รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด ปี 2558

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

3. กิจกรรม : การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพของประเทศไทย

กิจกรรมย่อย : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

ชื่อการทดลอง : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพและการจำแนกสกุลและชนิดปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

: Research and development on technical efficiency analysis and identification of PGPR biofertilizer

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ สังกัด กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กปผ.

ผู้ร่วมงาน : นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง สังกัด กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กปผ.

นางสาวกัลยกร โปร่งจันทึก สังกัด กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กปผ.

5. บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการนับปริมาณและการจำแนกเชื้อในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียสกุล *Azotobacter Beijerinckia Azospirillum Gluconacetobacter Burkholderia Herbaspirillum* และ *Curtobacterium* โดยแบ่งศึกษาเป็น 3 การทดลองย่อย คือ 1. การศึกษาชนิดสารละลายเจือจางที่เหมาะสมในการเจือจางตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 สกุล โดยการศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารละลายเจือจาง 8 ชนิด 2. การศึกษาวิธีการนับเชื้อที่เหมาะสมในการนับเชื้อในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ โดยศึกษาเปรียบเทียบวิธีการนับจำนวน 3 วิธี คือ plate count, drop plate และ drop plate MPN และ 3 การศึกษาวิธีการจำแนกเชื้อที่เหมาะสมในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ดำเนินการศึกษาโดยใช้ลักษณะทางสรีระวิทยาและวิธีวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ phylogenetic ในตำแหน่งยีน 16S rRNA ผลการทดลองพบว่าสารละลายเจือจางแร่ธาตุอาหาร LG, Bei, LGI, SRSM-Mineral, 1% peptone และ JNFB-Mineral ทำให้ปริมาณเชื้อทั้ง 7 ชนิดมีปริมาณเชื้อสูงกว่าน้ำกลั่น โดยวิธี drop plate มีปริมาณเชื้อสูงกว่า drop plate MPN และ plate count และการจำแนกด้วยวิธี phylogenetic โดยใช้ตำแหน่งยีน 16S rRNA สามารถจำแนกเชื้อในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทั้ง 7 สกุล ได้ถึงระดับชนิด

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

Abstract

Study on the numeration and identification of Nitrogen-Fixing bacteria: *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum, Gluconacetobacter, Burkholderia, Herbaspirillum*, and *Curtobacterium* in PGPR biofertilizer. The experiment was divided in three steps. Eight diluents and three counting methods were used for enumeration of the 7 Nitrogen-Fixing bacteria. Identification method was based on the phylogenetic analysis of 16S rRNA region. Results revealed that LG, Bei, LGI, SRSM-Mineral, 1% peptone and JNFB-Mineral was suitable for 7 Nitrogen-Fixing bacteria and gave the number of that higher than distilled water. Drop plate method showed higher than drop plate MPN and plate count. The amplification of the 16S rRNA gene amplification via PCR was used to identify 7 Nitrogen-Fixing bacteria into species level.

6. คำนำ

ปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เป็นปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ทั้งบริเวณดินรอบๆราก ผิวราก ภายในราก ต้นและใบพืช โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้ด้วยการสร้างธาตุอาหารหรือเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชบางชนิด มีแบคทีเรียหลายชนิดที่พบว่าอาศัยอยู่ใน ดิน ราก และต้น (Mehnaz *et al.* 2001)

โดยประโยชน์ที่สำคัญของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ที่อาศัยอยู่รอบๆรากพืชเหล่านี้ คือ การตรึงไนโตรเจน (Boddy *et al.*, 1995; Meunchang *et al.*, 2004) ผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid (IAA) (Meunchang *et al.*, 2004) ช่วยให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้นมีผลช่วยให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (Jacoud *et al*. 1999)

โดยประโยชน์ที่สำคัญของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ที่อาศัยอยู่รอบๆรากพืชเหล่านี้ คือ การตรึงไนโตรเจน (Boddy *et al.*, 1995; Meunchang *et al.*, 2004) ผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid (IAA) (Meunchang *et al.*, 2004) ช่วยให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้นมีผลช่วยให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (Jacoud *et al.*, 1999) และยังช่วยให้อนุภาคดินจับกันเป็นเม็ดดินที่สมบูรณ์ จึงช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดิน และลดการศักยภาพการพังทลายของดิน

การวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ เป็นการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์สำคัญที่มีชีวิต และการจำแนกสกุลหรือชนิดของจุลินทรีย์สำคัญที่เป็นองค์ประกอบของปุ๋ยชีวภาพเหล่านั้น ให้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ซึ่งโดยปกติแล้ววิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนี้ มีหลายวิธี

และมีความแตกแตกต่างกันไปตามชนิดของปุ๋ยชีวภาพนั้น ๆ เช่น วิธีนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (viable plate count) วิธีหาค่า MPN (Most Probable Number) วิธีการจำแนกสกุลจุลินทรีย์โดยวิธีสัณฐานวิทยา หรือวิธีทางพันธุวิศวกรรมโมเลกุล เป็นต้น

ในการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (Plant Growth Promoting Rhizobacteria Biofertilizer หรือ PGPR Biofertilizer) ซึ่งเป็นปุ๋ยชีวภาพชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีความสามารถหลายด้านอยู่ในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพเดียวกัน โดยจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสามารถ ตรึงไนโตรเจน ผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ช่วยละลายฟอสเฟต รวมทั้งสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคบางชนิดได้ อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจนับปริมาณ มักใช้อาหารจำเพาะในการนับและจำแนกตามสกุลจุลินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบ วิธีการที่พบว่านิยมใช้นับจุลินทรีย์สำคัญในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์โดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ 1) วิธีนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (viable plate count) ซึ่งใช้นับแบคทีเรียในกลุ่ม aerobic และ 2) วิธีการนับแบบ MPN (Most probable number) ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่ม micro aerophilic (กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา. 2551) แต่วิธีข้างต้นยังมีข้อบกพร่องหลายอย่าง จึงต้องมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพให้มีมาตรฐาน ทันสมัย และเหมาะสมกับปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

7. อุปกรณ์และวิธีการ

- อุปกรณ์

1. เชื้อบริสุทธิ์ *Azotobacter Beijerinckia Azospirillum Gluconacetobacter Burkholderia Herbaspirillum* และ *Curtobacterium* 2. เชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (Reference strain)

3. ตัวอย่างปุ๋ยปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ วัน และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์จากภาคเอกชน

4. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

5 น้ำเกลือ 0.85%

6. สารละลาย peptone 0.1%

7. สารละลายแร่ธาตุอาหาร LG, Bei, LGI, SRSM-Mineral, JNFB-Mineral

8. ไพรเมอร์ (primer)

-วิธีการ

1. คัดเลือกแบคทีเรียคล้ายสกุล *Azotobacter Beijerinckia Azospirillum Gluconacetobacter Burkholderia Herbaspirillum* และ *Curtobacterium* จาก culture collection ของหน่วยรวบรวมเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ ห้องปฏิบัติการวิจัยจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอิสระและปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา 7 ไอโซเลทและเชื้ออ้างอิง *Azotobacter vinelandii* ATCC478 โดยใช้วิธีการวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay

2. ดำเนินการศึกษา diluents ที่เหมาะสม ด้วยการเจือจางปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยเชื้อสกุล *Azotobacter Beijerinckia Azospirillum Gluconacetobacter Burkholderia Herbaspirillum* และ *Curtobacterium* ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 น้ำเกลือ 0.85%

กรรมวิธีที่ 3 สารละลาย peptone 0.1%

กรรมวิธีที่ 4 สารละลายแร่ธาตุอาหาร LG หรือ Bei หรือ LGI หรือ SRSM-Mineral หรือ JNFB-Mineral ขึ้นอยู่กับสกุลของเชื้อ

3. ศึกษาเปรียบเทียบการนับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระทั้ง 7 ไอโซเลท ด้วยวิธี Plate count, Drop plate และ MPN

4. การจำแนกสกุลและชนิด

4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

4.2 ศึกษาเปรียบเทียบ primer 3 ชุด สำหรับการจำแนกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอิสระทั้ง 7 ไอโซเลท ด้วยวิธี 16 rRNA sequencing มี 3 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 ใช้ ชุด primer UFUL, 515F, 1099F, 1500R

UFUL 5’-gcc taa cac atg caa gtc ga-3’

515F 5’-gtg cca gca gcc gcg gt-3’

1099F 5’-gca acg agc gca acc c-3’

1500R 5’-ttc agc att gtt cca ttg g-3’

กรรมวิธีที่ 2 ใช้ ชุด primer 1F, 3R

1F 5’-agt ttg atc ctg gct c-3’

3R 5’-aag gag gtg atc cag cc-3’

กรรมวิธีที่ 3 ใช้ ชุด primer fD1, rP2

fD1 5’-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3’

3R 5’-acg gct acc ttg tta cga ctt-3’

เตรียม PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของยีน 16S rRNA ให้ได้ความเข้มข้นอย่างน้อย 40 ng/µl และเตรียม primer fD1 (forward primer) และ rP2 (reverse primer) ความเข้มข้น 10 pmol/µl ต่อตัวอย่างที่ต้องการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นเตรียมปฏิกิริยาของการอ่านลำดับนิวคลีโอท์ ประกอบด้วย PCR product ของยีน 16S rRNA, Taq DNA polymerase, Primer, dNTP ที่มี ddNTP เป็นส่วนผสม นำส่วมผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง PCR โดยมีลำดับของปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ	
ขั้นตอนที่ 2	95 องศาเซลเซียส 30 วินาที	30 รอบ
	50 องศาเซลเซียส 10 วินาที	
	60 องศาเซลเซียส 4 นาที	
ขั้นตอนที่ 3	4 องศาเซลเซียส	

ตกตะกอนตัวอย่างด้วย Ethanol/Sodium acetate แล้วนำตัวอย่างที่ตกตะกอนละลายกลับด้วย Hi-Di Formamide 15 µl ต้มตัวอย่างที่ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที แช่น้ำแข็งทันทีนานประมาณ 5 นาที แล้วเข้าเครื่องอ่านลำดับเบส (DNA sequencer) โดยที่เครื่องอ่านลำดับเบสจะตรวจจับ Fluorescent dye ที่ติดไว้ที่ ddNTP แล้วอ่านค่าออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์

5. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank จากเวปไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เลือก ที่ BLAST แล้วเลือกที่ Nucleotide BLAST (blastn) จากนั้นใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จะแสดงตามลำดับความคล้ายคลึงกันจากมากไปหาน้อย

8. ผลการทดลอง

1. การศึกษาสารละลายเจือจาง

การศึกษาสารละลายเจือจางเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อ *Azotobacter* spp. ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย *A. venilandii* DASF02002 *A. beijerinckii* DASF02005 *A. vinelandii* ATCC478 เชื้อ *Azotobacter* ที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์วัน และเชื้อ *Azotobacter* ที่แยกจากปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ของภาคเอกชน พบว่าการใช้สารละลายเจือจางแร่ธาตุอาหาร LG ทำให้ปริมาณเชื้อรอดชีวิตมีปริมาณเชื้อสูงกว่าสายละลายชนิดอื่นๆ

2. วิธีการนับปริมาณเชื้อ

การศึกษาวิธีการนับปริมาณเชื้อ *Azotobacter* พบว่ามีปริมาณแตกต่างกันทั้ง 3 วิธี โดยวิธี drop plate ให้ปริมาณเชื้อสูงสุด รองลงมา plate count และ drop plate MPN โดยให้ปริมาณเชื้อ 1.82×10^8 2.81×10^7 และ 2.37×10^7 หน่วยโคโลนี ตามลำดับ (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1-3)

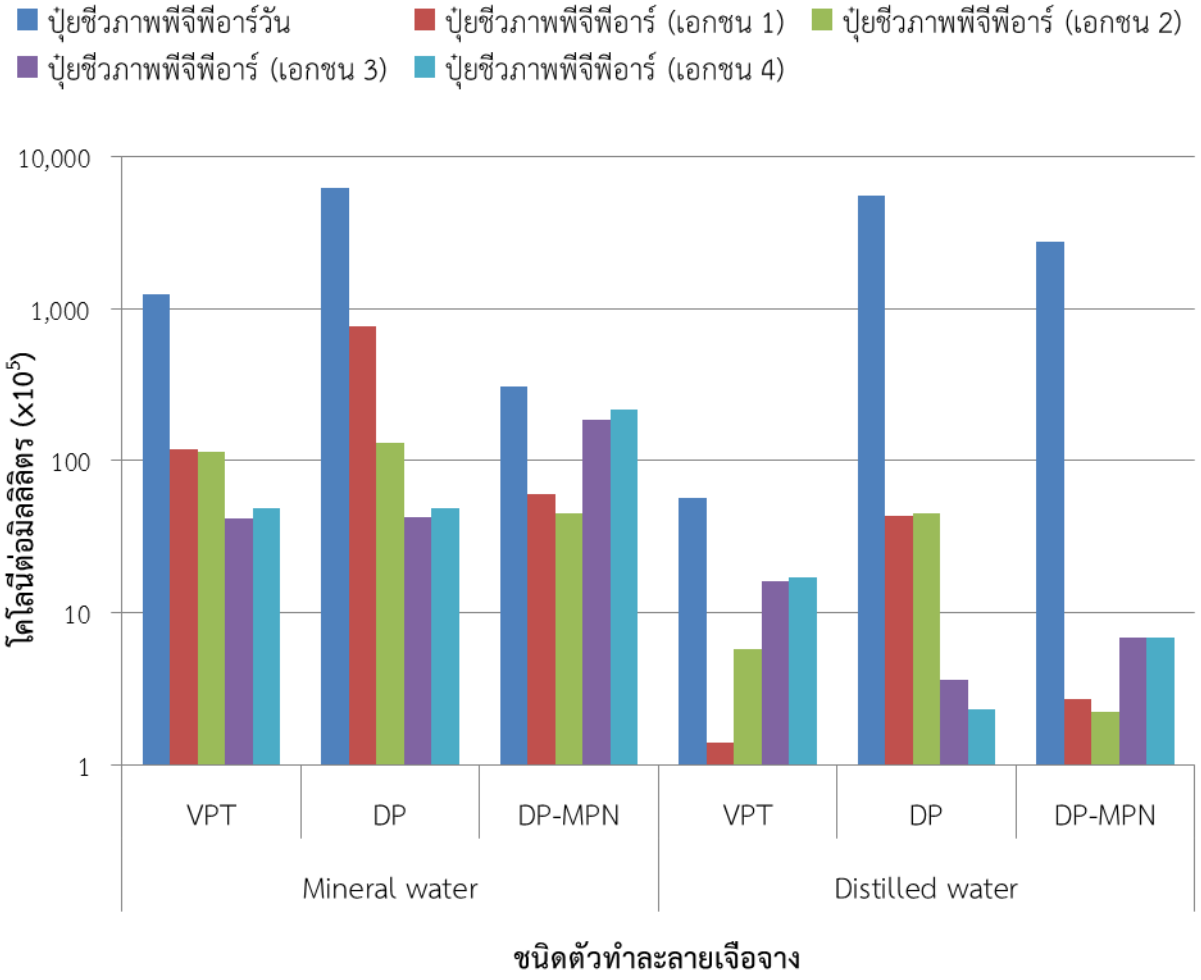
3. การจัดจำแนกสกุลและชนิด

การการศึกษาวิธีการจำแนกเชื้อที่เหมาะสมในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ที่ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* พบว่า การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเชื้อ *Azotobacter* ที่แยกได้จากตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทั้ง 7 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบเชื้อมาตรฐาน *A. vinelandii* (ATCC 478) พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ (ภาพที่ 2) การศึกษาจากจัดจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์ phylogenetic ใช้ไพรเมอร์ 3 ชุด พบว่าให้ผลการจัดจำแนกไม่แตกต่างกัน โดยที่ ชุด primer UFUL, 515F, 1099F, 1500R มีค่าใช้จ่าย 3,500 บาท/ตัวอย่าง ชุด primer 1F, 3R และชุด primer fD1, rP2 มีค่าใช้จ่ายประมาณ 500 บาท/ตัวอย่าง ผลการจำแนกเชื้อ *Azotobacter* ที่แยกจากปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ของเอกชนทั้ง 7 ตัวอย่าง คือ *Azotobacter* spp. หมายเลข ไอโซเลท 01,02,03,04,05,06, และ 07 มีความเหมือนกับ *A. vinelandii* ATCC 478 (AB175657) 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบวิธีการนับ

ปริมาณเชื้อ *Azotobacter* ทั้ง 3 วิธี โดยใช้สารละลายเจือจางแร่ธาตุอาหาร LG พบว่าวิธี drop plate MPN สามารถใช้ทดแทนวิธี viable plate count (ตารางที่ 2)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเชื้อ *Azotobacter* โดยการย้อมแกรมติดสีแดง (แกรมลบ) เซลล์มีรูปร่างรีหรือทรงกลม เมื่อเปรียบเทียบ *Azotobacter vinelandii* (ATCC 478) กับเชื้อ *Azotobacter* ที่แยกได้บริษัทเอกชนจำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ เช่น รูปร่าง ขนาด และลักษณะการติดสีย้อมแกรมลบ (ภาพที่ 2) *Jensen* (1954) และ Holt *et al.* (1994) รายงานลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Azotobacter* ว่าเซลล์ขนาด 1-2 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่รูปร่างรี แท่ง หรือทรงกลม เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์อาจอยู่รวมเป็นกลุ่มหรือต่อกันเป็นสาย มีแฟลกเจลล่า (flagella) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ และสร้างเมือก (mucus) และแคปซูล (capsule) บางชนิดสร้างเม็ดสี (pigment) เช่น สีเขียวอมเหลือง สีม่วง หรือสีน้ำตาลเข้ม

การจัดจำแนกสกุลของเชื้อ *Azotobacter* โดยวิธีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบสเมื่อนำข้อมูลที่ได้เทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงจาก GeneBank พบว่าเชื้อ *Azotobacter* sp.1-7 มีความเหมือนกับสายพันธุ์อ้างอิง *A. vinelandii* ATCC 487 (AB175657) 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3-11) การจัดจำแนกสกุลและชนิดของแบคทีเรียมีรายงานการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เนื่องจากเป็น conserve region มีการศึกษาครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันชื่อ Carl Woese มีรายงานการใช้ไพร์เมอร์ (primer) ในการจำแนกแบคทีเรียสกุลต่างๆ เช่น 27F 1492R 8F U1492R 928F 336R 1100F 1100R 337F 907R 785F 805R 533F 518R (Eden *et al.,* 1991; Weisburg *et al.,* 1991; Weidne *et al.,* 1996; Jiang 2006)



*VPT = viable plate count, DP = drop plate, DP-MPN = drop plate-MPN

ภาพที่ 1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารละลายเจือจางต่อวิธีการนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Azotobacter*

ตารางที่ 1 ปริมาณเชื้อ *Azotobacter* ในแต่ละสารละลายเจือจาง

สารละลายเจือจาง	ค่าเฉลี่ยวิธีการนับปริมาณ[1]		
	Viable plate count	Drop plate	Drop plate MPN
Mineral water	281.00	1823.52	237.20
Distilled water	23.78	1551.18	783.82
Standard deviation	53.87	61.95	192.79
t- value	4.77	4.40	-2.82
Sig.*	0.0000	0.0001	0.0066

*ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

[1]จำนวนตัวอย่าง 150 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 ปริมาณเชื้อ *Azotobacter* ในแต่ละวิธีการนับโดยใช้สารละลายเจือจาง Mineral water

วิธีการนับปริมาณ		ค่าเฉลี่ยความแตกต่างปริมาณเชื้อ[1]	Standard deviation	t- value	Sig.*
Viable plate count	Drop plate	158780.60	398.47	-3.87	0.0003
	Drop plate MPN	1218.79	34.91	1.25	0.2156
Drop plate	Viable plate count	158780.60	398.47	-3.87	0.0003
	Drop plate MPN	180354.82	424.68	3.74	0.0005
Drop plate MPN	Viable plate count	1218.79	34.91	1.25	0.2156
	Drop plate	180354.82	424.68	3.74	0.0005

*ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

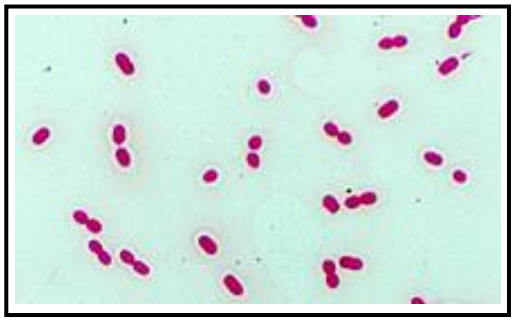
[1]จำนวนตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3 ปริมาณเชื้อ *Azotobacter* ในแต่ละวิธีการนับโดยใช้สารละลายเจือจาง Distilled water

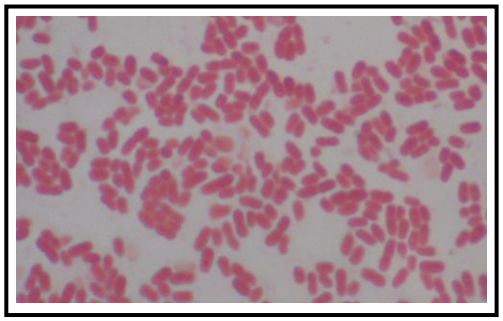
วิธีการนับปริมาณ		ค่าเฉลี่ยความแตกต่างปริมาณเชื้อ[1]	Standard deviation	t- value	Sig.*
Viable plate count	Drop plate	187669.32	433.21	-3.52	0.0009
	Drop plate MPN	47823.14	218.68	-3.48	0.0011
Drop plate	Viable plate count	187669.32	433.21	-3.52	0.0009
	Drop plate MPN	46349.99	215.29	3.56	0.0008
Drop plate MPN	Viable plate count	47823.14	218.68	-3.48	0.0011
	Drop plate	46349.99	215.29	3.56	0.0008

*ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

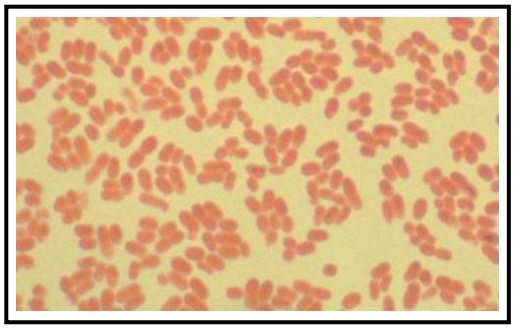
[1]จำนวนตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง



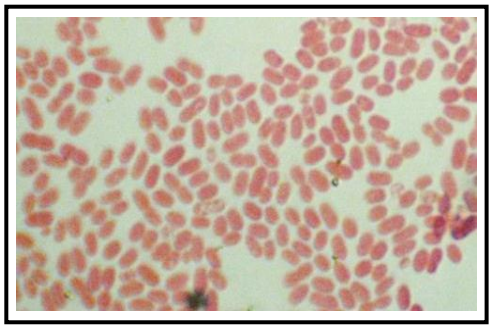
Azotobacter veniladii (ATCC 478)



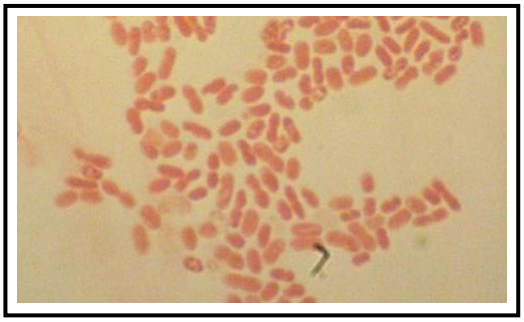
Azotobacter sp.1 (เอกชน 1)



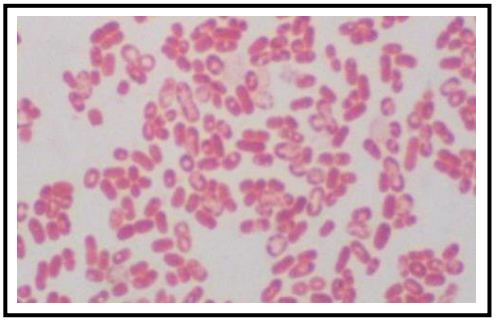
Azotobacter sp.2 (เอกชน 2)



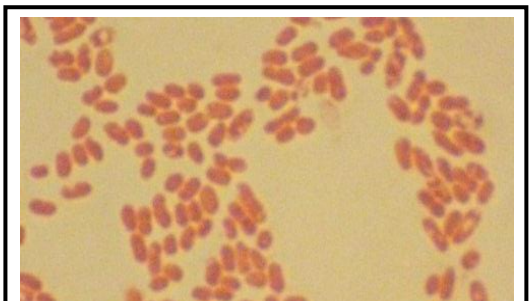
Azotobacter sp.3 (เอกชน 3)

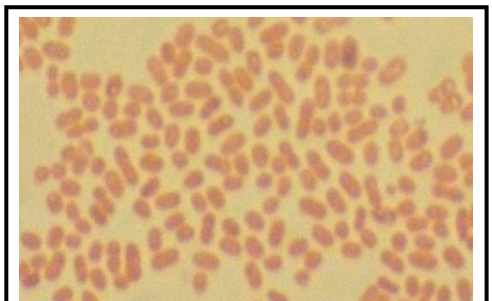


Azotobacter sp.4 (เอกชน 4)



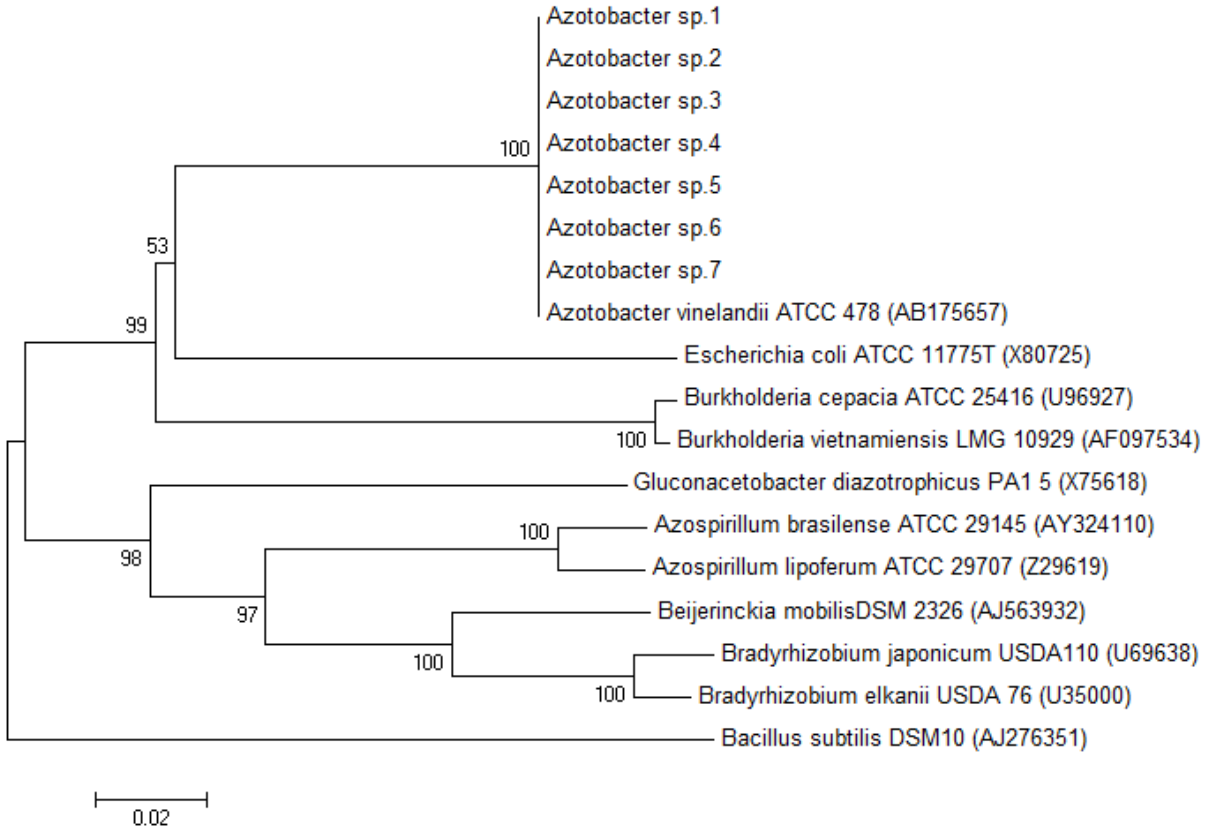
Azotobacter sp.5 (เอกชน 5)





Azotobacter sp.6 (เอกชน 6) *Azotobacter* sp.7 (เอกชน 7)

ภาพที่ 2 การเปรียบลักษณะทางสรีระวิทยาของ *Azotobacter* ของเชื้อมาตรฐานและบริษัทเอกชน

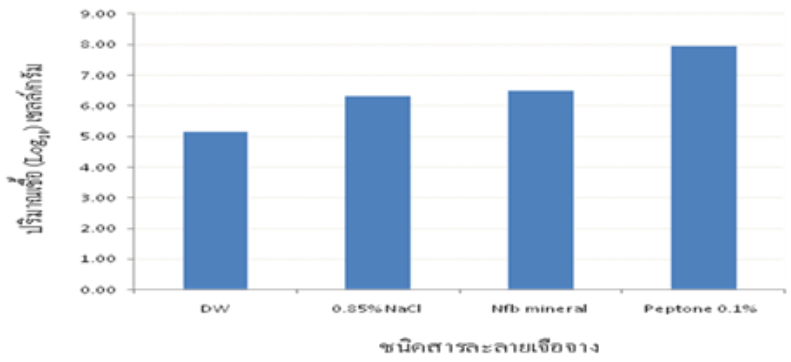


ภาพที่ 3 Neighbor-joining phylogenetic analysis โดยศึกษายีน 16S rRNA แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพีจีพีอาร์สกุล *Azotobacter* 1-7 ที่แยกได้จากปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ และสายพันธุ์อ้างอิง (Reference strains)

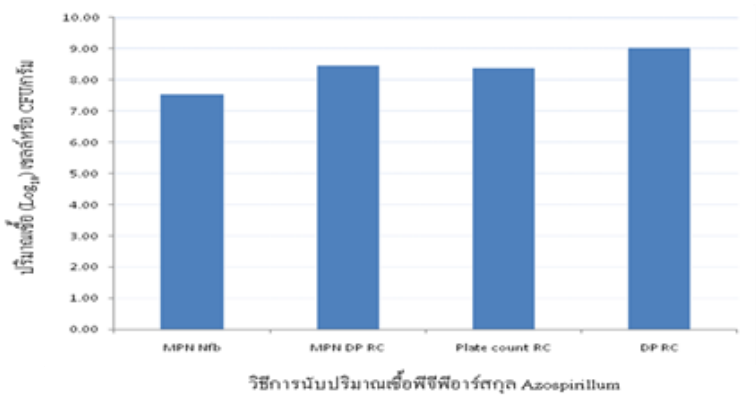
การศึกษาสารละลายเจือจางเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อ *Beijerinckia B. mobilis* ATCC35011 *B. indica* DASF04018 เพื่อการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ พบว่าการใช้สารละลายเจือจางแร่ธาตุอาหาร LG ทำให้ปริมาณเชื้อรอดชีวิตมีปริมาณเชื้อสูงกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการนับให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 3 วิธี คือ วิธี plant count, drop plate และ drop plate MPN แต่มีแนวโน้มว่าวิธี plate count จะมีปริมาณ

เชื้อที่นับได้ต่ำกว่าวิธีอื่นๆ การศึกษาการจัดจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์ phylogenetic ใช้ไพรเมอร์ 3 ชุด พบว่าให้ผลการจัดจำแนกไม่แตกต่างกัน

การศึกษาสารละลายเจือจางเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อ *Azospirillum* เพื่อการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ พบว่าสารละลายเจือจาง peptone 0.1% ทำให้ปริมาณเชื้อรอดชีวิตมีปริมาณเชื้อสูงกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 4) และผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการนับให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 3 วิธี (ภาพที่ 5) การศึกษาจากจัดจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์ phylogenetic ของยีน 16S rRNA พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ *Azospirillum brasilense* FN813485 เท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์



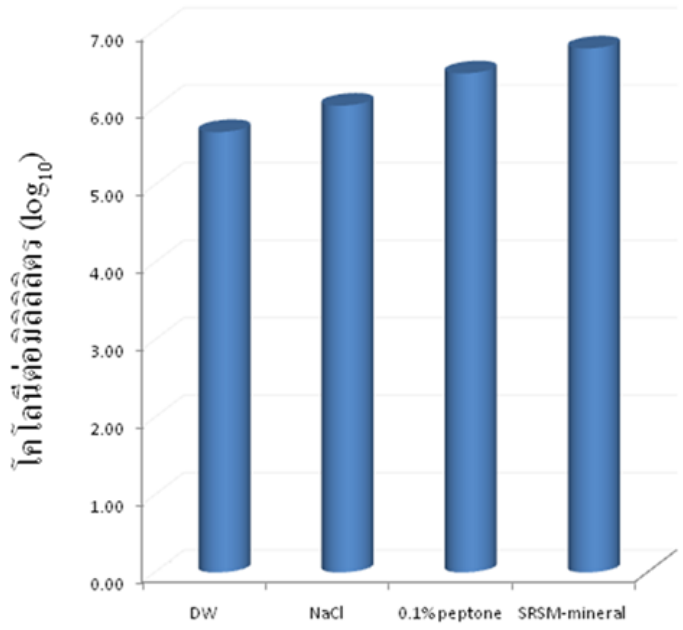
ภาพที่ 4 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารละลายเจือจางต่ออัตราการรอดของ *Azospirillum*



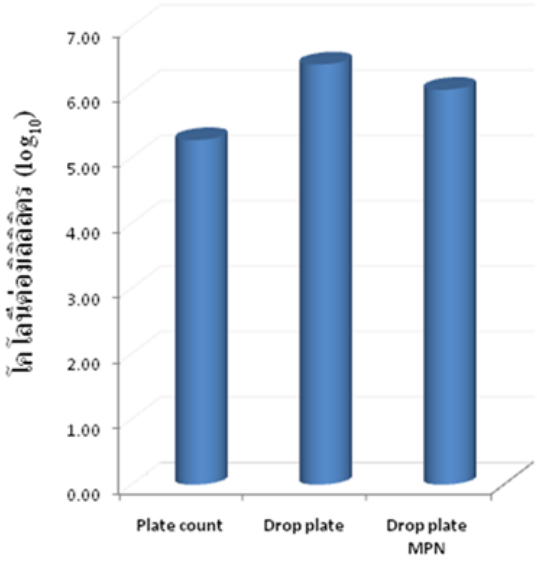
ภาพที่ 5 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารละลายเจือจางต่ออัตราการรอดของ *Azospirillum*

การศึกษาสารละลายเจือจางเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อ *Gluconacetobacter* พบว่าสารละลายเจือจาง LGI ทำให้ปริมาณเชื้อรอดชีวิตมีปริมาณเชื้อสูงกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ โดยวิธี MPN ในอาหารกึ่งเหลวปราศจากไนโตรเจน ให้ปริมาณสูงสุด ตามด้วย Drop LGI MPN plate count LGI และ Drop plate LGI ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 94, 8.8, 3.6 และ 1.8 $\times 10^7$ เซลล์หรือหน่วยโคโลนี การศึกษากราจัดจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์ phylogenetic ของยีน 16S rRNA พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ *Gluconacetobacter diazotrophicus* AM89258.1 เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

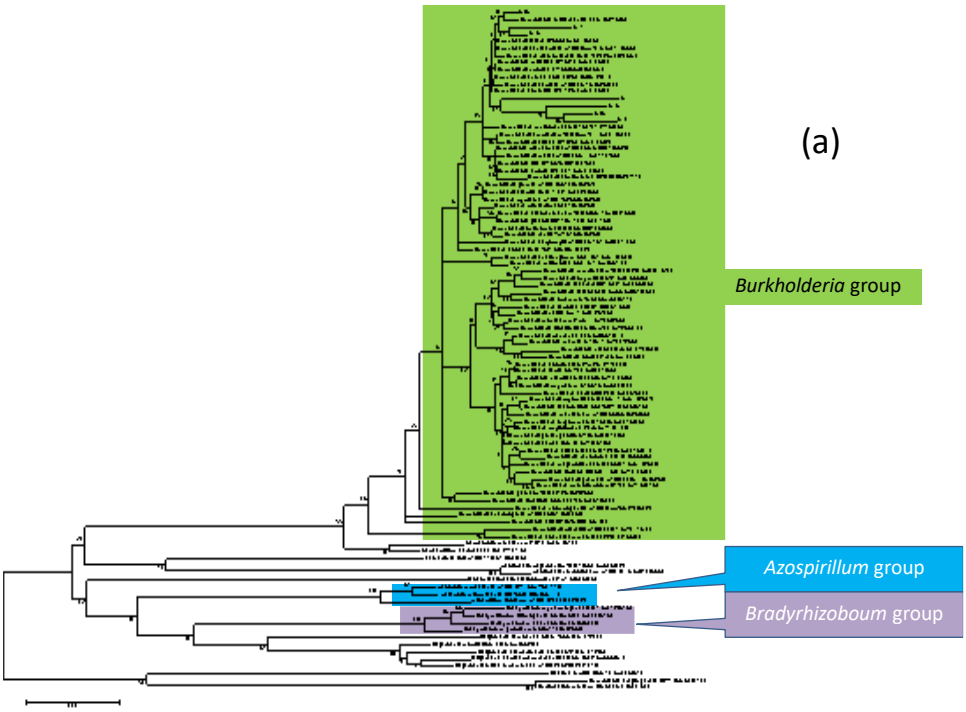
การศึกษาสารละลายเจือจางเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อ *Burkholderia* เพื่อการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ พบว่าสารละลายเจือจาง SRSM-Mineral ทำให้ปริมาณเชื้อรอดชีวิตมีปริมาณเชื้อสูงกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 6) มีปริมาณเชื้อแตกต่างกันทั้ง 3 วิธี โดยวิธี drop plate ให้ปริมาณเชื้อสูงสุด รองลงมา drop plate MPN และ plate count (ภาพที่ 7) การศึกษาการจัดจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์ phylogenetic ของยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับกลุ่มเชื้อที่ใกล้เคียงกับเชื้อเป้าหมายรหัส S44 (ภาพที่ 8)

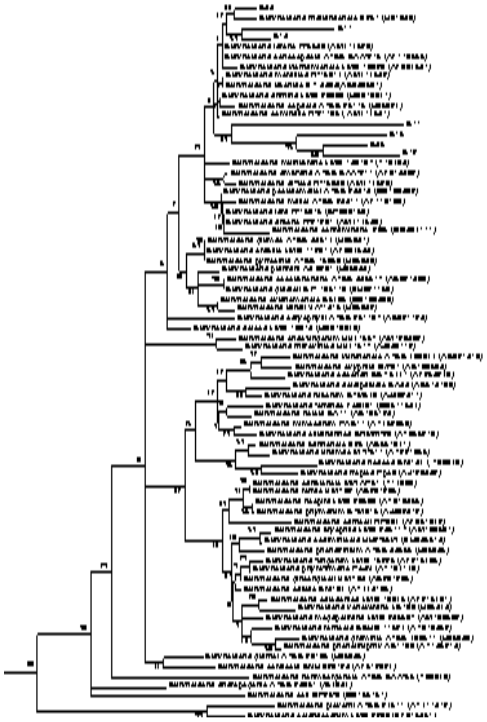


ภาพที่ 6 ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารละลายเจือจางต่อปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ *Burkholderia*



ภาพที่ 7 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ *Burkholderia* เมื่อนับด้วยวิธี plate count Drop plate และ Drop plate MPN

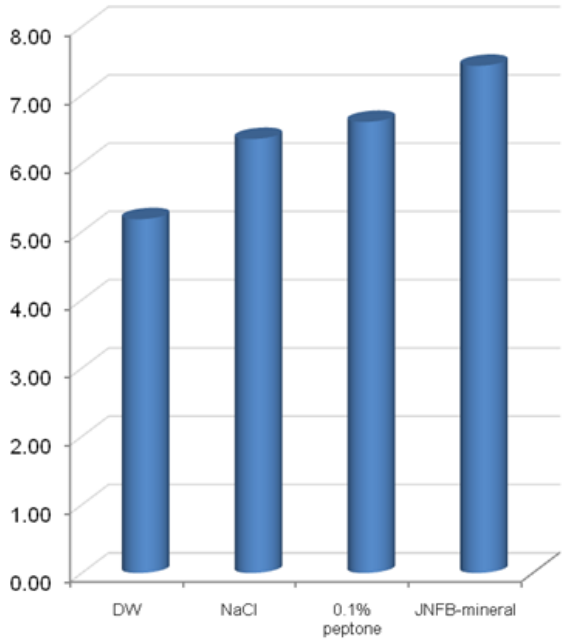




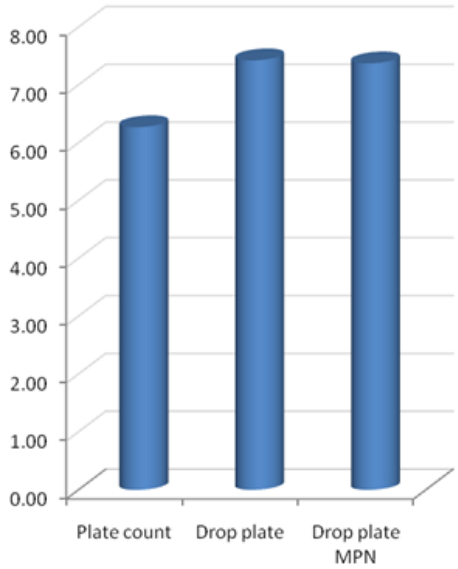
(b)

ภาพที่ 8 Neighbor-joining phylogenetic analysis โดยใช้ ยีน 16S rRNA 1,400 bp แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพีจีพีอาร์สกุล *Burkholderia* ที่แยกจากวิธีการนับในการทดลองย่อยที่ 2 (a) วิเคราะห์รวมทุกชนิด และ (b) วิเคราะห์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับเชื้อเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ รหัส S44

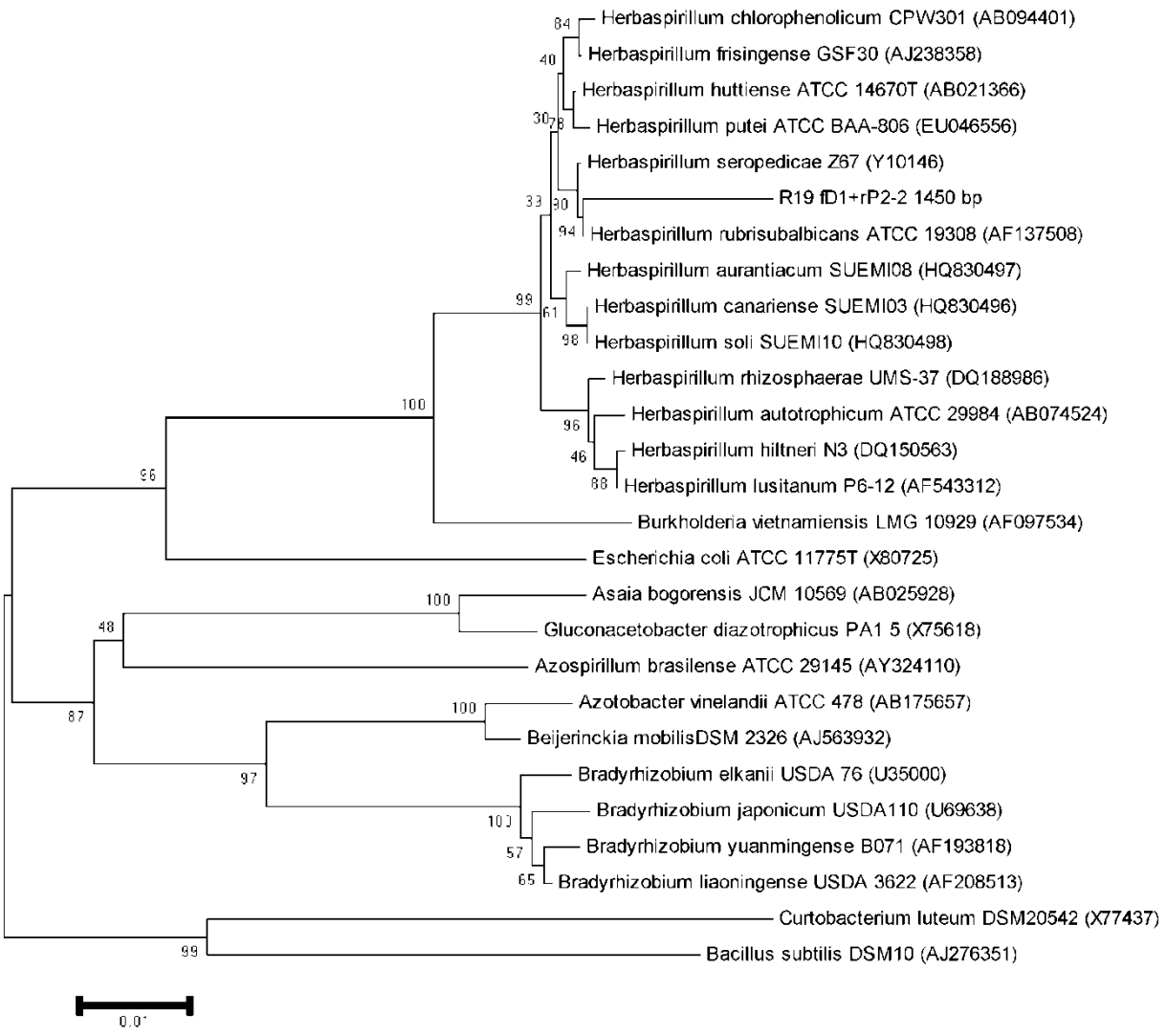
การศึกษาสารละลายเจือจางเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อ *Herbaspirillum* เพื่อการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ พบว่าสารละลายเจือจาง JNFB-Mineral ทำให้ปริมาณเชื้อรอดชีวิตมีปริมาณเชื้อสูงกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 9) มีปริมาณเชื้อแตกต่างกันทั้ง 3 วิธี โดยวิธี drop plate ให้ปริมาณเชื้อสูงสุด รองลงมา drop plate MPN และ plate count (ภาพที่ 10) การศึกษาการจัดจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์ phylogenetic ของยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับกลุ่มเชื้อที่ใกล้เคียงกับเชื้อเป้าหมายรหัส Ri19 (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 9 ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารละลายเจือจางต่อปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ *Herbaspirillum*



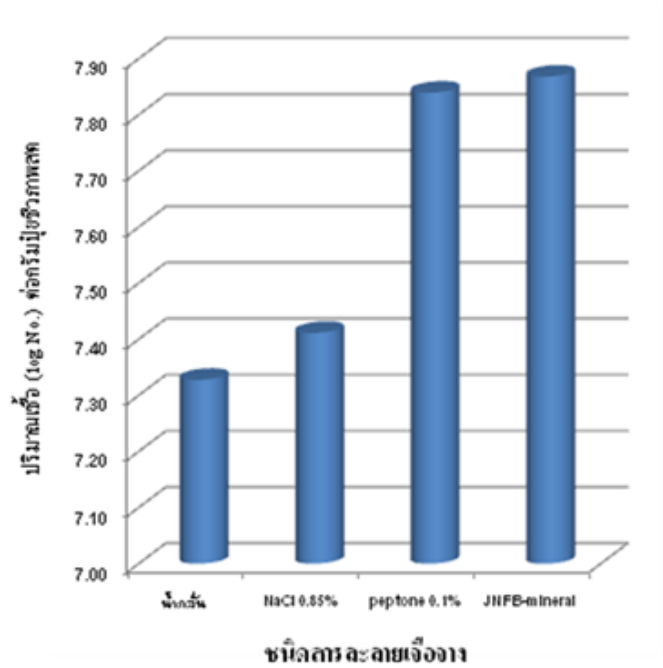
ภาพที่ 10 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ *Herbaspirillum* เมื่อนับด้วยวิธี plate count, Drop plate, Drop plate MPN



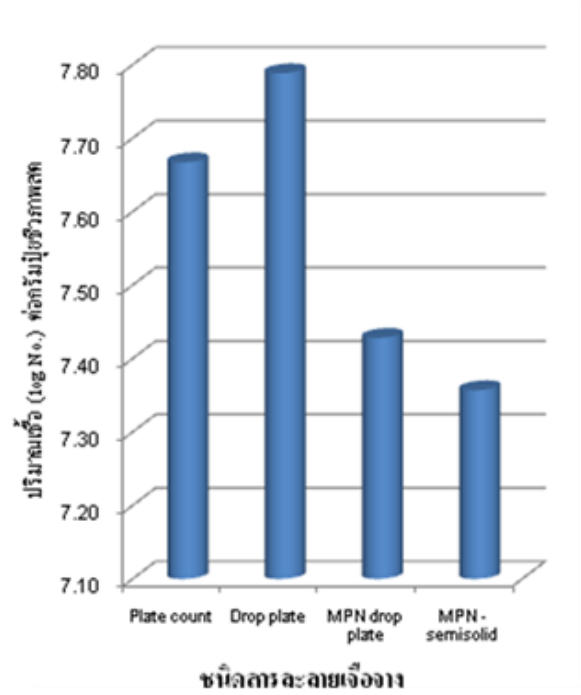
ภาพที่ 11 Neighbor-joining phylogenetic analysis โดยใช้ ยีน 16S rRNA 1,400 bp แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพีจีพีอาร์สกุล *Herbaspirillum* ที่แยกจากวิธีการนับในการทดลองย่อยที่ 2 วิเคราะห์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับเชื้อเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือรหัส Ri19

การศึกษาสารละลายเจือจางเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อ *Curtobacterium* เพื่อการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ พบว่าสารละลาย JNFB-mineral และ สารละลาย peptone 0.1% มีผลทำให้การนับ *Curtobacterium* มีปริมาณเชื้อสูงกว่า การใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและน้ำเกลือ 0.85% (ภาพที่ 12) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแร่ธาตุในสารละลายทั้งสองชนิดมีสภาพที่เหมาะสมกับเซลล์ทำให้ทนทานต่อ osmotic stress ได้มากกว่าในสารน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและน้ำเกลือ 0.85% การศึกษาวิธีการนับเชื้อ *Curtobacterium* เพื่อการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ นั้น พบว่าการนับโดยวิธี drop plate ให้ผลปริมาณเซลล์สูงสุด ส่วนวิธี plate count drop plate MPN และ drop plate MPN semisolid มีปริมาณเซลล์น้อยกว่า วิธี drop plate ตามลำดับ ซึ่งโดยทั่วไปแล้ววิธี drop plate MPN จะทำให้ผลการวิเคราะห์น้อยกว่า วิธี plate count ประมาณ 10 เท่า (ภาพที่ 13) การศึกษาวิธีการจำแนกเชื้อ

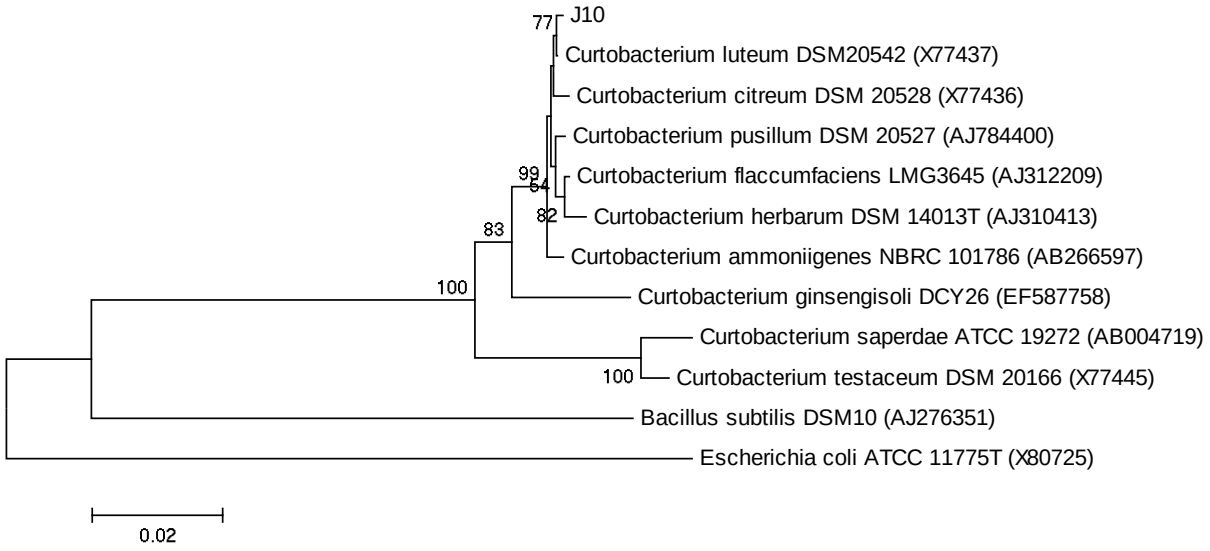
Curtobacterium โดยใช้วิธี phylogenetic ของยีน 16S rRNA ของตัวอย่าง *Curtobacterium* sp. J10 พบว่าสามารถจำแนกเป็นสกุล *Curtobacterium* ได้อย่างชัดเจน และเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกับ *C. luteum* DSM 20542 (X77437) มากที่สุด (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 12 ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารละลายเจือจางต่อปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ *Curtobacterium*



ภาพที่ 13 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ *Curtobacterium* เมื่อนับด้วยวิธี plate count Drop plate Drop plate-MPN และ MPN-semisolid media



ภาพที่ 14 Neighbor-joining phylogenetic analysis โดยใช้ ยีน 16S rRNA แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุ์กรรมในพีจีพีอาร์สกุล *Curtobacterium*

9. สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองนี้ทำให้ได้สารละลายเจือจาง (diluent) ที่เหมาะสมในการเจือจางปุ๋ยชีวภาพเพื่อนับปริมาณแบคทีเรียสกุล *Azotobacter Beijerinckia Azospirillum Gluconacetobacter Burkholderia Herbaspirillum* และ *Curtobacterium* รวม 5 ชนิด ได้แก่ สารละลายเจือจางธาตุอาหาร LG, Bei, LGI, SRSM-Mineral และ JNFB-Mineral การนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี drop plate มีแนวโน้มให้ปริมาณเชื้อสูงที่สุด และวิธีการจำแนกโดยใช้วิธี phylogenetic ของยีน 16S rRNA สามารถจำแนกเชื้อสกุลดังกล่าวได้ในระดับสกุล-ชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทั้ง 7 ชนิด

10. เอกสารอ้างอิง

Boddey, R.M. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contribution and prospects for improvement. Plant Soil. 174: 195-209.

Eden, P.A., T.M. Schmidt, R.P. Blakemore and N.R. Pace. 1991. Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16S rRNA-Specific DNA. International Journal of Systematic Bacteriology. 41 (2): 324–325.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T.Williams1 994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MS, USA.

Jacoud, C. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CTR1 during maize seed germination. Canadian Journal of Microbiology. 45: 339-342.

Jensen, H. L. 1954. The Azotobacteriaceae. Bacteriological Reviews18 (4): 195–214.

Jiang, H., H. Dong, G. Zhang, B. Yu, L. R. Chapman and M. W. Fields. 2006. Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. Applied and Environmental Microbiology 72 (6): 3832–3845.

Khan, Md. H. R., Md. Mohiuddin and M. Rahman. 2008. Enumeration, Isolation and Identification of Nitrogen-Fixing Bacterial Strains at Seedling Stage in Rhizosphere of Rice Grown in Non-Calcareous Grey Flood Plain Soil of Bangladesh. Journal of the Faculty of Environmental Science and Technology. Okayama University. 13(1): 97-101.

Mazinani, Z., M. Aminafshar, A. Asgharzadeh and M. Chamani. 2012. Different Methods for Isolation and Preliminary Identification of *Azotobacter*. International Journal of Agricultural Science and Research 3 (1): 1-8.

Mehnaz, S. 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. Canadian Journal of Microbiology. 47: 110-117.

Meunchang, S., S. Panichsakpatana, S. Ando, T. Yokayama. 2004. Phylogenetic and Physiological characterization of indigenous *Azospirillum* isolates in Thailand. Journal of the Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition 50(3): 413-421.

Meunchang, S., S. Panichsakpatana and R.W. Weaver. 2005. Inoculation of sugar mill by products compost with N_2 –fixing bacteria. Plant Soil. 271: 219-225.

Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 173 (2): 697–703.

Weidne, S., W. Arnold and A. Pühler (1996). Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl Env Microbiol 62 (3): 766–71.