บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย PGPR ที่มีความสามารถในการผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์จากดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลัง ที่มีศักยภาพสูงสุดในการเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและผลผลิตของมันสำปะหลัง ทำให้อยู่ในรูปเจลเซลล์ตรึง เพื่อรักษาคุณสมบัติของแบคทีเรีย โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยดังนี้

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลต่างๆ ที่เก็บรวบรวม มีดังต่อไปนี้

1. การคัดแยกแบคทีเรีย PGPR ที่สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์
2. ทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Activities) ของแบคทีเรียรอบรากพืช
3. การศึกษาปริมาณไซเดอร์โรฟอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย
4. การศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA ของแบคทีเรียเพื่อจัดจำแนกสปีชีส์
5. การตรึงเซลล์แบคทีเรียที่สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์ เพื่อใช้ในการทดสอบแบบเซลล์อิสระ (Cell Immobilization)

เครื่องมือในการวิจัย

อุปกรณ์

1. หลอดเก็บตัวอย่างดิน (soil tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร
2. ถุงปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุตัวอย่างดิน (sterile bag)
3. หลอดฝาเกลียว (screw cap test tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
4. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
5. ขวดรูปชมพู่ (conical flask) ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
6. บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 25, 100 และ 500 มิลลิลิตร
7. แท่งแก้วคน (stirring rod)
8. ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
9. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
10. ปิเปตต์ทิป (pipette tip)
11. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate)
12. ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
13. ปากคีบ (forcep)

เครื่องมือ

1. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
2. ตะแกรง ขนาด 100, 200 และ 325 mesh
3. เครื่องเขย่าสาร (Shaker)
4. เครื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
6. อ่างอังไอน้ำ (Water Bath)
7. กล้องจุลทรรศน์ (Light Microscope)
8. เครื่อง Spectrophotometer
9. เครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge)
10. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)
11. เครื่องวัด pH (pH meter)
12. เครื่องล้างความถี่สูง (Sonicator)
13. ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Normal Saline (Sigma, Aldrich, Germany)
2. Phosphhate Buffer Saline (Gibthai, Thailand)
3. Chrome azurole S agar
4. Skimmed milk agar
5. Primer
6. Special Vector
7. Isopropylthio β galactoside (IPTG)
8. Tris- Hcl buffer (pH8)
9. Casein
10. Trichloroacetic acid (TCA)
11. Folin-Ciocalten reagent
12. NaH_2PO_4
13. Glycine
14. NaOH
15. $Cacl_2$
16. Nutrient Agar (NA Agar) (Difco, USA)
17. Luria Broth (LB Broth) (Difco, USA)
18. Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD Agar) (Difco, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเก็บตัวอย่างดินเพื่อคัดแยกแบคทีเรีย PGPR ที่สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์

คัดแยกแบคทีเรีย PGPR โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการโดยเก็บจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม ในเขตจังหวัดนครราชสีมา ขนาดพื้นที่ 400 เมตร x 400 เมตร จำนวน 160 ต้น (10%) โดยเก็บจากต้นมันสำปะหลังแถวในถัดจากแถวริมนอกสุด 2 แถว โดยเก็บตัวอย่างจากต้นที่ 1 ไปยังต้นที่ 160 แบบซิกแซก

2. ทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Activities) ของแบคทีเรียรอบรากพืช

นำรากพืชมาล้างด้วย 0.1 โมล/ลิตร phosphate buffer ทำการเจือจางแล้วนำมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช

2.1 Phosphate solubilization assay (Nautiyal, 1999)

นำตัวอย่างดินใน Normal saline มา 0.1 มิลลิลิตร มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติ phosphate solubilizer ซึ่งจะให้โคโลนีที่มี halo zone รอบโคโลนี

2.2 Siderophore production

นำโคโลนีที่แยกได้จากข้อ 2.1 มาทดสอบคุณสมบัติในการสร้าง siderophore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ chrome azurole S agar (CAS) ตามวิธีของ Clark & Bavoil (1994) โดย spot เชื้อลงบน CAS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เลือกโคโลนีที่ให้สีเหลือง-ส้ม (yellow-orange halo) รอบๆ โคโลนี

3. การศึกษาปริมาณไซเดอร์โรฟอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มา 10 สายพันธุ์ นำมาศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์ โดยปริมาณไซเดอร์โรฟอร์จะคำนวณออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์ siderophore units (% SU) โดยใช้สูตร

$$\% \text{ SU} = \frac{Ar - As}{Ar} X\ 100$$

โดย Ar คือ absorbance of reference ที่ 630 nm (CAS reagent)

As คือ absorbance of sample ที่ 630 nm

4. การจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์

เมื่อดำเนินการตามข้อ 3 แล้ว ทำการจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้ Bergey's Manual of Systemic

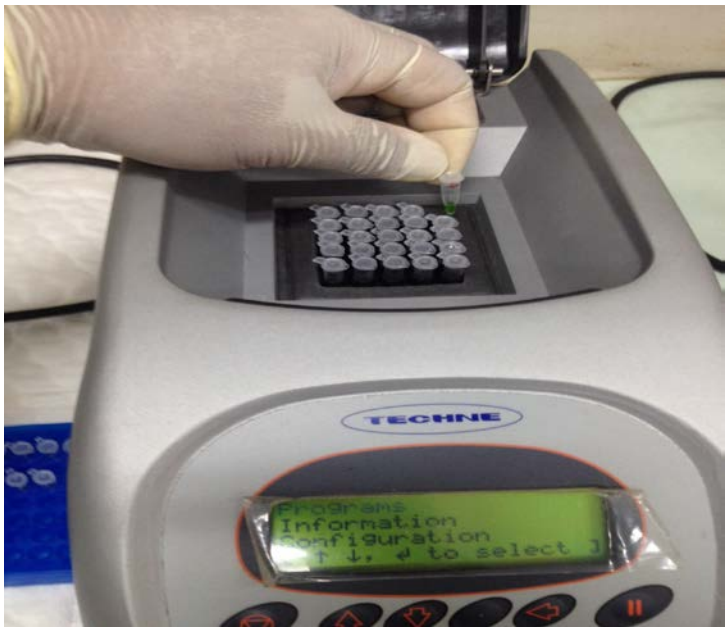
5. การศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA ของแบคทีเรียเพื่อจัดจำแนกสปีชีส์

จำแนกชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่มีประสิทธิภาพ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปฏิกิริยาชีวเคมี และลำดับเบสของ 16s rRNA ซึ่งการหาลำดับเบสของ 16s rRNA ยีน ทำได้โดยสกัด Genomic DNA ของแบคทีเรียและเพิ่มปริมาณ (amplify) DNA ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ forward 8f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ reverse 1492r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' โดยใช้เครื่อง Thermocycler โดยใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 16s rRNA ดังนี้ preheating: 95 องศาเซลเซียส 3 นาที denaturing: 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing: 60 องศาเซลเซียส 1 นาที extension: 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอน denaturing ถึง extension 25 รอบ ตามด้วย final extension: 72 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำมาแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง Electrophoresis นำ PCR product ไปทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการทำ DNA sequencing และนำลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X และ Mega (Thompson และคณะ, 1997; Kumar และคณะ, 2001)

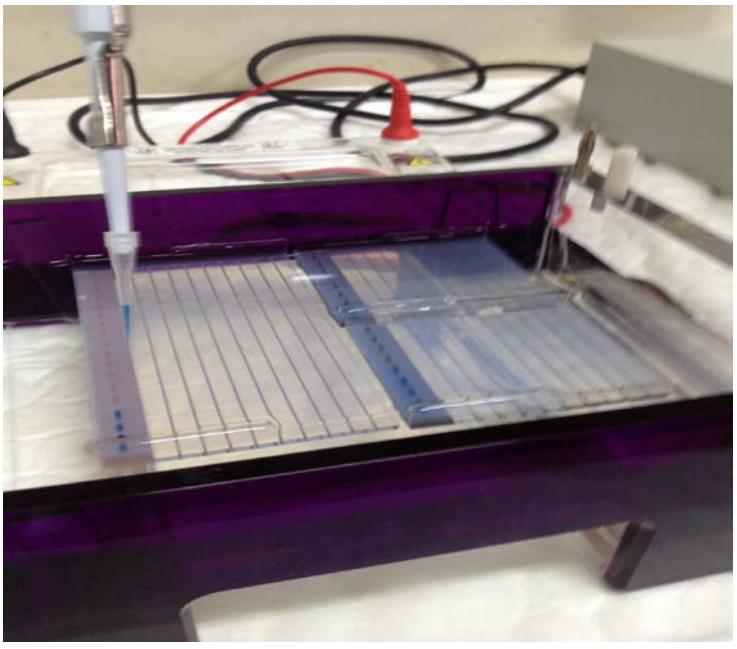
6. การตรึงเซลล์แบคทีเรียที่สามารถผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์ เพื่อใช้ในการทดสอบแบบเซลล์อิสระ (Cell Immobilization)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 10 สายพันธุ์ มาทำการตรึงเซลล์ โดยประยุกต์จากวิธีของกานแย้มพงษ์ ดัดแปลงจาก Carton และคณะ (2000) และ De Giulio และคณะ (2005) โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ King's B broth และเตรียมสารละลายที่ประกอบด้วย Sodium alginate 2% Glycerol 5% Xanthan gum 0.15% Inulin 0.1% และ Tween 80 0.1% นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave แล้วปิเปตต์มาผสม กับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียในอัตราส่วน 2 : 1 จากนั้นหยดสารผสมในสารละลาย 0.05 โมลาร์ $CaCl_2$ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองเม็ดเจลที่ได้ผ่านตะแกรง แล้วล้างด้วย sterile 0.85% NaCl

7. สรุปผลการวิจัยและจัดทำรูปเล่มรายงานวิจัย



ภาพที่ 3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย โดยใช้เครื่อง Thermocycler



ภาพที่ 3.2 การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis