดสุพรรณบุรี พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียตรงในโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดง มีลักษณะกลม (cocci) และแท่ง (rod)

ในส่วนของคุณสมบัติทางสรีรวิทยาเบื้องต้นนั้น โดยทำการทดสอบความสามารถในการใช้สารเคมีประเภทต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน สารที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ L-asparagine citric acid glucose lactic acid malic acid mannitol และ sorbitol นอกจากนี้ยังทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ampicillin chloramphenicol kanamycin และ tetracycline ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแบคทีเรียตรงในโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้สามารถใช้สารต่อไปนี้เป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ L-asparagine citric acid glucose lactic acid malic acid mannitol และ sorbitol โดยคิดเป็น 89% 79% 69% 29% 75% 82% และ 87% ของแบคทีเรียตรงในโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมด ตามลำดับ และแบคทีเรียตรงในโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้มีความสามารถในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ ampicillin ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร chloramphenicol ที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร kanamycin และ tetracycline ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยคิดเป็น 83% 62% 55% และ 50% ของแบคทีเรียตรงในโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมด ตามลำดับ (ภาพผนวกที่ 1)

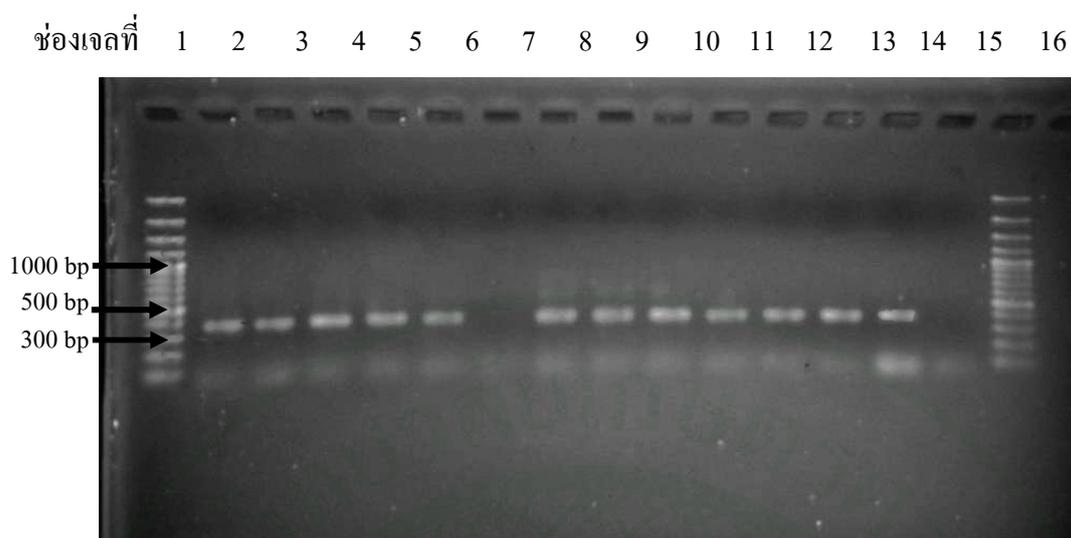
หลังจากนั้นทำการเก็บข้อมูลที่ได้และนำมาประมวลผลโดยวิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยใช้ simple matching binary coefficient เพื่อสร้าง dendrograms โดยใช้ข้อมูลจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแบบแกรมและการศึกษาสรีรวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์โดยการทดสอบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้ในการเจริญได้ และการทดสอบการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดได้เป็น 18 กลุ่มที่ระดับความเหมือนสูงสุด 78 เปอร์เซ็นต์ และสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 cluster โดย cluster I ประกอบด้วยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ 65 ไอโซเลต cluster II ประกอบด้วยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ 137 ไอโซเลต cluster III ประกอบด้วยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ 68 ไอโซเลต ซึ่งในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยแบคทีเรียที่ได้มาจากตัวอย่างรากข้าวที่ปลูกในเรือนทดลองและเก็บจากแปลงทดลอง ศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดสุพรรณบุรีดังแสดงภาพที่ 4 เพื่อคัดเลือกหาตัวแทนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ เพื่อนำไปศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยา ระดับโมเลกุลต่อไป



ภาพที่ 4 Dendrogram ที่สร้างโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียจริง
ใน โตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *nifH* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิคPCR

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแบบแกรมและการศึกษาสรีรวิทยาเบื้องต้น สามารถคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทนได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้มาจากตัวอย่างรากข้าวที่ปลูกในเรือนทดลองและเก็บจากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดสุพรรณบุรี เพื่อนำมาศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *nifH* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยยีน *nifH* ทำหน้าที่ควบคุมโปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (iron protein หรือ Fe-protein) ซึ่งเป็นโปรตีนหนึ่งที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (David, 2007) พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทนทั้งหมด 50 ไอโซเลต เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *nifH* โดยใช้ primer PoIF และ PoIR พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทน 40 ไอโซเลต ปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *nifH* ที่มีขนาด 360 bp ดังแสดงภาพที่ 5 คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียตัวแทน รายละเอียดแสดงในตารางที่ 9 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบการปรากฏของยีน *nifH* ในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ เช่น *Alcaligenes faecalis* A15 และ *Azospirillum irakense* (Vermeiren *et al.*, 1998) *Sinorhizobium meliloti* *Sinorhizobium* sp. strain NGR234 *Rhizobium etli* *Klebsiella* spp. และ *Paenibacillus odorifer* (Reiter *et al.*, 2003)



ภาพที่ 5 ผลผลิต PCR ของยีน *nifH*

ช่องเจลที่ 1	คือ ladder 100 bp plus	ช่องเจลที่ 2	คือ ไอโซเลต Sb-Pt13
ช่องเจลที่ 3	คือ ไอโซเลต Sb-Pt018	ช่องเจลที่ 4	คือ ไอโซเลต Sb-Pt20
ช่องเจลที่ 5	คือ ไอโซเลต Sb-Pt23	ช่องเจลที่ 6	คือ ไอโซเลต Sb-SPR06
ช่องเจลที่ 7	คือ ไอโซเลต Sb-SpI03	ช่องเจลที่ 8	คือ ไอโซเลต Sb-Hs08
ช่องเจลที่ 9	คือ ไอโซเลต Np-PI02-1	ช่องเจลที่ 10	คือ ไอโซเลต Np-PI13-1
ช่องเจลที่ 11	คือ ไอโซเลต Np-PI56-0	ช่องเจลที่ 12	คือ ไอโซเลต Bm-Sp07-1
ช่องเจลที่ 13	คือ ไอโซเลต Bn-PI22-0	ช่องเจลที่ 14	คือ positive control
ช่องเจลที่ 15	คือ negative control	ช่องเจลที่ 16	คือ ladder 100 bp plus

ตารางที่ 12 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ตัวแทน

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	แหล่งที่เก็บ	ชนิดดิน	พันธุ์ข้าว	การปรากฏของแถบ DNA ในส่วนของ	
					ชนิดปุ๋ย	ยีน <i>nifH</i>
1	Sb-Pt13	แปลงทดลอง	สระบุรี	ปทุมธานี	-	+
2	Sb-Pt18	แปลงทดลอง	สระบุรี	ปทุมธานี	-	+
3	Sb-Pt20	แปลงทดลอง	สระบุรี	ปทุมธานี	-	+
4	Sb-Pt23	แปลงทดลอง	สระบุรี	ปทุมธานี	-	+
5	Sb-Pt24	แปลงทดลอง	สระบุรี	ปทุมธานี	-	+
6	Sb-Pt27	แปลงทดลอง	สระบุรี	ปทุมธานี	-	+
7	Sb-Pt37	แปลงทดลอง	สระบุรี	ปทุมธานี	-	+
8	Sb-Pt52	แปลงทดลอง	สระบุรี	ปทุมธานี	-	+
9	Sb-SPR01	แปลงทดลอง	สระบุรี	SPR	-	+
10	Sb-SPR06	แปลงทดลอง	สระบุรี	SPR	-	-
11	Sb-HS05	แปลงทดลอง	สระบุรี	ข้าวหอมสุพรรณบุรี	-	-
12	Sb-Hs08	แปลงทดลอง	สระบุรี	ข้าวหอมสุพรรณบุรี	-	+

ตารางที่ 12 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ตัวแทน(ต่อ)

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	แหล่งที่เก็บ	ชนิดดิน	พันธุ์ข้าว	การปรากฏของแถบ DNA ในส่วนของ	
					ชนิดปุ๋ย	ยีน <i>nifH</i>
13	Sb-SpI03	แปลงทดลอง	สระบุรี	สุพรรณบุรี	-	+
14	Ay-Pt01-1	เรือนทดลอง	อยุธยา	ปทุมธานี	เคมี	-
15	Ay-Pt07-2	เรือนทดลอง	อยุธยา	ปทุมธานี	เคมี+อินทรีย์	+
16	Ay-Pt09-2	เรือนทดลอง	อยุธยา	ปทุมธานี	เคมี+อินทรีย์	-
17	Np-PI02-1	เรือนทดลอง	นครปฐม	พิษณุโลก	เคมี	+
18	Np-PI03-1	เรือนทดลอง	นครปฐม	พิษณุโลก	เคมี	+
19	Np-PI09-1	เรือนทดลอง	นครปฐม	พิษณุโลก	เคมี	+
20	Np-PI13-1	เรือนทดลอง	นครปฐม	พิษณุโลก	เคมี	+
21	Np-PI15-1	เรือนทดลอง	นครปฐม	พิษณุโลก	เคมี	+
22	Np-PI18-1	เรือนทดลอง	นครปฐม	พิษณุโลก	เคมี	-
23	Np-PI33-2	เรือนทดลอง	นครปฐม	พิษณุโลก	เคมี+อินทรีย์	+
24	Np-PI48-0	เรือนทดลอง	นครปฐม	พิษณุโลก	ไม่ได้ปุ๋ย	+

ตารางที่ 12 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทน(ต่อ)

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	แหล่งที่เก็บ	ชนิดดิน	พันธุ์ข้าว	การปรากฏของแถบ DNA ในส่วนของ	
					ชนิดปุ๋ย	ยีน <i>nifH</i>
25	Np-P156-0	เรือนทดลอง	นครปฐม	พิษณุโลก	ไม่ใส่ปุ๋ย	+
26	Bn-P104-1	เรือนทดลอง	บางเขน	พิษณุโลก	เคมี	-
27	Bn-P106-1	เรือนทดลอง	บางเขน	พิษณุโลก	เคมี	+
28	Bn-P108-1	เรือนทดลอง	บางเขน	พิษณุโลก	เคมี	+
29	Bn-P111-2	เรือนทดลอง	บางเขน	พิษณุโลก	เคมี+อินทรีย์	+
30	Bn-P116-0	เรือนทดลอง	บางเขน	พิษณุโลก	ไม่ใส่ปุ๋ย	-
31	Bn-P120-0	เรือนทดลอง	บางเขน	พิษณุโลก	ไม่ใส่ปุ๋ย	-
32	Bn-P122-0	เรือนทดลอง	บางเขน	พิษณุโลก	ไม่ใส่ปุ๋ย	+
33	Lp-Sp05-2	เรือนทดลอง	ลพบุรี	สุพรรณบุรี	เคมี+อินทรีย์	+
34	Bm-Sp01-1	เรือนทดลอง	บ้านหมี่	สุพรรณบุรี	เคมี	+
35	Bm-Sp04-1	เรือนทดลอง	บ้านหมี่	สุพรรณบุรี	เคมี	+

ตารางที่ 12 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทน(ต่อ)

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	แหล่งที่เก็บ	ชนิดดิน	พันธุ์ข้าว	ชนิดปุ๋ย	การปรากฏของแถบ DNA ในส่วนของ
						ยีน <i>nifH</i>
36	Bm-Sp05-1	เรือนทดลอง	บ้านหมี่	สุพรรณบุรี	เคมี	-
37	Bm-Sp07-1	เรือนทดลอง	บ้านหมี่	สุพรรณบุรี	เคมี	+
38	Bm-Sp10-1	เรือนทดลอง	บ้านหมี่	สุพรรณบุรี	เคมี	+
39	Bm-Sp13-1	เรือนทดลอง	บ้านหมี่	สุพรรณบุรี	เคมี	+
40	Bm-Sp15-1	เรือนทดลอง	บ้านหมี่	สุพรรณบุรี	เคมี	+
41	Bm-Sp17-2	เรือนทดลอง	บ้านหมี่	สุพรรณบุรี	เคมี+อินทรีย์	+
42	Bn-Pt02-1	เรือนทดลอง	บางเขน	ปทุมธานี	เคมี	-
43	Bn-Pt07-1	เรือนทดลอง	บางเขน	ปทุมธานี	เคมี	+
44	Bn-Pt09-1	เรือนทดลอง	บางเขน	ปทุมธานี	เคมี	+
45	Bn-Pt14-0	เรือนทดลอง	บางเขน	ปทุมธานี	ไม่ใส่ปุ๋ย	+
46	Bn-Pt19-0	เรือนทดลอง	บางเขน	ปทุมธานี	ไม่ใส่ปุ๋ย	+

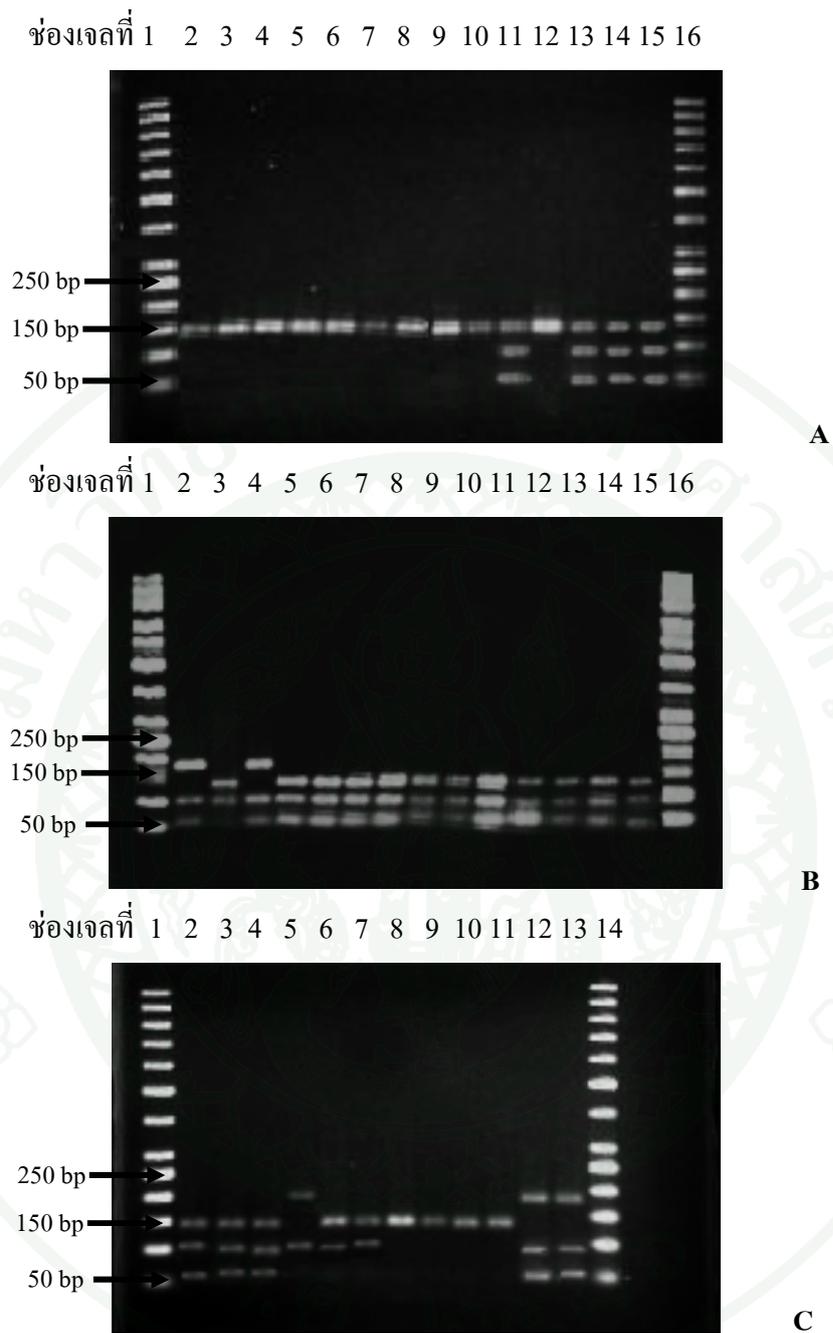
ตารางที่ 12 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทน(ต่อ)

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	แหล่งที่เก็บ	ชนิดดิน	พันธุ์ข้าว	ชนิดปุ๋ย	การปรากฏของแถบ DNA ในส่วนของ
						ยีน <i>nifH</i>
47	Bn-Pt20-0	เรือนทดลอง	บางเขน	ปทุมธานี	ไม่ใส่ปุ๋ย	+
48	Bn-Pt26-0	เรือนทดลอง	บางเขน	ปทุมธานี	ไม่ใส่ปุ๋ย	+
49	Bn-Pt28-0	เรือนทดลอง	บางเขน	ปทุมธานี	ไม่ใส่ปุ๋ย	+
50	Bn-Sp07-1	เรือนทดลอง	บางเขน	สุพรรณบุรี	เคมี	+

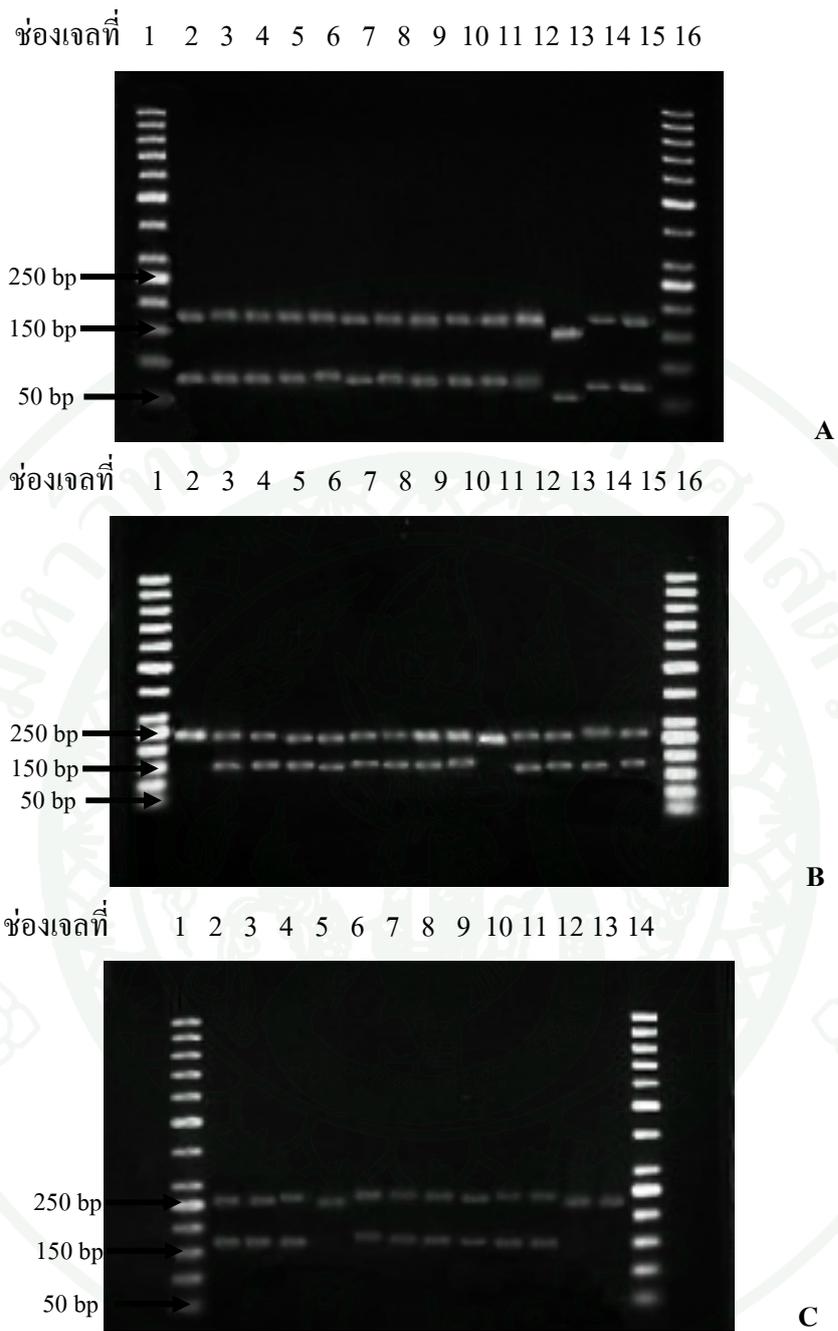
5. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียโดยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism โดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้ โดยทำการคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนจากการตรวจสอบส่วนของยีน *nifH* โดยใช้ primer PolF และ PolR พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทนทั้งหมด 40 ไอโซเลต ปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *nifH* จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทน 50 ไอโซเลต หลังจากนั้นนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทน 40 ไอโซเลต มาทำการศึกษาความหลากหลายโดยเทคนิค RFLP ของยีน *nifH* อาศัยการทำงานเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ได้แก่ *HahI* (*Hin6I* *CfoI*) *HpaII* (*MspI*) *HaeIII* *MboI* *RsaI* และ *HinfI* พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดสามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ขนาดแตกต่างกัน พบว่าเอนไซม์ *HahI* สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 190 140 100 และ 50 bp ดังแสดงในภาพที่ 6 เอนไซม์ *HpaII* สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 180 160 และ 75 bp ดังแสดงในภาพที่ 7 เอนไซม์ *HaeIII* สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 290 200 190 150 110 80 และ 70 bp ดังแสดงในภาพที่ 8 เอนไซม์ *MboI* สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 300 240 180 120 100 90 และ 80 bp ดังแสดงในภาพที่ 9 เอนไซม์ *RsaI* สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 360 250 240 และ 110 bp ดังแสดงในภาพที่ 10 และเอนไซม์ *HinfI* สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 230 150 140 และ 75 bp ดังแสดงในภาพที่ 11

ในส่วนขั้นตอนการตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ในส่วนของยีน *niyH* โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นบนเจล มาวิเคราะห์ความเหมือนและแตกต่างโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ หลังจากนั้นทำการเก็บข้อมูลที่ได้และนำมาประมวลผลโดยโดยวิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยใช้ simple matching binary coefficient เพื่อสร้าง dendrograms เพื่อคัดเลือกหาตัวแทนของแบคทีเรียที่เรียงใน โตรเจนเอนโดไฟต์ เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนต่อไป พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 14 กลุ่ม ที่ระดับความความเหมือนสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียที่เรียงในโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากแปลงทดลองศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรีพบอยู่ในกลุ่มที่ 1 ยกเว้น 1 ไอโซเลต (Sb-HS08) พบแยกอยู่ในกลุ่มที่ 7 แบคทีเรียที่เรียงในโตรเจนเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเรือนทดลองภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบอยู่ในกลุ่มที่ 2-14 ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 6 ผลผลิต PCR ของยีน *nifH* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HahI*
 ช่องเจลที่ 1A, 1B, 1C, 16A, 16B, 14C คือ ladder 50 bp plus
 ช่องเจลที่ 2A-15A, 2B-15B, 2C-13C คือ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน
 เอนโดไฟต์ ตัวแทน

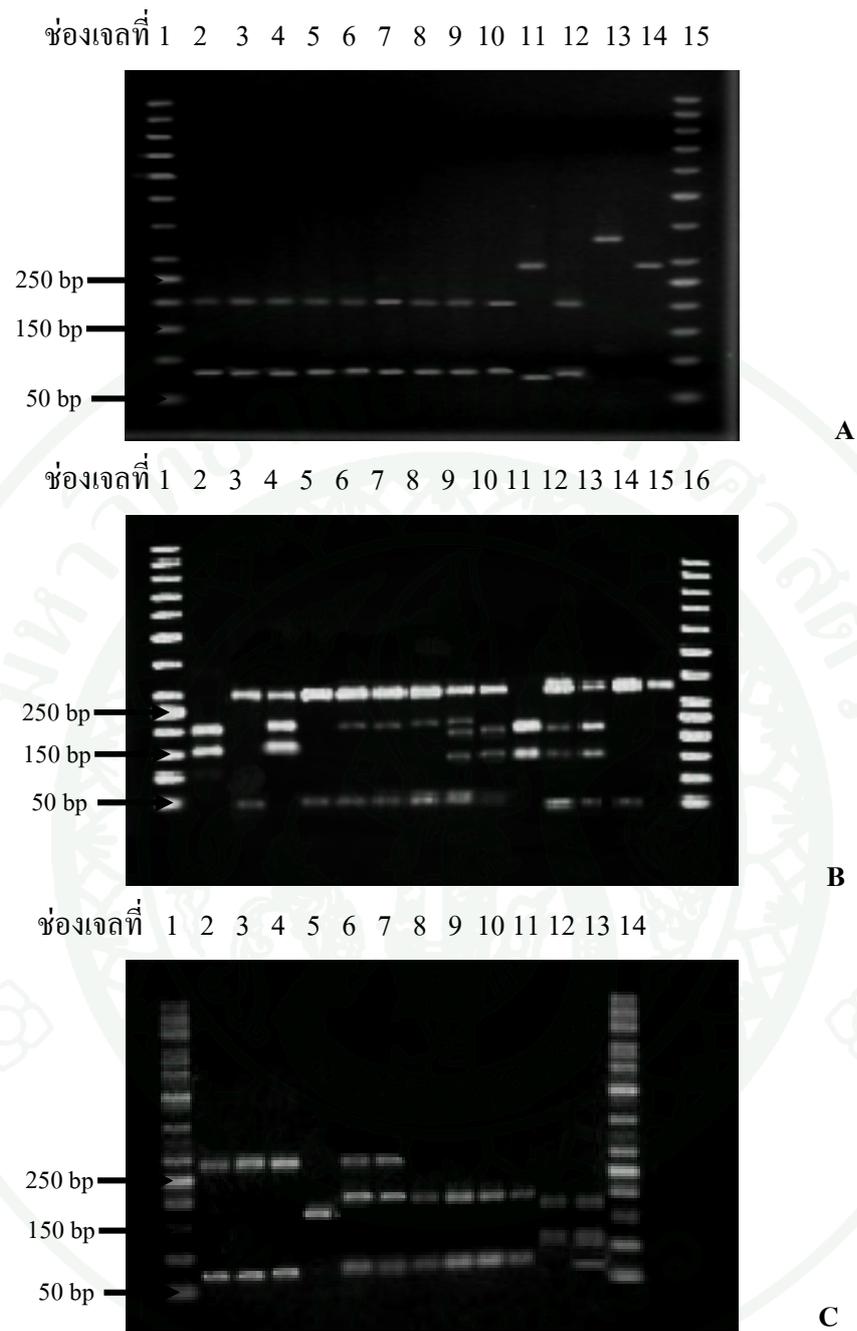


ภาพที่ 7 ผลผลิต PCR ของยีน *nifH* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaII*

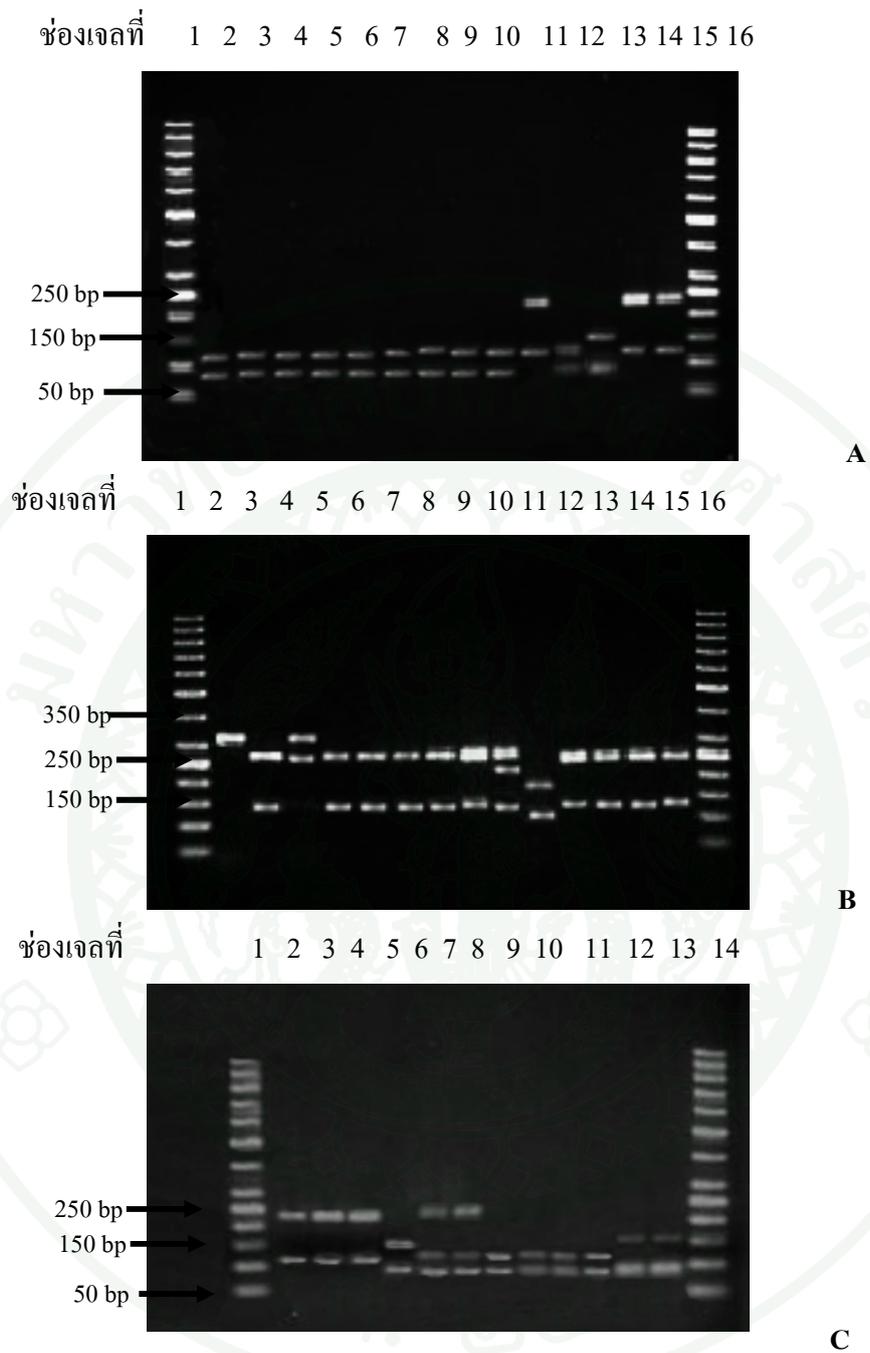
ช่องเจลที่ 1A, 1B, 1C, 16A, 16B, 14C คือ ladder 50 bp plus

ช่องเจลที่ 2A-15A, 2B-15B, 2C-13C คือ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

เอนโดไฟต์ตัวแทน

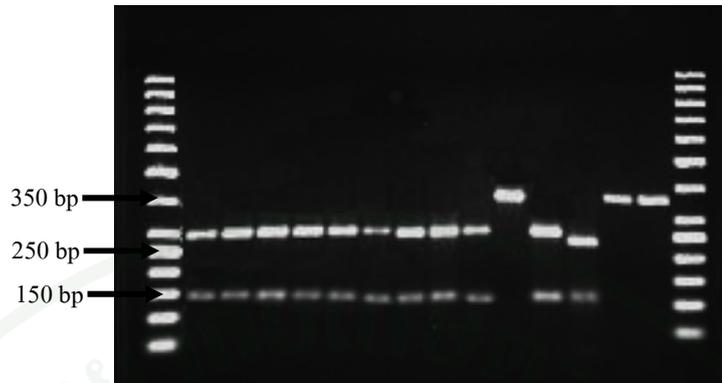


ภาพที่ 8 ผลผลิต PCR ของยีน *nifH* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII*
 ช่องเจลที่ 1A, 1B, 1C, 16A, 16B, 14C คือ ladder 50 bp plus
 ช่องเจลที่ 2A-15A, 2B-15B, 2C-13C คือ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน
 เอนโดไฟต์ตัวแทน



ภาพที่ 9 ผลผลิต PCR ของยีน *nifH* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MboI*
 ช่องเจลที่ 1A, 1B, 1C, 16A, 16B, 14C คือ ladder 50 bp plus
 ช่องเจลที่ 2A-15A, 2B-15B, 2C-13C คือ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน
 เอนโดไฟต์ตัวแทน

ช่องเจลที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



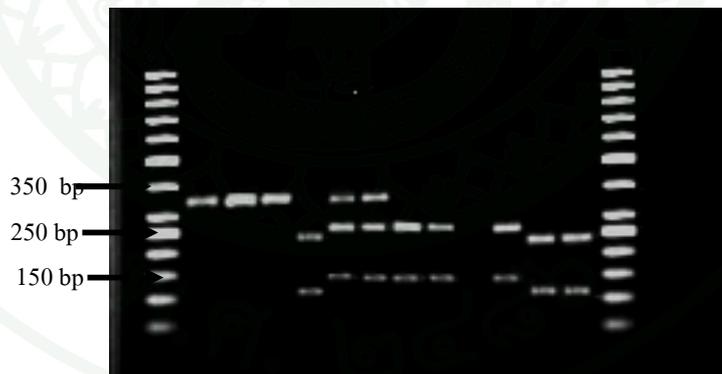
A

ช่องเจลที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



B

ช่องเจลที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



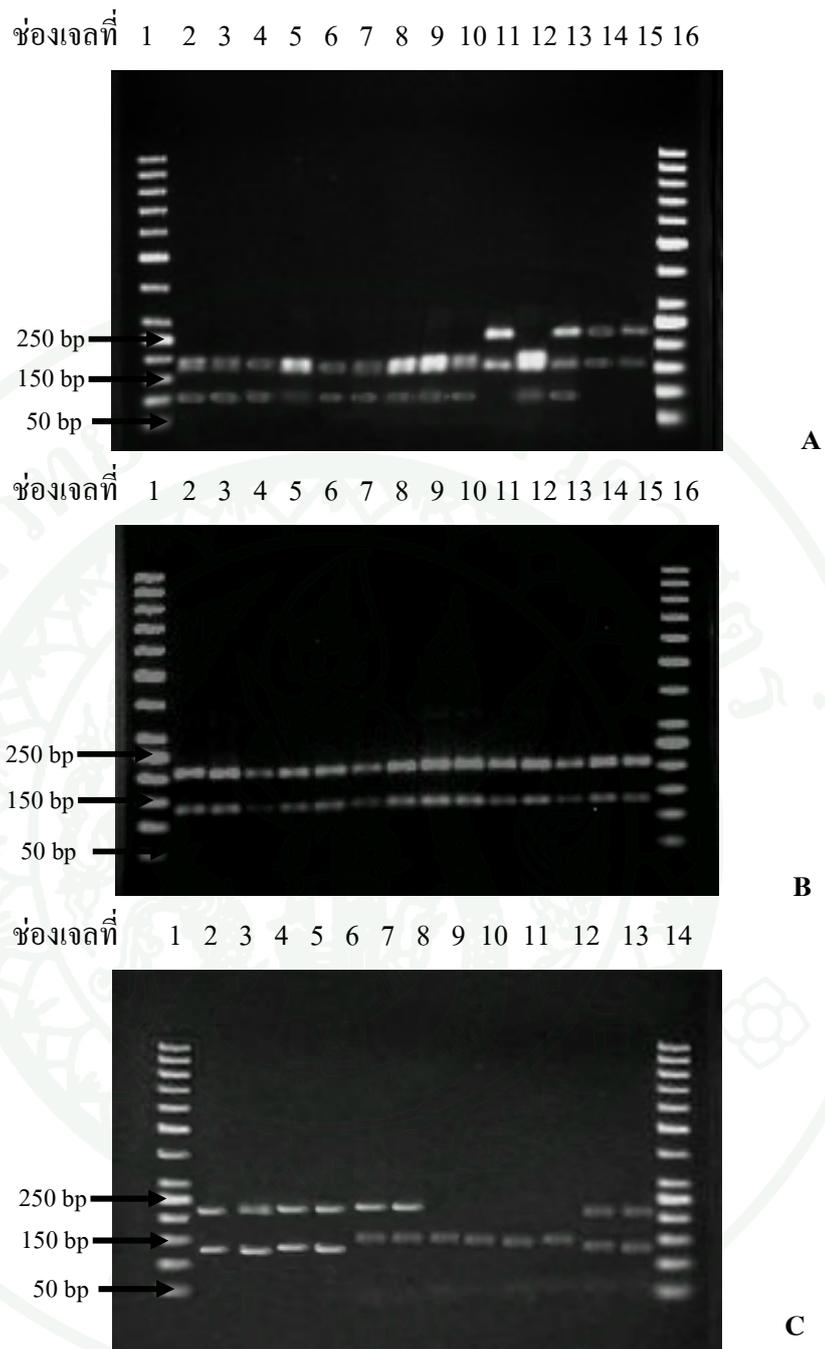
C

ภาพที่ 10 ผลผลิต PCR ของยีน *nifH* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*

ช่องเจลที่ 1A, 1B, 1C, 16A, 16B, 14C คือ ladder 50 bp plus

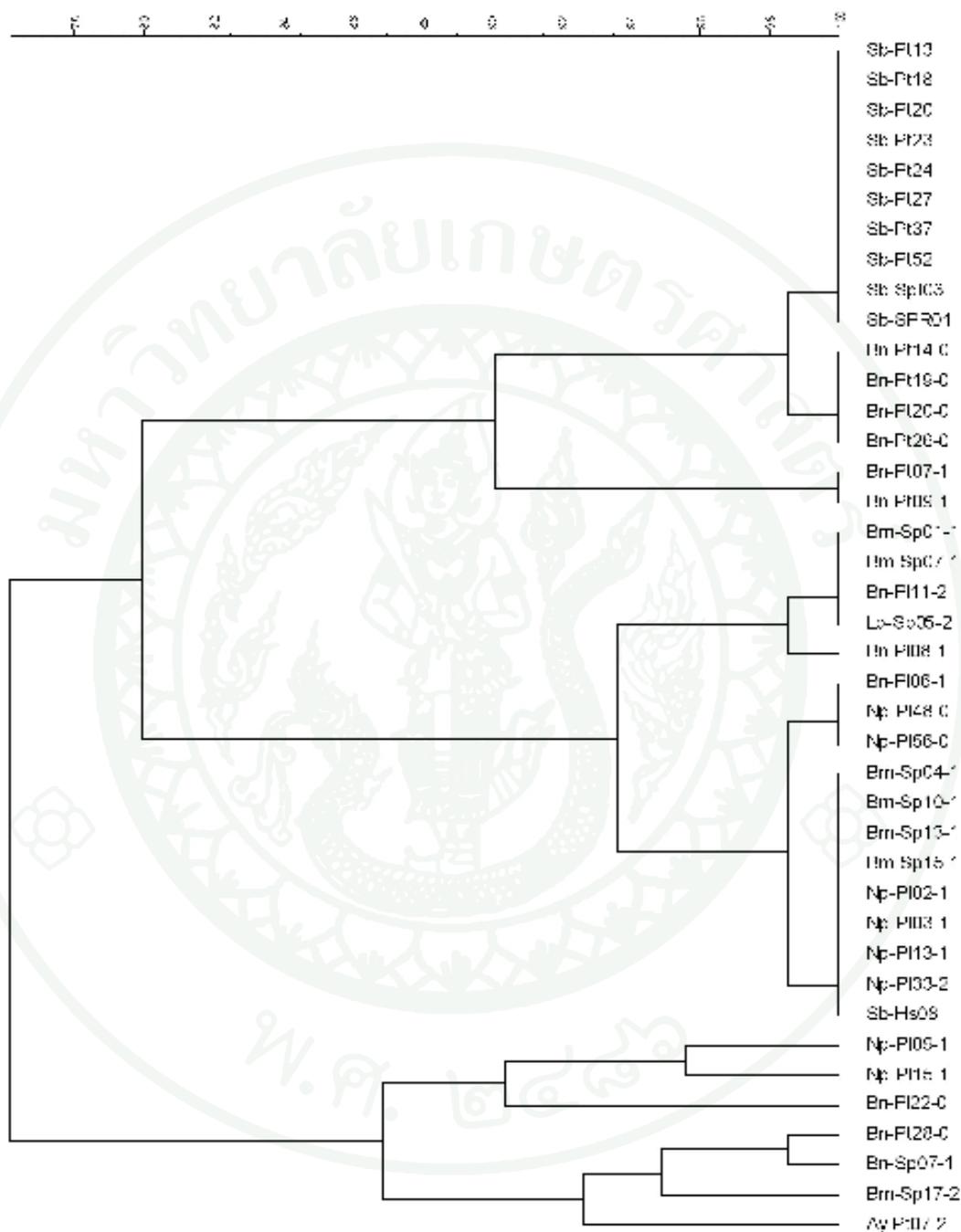
ช่องเจลที่ 2A-15A, 2B-15B, 2C-13C คือ แบคทีเรียตรึง

ไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทน



ภาพที่ 11 ผลผลิต PCR ของยีน *nifH* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ช่องเจลที่ 1A, 1B, 1C, 16A, 16B, 14C คือ ladder 50 bp plus ช่องเจลที่ 2A-15A, 2B-15B, 2C-13C คือ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทน

Scale: 1 ng (0.05% MEK)
RFLP



ภาพที่ 12 Dendrogram การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในโคไฟต์ที่แยก
ได้โดยใช้เทคนิค RFLP-PCR ของยีน *nifH*

6. การระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เรียตรงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ที่แยกได้ระดับดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียตรงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ตัวแทน 14 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค PCR พบว่าแบคทีเรียตรงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ที่แยกได้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งมีขนาดประมาณ 574 คู่เบส จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR วิเคราะห์ลำดับเบส โดยนำลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับเบสของแบคทีเรียตรงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ที่แยกได้ตัวแทน มีความเหมือนกับแบคทีเรียในฐานข้อมูลลำดับเบสของ GenBank พบว่า ไอโซเลต Sb-Pt13 มีความเหมือนกับ *Bradyrhizobium yuanmingense* strain TTB5 78% ไอโซเลต Bn-Pt14-0 มีความเหมือนกับ *Bradyrhizobium* sp. 93% ไอโซเลต Bn-Pt07-1 และ Bn-Pt11-2 มีความเหมือนกับ *Azorhizobium caulinodans* 99% ไอโซเลต Bn-Pt08-1 และ Bn-Pt06-1 มีความเหมือนกับ *Azorhizobium caulinodans* 98% ไอโซเลต Np-Pt02-1 และ Np-Pt09-1 มีความเหมือนกับ Uncultured bacterium 99% ไอโซเลต Np-Pt15-1 มีความเหมือนกับ *Burkholderia cepacia* strain BEB17 94% ไอโซเลต Bn-Pt22-0 มีความเหมือนกับ Uncultured alpha proteobacterium 99% ไอโซเลต Bn-Pt28-0 และ Bn-Sp07-1 มีความเหมือนกับ Uncultured bacterium 99% ไอโซเลต Bm-Sp17-2 มีความเหมือนกับ *Azorhizobium caulinodans* 98% และไอโซเลต Ay-Pt07-2 มีความเหมือนกับ *Burkholderia vietnamiensis* 94% ดังแสดงในตารางที่ 13

7. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

จากข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย ทำให้สามารถจัดกลุ่มของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟท์ที่แยกได้ 14 กลุ่มที่ระดับความคล้ายคลึง 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวแทนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟท์ในแต่ละกลุ่ม มาทำการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยการใช้วิธี acetylene reduction activity assay (Burriss ,1975) พบแบคทีเรียที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.204-1.138 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยการใช้วิธี acetylene reduction activity assay ของแบคทีเรีย *Enterobacter dissolvens*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Pantoea agglomerans* และ *Pseudomonas* spp. ที่แยกได้จากรากข้าวพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 โดยพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 18.34-23,319.17 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อตัวอย่าง (Janpen *et al.*, 2009)

ตารางที่ 13 ชนิดของแบคทีเรียที่เรียงในโตรเจนเอนโคไฟต์ที่แยกได้โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแต่ละไอโซเลต

ลำดับ	รหัส	ชนิดของแบคทีเรียในระดับดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA 5'end (500bp)	%Similarity	
			เปรียบเทียบกับ DNA sequence ใน ฐานข้อมูล	ประสิทธิภาพในการ ตรึงไนโตรเจน (nmol C ₂ H ₄ ·H ⁻¹ ·tube ⁻¹)
1	Sb-Pt13	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> strain TTB5	78	0.619
2	Bn-Pt14-0	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	93	0.956
3	Bn-Pt07-1	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	99	0.470
4	Bn-Pt11-2	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	99	0.537
5	Bn-Pt08-1	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	98	0.245
6	Bn-Pt06-1	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	98	0.819
7	Np-Pt02-1	Uncultured bacterium	99	1.023
8	Np-Pt09-1	Uncultured bacterium	99	0.204
9	Np-Pt15-1	<i>Burkholderia cepacia</i> strain BEB17	94	0.514
10	Bn-Pt22-0	Uncultured alpha proteobacterium	99	0.245
11	Bn-Pt28-0	Uncultured bacterium	99	0.904
12	Bn-Sp07-1	Uncultured bacterium	99	1.138
13	Bm-Sp17-2	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	98	0.658
14	Ay-Pt07-2	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	94	0.156

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณธาตุอาหารหลักของดินตัวแทนที่จะนำมาศึกษา พบว่าดินที่นำมาศึกษามีค่า ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่ำอยู่ในช่วงร้อยละ 0.08-0.21 ปริมาณฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์สูงมากอยู่ในช่วง 43-479 mg kg⁻¹ และ 67-387 mg kg⁻¹ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ สำหรับการแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์จากรากข้าว นั้น พบว่าในแต่ละสายพันธุ์ของแต่ละพันธุ์ข้าวให้จำนวนแบคทีเรียที่แตกต่างกัน

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่พบทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้ในการเจริญได้ และการทดสอบการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ได้เป็น 18 กลุ่มที่ระดับความเหมือนสูงสุด 78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ที่เป็นตัวแทนจากแต่ละกลุ่มจำนวน 50 ไอโซเลต พบการปรากฏของยีน *nifH* 40 ไอโซเลต คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ตัวแทน หลังจากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตัวแทนโดยใช้เทคนิค RFLP ของยีน *nifH* สามารถแบ่งแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟต์ได้เป็น 14 กลุ่มที่ระดับความเหมือนสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และพบแบคทีเรียไอโซเลต Bn-Sp07-1 ซึ่งแยกได้จากรากข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี ที่ปลูกในชุดดินบางเขน มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุดที่ 1.138 นาโนโมลเอทิลีนต่อชั่วโมงต่อตัวอย่าง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2541. **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ อุตตะนันท์. 2550. **ดินที่ใช้ปลูกข้าว**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. **มูลค่าส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร**. แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/oae_website/oae_imex.php , 20 มกราคม 2551.
- Barraquio, W.L., J.K. Ladha and I. Watanabe. 1983. Isolation and identification of N₂- fixing *Pseudomonas* associated with wet land rice. **Can. J. Microbiol.** 29: 867-873.
- _____, L. Revilla and J.K. Ladha. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant Soil.** 194: 15-24.
- Boddey, R.M., O.C. de Oliveira, S. Urquiaga, V.M. Reis, F.L. de Olivares, V.L.D. Baldani and J. Dobreiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant Soil.** 174: 195-209.
- Bohlool, B.B., J.K. Ladha, D.P. Garrity and T. George. 1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture : a perspective. **Plant Soil.** 141: 1-11.
- Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available form of phosphorus in soil. **Soil Sci.** 59: 39-45.
- Burris, R.H. 1975. The acetylene-reduction technique. pp. 249 -258. In W.D.P. Stewart, ed. **Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms**. Cambridge University Press, London.

- Burris, R. H. and P. W. Wilson. 1957. Methods for measurement of nitrogen fixation. pp. 355-367. In S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds. **Methods in Enzymology**. Academic Press, New York.
- Chiarini, L., A. Bevivino, C. Dalmastr, C. Nacamulli and S. Tabacchioni. 1998. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Appl. Soil Ecol.** 8: 11–18.
- De Datta, S.K. and R.J. Buresh. 1989. Integrated nitrogen management in irrigated rice. **Advan. Soil Sci.** 10: 143–169.
- FAOSTAT. 2005. The agricultural production. Available source : <http://faostat.fao.org>, January 21, 2008.
- Garland, J.L. and A.L. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 2351–2359.
- Giller, K.E. and G. Cadisch. 1995. Future benefits from biological nitrogen fixation : an ecological approach to agriculture. **Plant Soil.** 174: 255-277.
- Gomes, N.C.M., H. Heuer, J. SchÖnfeld, R. Costa, L. Medonça-Hagler and K. Smalla. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant Soil.** 232: 167–180.
- Xie, G. H., M. Y. Cai, G. C. Tao and Y. Steinberger. 2003. Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. **Biol. Fertil. Soils.** 37: 29-38.

- Gyaneshwar, P., E. K. James, N. Mathan, P. M. Reddy, B. Reinhold-hurek and J.K. Ladha. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **J. of Bacteriol.** 183: 2634–2645.
- Hallmann, J., R. Rodriguez-Kabana, J. W. Kloepper, A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee and J.W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** 43: 895-914.
- Hossain, M. and K.S. Fischer. 1995. Rice research for food security and sustainable agricultural development in Asia : Achievements and future challenges. **Geo Journal.** 35: 286-295.
- Ibekwe, A.M. and A.C. Kennedy. 1999. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. **Plant Soil.** 206: 151–161.
- Jackson, M.L. 1965. **Soil Chemnical Analysis : Advanced Course.** Department of Soil, University of Wisconsin. Madison.
- James, E.K. and F.L. Olivares. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.** 17: 77–119.
- James, E.K., P. Gyaneshwar, W.L. Barraquio, N. Mathan and J. K. Ladha. 2000. Endophytic diazotrophs associated with rice. pp. 119 -140. *In* J.K. Ladha and P.N. Reddy, eds. **The quest for nitrogen fixation in rice.** IRRI. Makati City. Philippines.
- Jennifer, L.K., L.A. Beaudette., M. Hart., P. Moutoglis., J.N. Klironomos., H. Lee and J.T. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. **J. Microbiol. Methods.** 58: 169– 188.
- van Kammen, A. 1997. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture. *In* A. Legocki, H. Bothe and A. Puhler, eds. **Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture.** Springer. Berlin Heidelberg. New York : 177-178.

- Fisher, K. and W. E. Newton. 2002. Nitrogen Fixation — A General Overview. pp. 1-34. *In* G. J. Leigh, ed. **Nitrogen Fixation at the Millennium**. Elsevier. Amsterdam.
- Kent, A.D. and E.W. Triplett. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere. **Annual. Rev. Microbiol.** 56: 211-236.
- Kiyoshi, H., M. Hayatsu, I. Nioh and H. Nakai. 2001. Comparison of Nitrogen- fixing bacteria flora of rice rhizosphere in the fields treated long – term with agrochemicals and non – agrochemicals. **Micro. Environ.** 16: 155-160.
- Ladha, J.K., G.J.D. Kirk, S. Bennett, P.M. Reddy and U. Singh. 1998. Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved lowland rice germplasm. **Field Crops Res.** 56: 41-72.
- Ladha, J.K. and M.B. Peoples. 1995. Management of biological nitrogen fixation for the development of more productive and sustainable agricultural systems. **Plant Soil.** 174: 1-286.
- Liu, W., T.L. Marsh, H. Cheng and L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4516– 4522.
- Malik, K.A., R. Bila, S. Mehnaz, G. Rasul, M.S. Mirza and S. Ali. 1997. Association of nitrogen -fixing plant promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant Soil.** 194: 37-44.
- Minamisawa, K., K. Nishioka, T. Miyaki, B. Ye, T. Miyamoto, M. You, A. Saito, M.Saito, W.L. Barraquio, N. Teumroong, T. Sein and T. Sato. 2004. Anaerobic Nitrogen-Fixing Consortia Consisting of Clostridia from Gramineous Plants. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 3096-3102.

- Mylona P., K. Pawlowski and T. Bisseling. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. **Plant Cell**. 7: 869-885.
- Muyzer, G., E.C.D. Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 695–700.
- Oyaizu-Masuchi Y. and K. Komagata. 1988. Isolation of free – living nitrogen –fixing bacteria from the rhizosphere of rice. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 34: 127-164.
- Pratt, P.F. 1965. Potassium. pp. 1022-1030. In C.A. Black, ed. **Method of Soil Analysis**. Part II. Agronomy NO. 9. America Society Agronomy Inc. Wisconsin. Madison.
- Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1997. *Azoarcus* spp. and their interactions with grass roots. **Plant Soil**. 194: 57-64.
- Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs : identification, localization, and perspectives to study their function. **Crit. Rev. Plant Sci.** 17: 29–54.
- Reiter, B., Bürgmann, H., Burg, K. and A., Sessitsch. 2003. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. **Can. J. Microbiol.** 49:549-555.
- Roger, P.A. and J.K. Ladha. 1992. Biological N₂ fixation in wetland rice fields : Estimation and contribution to nitrogen balance. **Plant Soil**. 141: 41-55.
- Roling, W.F.M., B.M. van-Breukelen, M. Braster, M.T. Goeltom and J. Groen. 2000. Analysis of microbial communities in a landfill leachate polluted aquifer using a new method for anaerobic physiological profiling and 16S rDNA based fingerprinting. **Microb. Ecol.** 40: 177–188.

- Sessitsch, A., B. Reiter, U. Pfeifer and E. Wilhelm. 2001. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiol. Ecol.** 1305: 1-10.
- Siciliano, S.D., C.M. Theoret, J.R. de Freitas, P.J. Huci and J.J. Germida. 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. **Can. J. Microbiol.** 44: 844-851.
- Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer and G. Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 4742-4751.
- Smit, E., P. Leeflang, S. Gommans, J. van den Broek, S. van Mil and K. Wernars. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a weath field as determined by cultivation and molecular methods. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 2284-2291.
- Spigaglia, P. and P. Mastrantonio. 2003. Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. **J. Clinical. Microbiol.** 41: 2454-2457.
- Sturz, A.V., B.R. Christie, B.G. Matheson, W.J. Arsenault and N.A. Buchanan. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Patho.** 48: 360-369.
- Sylvia, D.M., J. J. Fuhrmann, P.G. Hartel and D.A. Zuberer. 2007. **Principles and applications of soil microbiology**, 2nd ed. Pearson-Prentice Hall. Upper Saddle River. NJ.
- Theron, J. and T.E. Cloete. 2000. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Crit. Rev. Microbiol.** 26: 37- 57.

- Tiedje, J.M., S. Asuming-Brempong, K. Nusslein, T.L. Marsh and S.J. Flynn. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. **Appl. Soil Ecol.** 13: 109– 122.
- Torsvik, V., R. Sorheim and J. Goksoyr. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. **J. Ind. Microbiol.** 17: 170–178.
- Torsvik, V., F.L. Daae, R. Sandaa and L. Ovreas. 1998. Reviewarticle: novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **J. Biotechnol.** 64: 53–62.
- Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro and T. Matsuguchi. 1995a. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **J. Bact.** 177: 1414-1417.
- Ueda T, Y. Suga, N. Yahiro and T. Matsuguchi. 1995b. Genetic diversity of N₂ fixing bacteria associated with rice roots by molecular evolutionary an alysis of *nifD* library. **Can. J. Microbiol.** 41: 235-240.
- Vance, C.P. 1997. Enhanced agricultural sustainability through biological nitrogen fixation. pp. 179-186. *In* A. Legocki, H. Bothe and A.Puhler, eds. **Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture.** Springer Berlin Heidelberg. New York.
- Waggoner, P. E. 1994. **How Much Land Can Ten Billion People Spare for Nature?** Council for Agricultural Science and Technology. Ames. IA.
- Yoshida, S. 1981. **Fundamentals of Rice Crop Science.** International Rice Research Institute. LosBaños,Philippines.



ตารางผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของอาหาร N-free solid malate-glucose medium (NFMM)

สารเคมี	ปริมาณ
glucose	10.0 กรัม
L-malic acid	5.0 กรัม
MgSO ₄ ·H ₂ O	0.2 กรัม
FeCl ₃	0.01 กรัม
NaCl	0.1 กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 กรัม
K ₂ HPO ₄	0.1 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.4 กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0.002 กรัม
0.5%Bromothymolblue	5.0 มิลลิลิตร
Agar	18.0 กรัม

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Guang *et. al.* (2003)

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ด้วย 1 N NaOH แล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C 20 นาที

ตารางผนวกที่ 2 ส่วนประกอบของอาหาร N-free malate medium (Nfb)

สารเคมี	ปริมาณ	
malic acid	5.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
CaCl ₂	0.02	กรัม
trace-element solution	2.0	มิลลิลิตร
1.64 % FeEDTA	4.0	มิลลิลิตร
vitamin solution	1.0	มิลลิลิตร
agar	17.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.8 ด้วย 1 N NaOH แล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C 20 นาที

หมายเหตุ trace-element solution ประกอบด้วย Na₂MoO₄·2H₂O 200 มิลลิกรัม MnSO₄·H₂O 235 มิลลิกรัม H₃BO₃ 280 มิลลิกรัม CuSO₄·5H₂O 8 มิลลิกรัม ZnSO₄·7H₂O 24 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร และ vitamin solution ประกอบด้วย biotin 10 มิลลิกรัมและ pyridoxine 20 มิลลิกรัม, เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 3 ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาดิน

ระดับ (rating)	พิสัย (range)
เป็นกรดรุนแรงมากที่สุด (ultra acid)	<3.5
เป็นกรดรุนแรงมาก(extremely acid)	3.5-4.5
เป็นกรดจัดมาก(strongly acid)	4.5-5.0
เป็นกรดจัด(strongly acid)	5.1-5.5
เป็นกรดปานกลาง(moderately acid)	5.6-6.0
เป็นกรดเล็กน้อย(slightly acid)	6.1-6.5
เป็นกลาง(neutral)	6.6-7.3
เป็นด่างเล็กน้อย(slightly alkaline)	7.4-7.8
เป็นด่างปานกลาง(moderately alkaline)	7.9-8.4
เป็นด่างจัด(strongly alkaline)	8.5-9.0
เป็นด่างจัดมาก(very strongly alkaline)	>9.0

ที่มา: คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2541)

ตารางผนวกที่ 4 การจัดระดับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%)

ระดับ (rating)	พิสัย (%)
ต่ำมาก(VL)	<0.1
ต่ำ(L)	0.1-0.2
ปานกลาง(M)	0.2-0.5
สูง(H)	0.5-0.75
สูงมาก(VH)	>0.75

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 5 การจัดระดับปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์(Available P) (Bray II)

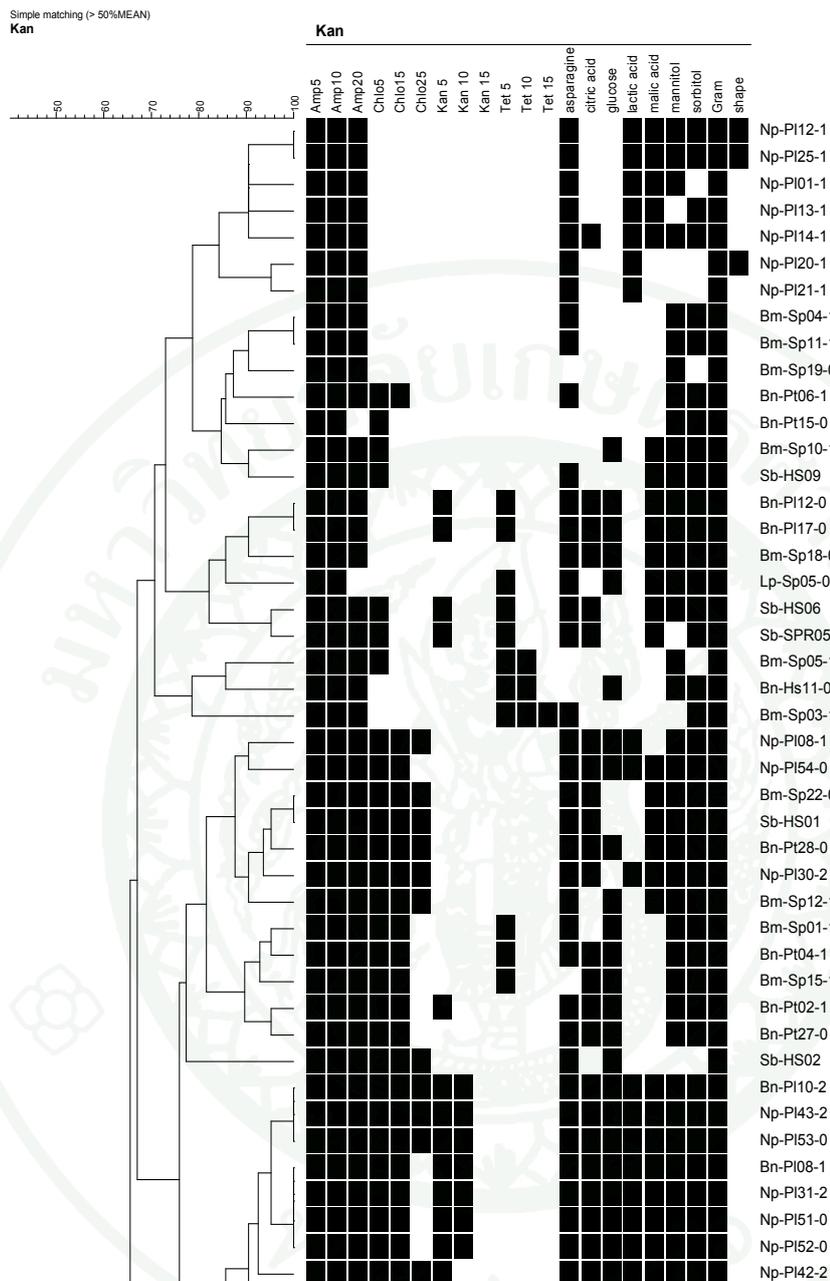
ระดับ (rating)	พิสัย (mg/kg)
ต่ำมาก(VL)	<3
ต่ำ(L)	3-5
ค่อนข้างต่ำ(ML)	6-10
ปานกลาง(M)	11-15
ค่อนข้างสูง(MH)	16-25
สูง(H)	26-45
สูงมาก(VH)	>45

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

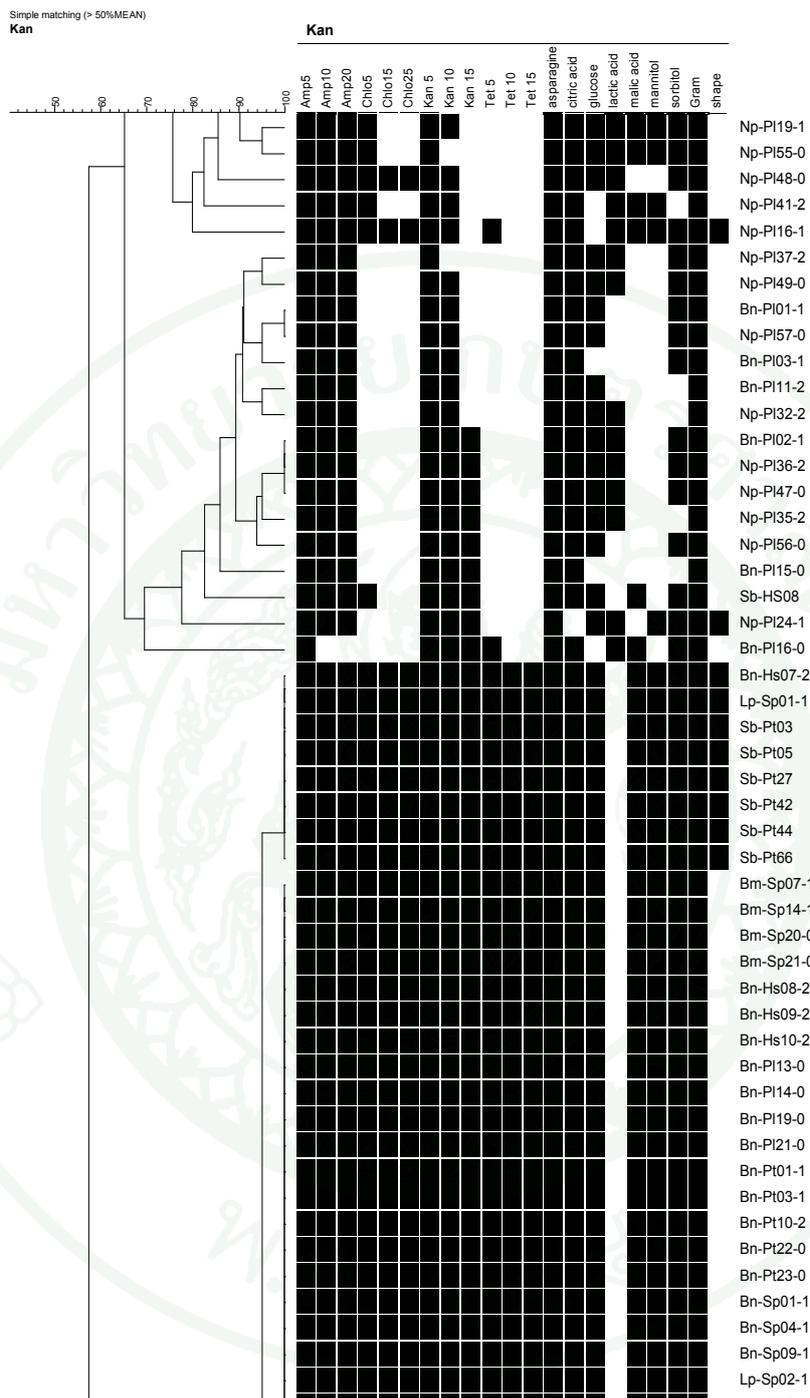
ตารางผนวกที่ 6 การจัดระดับปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์(Available K)(NH₄OAc)

ระดับ (rating)	พืช (mg/kg)
ต่ำมาก(VL)	<30
ต่ำ(L)	30-60
ปานกลาง(M)	60-90
สูง(H)	91-120
สูงมาก(VH)	>120

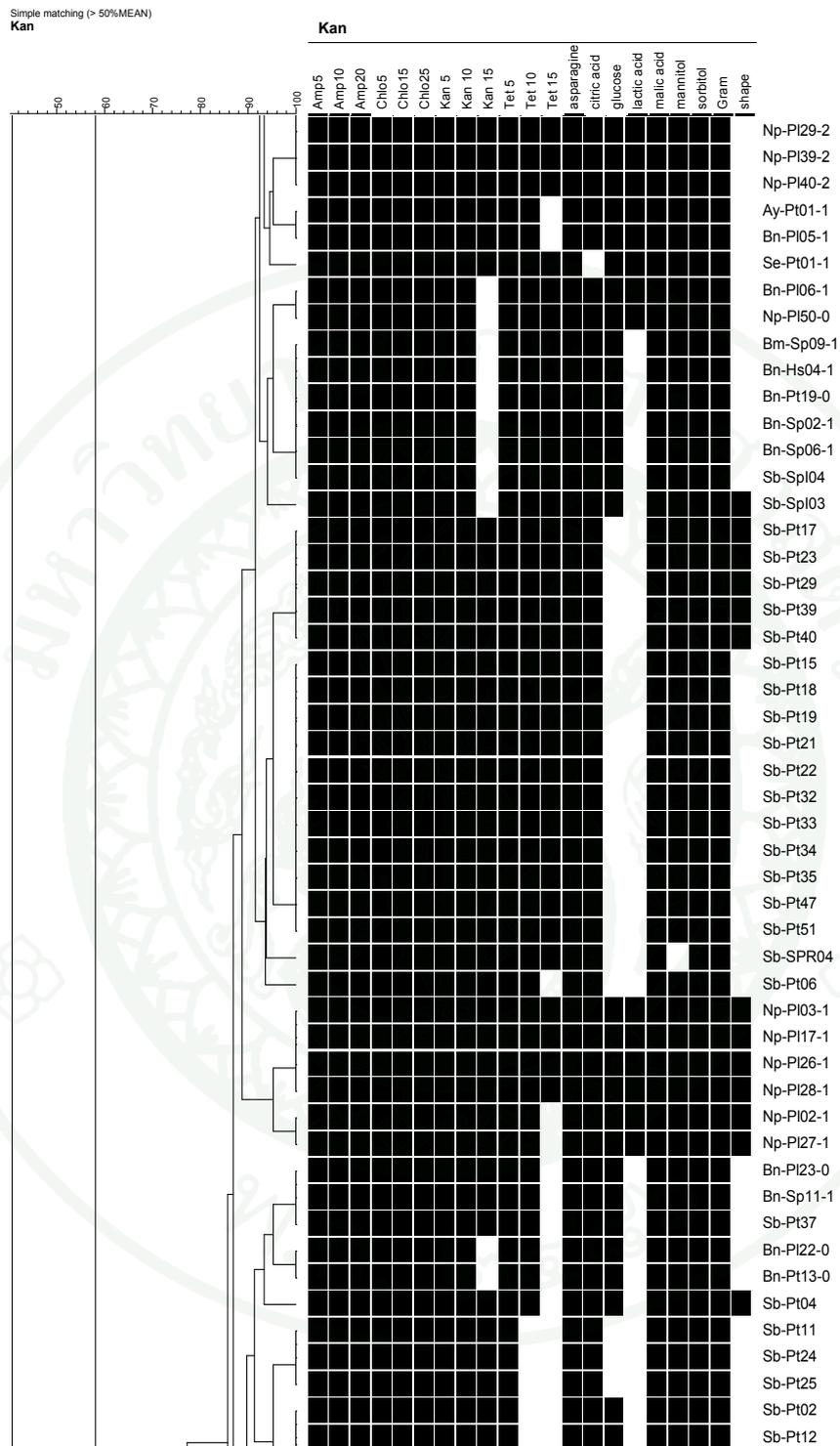
ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)



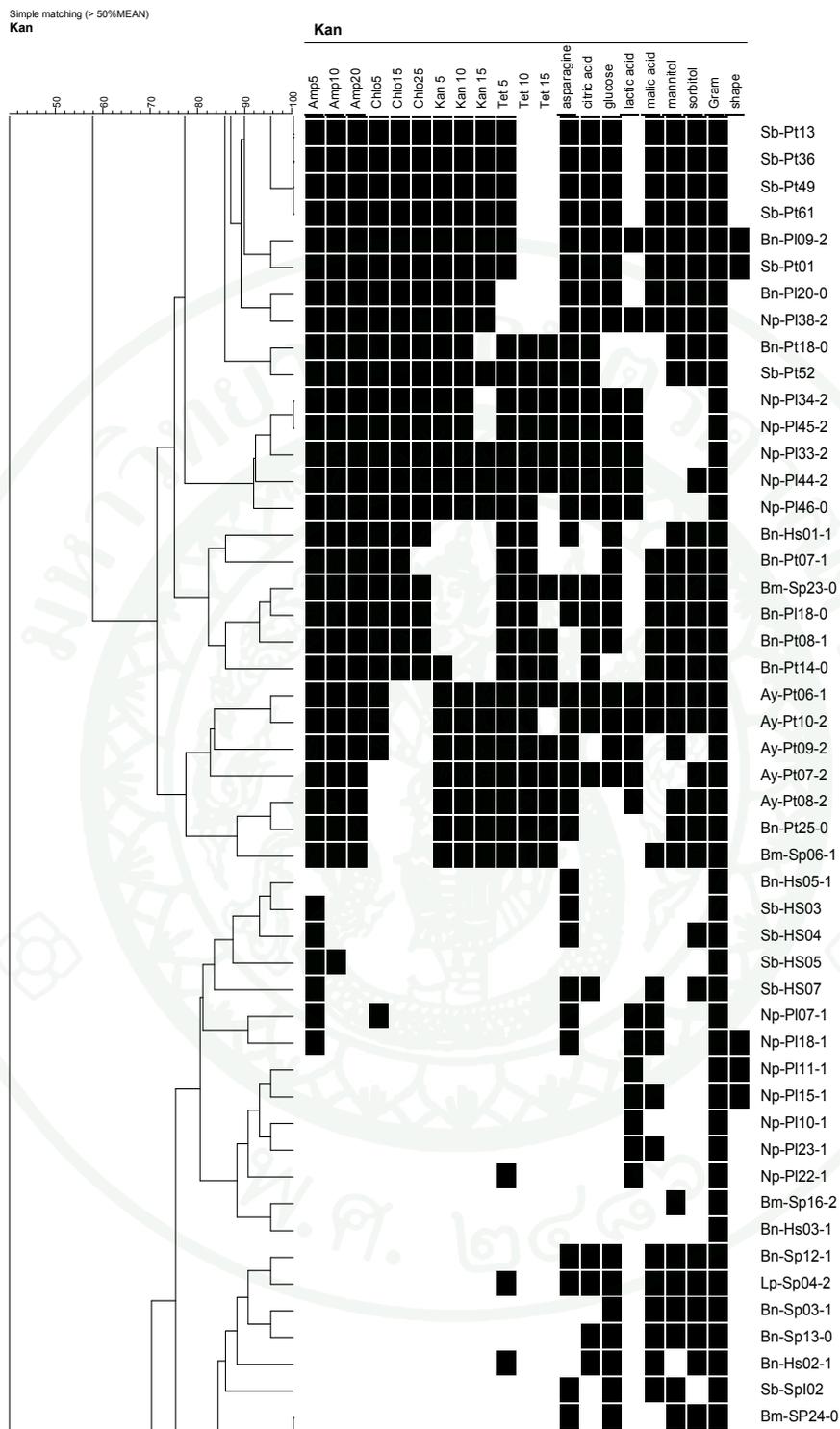
ภาพผนวกที่ 1 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโคไฟต์ที่แยกได้อย่างละเอียด



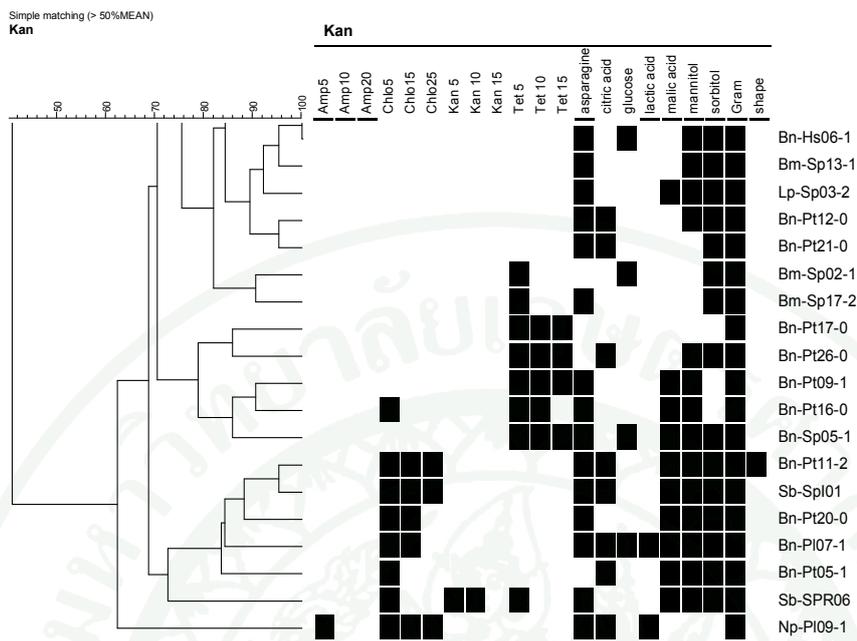
ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)



ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)



ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)



ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

Azorhizobium caulinodans ORS 571 DNA, complete genome

Length=5369772

Score = 1026 bits (555), Expect = 0.0

Identities = 562/565 (99%), Gaps = 2/565 (0%)

Strand=Plus/Plus

Bn-Pt07	18	GGAGC-TGTGGTTT-ATTCTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGG	75
<i>A. caulinodans</i>	681389	GGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGG	681448
Bn-Pt07	76	ACGACTTCCGGAGACGGATTCTTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTG	135
<i>A. caulinodans</i>	681449	ACGACTTCCGGAGACGGATTCTTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTG	681508
Bn-Pt07	136	TCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTT	195
<i>A. caulinodans</i>	681509	TCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTT	681568
Bn-Pt07	196	TAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACCTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAG	255
<i>A. caulinodans</i>	681569	TAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACCTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAG	681628
Bn-Pt07	256	GTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGTACAATG	315
<i>A. caulinodans</i>	681629	GTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGTACAATG	681688
Bn-Pt07	316	GCGGTGACAAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAATCTCCAAAAGCCGCTCAGTT	375
<i>A. caulinodans</i>	681689	GCGGTGACAAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAATCTCCAAAAGCCGCTCAGTT	681748
Bn-Pt07	376	CGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAAC	435
<i>A. caulinodans</i>	681749	CGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAAC	681808
Bn-Pt07	436	ATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTG	495
<i>A. caulinodans</i>	681809	ATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTG	681868
Bn-Pt07	496	GCTTTACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGTG	555
<i>A. caulinodans</i>	681869	GCTTTACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGTG	681928
Bn-Pt07	556	ACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA	580
<i>A. caulinodans</i>	681929	ACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA	681953

ภาพผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้รหัส Bn-Pt07-1 กับ *Azorhizobium caulinodans*

Azorhizobium caulinodans ORS 571 DNA, complete genome

Length=5369772

Score = 1009 bits (546), Expect = 0.0

Identities = 551/553 (99%), Gaps = 2/553 (0%)

Strand=Plus/Plus

Bn-P111	19	ATGTGG-TT-ATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGGACGAC	76
<i>A. caulinodans</i>	681394	ATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGGACGAC	681453
Bn-P111	77	TTCCGGAGACGGATTTCTTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC	136
<i>A. caulinodans</i>	681454	TTCCGGAGACGGATTTCTTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC	681513
Bn-P111	137	AGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTTTAGTT	196
<i>A. caulinodans</i>	681514	AGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTTTAGTT	681573
Bn-P111	197	GCCATCATTACAGTTGGGCACTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGG	256
<i>A. caulinodans</i>	681574	GCCATCATTACAGTTGGGCACTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGG	681633
Bn-P111	257	GATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGT	316
<i>A. caulinodans</i>	681634	GATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGT	681693
Bn-P111	317	GACAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGAT	376
<i>A. caulinodans</i>	681694	GACAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGAT	681753
Bn-P111	377	TGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCC	436
<i>A. caulinodans</i>	681754	TGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCC	681813
Bn-P111	437	ACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTT	496
<i>A. caulinodans</i>	681814	ACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTT	681873
Bn-P111	497	ACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGTACTGG	556
<i>A. caulinodans</i>	681874	ACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGTACTGG	681933
Bn-P111	557	GGTGAAGTCGTAA 569	
<i>A. caulinodans</i>	681934	GGTGAAGTCGTAA 681946	

ภาพผนวกที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้รหัส

Bn-P111-2 กับ *Azorhizobium caulinodans*

Azorhizobium caulinodans ORS 571 DNA, complete genome

Length=5369772

Score = 987 bits (534), Expect = 0.0

Identities = 555/564 (98%), Gaps = 5/564 (0%)

Strand=Plus/Plus

Bn-P108	15	AGCATGTGG-AT-ATTCG-AGC-ACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGGAC	70
<i>A. caulinodans</i>	681391	AGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGGAC	681450
Bn-P108	71	GACTTCCGAAAACGGATTCTTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTC	130
<i>A. caulinodans</i>		GACTTCCGGAGACGGATTCTTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTC	681510
Bn-P108	131	GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTTTA	190
<i>A. caulinodans</i>	681511	GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTTTA	681570
Bn-P108	191	GTTGCCATCATTAGTGGGCACTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGT	250
<i>A. caulinodans</i>	681571	GTTGCCATCATTAGTGGGCACTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGT	681630
Bn-P108	251	GGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGGC	310
<i>A. caulinodans</i>	681631	GGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGGC	681690
Bn-P108	311	GGTGACAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCG	370
<i>A. caulinodans</i>	681691	GGTGACAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCG	681750
Bn-P108	371	GATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAACAT	430
<i>A. caulinodans</i>	681751	GATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAACAT	681810
Bn-P108	431	GCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGC	490
<i>A. caulinodans</i>	681811	GCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGC	681870
Bn-P108	491	TTTACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGTGAC	550
<i>A. caulinodans</i>	681871	TTTACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGTGAC	681930
Bn-P108	551	TGGGGTGAAGTCGTAACAAAGGTA	574
<i>A. caulinodans</i>	681931	TGGGGTGAAGTCGTAACAA-GGTA	681953

ภาพผนวกที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้รหัส

Bn-P108-1 กับ *Azorhizobium caulinodans*

Azorhizobium caulinodans ORS 571 DNA, complete genome

Score = 965 bits (522), Expect = 0.0

Identities = 542/551 (98%), Gaps = 3/551 (0%)

Strand=Plus/Plus

Bn-P106	12	GGA-CATGTGGATT-ATTCGATGC-ACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGG	68
<i>A. caulinodans</i>	681389	GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGG	681448
Bn-P106	69	ACGACTTCCGAAACGGATTTCCTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTG	128
<i>A. caulinodans</i>	681449	ACGACTTCCGAGACGGATTTCCTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTG	681508
Bn-P106	129	TCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTT	188
<i>A. caulinodans</i>	681509	TCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTT	681568
Bn-P106	189	TAGTTGCCATCATTCAAGTTGGGCACTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAG	248
<i>A. caulinodans</i>	681569	TAGTTGCCATCATTCAAGTTGGGCACTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAG	681628
Bn-P106	249	GTGGGGATGACGTCAAGTCCTCGTGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATG	308
<i>A. caulinodans</i>	681629	GTGGGGATGACGTCAAGTCCTCGTGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATG	681688
Bn-P106	309	GCGGTGACAAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAACTCCAAAAGCCGTCTCAGTT	368
<i>A. caulinodans</i>	681689	GCGGTGACAAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAACTCCAAAAGCCGTCTCAGTT	681748
Bn-P106	369	CGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAAC	428
<i>A. caulinodans</i>	681749	CGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGC	681808
Bn-P106	429	ATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTG	488
<i>A. caulinodans</i>	681809	ATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTG	681868
Bn-P106	489	GCTTTACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCAGGTAGGGTCAGTG	548
<i>A. caulinodans</i>	681869	GCTTTACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCAGGTAGGGTCAGTG	681928
Bn-P106	549	ACTGGGGTGAA 559	
<i>A. caulinodans</i>	681929	ACTGGGGTGAA 681939	

ภาพผนวกที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้รหัส

Bn-P106-1 กับ *Azorhizobium caulinodans*

Burkholderia cepacia strain BEB17 16S ribosomal RNA gene, partial

Length=726

Score = 481 bits (260), Expect = 3e-132

Identities = 293/309 (94%), Gaps = 2/309 (0%)

Strand=Plus/Plus

Np-P115	257	TCATGGGCTTTAT-GGTGAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGATGGTTGCC	315
<i>B. cepacia</i>	418	TCATGGCCCTTATGGGT-AGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCC	476
Np-P115	316	AGCCTGCGAGTGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCCTACTCCGGATTGCATTCTGCAAC	375
<i>B. cepacia</i>	477	AACCCGCGAGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACCTCTGCAAC	536
Np-P115	376	TCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCATCCTGCCGCGGTGAATACGT	435
<i>B. cepacia</i>	537	TCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT	596
Np-P115	436	TCCCGGGTCTTGTACACGCCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTACCAGAAGTGGCT	495
<i>B. cepacia</i>	597	TCCCGGGTCTTGTACACGCCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTACCAGAAGTGGCT	656
Np-P115	496	AGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATTTCGACTGGGGTGAAGTCGTAA	555
<i>B. cepacia</i>	657	AGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATTTCGACTGGGGTGAAGTCGTAA	716
Np-P115	556	CAAGGTAAC 564	
<i>B. cepacia</i>	717	CAAGGTAAC 725	

ภาพผนวกที่ 8 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้รหัส

Np-P115-1 กับ *Burkholderia cepacia* strain BEB17

Azorhizobium caulinodans ORS 571 DNA, complete genome

Length=5369772

Score = 1005 bits (544), Expect = 0.0

Identities = 549/551 (99%), Gaps = 2/551 (0%)

Strand=Plus/Plus

Bm-Sp17	14	CATGTGG-TT-ATTCTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGGACGA	71
<i>A. caulinodans</i>	681393	CATGTGGTTAATTCTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGGACGA	681452
Bm-Sp17	72	CTTCCGGAGACGGATTCTTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	131
<i>A. caulinodans</i>	681453	CTTCCGGAGACGGATTCTTCCAGCAATGGACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT	681512
Bm-Sp17	132	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGT	191
<i>A. caulinodans</i>	681513	CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGT	681572
Bm-Sp17	192	TGCCATCATTTCAGTTGGGCACTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGG	251
<i>A. caulinodans</i>	681573	TGCCATCATTTCAGTTGGGCACTCTAAAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGG	681632
Bm-Sp17	252	GGATGACGTC AAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGG	311
<i>A. caulinodans</i>	681633	GGATGACGTC AAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGG	681692
Bm-Sp17	312	TGACAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA	371
<i>A. caulinodans</i>	681693	TGACAATGGGATGCGAGCCTGCGAGGGTGAGCAAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA	681752
Bm-Sp17	372	TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGC	431
<i>A. caulinodans</i>	681753	TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGC	681812
Bm-Sp17	432	CACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGCTT	491
<i>A. caulinodans</i>	681813	CACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGCTT	681872
Bm-Sp17	492	TACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCAGCCACGGTAGGGTCAGTGACTG	551
<i>A. caulinodans</i>	681873	TACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCAGCCACGGTAGGGTCAGTGACTG	681932
Bm-Sp17	552	GGGTGAAGTCG 562	
<i>A. caulinodans</i>	681933	GGGTGAAGTCG 681943	

ภาพผนวกที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้รหัส

Bm-Sp17-2 กับ *Azorhizobium caulinodans*

Burkholderia vietnamiensis G4 chromosome 1, complete sequence

Length=3652814

Score = 992 bits (537), Expect = 0.0

Identities = 544/547 (99%), Gaps = 2/547 (0%)

Strand=Plus/Minus

Ay-Pt07	15	AATTCATTG-AACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCCGAAGAGA	73
<i>B. vietnamiensis</i>	2560835	AATTCGA-TGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCCGAAGAGA	2560777
Ay-Pt07	74	TTCGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	133
<i>B. vietnamiensis</i>	2560776	TTCGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	2560717
Ay-Pt07	134	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCA	193
<i>B. vietnamiensis</i>	2560716	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCA	2560657
Ay-Pt07	194	AGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTC	253
<i>B. vietnamiensis</i>	2560656	AGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTC	2560597
Ay-Pt07	254	CTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCC	313
<i>B. vietnamiensis</i>	2560596	CTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCC	2560537
Ay-Pt07	314	AACCCGCGAGGGGAGCTAATCCCAGAAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAAC	373
<i>B. vietnamiensis</i>	2560536	AACCCGCGAGGGGAGCTAATCCCAGAAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAAC	2560477
Ay-Pt07	374	TCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGT	433
<i>B. vietnamiensis</i>	2560476	TCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGT	2560417
Ay-Pt07	434	TCCCGGTCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTACCAGAAGTGGCT	493
<i>B. vietnamiensis</i>	2560416	TCCCGGTCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTACCAGAAGTGGCT	2560357
Ay-Pt07	494	AGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAA	553
<i>B. vietnamiensis</i>	2560356	AGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAA	2560297
Ay-Pt07	554	CAAGGTA 560	
<i>B. vietnamiensis</i>	2560296	CAAGGTA 2560290	

ภาพผนวกที่ 10 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้รหัส

Ay-Pt07-2 กับ *Burkholderia vietnamiensis*

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเบญจมาศ รสโสภา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	14 มีนาคม 2528
สถานที่เกิด	ราชบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เคมีการเกษตร) เกียรตินิยมอันดับ 1 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2549
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) ทุนโครงการความร่วมมือในการแลกเปลี่ยนนิสิตระดับปริญญาโท ระหว่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และ Louisiana State University ประเทศสหรัฐอเมริกา (KU-LSU Internship Program 2009)