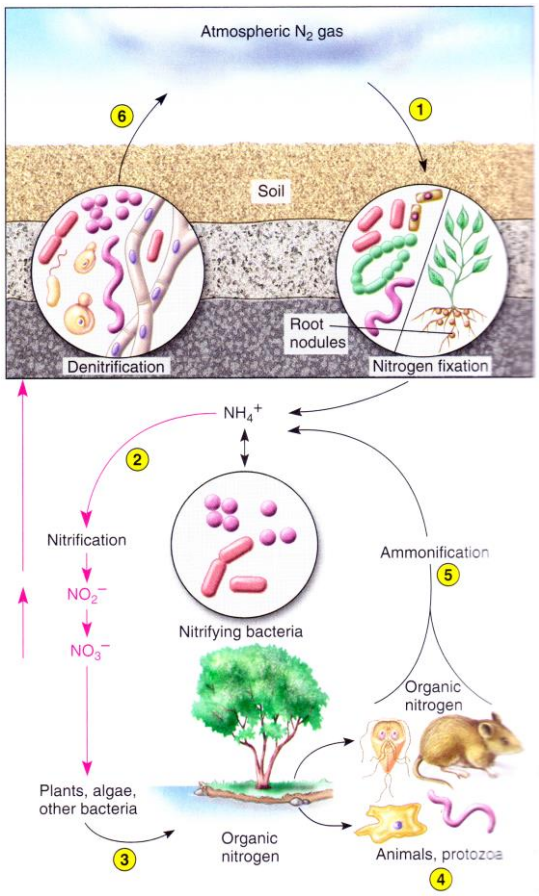
บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ธาตุไนโตรเจน

พืชต้องการธาตุไนโตรเจนในการเจริญเติบโต โดยไนโตรเจนเป็นกลุ่มธาตุที่พืชต้องการในปริมาณมากหรือมหธาตุ โดยทั่วไปแล้วพืชจะมีไนโตรเจนประมาณ 1 - 5% โดยน้ำหนัก ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อพืชอย่างยิ่ง เพราะเป็นส่วนประกอบพื้นฐานของรงควัตถุในใบสีเขียวของพืช คือ คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) ซึ่งช่วยในการสังเคราะห์แสงและพืชยังต้องการไนโตรเจนในการสร้างสารประกอบหลายชนิด เช่น กรดนิวคลีอิก (Nucleic Acids) กรดอะมิโน (Amino Acids) โปรตีน (Protein) และสารประกอบไนโตรเจนที่สำคัญ ก็คือ เอนไซม์ (Enzyme) ซึ่งเป็นตัวเร่งกระบวนการทางชีววิทยา (Biological Process) ในพืชธาตุไนโตรเจนที่พืชนำมาใช้ส่วนหนึ่งได้มาจากองค์ประกอบที่มีอยู่ในดิน หรือวัสดุที่ใช้ปลูก รวมทั้งธาตุอาหารที่มีการเพิ่มให้กับพืช เช่น การใส่ปุ๋ย และอีกส่วนที่สำคัญได้มาจากการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์

ตามธรรมชาติไนโตรเจน (N_2) เป็นก๊าซที่มีมากที่สุดในบรรยากาศร้อยละ 79 โดยปริมาตร แต่อยู่ในรูปที่สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรง จุลินทรีย์จึงบทบาทในการเปลี่ยนรูปไนโตรเจนให้อยู่ในรูปที่สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ใช้ได้ เช่น แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ไนไตรต์ (NO_2) และไนเทรต (NO_3) กระบวนการเปลี่ยนแปลงไนโตรเจนในวัฏจักรไนโตรเจนประกอบด้วย 6 ขั้นตอนย่อย (ภาพที่ 2.1) คือ



ภาพที่ 2.1 วัฏจักรไนโตรเจน
ที่มา: Tolaro & Chess, (2012: 793)

1. การตรึงไนโตรเจน (Nitrogen Fixation)เป็นการตรึงก๊าซไนโตรเจน (N_2) ในบรรยากาศให้เป็นแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และแปรรูปให้เกิดเป็นโปรตีน หรือสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ต่อไป จุลินทรีย์ที่มีบทบาทเป็นกลุ่ม Nitrogen Fixation Bacteria ที่ดำรงชีวิตแบบอิสระ (Free-living Nitrogen Fixer) แบ่งเป็นกลุ่มตรึงก๊าซไนโตรเจนในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน (Aerobe) เช่น *Azotobacter* และ *Azospirillium* ส่วนอีกกลุ่มตรึงก๊าซไนโตรเจนในสภาวะที่ไม่มีก๊าซออกซิเจน (Anaerobe) เช่น *Clostridium* และ *Desulfovibrio* รวมถึงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* และ *Nostoc*

ส่วนอีกกลุ่มที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศ โดยจุลินทรีย์อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นโดยเฉพาะพืชเป็นการดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัย (Symbiosis Nitrogen Fixer) เช่น *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* และ *Azorhizobium* ที่อาศัยอยู่ภายในรากพืชตระกูลถั่ว จากนั้นชักนำให้พืชตระกูลถั่วสร้างปมราก (Root Nodules) โดยมีแบคทีเรียอาศัยอยู่ภายในพร้อมตรึงก๊าซไนโตรเจนให้กับต้นถั่ว

2.การสร้างไนเตรต (Nitrification) เป็นกระบวนการที่มีการออกซิไดซ์แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) หรือแอมโมเนีย (NH_3) ให้เป็นไนไตรต์ (NO_2^-) และไนเทรต (NO_3^-) แบคทีเรียที่ทำหน้าที่นี้

เรียกว่า Nitrifying Bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Chemoautotrophs มี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการออกซิไดซ์แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) หรือแอมโมเนีย (NH_3) ไปเป็นไนไตรต์ (NO_2^-) หรือใช้แอมโมเนียมไอออน หรือแอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน เช่น *Nitrosomonas, Nitrosovibrio* และ *Nitrosospira* เป็นต้น ขั้นตอนที่สองเป็นการออกซิไดซ์ไนไตรต์ (NO_2^-) ไปเป็นไนเทรต (NO_3^-) หรือใช้ไนไตรต์เป็นแหล่งพลังงาน ขั้นนี้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเพราะไนไตรต์เป็นพิษต่อพืช แบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Nitrobacter* เป็นต้น

3. พืช สาหร่าย และแบคทีเรียนำไนเตรต (NO_3^-) ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน และกรดนิวคลิอิก

4. กลุ่มผู้บริโภค เช่น โพรโทซัว และสัตว์ชนิดต่างๆ นำสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบไปใช้ในการสร้างส่วนต่างๆ ของเซลล์ และควบคุมการทำงานของสิ่งมีชีวิต

5. การสร้างแอมโมเนีย หรือกระบวนการแอมโมนิฟิเคชั่น (Ammonification) เป็นการสร้างแอมโมเนีย (NH_3) จากการสลายสารอินทรีย์ไนโตรเจนในซากสิ่งมีชีวิตที่ตายลง และของเสีย เช่น กรดยูริก ยูเรีย โดยจุลินทรีย์ Ammonifying Bacteria ที่สร้าง Extracellular Proteolytic Enzyme ย่อยสลายโปรตีนไปเป็นกรดอะมิโน และนำเข้าไปในเซลล์ กรดอะมิโนจะถูกดึงหมู่อะมิโนออกกลายเป็นแอมโมเนีย จุลินทรีย์กลุ่มนี้ เช่น *Bacillus* และ *Proteus*

6. การผันกลับของไนเตรต (Denitrification) เป็นกระบวนการรีดิวซ์ไนเตรต (NO_3^-) ไปเป็นไนโตรเจน (N_2) โดยจุลินทรีย์ Denitrifying Bacteria เช่น *Pseudomonas, Acinetobacter*, *Alcaligenes* และ *Achromobacter* แบคทีเรียพวกนี้อาศัยอยู่ในดินส่วนลึก ๆ และในตะกอนที่ทับทมกันใต้แหล่งน้ำ ซึ่งเป็นที่มีออกซิเจนน้อย และใช้ไนเทรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนในกระบวนการหายใจ โดยรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนโตรเจน กลับเข้าสู่วัฏจักรใหม่

Nitrate Reduction เป็นกระบวนการรีดิวซ์ไนเตรต (NO_3^-) ให้เกิดเป็นไนไตรต์ (NO_2^-) หรือแอมโมเนีย (NH_3) (Tolaro & Chess, 2012: 792-793)

ในวัฏจักรไนโตรเจนมีจุลินทรีย์เข้าไปเกี่ยวข้องในการเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนเพื่อให้เป็นประโยชน์ต่อพืช โดยเฉพาะในส่วนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศด้วย Nitrogen Fixation Bacteria ซึ่งสามารถทดแทนการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนได้

แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระ

แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีพแบบอิสระ (Free Living Fixing Bacteria) มีบทบาทในการตรึงไนโตรเจนโดยไม่ต้องอาศัยอยู่ในปมรากพืชตระกูลถั่ว อาจดำรงชีวิตอย่างอิสระในดินหรืออาศัยอยู่กับรากพืชที่ไม่จำเป็นต้องเป็นพืชตระกูลถั่วเท่านั้น จึงพบในบริเวณรากพืชอื่นๆ เช่น พืชตระกูลหญ้าและผักต่างๆ โดยไม่ทำให้เกิดปมราก การเจริญเติบโตในบริเวณรากก็อาจสร้างโคโลนีในดินรอบผิวรากหรือไรโซสเฟียร์ (Rhizophere) บนผิวรากหรือแทรกตัวเข้าไปอาศัยอยู่ระหว่างเซลล์ของรากพืช แบคทีเรียที่ดำรงชีวิตในดินนอกบริเวณรากจะตรึงไนโตรเจนได้น้อยมาก เนื่องจากมีอาหารไปเลี้ยงไม่เพียงพอ แต่พวกที่อาศัยบริเวณรากพืชมักตรึงไนโตรเจนได้มากกว่า เนื่องจากได้รับสารอาหารต่างๆ จากรากพืช

แบคทีเรียพวกนี้แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะการสร้างโคโลนีกับรากพืช คือ แบคทีเรียในดินรอบผิวราก (Rhizophere Bacteria) เป็นพวกที่สร้างโคโลนีในดินรอบผิวรากและผิวที่ราก เช่น *Azotobacter* spp, *Beijerinckia* spp. สำหรับดินรอบผิวรากหรือไรโซสเฟียร์ หมายถึง ดินที่อยู่ใกล้ผิวรากโดยรอบ ซึ่งรากมีอิทธิพลต่อชนิด และประชากรของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินส่วนนั้น กลุ่มที่ 2 คือ แบคทีเรียที่อาศัยในรากแบบไม่แท้ (Facultive Endophytes) เป็นพวกที่สร้างโคโลนีที่ผิวรากหรือเจริญอยู่ระหว่างเซลล์ในราก เช่น *Azospirillum* spp. และกลุ่มสุดท้าย คือ แบคทีเรียที่อาศัยในรากแท้ (Obligate Endophytes) เป็นพวกที่สร้างโคโลนีระหว่างเซลล์ในรากเท่านั้น เช่น *Azotobacter diazotrophicus, Herbaspillum* spp. และ *Azoarcus* spp. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ (Free Living) มีไม่น้อยกว่า 26 สกุล ใน 11 วงศ์ พบในดินทั่วไปแทบทุกสภาพแวดล้อม

Azotobacter เป็นแบคทีเรียที่เจริญในที่มีอากาศ (Obligate Aerobe) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ดำรงชีวิตแบบ Non- Symbiotic และ Free Living

Azospirillum เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เจริญในที่มีอากาศ ที่พบแพร่หลายในระบบนิเวศที่มีการปลูกพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวโพด อ้อย และข้าวฟ่าง ปัจจุบันมี 5 ชนิด คือ *A. brasilense, A. lipoferum, A. amazonense, A. halopraeferens* และ *A. irakense* (Shridhar, 2012)

Beijerinckia เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เจริญในที่มีอากาศ พบบริเวณรากของพืชไร่พวกอ้อย ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต และถั่วเหลือง (จักรพงษ์ ไชวงศ์ ปฏิภาณ สุทธิกุลบุตร และจีราภรณ์ อินทสาร. 2554)

สำหรับ *Azotobacter* นั้นนอกจากจะตรึงไนโตรเจนแล้ว บางชนิดยังอาจสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น สังเคราะห์ Indol – 3 – Acetic Acid (IAA) จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) และสารคล้ายจิบเบอเรลลิน สังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราหรือละลายสารอนินทรีย์ฟอสเฟต ช่วยให้พืชได้รับฟอสเฟตในรูปที่เป็นประโยชน์มากขึ้น มีรายงานว่า *Azotobacter paspali* ซึ่งอยู่อย่างจำเพาะเจาะจงในดินรอบผิวรากของ *Paspalum notatum* ช่วยให้พืชนี้เจริญเติบโตได้ดีขึ้นจากการตรึงไนโตรเจน และผลิตฮอร์โมนพืชกล่าวคือประมาณ 11%ของไนโตรเจนที่พืชใช้มาจากการตรึงของอะโซโตแบคเตอร์

สำหรับ *Azospirillum* ตรึงไนโตรเจนได้น้อยเพียง 0.8 กิโลกรัม.N ต่อไร่ การใช้จุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน ก็ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชบาชนิดได้ดีเช่นเดียวกัน เช่น การใช้*Azospirillum* ร่วมกับไรโซเบียมในถั่วบางชนิด และ *Azospirillum* ร่วมกับอาร์บัสคิวลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) กับข้าวสาลี ข้าวฟ่าง และข้าวโพด

พันธุศาสตร์ของแบคทีเรีย

ดีเอ็นเอ (DNA, Deoxyribonucleic Acid) เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต สามารถจำลองตัวเองได้ ดีเอ็นเอทำหน้าที่เก็บรหัสข้อมูลของพ่อแม่และถ่ายทอดสู่รุ่นลูก ดังนั้นลูกจึงมีลักษณะของพ่อและแม่อยู่ในเซลล์ทุกเซลล์ โครงสร้างของดีเอ็นเอถูกค้นพบเมื่อปี พ.ศ. 2496 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันชื่อ เจมส์ วัตสัน (James Watson) และ นักฟิสิกส์ชาวอังกฤษ ชื่อ ฟรานซิส คริก (Francis Crick) (Raven, Evert, & Eichhorn, 1999) ทั้งสองพบว่า ดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อย

หรือเบส 4 ชนิด ได้แก่ A (Adenine) T (Thymine) C (Cytosine) และ G (Guanine) เรียงต่อกันเป็นสายยาวยึดติดกันโดยมีแกนเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose) และฟอสเฟต(Phosphate) สายยาวนี้เรียกว่าสายนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ดีเอ็นเอเป็นสายนิวคลีโอไทด์ 2 สาย จับกันเป็นเกลียวคู่โดยเบสต่างๆ การจับกันของเบสนั้นจะจับกันแบบเฉพาะเจาะจง โดยพันธะเคมี เบส A จะจับคู่กับเบส T และเบส C จะจับคู่กับเบส G ทำให้ดีเอ็นเอมีรูปร่างคล้ายบันไดเวียน (Spiral) การเรียงตัวของเบส A T C และ G ที่ประกอบเป็นสายดีเอ็นเอมีความสำคัญมาก เพราะในที่สุดจะเป็นตัวกำหนดการแปลความหมายออกมาในรูปของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตต่างๆ (Borsch et. al., 2003) มีผู้ประมาณว่าถ้านำดีเอ็นเอทั้งหมดที่อยู่ในเซลล์ทุกเซลล์ของมนุษย์คนหนึ่งๆ มาคลี่เป็นสายยาวจะคิดเป็นระยะทางมากกว่า 700,000 กิโลเมตร ซึ่งเทียบเท่ากับระยะไปกลับโลกกับดวงจันทร์ (Brookes, 2003) ดีเอ็นเอของแบคทีเรียอยู่ในบริเวณนิวคลิออยด์ (Nucleoid Region) ของไซโตพลาสซึม มีขนาดประมาณ 1 – 10 ไมโครเมตร โมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นรูปวงกลมง่ายๆ

แบคทีเรียมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual Reproduction) แบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ และแบ่งจาก 2 เป็น 4 เซลล์ไปเรื่อยๆ เรียกการแบ่งเซลล์แบบนี้ว่า Binary Fission ซึ่งทำให้เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีสารพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการ แต่แบคทีเรียสามารถแลกเปลี่ยนส่วนประกอบของสารพันธุกรรมระหว่างกันได้ ทำให้เซลล์แบคทีเรียรุ่นลูกมีสารพันธุกรรมต่างไปจากเดิม เรียกการสืบพันธุ์แบบนี้ว่า Parasexual Reproduction ซึ่งคล้ายกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ต่างกันที่ Parasexual Reproduction ไม่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสและการปฏิสนธิเช่นเดียวกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

หลักการสำคัญของ Parasexual Reproduction เป็นการถ่ายทอดยีน หรือ DNA จากเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ (Donor) ไปยังเซลล์แบคทีเรียผู้รับ (Recipient) ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียรับมีสารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป แบ่งได้เป็น 3 กระบวนการ ได้แก่

1. ทรานสฟอร์เมชั่น (Transformation) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วน DNA จากเซลล์แบคทีเรียผู้ให้ไปสู่เซลล์แบคทีเรียผู้รับ ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์แบคทีเรียผู้รับ จากนั้นชิ้นส่วนดังกล่าวจะเข้าไปประกบคู่กับ DNA ของเซลล์แบคทีเรียผู้รับในส่วนที่เป็นโฮโมโลกัสกัน การเกิดทรานสฟอร์เมชั่นไม่ใช่ปรากฏการณ์ตามธรรมชาติที่สามารถเกิดขึ้นได้กับทุกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ปัจจัยสำคัญต่อการเกิดทรานสฟอร์เมชั่น คือ

- ปริมาณชิ้นส่วน DNA ควรมีปริมาณ 15 โมเลกุลต่อแบคทีเรีย 1 เซลล์
- ขนาดโมเลกุลของ DNA ที่เข้าไปอยู่ในเซลล์แบคทีเรียผู้รับ เนื่องจากถ้าขนาดโมเลกุล ของ DNA มีขนาดใหญ่มากก็จะไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้
- ชิ้นส่วน DNA ต้องมาจากแบคทีเรียชนิดเดียวกัน หรือใกล้เคียงกับชนิดของแบคทีเรียผู้รับ
- สรีรวิทยาของแบคทีเรียผู้รับในระยะ Log Phase ซึ่งเป็นระยะที่มีการแบ่งเซลล์มากที่สุด จะเป็นระยะที่พบการทรานสฟอร์เมชั่นมากที่สุด เซลล์ที่อยู่ในระยะนี้ มีชื่อเรียกว่าคอมพีเทนต์เซลล์ (Competent Cell)

2. คอนจูเกชั่น (Conjugation) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดยีนจากเซลล์เซลล์แบคทีเรียผู้ให้ไปสู่เซลล์แบคทีเรียผู้รับ โดยผ่านทางท่อที่เรียกว่า Conjugation Tube ส่งผลให้เกิดยีนรีคอมบิเนชั่นในเซลล์แบคทีเรียผู้รับ

3. ทรานสดักชั่น (Transduction) กลไกที่ทำให้ยีน หรือส่วนของโครโมโซมของเซลล์แบคทีเรียถ่ายทอดไปสู่เซลล์แบคทีเรียอีกเซลล์หนึ่ง โดยมีไวรัสทำหน้าที่เป็นพาหะ โดยเฉพาะไวรัสพวกแบคเทอริโอฟาจ

ยีน 16S rDNA

rRNA (Ribosomal Ribonucleic Acid) หมายถึง RNA ที่เป็นส่วนประกอบของไรโบโซม มีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 65 ของน้ำหนักไรโบโซม และเป็นไรโบโซมที่มีปริมาณมากที่สุด คือ ประมาณร้อยละ 80 ของ RNA ทั้งหมดภายในเซลล์ rRNA ของแบคทีเรียมี 3 ขนาด ได้แก่ 23S, 16S และ 5S ผลจากการศึกษาโดยวิธีไฮบริไดเซชั่น แสดงให้เห็นว่าในบางส่วนของ DNA จะมีลำดับเบสที่เป็นองค์ประกอบกับลำดับเบสใน rRNA ดังนั้นจึงเป็นหลักฐานที่บอกให้ทราบว่า ในการสังเคราะห์ rRNA นั้นจะต้องมี DNA ในส่วนดังกล่าวเป็นแม่แบบแน่นอน หลังจากการสังเคราะห์แล้ว rRNA จะออกไปในส่วนของไซโตพลาสซึมทำหน้าที่เป็นแหล่งสังเคราะห์โปรตีนต่อไป (ศิวพร แพงคำ. 2553)

การระบุชนิดแบคทีเรียนิยมใช้ยีนในโอเปอรอน rRNAOperon (*rrn*) ที่มีความเป็นอนุรักษ์สูงในแบคทีเรีย ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอชนิด 16S, 23S และ 5S เรียงลำดับตามการ Transcription จาก 5’ ไป 3’ คือ 16S rRNA, spacer, tRNA, spacer, tRNA, spacer, 23S rRNA โดย 16S rRNA gene (rrs) มีความผันแปรทางวิวัฒนาการต่ำ มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง และมีขนาดที่เหมาะสม (ประมาณ 1.5 kb) เพียงพอที่จะใช้เป็นข้อมูลเพื่อนำมาจำแนกแบคทีเรีย (Janda & Abbott, 2007) มีความหลากหลายในแต่ละกลุ่มแบคทีเรีย มีความจำเพาะในการจำแนกแบคทีเรียได้ในระดับสปีชีส์ (Species) สกุล (Genera) และแฟมิลี (Family) (Barry et. al., 1991)

การหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ด้วยการทำพีซีอาร์นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ไปแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (Agarose Gel) ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide) 3-5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ และนำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ด้วยเครื่อง UV Transilluminator นำผลที่ได้ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียต่อไป

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กันต์กนิษฐ และคณะ (2555) ได้คัดแยกไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากพื้นที่เกษตรอินทรีย์อำเภอสนามชัยเขต จังหวัดฉะเชิงเทรา คือ *Nostoc* sp. TUBT01 และ *Nostoc* sp. TUBT02 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการเติบโต พบว่า *Nostoc* sp. TUBT02 มีอัตราการเติบโตสูงกว่า *Nostoc* sp. TUBT01 ทั้งในสูตรอาหารที่มีและไม่มีไนโตรเจน โดย

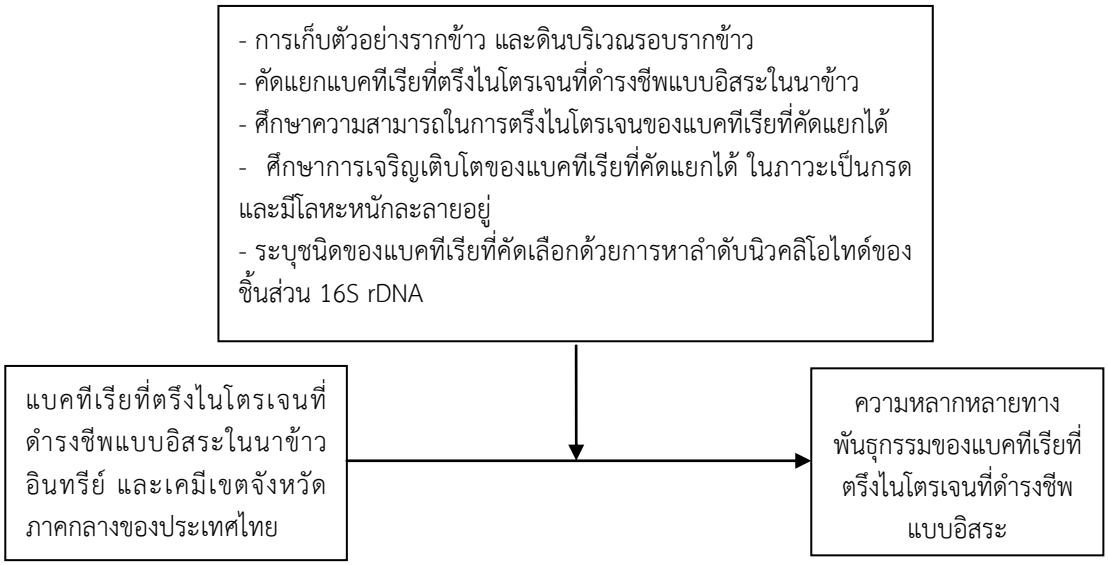
ไนโตรเจนไม่มีผลต่อการเติบโตของ *Nostoc* sp. TUBT01 แต่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Nostoc* sp. TUBT02

Shu et. al., (2012) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบริเวณรากข้าว (Rhizosphere) และในดินนาข้าว (Bulk) ในนาแบบดั้งเดิม (Conventional Management) และแบบเกษตรอินทรีย์ (Organic Management) ในระยะเวลา 2, 3, 5, และ 9 ปี พบความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในดินทั้ง Rhizosphere และBulk ของนาแบบเกษตรอินทรีย์มากกว่านาแบบดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลา 3, 5 และ 9 ปี นั่นคือ ความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในดิน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อทำนาแบบเกษตรอินทรีย์ในระยะเวลาที่นานขึ้น โดยพบมากที่สุดในการทำนาแบบเกษตรอินทรีย์ ที่ระยะเวลา 5 ปี เมื่อแยก Phylogenetic Distribution พบว่า Taxonomic Group ประกอบด้วย *Alphaproteobacteria* (27.6%), *Betaproteobacteria* (24.1%) และ Gammaproteobacteria (48.3%) ใน Dominant Diazotrophs พบ Order *Rhizobiales* และ *Pseudomonadales* เป็นส่วนใหญ่

Guimar et al., (2012) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacteria) และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (Free-Living Nitrogen-Fixing) ในดินทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอังกฤษ โดยศึกษาถึงปัจจัยการปลูกพืชหมุนเวียน (Crop Rotation) การป้องกันจากศัตรูพืช (Crop Protection) และการบำรุงพันธุ์ (Fertility Management) ในการเกษตรแบบอินทรีย์เทียบกับเกษตรแบบดั้งเดิม (Conventional) โดยเก็บดินในช่วงเดือนมีนาคม มิถุนายน และกันยายน ปี ค.ศ.2007 วิเคราะห์ยีน 16S rRNA โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และ Quantitative PCR (qPCR) เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ผลการศึกษาพบว่า การปลูกพืชหมุนเวียนมีผลต่อความหลากหลายของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ($p < 0.001$) พบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสูง ในช่วงการบำรุงพันธุ์ของเกษตรแบบดั้งเดิมในเดือนมิถุนายน ($p = 0.03$) และการป้องกันจากศัตรูพืชของเกษตรแบบอินทรีย์ในเดือนกันยายน ($p = 0.01$)

Zhan & Sun (2012) ศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (Free-Living Nitrogen-Fixing) ในดินบริเวณรอบรากพืช (Rhizosphere) และดินในพื้นที่เพาะปลูก (Non- Rhizosphere) ในผืนดินที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ของเหมืองทองแดง (Wastelands of Copper Mine Tailings) โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction-Denatured Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) มีดิน Rhizosphere จำนวน 11 ตัวอย่าง และดิน Non - Rhizosphere จำนวน 9 ตัวอย่าง เก็บจาก 6 แปลง 2 แห่งของผืนดินที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ ในช่วงเวลาที่ห่างกัน พบว่า ดิน Non- Rhizosphere มีความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมากกว่าดิน Rhizosphere และความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้รับผลกระทบจากคุณสมบัติทางเคมี กายภาพของผืนดิน ชนิดของพันธุ์ที่ปลูก สารอาหารในดิน และโลหะหนัก

Orr et al. (2012) ศึกษาผลกระทบของการจัดการทางการเกษตร (Crop Management) ในดินเกษตรแบบอินทรีย์ (Organic Managed Agriculture) และการเกษตรแบบดั้งเดิม (Conventionally Managed Agriculture)ที่มีต่อความหลากหลายและจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacterial Communities) และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (Free-Living Nitrogen Fixing

Bacteria) พบว่าช่วงบำรุงพันธุ์มีผลต่อความหลากหลาย และจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมด รวมถึงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเล็กน้อย ในขณะที่ความหลากหลายของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะน้อยลงในช่วงป้องกันศัตรูพืชของเกษตรแบบดั้งเดิม เทียบกับช่วงเวลาอื่น แสดงว่าแบคทีเรียมีความไวต่อสารกำจัดศัตรูพืช และแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนมีปริมาณสูงสุดในปีแรก และลดลงในปีที่ 2 และปีที่ 3 ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดกลับเพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งแสดงว่าทั้งชนิด และปริมาณของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับจำนวนปี และฤดูกาล เมื่อวิเคราะห์ด้วย Regression Analysis พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้รับผลกระทบจากสภาวะแวดล้อมของดิน เช่น อุณหภูมิของดิน และสภาพอากาศ

กรอบแนวคิดในการวิจัย