

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาการคัดแยกไรโซแบคทีเรีย

การศึกษากการคัดแยกไรโซแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันฝรั่งที่เก็บจากพื้นที่ปลูกมันฝรั่งที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม ในเขตพื้นที่อำเภอพบพระ จังหวัดตาก ขนาดพื้นที่ 400 เมตร x 400 เมตร (ภาพที่ 4.1) โดยการเก็บตัวอย่างจากดินรอบรากมันฝรั่ง ทั้งสิ้น 365 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4.2) นำมาคัดแยกไรโซแบคทีเรียรอบรากพืชที่มีศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชได้แก่ phosphate solubilization assay, Siderophore production และ Protease activity ผลการศึกษาพบว่า สามารถคัดแยกไรโซแบคทีเรียที่มีศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลท



ภาพที่ 4.1 พื้นที่แปลงปลูกมันฝรั่งที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม อำเภอพบพระ จังหวัดตากที่คณะผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างดินรอบรากมันฝรั่ง เพื่อนำมาคัดแยกไรโซแบคทีเรีย

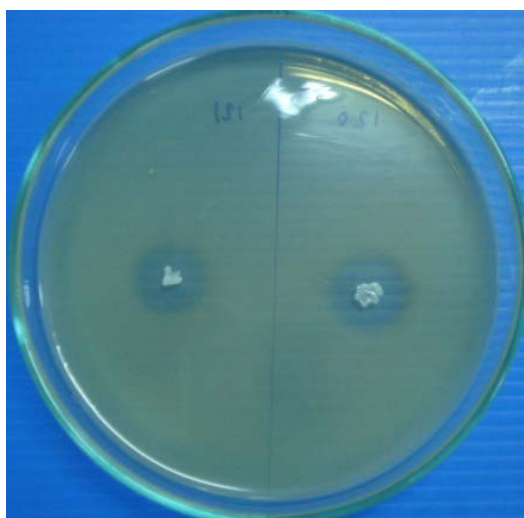


ภาพที่ 4.2 ลงพื้นที่เก็บตัวอย่างจากดินรอบรากมันฝรั่ง อำเภอพบพระ จังหวัดตาก

2. ผลการทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช

2.1 Phosphate solubilization assay

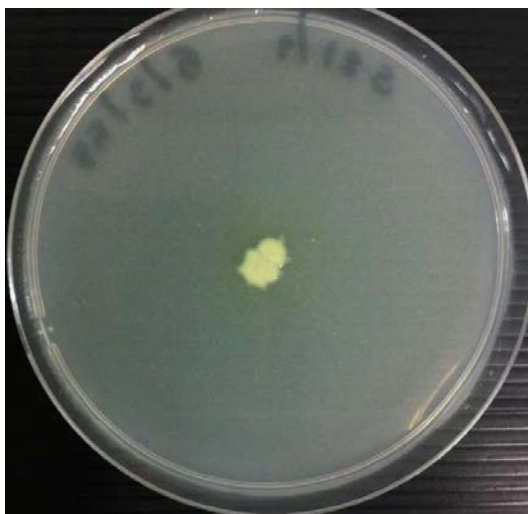
การศึกษาคูณสมบัติ phosphate solubilizer ของแบคทีเรียรอบรากพืช โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันฝรั่ง มาเพาะเลี้ยงเชื้อโดย spot เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติ phosphate solubilizer ซึ่งจะให้โคโลนีที่มี halo zone รอบโคโลนี พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันฝรั่งทั้งหมด 60 ไอโซเลท ที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนี ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ลักษณะ halo zone รอบโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
modified Pikovskaya agar

2.2 Siderophore production

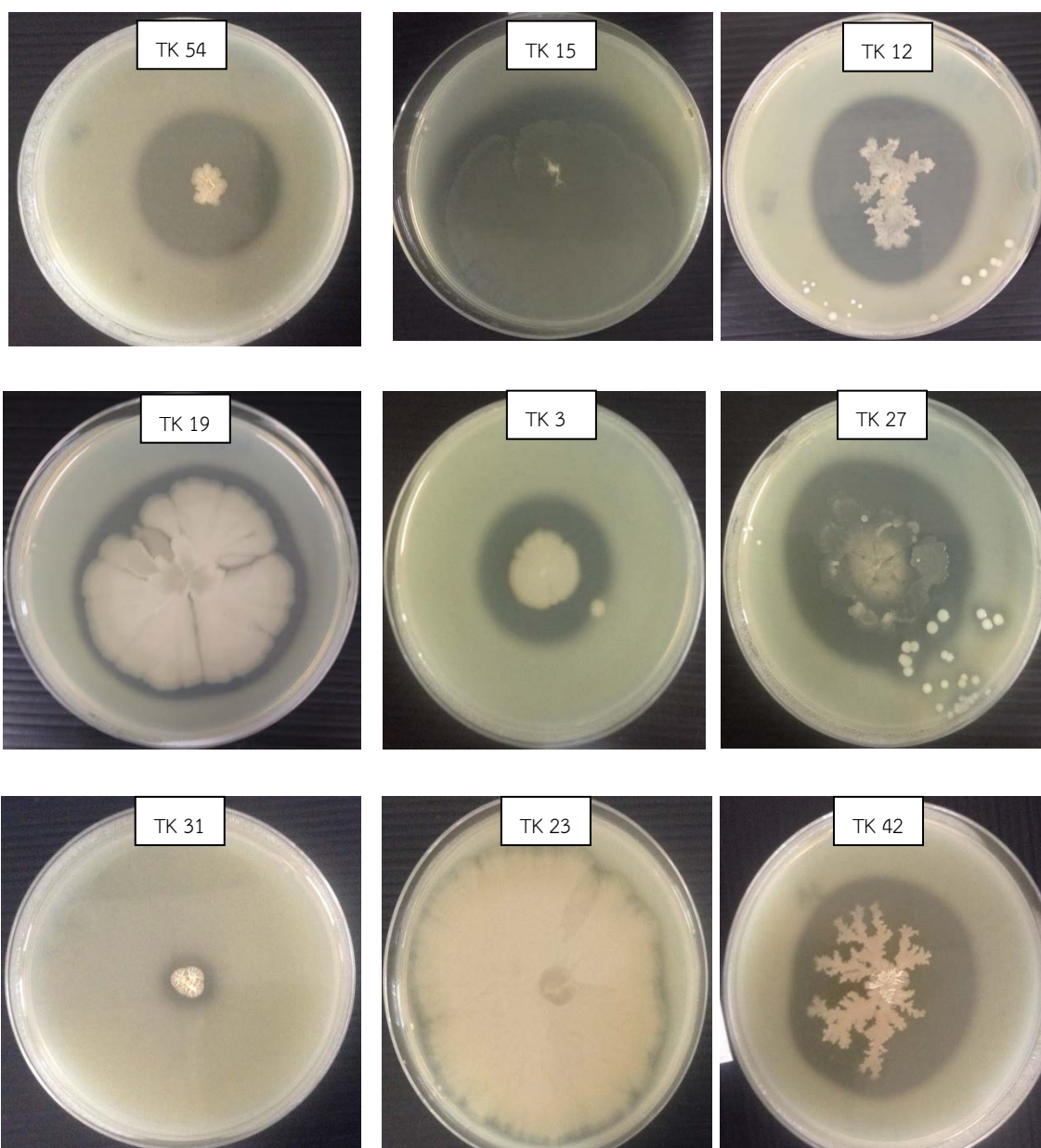
การศึกษาคุณสมบัติ phosphate solubilizer ของแบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันฝรั่ง มาเพาะเลี้ยงเชื้อโดย spot เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เลือกโคโลนีที่ให้สีเหลือง-ส้มรอบๆ โคโลนี พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันฝรั่งทั้งหมด 60 ไอโซเลท สามารถสร้าง siderophore โดยให้โคโลนีที่มีสีเหลือง-ส้ม ดังภาพที่ 4.4



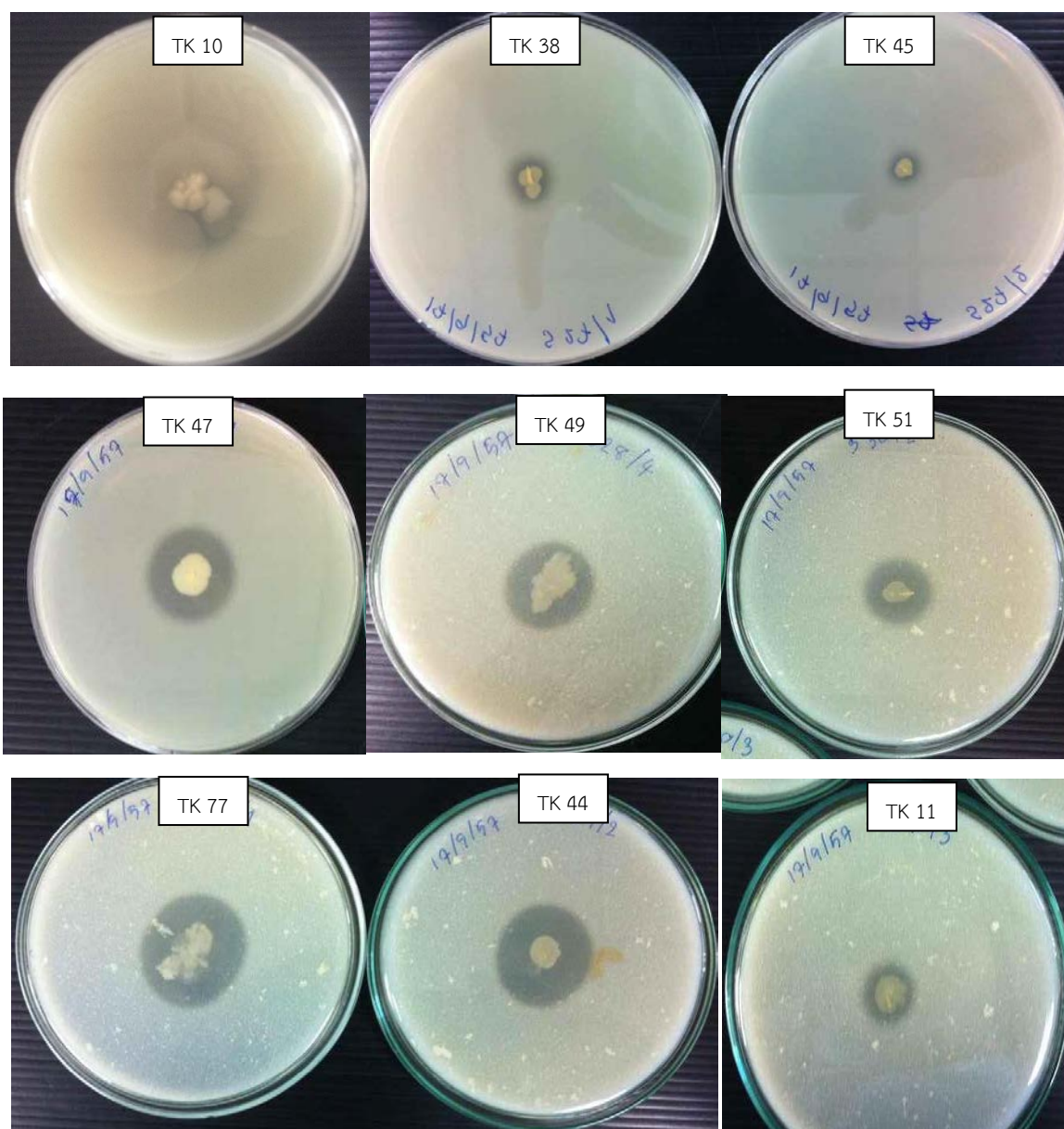
ภาพที่ 4.4 โคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง siderophore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar

2.3 Protease activity

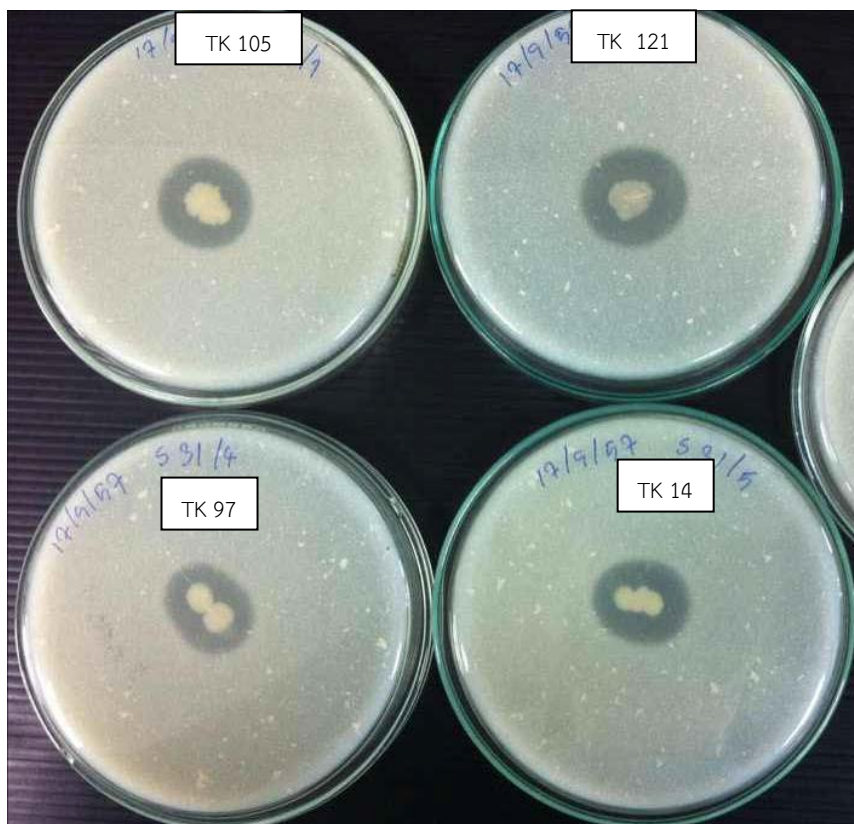
การศึกษาคณะสมบัติการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสโดยนำแบคทีเรียที่แยกจากดินบริเวณรอบรากมันฝรั่งมาทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดย spot เชื้อลงบนอาหาร skimmed milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เลือกโคโลนีที่ให้โซนใสรอบๆ โคโลนีพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันฝรั่งทั้งหมด 60 ไอโซเลท มีเพียง 22 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยจะพบโซนใสรอบๆ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skimmed milk agar แบคทีเรียทั้ง 22 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท TK54 TK15 TK12 TK19 TK3 TK27 TK31 TK23 TK42 TK10 TK38 TK45 TK47 TK49 TK51 TK77 TK44 TK11 TK105 TK121 TK97 และ TK14 ดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ให้ลักษณะโซนใสรอบๆ โคโลนี
บนอาหาร skimmed milk agar



ภาพที่ 4.5 แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ให้ลักษณะโซนใสรอบๆ โคโลนีบน
อาหาร skimmed milk agar (ต่อ)

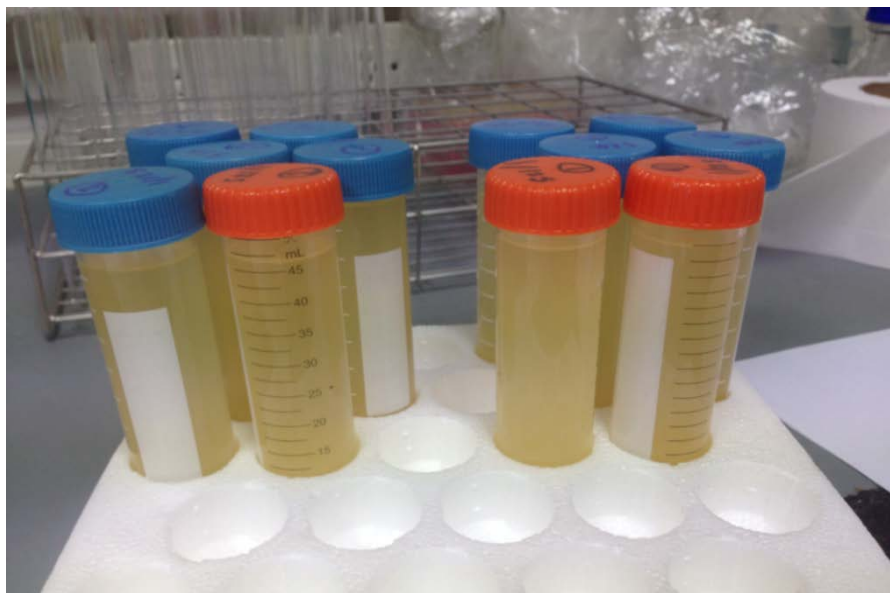


ภาพที่ 4.5 แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ให้ลักษณะโซนใสรอบๆ โคโลนีบน
อาหาร skimmed milk agar (ต่อ)

3. ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจากไรโซแบคทีเรีย

นำไรโซแบคทีเรีย 22 ไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (yeast, peptone, glucose) บ่มโดยใช้เครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 220 RPM ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 3 วัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8500 x g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่มี extracellular enzyme (ภาพที่ 4.6) มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสโดยบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.7) พบว่า ไรโซแบคทีเรียไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุด คือ TK10 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่ 182.08 Uml⁻¹ รองลงมาคือไอโซเลทที่ TK23 และ TK15 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่

159.16 และ 157.08 Uml^{-1} ตามลำดับ ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสแสดงในตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.6 เอนไซม์โปรตีเอสที่หลั่งออกมาจากเซลล์แบคทีเรีย



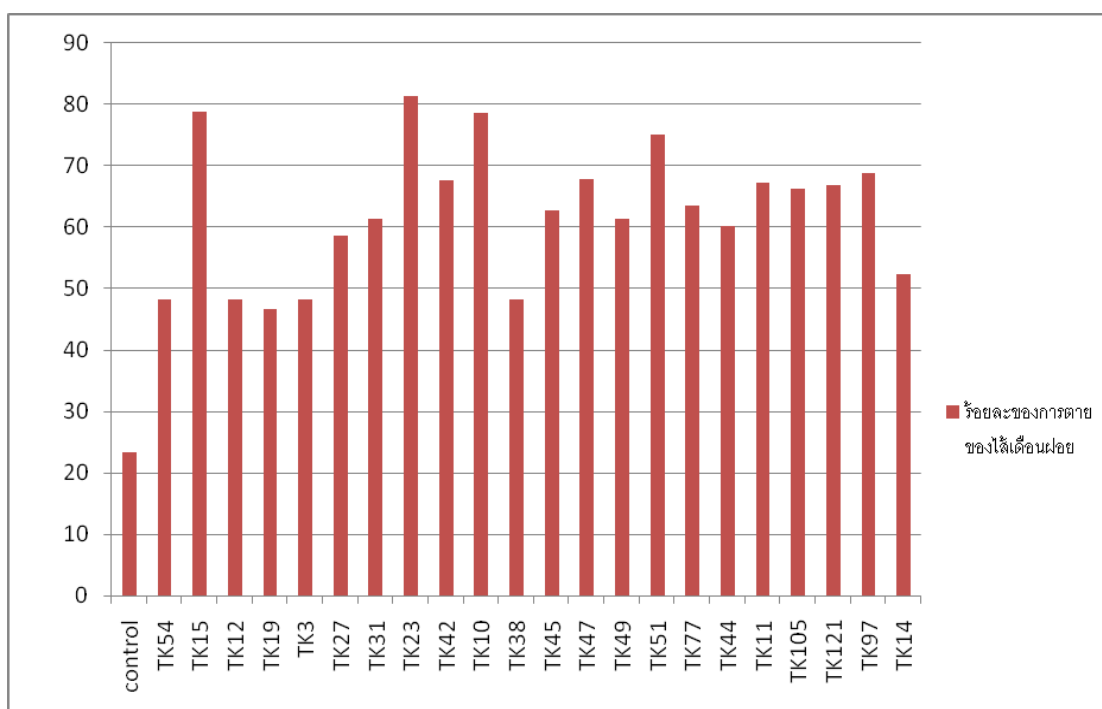
ภาพที่ 4.7 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

ตารางที่ 4.1 ความสามารถของเอนไซม์โปรตีเอสในการย่อยสลายเคซีน เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	OD. 660 nm	Slop	Uml ⁻¹
1	control	0.019	0.01	7.92
2	TK54	0.213	0.01	88.75
3	TK15	0.377	0.01	157.08
4	TK12	0.213	0.01	88.75
5	TK19	0.195	0.01	81.25
6	TK3	0.213	0.01	88.75
7	TK27	0.264	0.01	110.00
8	TK31	0.303	0.01	126.25
9	TK23	0.382	0.01	159.16
10	TK42	0.320	0.01	133.33
11	TK10	0.437	0.01	182.08
12	TK38	0.369	0.01	153.75
13	TK45	0.232	0.01	96.66
14	TK47	0.282	0.01	117.49
15	TK49	0.321	0.01	133.74
16	TK51	0.303	0.01	126.24
17	TK77	0.358	0.01	149.16
18	TK44	0.283	0.01	117.91
19	TK11	0.297	0.01	123.74
20	TK105	0.322	0.01	134.16
21	TK121	0.272	0.01	113.33
22	TK97	0.328	0.01	136.66
23	TK14	0.292	0.01	132.63
เฉลี่ย		0.286	0.01	119.37

4. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีเอสจากไรโซแบคทีเรีย ในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita*

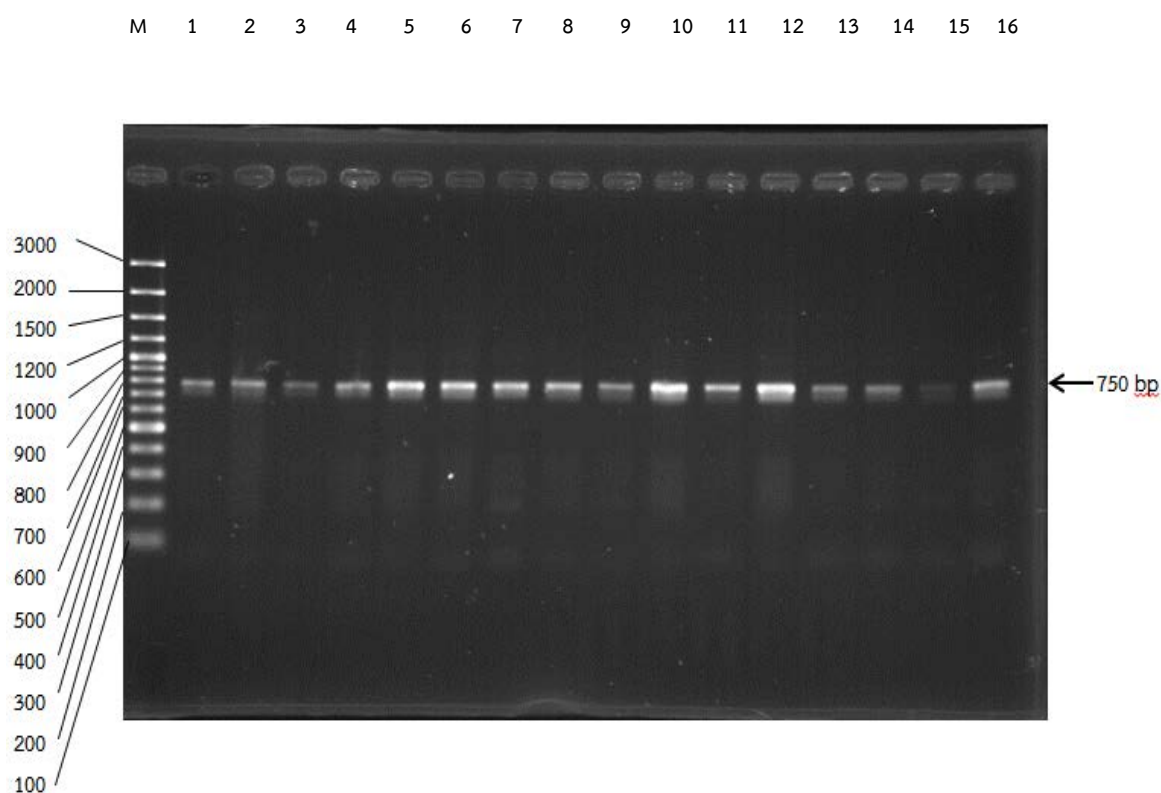
นำส่วนผสม 300 μ l ผสมกับตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita* 200 ตัว ปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำ 3 ซ้ำ) และชุดควบคุม (control) ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD เปลา น้ำกลั่น และ supernatant ที่ผ่านการต้ม 15 นาที ตรวจนับจำนวนตัวอ่อนที่ตายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายตัวอ่อน *M. incognita* ระยะ J2 โดยเปรียบเทียบเป็นร้อยละของการตายของไส้เดือนฝอยรอบรากพืช พบว่า ไอโซเลตที่ TK 23 สามารถทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด โดยเอนไซม์โปรตีเอสที่หลั่งออกมาจากเซลล์ สามารถทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปมได้ถึง ร้อยละ 83 ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจาก 48 ชั่วโมง ทำลายตัวอ่อนได้ ร้อยละ 93 (protease activity unit : 159.16 Uml⁻¹ ที่ 37 °C, pH 7.0) (ภาพที่ 4.8)



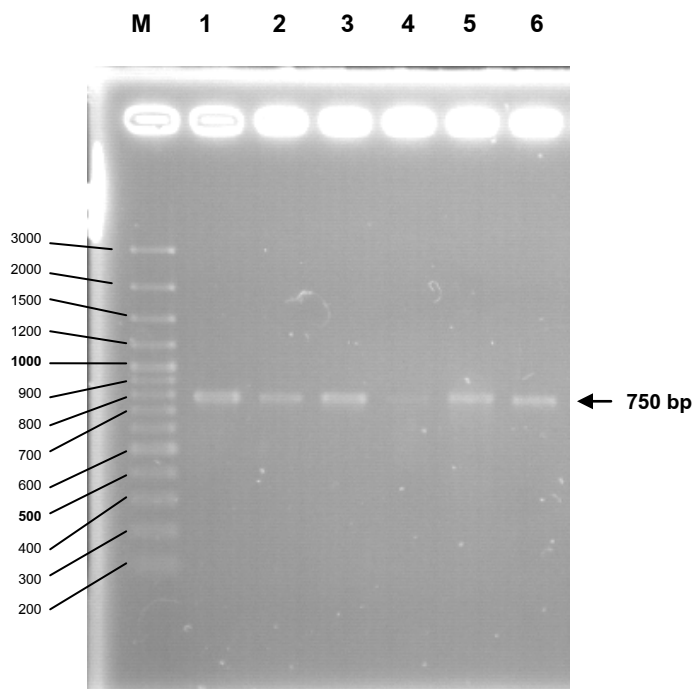
ภาพที่ 4.8 ร้อยละของการตายของไส้เดือนฝอยรอบรากพืช

5. ผลการจำแนกชนิดของไรโซแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรตีนเอสที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita*

จำแนกแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved region ของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ และแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA ได้ PCR Product ขนาด 750 bp (ภาพที่ 4.9) นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายตัวอ่อนระยะที่ J2 ของ *M. incognita* ในระดับสปีชีส์



ภาพที่ 4.9 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ถึง 16 PCR product ขนาด 750 bp จากดีเอ็นเอของไรโซแบคทีเรียรอบรากมันฝรั่งไอโซเลทที่ TK54 TK15 TK12 TK19 TK3 TK27 TK31 TK23 TK42 TK10 TK38 TK45 TK47 TK49 TK51 และ TK77 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.9 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (ต่อ)
 เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ถึง 6 PCR product ขนาด 750 bp จากดีเอ็นเอของ
 ไรโซแบคทีเรียรอบรากมันฝรั่งไอโซเลทที่ TK44 TK11 TK105 TK121 TK97
 และ TK14 ตามลำดับ

6. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีเอสจากไรโซแบคทีเรียในแปลงทดลอง

นำเอนไซม์โปรตีเอสจากไรโซแบคทีเรียมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในรูปแบบน้ำ แล้วทดสอบประสิทธิภาพในแปลงทดลองของเกษตรกรอาสาสมัคร ดังนี้

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำในแปลงทดลองขนาด 1x2 เมตร โดยปลูกมันฝรั่ง 2 แถวต่อแปลงมีระยะห่างระหว่างแถว 75 ซม. ระยะห่างระหว่างต้น 25 ซม. กรรมวิธีทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่จุ่มหัวพันธุ์

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มหัวพันธุ์ก่อนปลูกในชีวภัณฑ์เอนไซม์โปรตีเอสความเข้มข้น 1 mg/l

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มหัวพันธุ์ก่อนปลูกในชีวภัณฑ์เอนไซม์โปรตีเอสความเข้มข้น 5 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มหัวพันธุ์ก่อนปลูกในชีวภัณฑ์เอนไซม์โปรตีเอสความเข้มข้น 10 mg/l

กรรมวิธีที่ 5 โรยร่องปลูกด้วยสาร carbofuran 3G อัตรา 10 g/แปลง

เก็บตัวอย่างดินก่อนปลูกและหลังปลูกเพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนไส้เดือนฝอยในดินจำนวน 5 จุดต่อแปลงย่อยเก็บหัวมันฝรั่งทั้งหมดจากต้นมันฝรั่งจำนวน 5 ต้นที่สุ่มได้จากแต่ละแปลงย่อยบันทึกน้ำหนักรวมของหัวมันฝรั่งและสุ่มตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า $1\frac{1}{2}$ นิ้วจำนวน 10 หัวเพื่อวัดระดับการเกิดหูของหัวมันฝรั่ง

ซึ่งจากการศึกษา จำนวน 5 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ พบว่า กรรมวิธีที่ 4 มีค่าเฉลี่ยการทำลายไส้เดือนฝอยในแปลงมันฝรั่งเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับร้อยละ 32.3 รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 3 มีค่าเฉลี่ยการทำลายไส้เดือนฝอยเท่ากับ ร้อยละ 27.3 ส่วนกรรมวิธีที่ 2 และ 5 มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 10.8 และ 8.3 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ 1 ไม่สามารถทำลายไส้เดือนฝอยรากปมได้



ภาพที่ 4.10 การสาริตการฉีดพ่นชีวภัณฑ์ประเภทเอนไซม์โปรตีเอสที่สกัดจากแบคทีเรีย เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพื้นที่อำเภอบพพระ จังหวัดตาก



ภาพที่ 4.11 หลังจากการฉีดชีวภัณฑ์ประเภทเอนไซม์โปรตีนเอสที่สกัดจากแบคทีเรียแปลงมันฝรั่งมีอัตรา การเหี่ยวเฉาลดลง ต้นมันฝรั่งแข็งแรงมากขึ้น



ภาพที่ 4.12 ผลผลิตมันฝรั่งมีความแข็งแรงและลดปัญหารากปมลงอย่างเห็นได้ชัด

จากภาพที่ 4.13 เกษตรกรลงมือเก็บผลผลิตในแปลงที่มีการใช้เอ็นไซม์โปรตีเอสที่สกัดจากแบคทีเรีย เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งผลผลิตที่ได้มีขนาดและน้ำหนักสูงขึ้นจากที่มีปัญหาไส้เดือนฝอยรากปมรบกวน ซึ่งแต่ละแถวมีผลมันฝรั่งกลม มีน้ำหนักและมีขนาดใหญ่ ซึ่งเมื่อเกษตรกรทำการขุดหัวมันฝรั่งขึ้นมาแล้วจะนำมาใส่ถุงเพื่อนำส่งโรงงานรับซื้อในพื้นที่ต่อ ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลผลิตในถุงมีความสมบูรณ์เป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 4.14) โดยเฉลี่ยน้ำหนักต่อถุงอยู่ระหว่าง 50 - 80 กิโลกรัมต่อถุง



ภาพที่ 4.13 เกษตรกรเก็บผลผลิตมันฝรั่งในแปลงที่มีการใช้เอ็นไซม์โปรตีเอสที่สกัดจากแบคทีเรีย เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม



ภาพที่ 4.14 ผลผลิตมันฝรั่งที่เกษตรกรนำมาใส่ถุงเพื่อนำส่งโรงงานรับซื้อในพื้นที่