

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ

ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

กิจกรรมย่อย : การศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืช

3. การทดลองที่ 4.2.3 : การศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืชในระดับ micro-plot

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศิริลักษณ์ แก้วสุริยิต

ผู้ร่วมงาน : นางประไพ ทองระอา

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ : ทำการศึกษาการศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืช โดยวิธีเพาะเลี้ยง

จุลินทรีย์ (conventional method) ในเบื้องต้น พบว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ มูลโค แหนแดงแห้ง และ แหนแดงสด ตามกรรมวิธีที่กำหนด 8 กรรมวิธี คือ 1. กรรมวิธีควบคุม (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน) 2. ใส่แหนแดงแห้ง 3. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค 4. กรรมวิธีควบคุม+เชื้อ *P. fluorescens* 5. ใส่แหนแดงแห้ง+เชื้อ *P. fluorescens* 6. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค+เชื้อ *P. fluorescens* 7. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค+เชื้อ *P. fluorescens* และ 8. ใส่แหนแดงสด+เชื้อ *P. fluorescens* พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 เดือน ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด มีปริมาณค่อนข้างคงที่ จากปริมาณเริ่มต้น คือ 10^7 - 10^8 cfu/1 กรัมดิน ในทุกกรรมวิธี และพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในแต่ละเดือนค่อนข้างคงที่และไม่แตกต่างกัน ทั้งที่ใส่เชื้อเครื่องหมาย (*P. Fluorescens*) และที่ไม่ใส่เชื้อเครื่องหมาย จากนั้นสุ่มเก็บดินแต่ละกรรมวิธีเพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืชด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ (Sequence-based metagenomics) โดยการใช้วิธี paired end read ในส่วน hypervariable region (V3-V4) ของ 16s rDNA ด้วยไพรเมอร์ 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG และ 802R: TACNVGGGTATCTAATCC แล้วนำไปวิเคราะห์ ลำดับเบสเพื่อประเมินความหลากหลายของโครงสร้างประชากรในแต่ละกรรมวิธี จากข้อมูลที่ได้พบว่า สามารถสร้าง clean pair reads ได้ทั้งหมด จำนวน 389820 reads เมื่อนำ read ที่ได้มากรองข้อมูลพบว่ามีจำนวน filtered tag อยู่ในช่วง 14313-19404 tag และเมื่อนำมาจัดกลุ่ม OTU (Operational Taxonomic Units) โดยเลือกข้อมูลที่มีความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของ tag ไม่ต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำข้อมูลแต่ละกรรมวิธีจัดกลุ่มได้ในช่วง 1017-1528 OTU โดยพบว่ากรรมวิธีที่ 4 มีจำนวน OTU สูงที่สุด คือ 15283 กลุ่ม และกรรมวิธีที่ 3 ที่เติมมูลโคนั้นมี OTU ต่ำสุด คือ 1017 กลุ่ม เมื่อนำมาวิเคราะห์ Rarefaction พบว่าประชากรจุลินทรีย์ในกรรมวิธีที่ 4 มีค่าความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์สูงที่สุด รองลงมาคือประชากรในกรรมวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ 3 มีความหลากหลายของประชากรน้อยที่สุด และเมื่อวิเคราะห์

ความหลากหลายของโครงสร้างประชากรระดับ alpha พบว่าประชากรจุลินทรีย์ในกรรมวิธีที่ 3 มีค่าดัชนี Shannon ต่ำกว่าประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น และเมื่อวิเคราะห์ค่า beta diversity analysis ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficients) อยู่ในช่วง 0.341 ถึง 0.559 สามารถแบ่งได้ เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ กรรมวิธีที่ 7 ดินที่ใส่มูลสัตว์+เชื้อ และ 8 ดินที่ใส่แหนแดงสด + เชื้อ กลุ่มที่ 2 คือ กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธี ควบคุม กรรมวิธีที่ 2 ใส่แหนแดงแห้ง 4. ใส่แหนแดงสด 5. ควบคุม + เชื้อ 6. ใส่แหนแดงแห้ง + เชื้อ ตามลำดับ และกลุ่มที่ 3 คือ กรรมวิธีที่ 3 ดินใส่มูลสัตว์ และจากข้อมูลที่ได้จาก OTU เมื่อนำมาเปรียบเทียบในแต่ละโครงสร้างประชากรในระดับไฟลัม พบว่าแบคทีเรียกลุ่มหลัก คือ ในทุกกรรมวิธี คือ Bacteroidetes Firmicutes Acidobacteria Proteobacteria และ Cyanobacteria พบว่า ในกรรมวิธีที่ 2 4 6 และ 8 ที่มีการใส่แหนแดงในรูปแหนแดงแห้ง และแหนแดงสด จะพบประชากรของ Cyanobacteria สูงถึง 5.85 6.94 4.07 และ 3.18 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่ได้เติมแหนแดง จะพบประชากรกลุ่มนี้ในปริมาณที่ต่ำกว่า และเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่เติมแหนแดงจะพบว่าไม่ว่าจะเติมแหนแดงสดหรือแหนแดงแห้ง หากมีการเติมเชื้อ *P. fluorescens* จะทำให้ประชากรกลุ่มนี้ลดลง เป็นที่น่าสังเกตว่าในโครงสร้างของประชากรกรรมวิธีที่ 3 คือดินที่ใส่มูลโค และ กรรมวิธีที่ 7 คือดินที่ใส่มูลโคและเติมเชื้อ *P. fluorescens* มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรในกลุ่ม Firmicutes และ Proteobacteria อย่างมาก โดยพบว่ากรรมวิธีที่ 3 มีการกระจายตัวของไฟลัม Firmicutes สูงถึง 29.54 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเติมเชื้อ *P. fluorescens* ลงไปในโครงสร้างประชากรที่มีการใส่มูลโค พบว่าทำให้ประชากรกลุ่มนี้ลดลงเป็นอย่างมาก เหลือเพียง 2.80 เปอร์เซ็นต์ และเป็นไปในทิศทางเดียวกับโครงสร้างประชากรในกรรมวิธีที่ 4 และ 8 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้รุนแรงกว่าในกรรมวิธีที่เติมแหนแดงแห้ง (กรรมวิธีที่ 2 และ 6) และกรรมวิธีที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (กรรมวิธีที่ 1 และ 5)

6. คำนำ : การเกษตรในปัจจุบันมุ่งเน้นให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่สูง ทำให้มีการใช้ปัจจัยการผลิตในปริมาณมาก ทั้งปุ๋ยเคมี สารปรับปรุงดิน สารเคมีกำจัดแมลงและวัชพืช ซึ่งการใช้ปัจจัยการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตพืชนั้นส่งผลกระทบต่อคุณภาพดิน ทั้งทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพของดิน ซึ่งส่งผลต่อเนื่องทำให้ผลผลิตของดินลดลง จุลินทรีย์ในดินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างยิ่งต่อผลผลิตของดิน จึงสมควรต้องมีการศึกษาจุลินทรีย์ในดิน โดยมุ่งเน้นไปที่โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดินที่ปลูกพืชต่างๆชนิด และในชุดดินที่เพาะปลูกต่างๆ ศึกษากิจกรรมจุลินทรีย์ในดิน เมื่อมีการใส่แหล่งของคาร์บอนให้ดิน เพราะแหล่งของคาร์บอนมีผลต่อกิจกรรมและโครงสร้างของจุลินทรีย์ในดิน แหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์มีหลายรูปแบบ เช่น วัสดุอินทรีย์เหลือทิ้งต่างๆในไร่นา ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสด ฯลฯ

จุลินทรีย์ในดินมีบทบาทสำคัญในการทำให้กิจกรรมต่างๆ ในดินดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง เช่น มีส่วนในของกระบวนการสร้างโครงสร้างดิน การย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ในดิน การกำจัดสารที่เป็นพิษ การหมุนเวียนธาตุอาหาร คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และกำมะถันในดิน นอกจากนี้ จุลินทรีย์ยังเป็นปัจจัยหลักในการยับยั้งเชื้อโรคพืชในดิน ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และในการเปลี่ยนแปลงของพืชพันธุ์ จึงทำให้เกิดความสนใจมากขึ้นเรื่อยๆในเรื่อง การจัดการประชากรจุลินทรีย์ดินเพื่อช่วยการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตาม เพื่อผลประโยชน์

สูงสุดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเข้าใจถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความหลากหลายและ กิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน ปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม อาทิเช่น ชนิดของดิน สถานภาพของธาตุอาหารพืชในดิน ความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น เช่นเดียวกับปัจจัยทางด้านพืช มีอิทธิพลต่อความหลากหลายและกิจกรรมของ จุลินทรีย์

เป็นที่ตระหนักกันมานานแล้วว่าการปฏิบัติต่อหรือการจัดการดิน มีผลต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดิน การใช้สารกำจัดศัตรูพืช (Heilmann et al., 1995) ปุ๋ยหมัก (Schonfeld et al., 2002) หรือปุ๋ยคอก หรือการใช้ จุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม (Mahaffee and Kloepper, 1997) ทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงผลที่มีต่อโครงสร้าง ประชากรจุลินทรีย์ดิน คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี ของดิน (Kennedy and Smith, 1995) การกระจายตัวของ อนุภาคดิน (Ranjard and Richaume, 2001) การมีอยู่และอายุของชนิดพืชที่เฉพาะเจาะจง (Garland, 1996; Grayston et al., 1998) และ crop rotation (Villich, 1997) เป็นปัจจัยหลักในการพิจารณาโครงสร้างประชากร จุลินทรีย์ดิน

การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในหนึ่งประชากร (community) นั้น สามารถทำได้โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และนำมาจำแนกโดยวิธีพื้นฐานทางด้านจุลชีววิทยา ซึ่งโดยทั่วไปพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้อยู่เพียงไม่ ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 98 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (uncultivable microbes) (Wade, 2002) การสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างประชากรที่ต้องการศึกษาโดยตรง โดยไม่ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เรียกว่าการทำ เมตาจีโนมิกส์ ซึ่งการทำเมตาจีโนมิกส์นั้นจะทำให้สามารถศึกษาจุลินทรีย์ทั้งที่สามารถเพาะเลี้ยงได้และไม่สามารถ เพาะเลี้ยงได้ และเมื่อนำข้อมูลที่ได้มาถอดรหัสพันธุกรรม จะสามารถวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้เพื่อหาความสัมพันธ์ของ กลุ่มประชากร และวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบในความหลากหลายของระบบนิเวศนั้นๆ เพื่อนำมาประยุกต์ในงาน ทางด้านการเกษตรต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

1. การศึกษาจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืชในระดับ micro-plot เบื้องต้น

ทำการเพาะปลูกพืชลงในระบบนิเวศน์วิทยาจำเพาะ(micro plot) ที่จะทำการศึกษา ซึ่งมีลักษณะเนื้อดิน เป็นดินร่วนปนทราย และใส่สิ่งทดลองตามที่กำหนด คือ

1. ดำรับควบคุม
2. แหนแดงแห้ง
3. ปุ๋ยหมักมูลโค
4. แหนแดงสด
5. ดำรับควบคุม+เชื้อ *P. fluorescens*
6. แหนแดงแห้ง+เชื้อ *P. fluorescens*
7. ปุ๋ยหมักมูลโค+เชื้อ *P. fluorescens*
8. แหนแดงสด+เชื้อ *P. fluorescens*

และกำหนดให้ความชื้นในดินเท่ากับ field capacity โดยวิธี core sample จากนั้นใส่แหล่งของคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น แหนแดง หรือมูลสัตว์ ลงใน micro plot ที่เตรียมไว้ เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ทำการตรวจสอบโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ดินบริเวณรอบๆ ราก เบื้องต้นโดยการหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี Standard Plate Count (SPC) นับจำนวนแบคทีเรียรวมในประชากรแต่ละ micro plot

2. การศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดินบริเวณรากพืชในระดับ micro-plot โดยวิธีเมตาจีโนมิกส์

ทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยเริ่มจากการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอออกมาจากตัวอย่างในโครงสร้างประชากรแต่ละกลุ่มโครงสร้างประชากรตามกรรมวิธีที่กำหนด คือ 1. กรรมวิธีควบคุม (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน) 2. ใส่แหนแดงแห้ง 3. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค 4. กรรมวิธีควบคุม+เชื้อ *P. fluorescens* 5. ใส่แหนแดงแห้ง+เชื้อ *P. fluorescens* 6. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค+เชื้อ *P. fluorescens* 7. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค+เชื้อ *P. fluorescens* และ 8. ใส่แหนแดงสด+เชื้อ *P. fluorescens* โดยใช้วิธี CTAB extraction method ซึ่งวิธีการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ อธิบายพอสังเขปดังนี้ ซึ่งดินในแต่ละกรรมวิธีๆ ละ 1 กรัม เติม lysis buffer 2.7 มล. (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Sodium phosphate pH 8.0, 1.5 M NaCl และ 1% CTAB และเติม 10 mg/ml Proteinase K ปริมาณ 20 μ l เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 20% SDS ปริมาณ 300 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปเซนตริฟิวก์ที่ ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายส่วนใสด้านบนใสในหลอด 2 ml แล้วเติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v) เท่ากับปริมาตรของส่วนใสที่ได้ นำไปเซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บของเหลวด้านบน และนำไปตกตะกอน ดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่า จากนั้นนำไปเซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนของดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็น เซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง และตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TBE buffer แล้วตรวจหาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของประชากรจุลินทรีย์ที่สกัดได้ ทำโดยใช้เทคนิค gel electrophoresis โดยใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) 100 โวลต์ นาน 30 นาที บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับ DNA Marker (M) ขนาด 1 กิโลเบส และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 1000 Spectrophotometer ให้มีความเข้มข้นสูงกว่า 25 ng/ μ l และ OD 260/280 = 1.8~2.0

จัดส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ BGI Tech Solutions (HongKong) Co., Ltd ประเทศจีน เพื่อทำเมตาจีโนมิกส์ (Sequence-based metagenomics) โดยวิธี 16S amplicon sequencing โดยการใช้วิธี paired end read ในส่วนของ hypervariable region (V3-V4) ของ 16s rDNA โดยใช้ Forward primer 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG และ Reverse primer 802R: TACNVGGGTATCTAATCC และนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้ฐานข้อมูล FASTA format จะทำให้ทราบถึงความแตกต่างของกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ดิน และนำมาจำแนกชนิดของกลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ที่

โดดเด่นในแต่ละโครงสร้างประชากร โดยนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล โดยใช้ โปรแกรม BLASTN (basic local alignment search tools)

8. ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาโครงสร้างประชากรโดยวิธีเพาะเลี้ยงในอาหาร

ทำการคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้เป็นเชื้อเครื่องหมาย สำหรับใช้ในการทดลอง ได้แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* เป็นเชื้อเครื่องหมายเนื่องจากมีคุณสมบัติเรืองแสง (ภาพที่ 2) และมีคุณสมบัติที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ สามารถพบได้ทั่วไปในวัสดุอินทรีย์ เช่น ใบพืช ดินหรือเศษซากต่างๆ ที่มีการย่อยสลาย และจากการตรวจสอบด้านที่จะใช้ในการทดลอง คือชุดดินสติกซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ (ตารางที่ 1) พบว่าไม่มีเชื้อที่เป็นชนิดเดียวกันกับเชื้อที่ใช้เป็นเชื้อเครื่องหมาย จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในแต่ละกระถาง พร้อมทั้งตรวจนับปริมาณเชื้อเครื่องหมายในแต่ละกรรมวิธี ดังนี้ 1. กรรมวิธีควบคุม (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน) 2. ใส่แทนแดงแห้ง 3. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค 4. กรรมวิธีควบคุม+เชื้อ *P. fluorescens* 5. ใส่แทนแดงแห้ง+เชื้อ *P. fluorescens* 6. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค+เชื้อ *P. fluorescens* จากการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธีพบว่า กรรมวิธีที่ใส่แหล่งคาร์บอนในรูปต่าง ๆ และใส่เชื้อแบคทีเรียเครื่องหมายลงไปมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น มากกว่ากรรมวิธีที่มีการใส่แหล่งคาร์บอนอย่างเดียว ทั้งแทนแดงแห้งและปุ๋ยหมักมูลโค โดยมีปริมาณแบคทีเรียรวมทั้งหมดเท่ากับ 2.8×10^8 และ 1.8×10^8 cfu/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และเมื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ *P. fluorescens* ในดินรอบรากพืชที่ใช้เป็นเชื้อเครื่องหมาย พบว่าที่ระยะเวลา 75 วัน เชื้อจุลินทรีย์เครื่องหมายมีปริมาณลดลง

ตารางที่ 1 สมบัติทางเคมีของชุดดินสติกที่ใช้ในการทดลอง

ชุดดิน	pH	OM (%)	Avail.P (mg/kg)	Exch. K (mg/kg)
สติก	5.7	0.67	28.4	123

ตาราง 2 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในดินรอบรากพืชที่ระยะเวลาต่าง ๆ

	0 วัน	3 วัน	7 วัน	15 วัน	30 วัน	45 วัน	60 วัน	75 วัน
1. ดาร์ควบคุม	4.4×10^7 e	1.6×10^7 b	6.6×10^7 b	4.3×10^7 b	3.1×10^7 b	1.6×10^7 c	9×10^7	4.2×10^7 b
2. แทนแดงแห้ง	5.9×10^7 d	4×10^7 a	5.1×10^7 b	4×10^7 b	5.9×10^7 a	1.7×10^7 bc	5.3×10^7	5.9×10^7 b
3. ปุ๋ยหมักมูลโค	6.1×10^7 d	3.4×10^7 ab	9.3×10^7 a	3.2×10^7 b	5.7×10^7 a	5×10^7 ab	7.4×10^7	5.1×10^7 b
4. ดาร์ควบคุม+เชื้อ	7.2×10^7 c	5×10^7 a	4.9×10^7 b	5.2×10^7 b	8.6×10^7 a	3.9×10^7 abc	6.3×10^7	6.5×10^7 b
5. แทนแดงแห้ง+เชื้อ	2.2×10^8 a	4.9×10^7 a	5.7×10^7 b	3.9×10^7 b	6.6×10^7 a	9.4×10^7 a	8.9×10^7	2.8×10^8 a
6. ปุ๋ยหมักมูลโค+เชื้อ	1.2×10^8 b	5.2×10^7 a	1.8×10^8 b	1.1×10^8 a	8×10^7 a	6.6×10^7 a	1.4×10^8	1.8×10^8 a
CV (%)	0.54	2.58	1.89	2.12	1.28	3.49	3.27	1.78

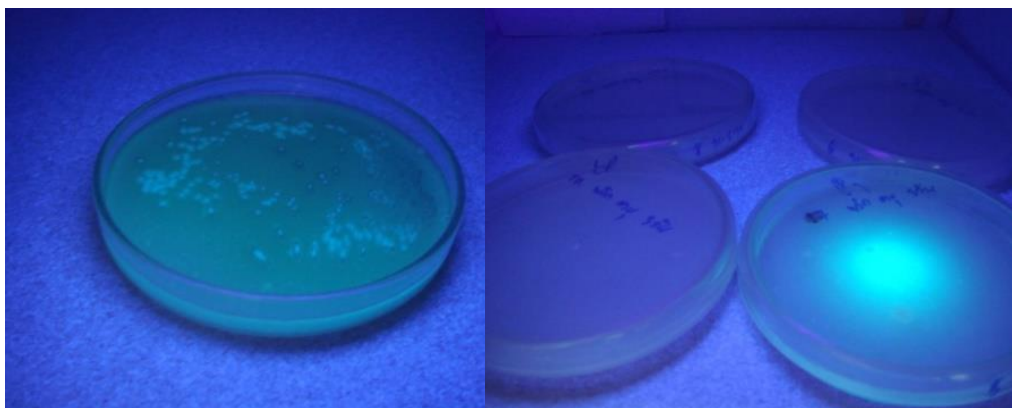
ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันทางด้านสมมติ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ +เชื้อ หมายถึง ใส่เชื้อ *P. fluorescens* เพิ่มลงไปในดิน

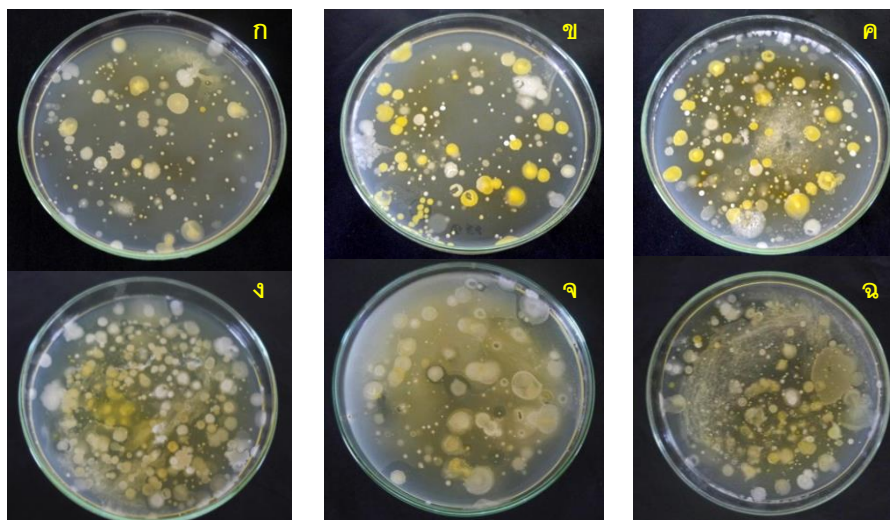
ตาราง 3 จำนวนจุลินทรีย์ *P. fluorescens* ในดินรอบรากพืชที่ระยะเวลาต่าง ๆ

	0 วัน	3 วัน	75 วัน
1. กรรมวิธีควบคุม	–	–	–
2. แหนแดงแห้ง	–	–	–
3. ปุ๋ยหมักมูลโค	–	–	–
4. กรรมวิธีควบคุม+เชื้อ	4.2×10^5	4×10^5	4.3×10^4
5. แหนแดงแห้ง +เชื้อ	4.9×10^5	4×10^5	3.1×10^4
6. ปุ๋ยหมักมูลโค+เชื้อ	3.3×10^5	1.6×10^5	2.1×10^4

หมายเหตุ +เชื้อ หมายถึง ใส่เชื้อ *P. fluorescens* เพิ่มลงไปในดิน



ภาพที่ 1 เชื้อเครื่องหมาย *Pseudomonas fluorescens* ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 2 แสดงความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแต่ละ คือ ควบคุม(ก) ใส่ใบไม้(ข) ใส่มูลสัตว์(ค) ควบคุมร่วมกับเชื้อเครื่องหมาย(ง) ใส่ใบไม้ร่วมกับเชื้อเครื่องหมาย(จ) และใส่มูลสัตว์ร่วมกับเชื้อเครื่องหมาย(ฉ)

เมื่อทดลองปลูกกล้วยในกระถางที่จัดทำเป็นระบบนิเวศจำลองตามที่กำหนดในชุดดินสติกที่คลุกเคล้าแหล่งของคาร์บอนที่ใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ คือ แหนแดงสด แหนแดงแห้ง และมูลสัตว์ที่ใส่และไม่ใส่เชื้อเครื่องหมาย (*P. fluorescens*) เมื่อทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าแบคทีเรียในแต่ละเดือนมีปริมาณใกล้เคียงกันและค่อนข้างคงที่ คืออยู่ในปริมาณ 10^7 - 10^8 cfu/1 กรัมดิน ในทุกกรรมวิธี และพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในแต่ละเดือนค่อนข้างคงที่และไม่แตกต่างกัน ทั้งที่ใส่เชื้อเครื่องหมาย และที่ไม่ใส่เชื้อเครื่องหมาย ดังแสดงในตารางที่ 4

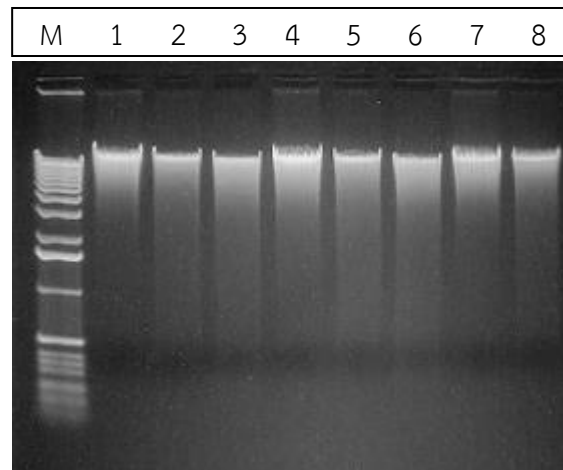
ตารางที่ 4 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธี ระยะเวลา 12 เดือน

	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M	6 M	7 M	8 M	9 M	10 M	11 M	12 M
1 Cont	7.2×10^7	5×10^7	6.1×10^7	4.5×10^7	6×10^7	4.9×10^7	9×10^7	4.6×10^7	4.8×10^7	4.7×10^7	9.5×10^7	5.9×10^7
2 Dry Az	2.2×10^8	9.8×10^7	5.2×10^7	6×10^7	4.8×10^7	3.7×10^7	6.4×10^7	7.6×10^7	1×10^8	9.3×10^7	1.4×10^8	3.1×10^8
3 Cow C	1.4×10^8	6×10^7	6.4×10^7	9.4×10^7	6.9×10^7	3.9×10^7	7.5×10^7	6×10^7	8.5×10^7	1.2×10^8	1.8×10^8	1.9×10^8
4 Fre Az	7.2×10^7	5×10^7	6.1×10^7	4.5×10^7	6×10^7	4.9×10^7	9×10^7	4.6×10^7	4.8×10^7	4.7×10^7	9.5×10^7	5.9×10^7
5 Cont+B	4.3×10^7	3.9×10^7	4.4×10^7	4.3×10^7	1.1×10^8	1.2×10^8	6.5×10^7	1.7×10^7	2.5×10^7	5.7×10^7	8.6×10^7	4.7×10^7
6 Dry Az+B	5.8×10^7	3×10^7	1.7×10^7	4.8×10^7	5.5×10^7	3.5×10^7	3.4×10^7	3.2×10^7	1.1×10^7	5.2×10^7	6.2×10^7	5.3×10^7
7 Cow C+B	6.8×10^7	2.6×10^7	5.3×10^7	1.9×10^8	7.9×10^7	2.8×10^7	5.7×10^7	6.9×10^7	3.9×10^7	4.6×10^7	9.2×10^7	5.4×10^7
8 Fre Az+B	2.2×10^8	9.8×10^7	5.2×10^7	6×10^7	4.8×10^7	3.7×10^7	6.4×10^7	7.6×10^7	1×10^8	9.3×10^7	1.4×10^8	3.1×10^8

หมายเหตุ M = เดือน Cont = ควบคุม Dry Az = แหนแดงแห้ง Fre Az = แหนแดงสด Cow C = ปุ๋ยมูลโค
B = แบคทีเรียเครื่องหมาย

การทดลองที่ 2 การศึกษาโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

และเมื่อนำดินแต่ละโครงสร้างประชากร ทั้ง 8 กรรมวิธีคือ 1) กรรมวิธีควบคุม 2) ใส่เหนแดงแห้ง 3) ใส่มูลโค 4) ใส่เหนแดงสด 5) กรรมวิธีควบคุม+เชื้อ *P. fluorescens* 6) ใส่เหนแดงแห้ง+เชื้อ *P. Fluorescens* 7) ใส่มูลโค+เชื้อ *P. fluorescens* และ 8) ใส่เหนแดงสด+เชื้อ *P. fluorescens* มาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB เพื่อนำไปศึกษาโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียด้วยวิธี 16S amplicon sequencing และผลการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากดินแต่ละกรรมวิธีดังแสดงในภาพที่ 4



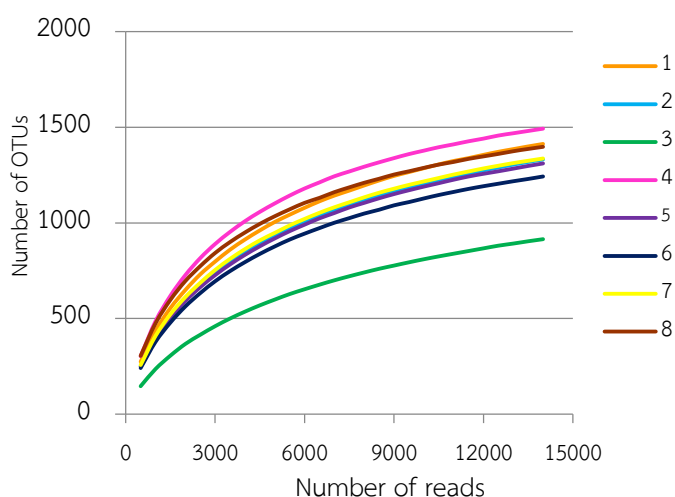
ภาพที่ 4 แสดงจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกได้จากจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินของแต่ละ (1-8) ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 1 kb

เมื่อนำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอไปหาลำดับเบสเพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแต่ละกลุ่มประชากร ด้วยวิธีการหาลำดับเบสจากสายดีเอ็นเอของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงได้ยาก (conserved region) ในส่วนของ V3-V4 hypervariable region ของ 16s rDNA (16s amplicon sequencing) จากการลำดับเบสของกรรมวิธีทั้ง 8 คือ 1. กรรมวิธีควบคุม 2. ใส่เหนแดงแห้ง 3. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค 4. ใส่เหนแดงสด 5. กรรมวิธีควบคุม+เชื้อ *P. fluorescens* 6. ใส่เหนแดงแห้ง+เชื้อ *P. fluorescens* 7. ใส่ปุ๋ยหมักมูลโค+เชื้อ *P. fluorescens* 8. ใส่เหนแดงสด+เชื้อ *P. fluorescens* พบว่าสามารถสร้าง clean pair reads ได้ทั้งหมด จำนวน 389820 reads เมื่อนำ read ที่ได้มากรองข้อมูล พบว่ามีจำนวน filtered tag อยู่ในช่วง 14313-19404 tag และเมื่อนำมาจัดกลุ่ม OTU (Operational Taxonomic Units) โดยเลือกข้อมูลที่มีความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของ tag ไม่ต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำข้อมูลแต่ละกรรมวิธีจัดกลุ่มได้ในช่วง 1017-1528 OTU โดยพบว่ากรรมวิธีที่ 4 มีจำนวน OTU สูงที่สุด คือ 15283 และกรรมวิธีที่ 3 ที่เติมมูลโคนั้นมี OTU ต่ำสุด คือ 1017 ถึงแม้ว่าจะมีจำนวน filtered tag สูงที่สุด คือ 19404 ก็ตาม

ตารางที่ 5 ค่าทางสถิติของ tag จำนวน Tag ที่ผ่านการ filtered และจำนวน OTU ที่ได้ ในแต่ละกรรมวิธี โดยประชากรแต่ละกลุ่มโครงสร้างมีความคล้ายคลึงกันไม่ต่ำกว่า 97 เปอร์เซ็นต์

Treatment	Total Pairs Read No.	Connect Tag No.	Connect Ratio (%)	Average Length /SD	Tags Without Primer	Tag Utilization Ratio (%)	Average Length (bp)/SD	Filtered Tag	OTU No.
1. Cont	56673	55477	97.89	459/10	54677	96.48	419/10	16982	1481
2. Dry Az	43463	42491	97.76	459/10	41971	96.57	420/10	16720	1395
3. Cow C	56715	55531	97.91	456/11	54801	96.63	417/11	19404	1017
4. Fre Az	49537	48588	98.08	458/11	47851	96.60	418/11	15734	1528
5. Cont+B	50525	49586	98.14	459/10	48843	96.67	419/10	17083	1375
6. Dry Az+B	29567	29010	98.12	459/10	28630	96.83	420/10	17163	1304
7. Cow C+B	51765	50617	97.78	458/11	49852	96.30	418/11	14313	1344
8. Fre Az+B	51575	50584	98.08	458/11	49646	96.26	418/11	15167	1422
Total	389820	381884							

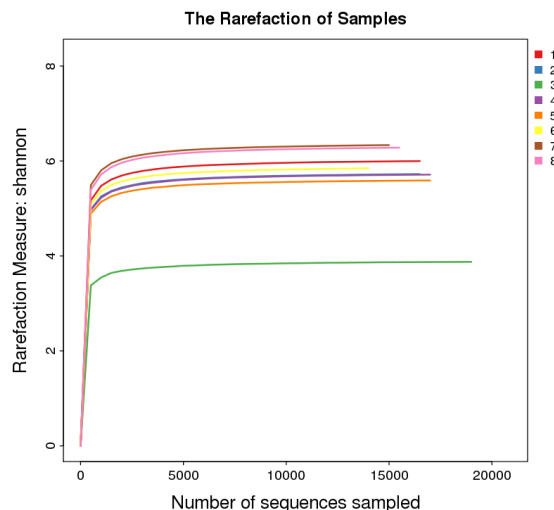
จากค่า Rarefaction curves ในภาพที่ 5 พบว่า ประชากรจุลินทรีย์ในกรรมวิธีที่ 4 มีค่าความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์สูงที่สุด รองลงมาคือประชากรในกรรมวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ และพบว่าประชากรในกรรมวิธีที่ 3 มีความหลากหลายของประชากรน้อยที่สุด



ภาพที่ 5 Rarefaction curves ของตัวอย่างโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในแต่ละกรรมวิธี (1-8)

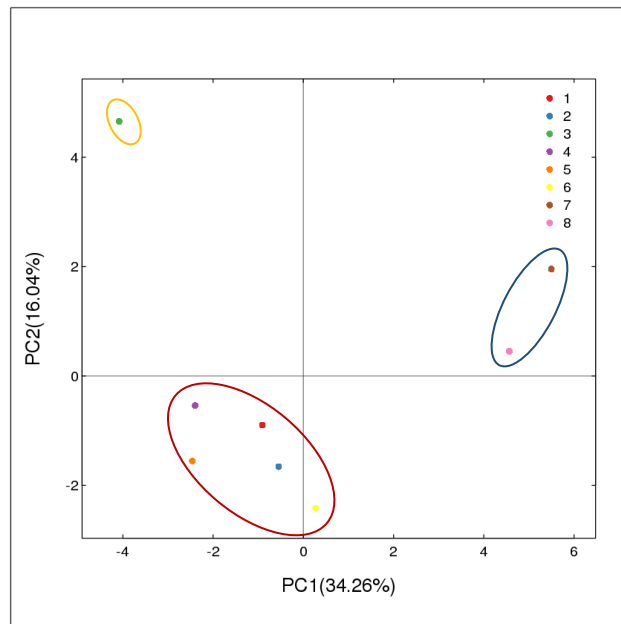
การวิเคราะห์ค่า alpha diversity analysis โดยวิเคราะห์จากดัชนีความหลากหลายชนิดของแบคทีเรียที่ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างประชากรแต่ละกลุ่ม โดยทำการวิเคราะห์ข้อมูลประเมินค่าความหลากหลายชนิดของแบคทีเรียด้วย ค่าดัชนี Shannon (Shannon diversity Index) จากผลการวิเคราะห์ค่าดัชนี Shannon

พบว่าประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 3 มีค่าดัชนี Shannon ต่ำกว่าประชากรจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น ซึ่งบ่งชี้ว่าโครงสร้างของประชากรแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความหลากหลายทางชนิดต่ำกว่าโครงสร้างประชากรกลุ่มอื่น แต่อย่างไรก็ตามค่าที่คำนวณได้ก็ยังคงอยู่ในเกณฑ์ที่สูงกว่า 1 (ซึ่งค่ามากกว่า 1 แสดงว่าดัชนีความหลากหลายทางชีวภาพสูง) ในขณะที่โครงสร้างประชากรในกลุ่ม ที่ 7 และ 8 มีค่าดัชนี Shannon สูงที่สุด



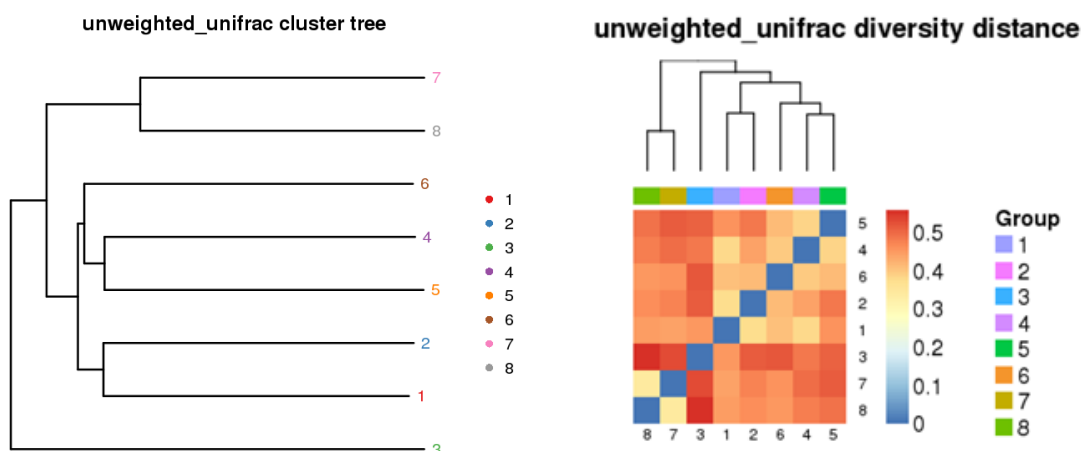
ภาพที่ 6 ค่าดัชนี Shannon ของตัวอย่างโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในแต่ละกรรมวิธี (1-8)

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบ (Principal Component Analysis, PCA) โดยการสร้างแผนที่แสดงตำแหน่งของข้อมูล 2 มิติ โดยใช้กราฟ 2 องค์ประกอบ ซึ่งการวางตำแหน่งของจุดตัวอย่างจะแสดงถึงความเหมือนหรือความต่างของโครงสร้างประชากรของสิ่งที่ศึกษา โดยแสดงลักษณะของ Biplot ที่แสดงลักษณะของตัวอย่าง ซึ่งจุดที่อยู่ใกล้กันจะหมายถึงการมีโครงสร้างประชากรคล้ายกันมากกว่าจุดที่ห่างออกไป จากการศึกษาความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรทั้ง 8 กรรมวิธี ด้วยเทคนิค PCA พบว่าสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 50.30% โดยใช้ Principal Component 1 และ 2 (PC1และ PC2) ดังภาพที่ 7 พบว่า PC1 (แกนนอน) ซึ่งสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 34.26% มีความสัมพันธ์ในทิศทางบวกกับกลุ่มประชากรที่ 7 และ 8 เมื่อพิจารณาแกน PC2 (แกนตั้ง) ซึ่งสามารถอธิบายความแปรปรวนได้เพิ่มอีก 16.04% พบว่ามีกลุ่มประชากรที่ 3 คือการใส่มูลโคมีการกระจายห่างจากกลุ่มอื่นๆ และมีการกระจายห่างจากกลุ่มที่ 7 และ 8 มากที่สุด ในขณะที่ประชากรแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1, 2, 4, 5 และ 6 ซึ่งไม่มีมูลโคมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางตรงกันข้าม



ภาพที่ 7 ผลการวิเคราะห์ PCA ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในแต่ละกรรมวิธี (1-8)

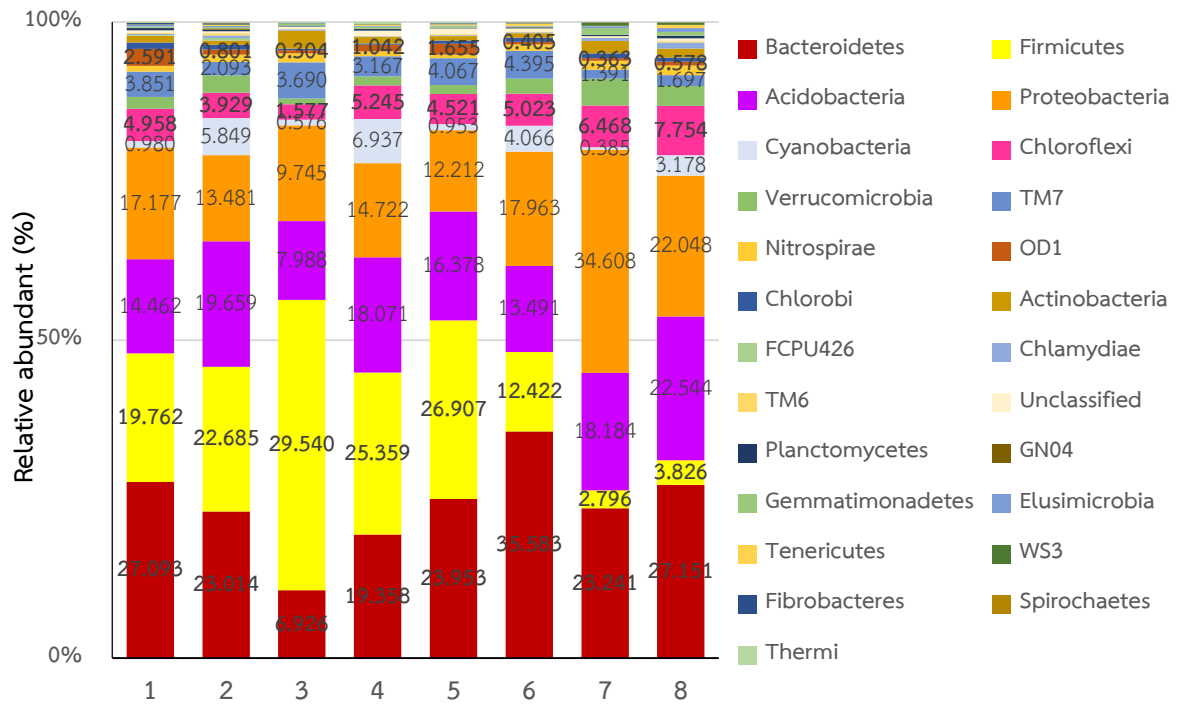
การวิเคราะห์ค่า beta diversity analysis เพื่อประเมินค่าความแตกต่างของตัวอย่างในโครงสร้างประชากร จาก FASTA format แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม QIIME Ver.1.80 พบว่า วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficients) ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.341 ถึง 0.559 สามารถแบ่งได้ เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ กรรมวิธีที่ 7 ดินที่ใส่มูลสัตว์+เชื้อ และ 8 ดินที่ใส่แหนแดงสด + เชื้อ กลุ่มที่ 2 คือ กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่ 2 ใส่แหนแดงแห้ง 4. ใส่แหนแดงสด 5. ควบคุม + เชื้อ 6. ใส่แหนแดงแห้ง + เชื้อ ตามลำดับ และกลุ่มที่ 3 คือ กรรมวิธีที่ 3 ดินใส่มูลสัตว์ (ภาพที่ 8) เมื่อนำวิธี UPGMA มาจัดกลุ่มจะเห็นได้ว่าประชากรแบคทีเรียในกรรมวิธีที่ไม่ได้ใส่มูลสัตว์เพิ่มเติมจะมีความใกล้ชิดกันมากกว่ากรรมวิธีที่ใส่มูลสัตว์ ถึงแม้ว่าจะมีหรือไม่มีเชื้อใส่เชื้อก็ตาม



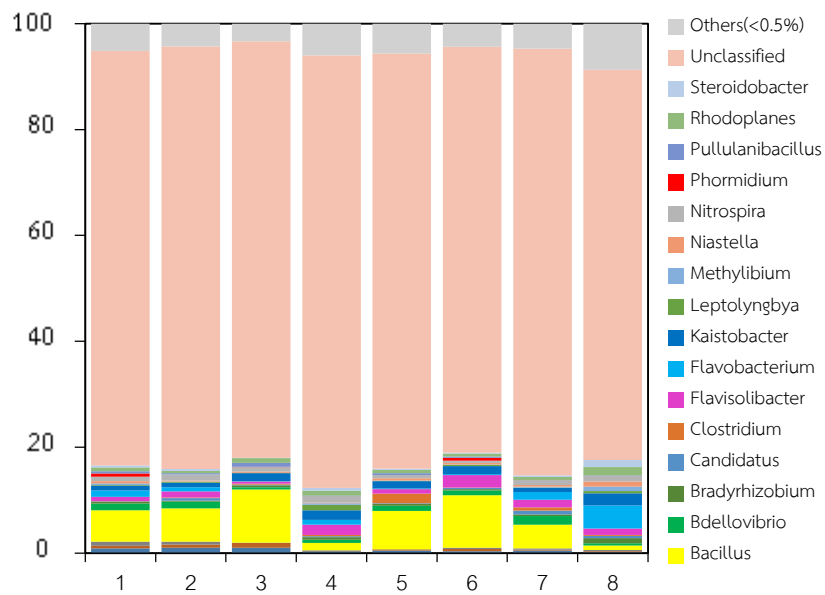
ภาพที่ 8 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรแบคทีเรีย 8 ประชากรจากการจัดกลุ่มโดยวิธี unweighted_unifrac cluster tree และ unweighted_unifrac diversity distance

จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จาก OTU เมื่อนำมาเปรียบเทียบในแต่ละโครงสร้างประชากรในระดับไฟลัม พบว่าแบคทีเรียกลุ่มหลัก คือ ในทุกกรรมวิธี คือ Bacteroidetes Firmicutes Acidobacteria Proteobacteria และ Cyanobacteria (ภาพที่ 9) และพบว่าในกรรมวิธีที่ 2 4 6 และ 8 ที่มีการใส่เหินแดงในรูปเหินแดงแห้ง และเหินแดงสด จะพบประชากรของ Cyanobacteria สูงถึง 5.85 6.94 4.07 และ 3.18 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่ได้เติมเหินแดง จะพบประชากรกลุ่มนี้ในปริมาณที่ต่ำกว่า และเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่เติมเหินแดงจะพบว่าไม่ว่าจะเติมเหินแดงสดหรือเหินแดงแห้ง หากมีการเติมเชื้อ *P. fluorescens* จะทำให้ประชากรกลุ่มนี้ลดลง เป็นที่น่าสังเกตว่าในโครงสร้างของประชากรกรรมวิธีที่ 3 คือดินที่ใส่มูลโค และ กรรมวิธีที่ 7 คือดินที่ใส่มูลโคและเติมเชื้อ *P. fluorescens* มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรในกลุ่ม Firmicutes และ Proteobacteria อย่างมาก โดยพบว่ากรรมวิธีที่ 3 มีการกระจายตัวของ Firmicutes สูงถึง 29.54 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเติมเชื้อ *P. fluorescens* ลงไปในโครงสร้างประชากรที่มีการใส่มูลโค จะพบว่า Firmicutes ลดลงเป็นอย่างมาก เหลือเพียง 2.80 เปอร์เซ็นต์ และเป็นไปในทิศทางเดียวกับโครงสร้างประชากรในกรรมวิธีที่ 4 และ 8 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้รุนแรงกว่าในกรรมวิธีที่เติมเหินแดงแห้ง (กรรมวิธีที่ 2 และ 6) และกรรมวิธีที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (กรรมวิธีที่ 1 และ 5)

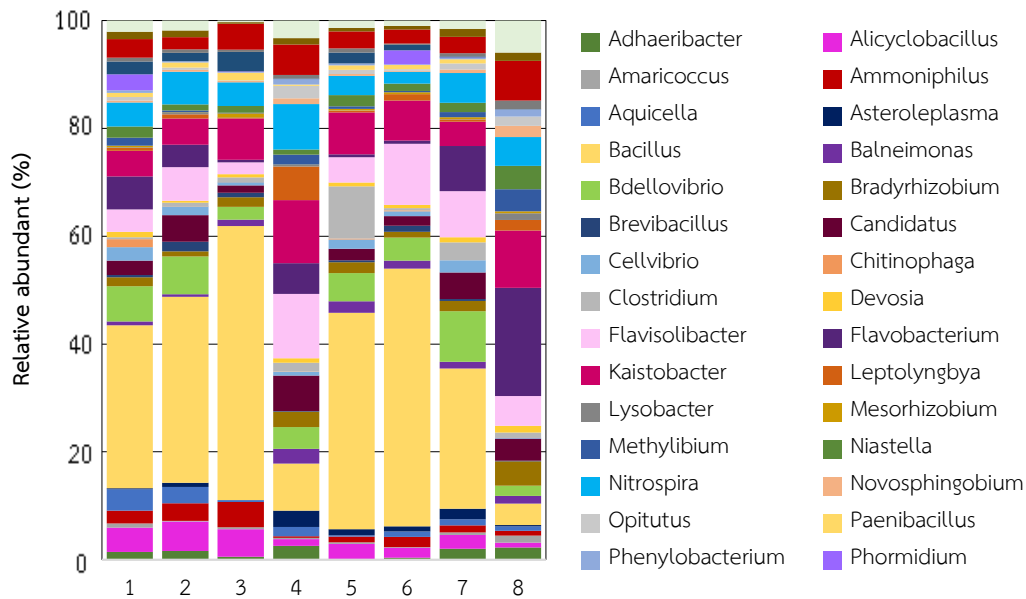
เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในระดับสกุลพบว่าแบคทีเรียส่วนมากที่พบจะเป็น unclassified ถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10) แต่เมื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถจำแนกได้ของแบคทีเรีย 35 สกุลแรกที่พบในโครงสร้างประชากรของแต่ละกรรมวิธี (ภาพที่ 11) โดยพบว่าแบคทีเรียสกุล Bacillus จะเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในโครงสร้างประชากรในเกือบทุกกรรมวิธี ยกเว้นกรรมวิธีที่ 4 และ 8 ที่เติมเหินแดงสด จะมีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียสกุล Flavisolibacter Flavobacterium หรือ Kaistobacter เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดลงไปดิน (เหินแดงสด เหินแดงแห้ง และมูลโค) มีผลทำให้โครงสร้างประชากรเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (กรรมวิธีที่ 1 ควบคุม) รวมถึงการเติมเชื้อ *P. fluorescens* เพิ่มลงไปดินก็มีผลทำให้โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 9 โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในแต่ละกรรมวิธี (กรรมวิธี 1-8) 25 ลำดับแรกในระดับไฟลัม

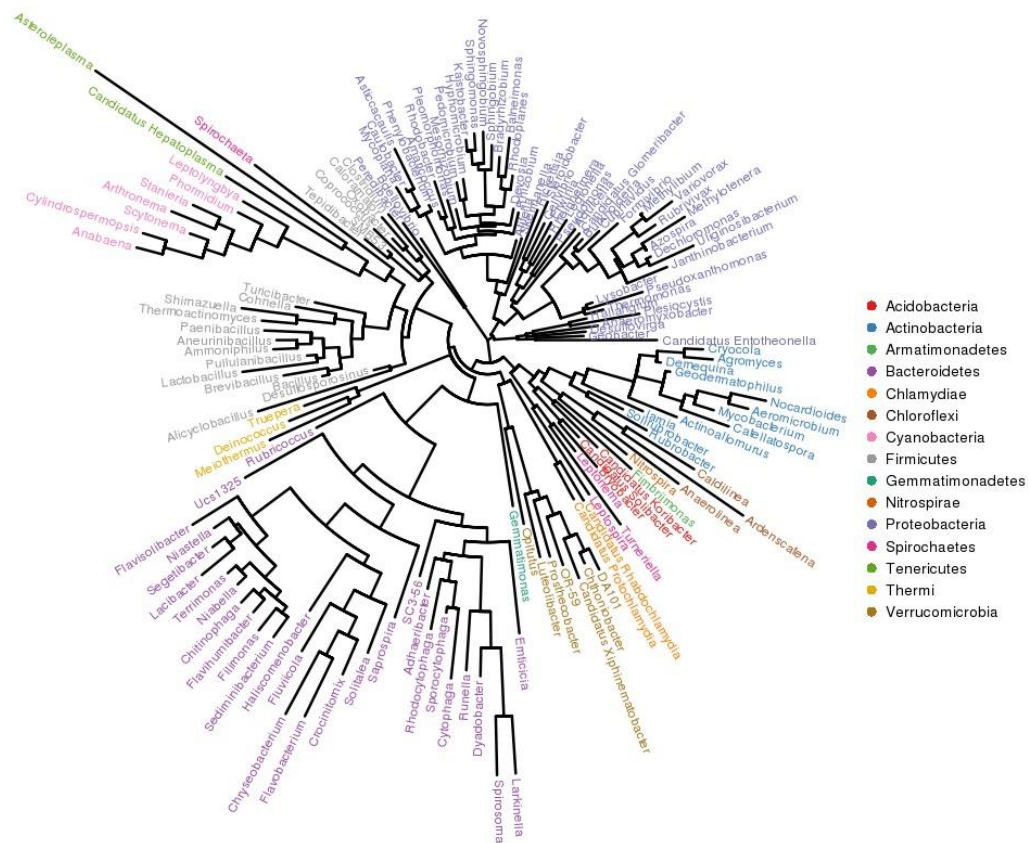


ภาพที่ 10 โครงสร้างประชากรของแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในแต่ละกรรมวิธี (1-8) ในระดับสกุล



ภาพที่ 11 ชนิดของแบคทีเรีย 35 สกุลแรกที่พบในโครงสร้างประชากรของแต่ละกรรมวิธี (1-8)

จากการทำการวิเคราะห์ ไฟโลเจเนติกส์ ทรี ดังแสดงในภาพที่ 12 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของชนิดของจุลินทรีย์ระดับสกุลที่มีในกลุ่มประชากร ทั้ง 8 กรรมวิธี ที่ถูกจัดกลุ่มในแต่ละโพลัม จำนวน 15 โพลัม โดยพบว่าประชากรจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่อยู่ในโพลัม Proteobacteria Bacteroidetes Firmicutes Actinobacteria และ Cyanobacteria ตามลำดับ



ภาพที่ 12 แผนภูมิวงศาวนวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในระดับสกุลที่พบในโครงสร้างประชากร
ทั้ง 8 กรรมวิธีที่ทำการศึกษา โดยสีเดียวกันที่ปรากฏในแผนภูมิจะอยู่ในแฟ้มเดียวกัน

สรุปผลการทดลอง :

การเพิ่มแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันลงไปในดิน มีผลทำให้ประชากรแบคทีเรียมีความหลากหลายแตกต่างกัน การเติมแหล่งคาร์บอนที่มาจากสัตว์ (มูลสัตว์) ทำให้ประชากรแบคทีเรียมีความหลากหลายที่แตกต่างไปจากที่มาจากพืช และการเติมแหล่งคาร์บอนที่มาจากพืชที่เป็นพืชสดกับพืชแห้งก็ทำให้เกิดความหลากหลายของโครงสร้างประชากรที่แตกต่างกัน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : จากการทดลองสามารถนำการเติมแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดไปประเมินโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชได้

11. คำขอบคุณ(ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง :

- Garland, J.L. 1996. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biol. Biochem.* 28: 223-230.
- Grayston, S.J., S. Wang, C.D. Campbell, and A.C. Edwards. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 30: 369-378.
- Heilmann, B., M. Lebuhn, and F. Beese. 1995. Methods of investigation of metabolic activity and shifts in the microbial community in soil treated with a fungicide. *Biol. Fert. Soils* 19: 186-192.
- Kennedy, A.C. and K.L. Smith. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soil. *Pl. Soil* 170: 75-86.
- Mahaffee, W.F. and J.W. Kloepper. 1997. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field grown cucumber plants inoculated with plant growth-promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. *Can. J. Microb.* 43: 344-353.
- Ranjard, L. and Richaume A.S. 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 152: 707-716.
- Schonfeld, J., A. Gelsomino, L.S. Van Overbeek, A. Gorissen, K. Smalla and J.D. van Elsas. 2002. Effects of compost addition and stimulated solarization on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. *FEMS Microb. Ecol.* 43: 63-74.
- Villich, V. 1997. Assessment of microbial diversity by fatty acid analysis. *Dev. Pl. Pathol.* 11:71-74.

Washington D.C.

Wade W., 2002. Uncultivable bacteria-the uncharacterized organisms that cause oral infections.
J. R. Soc. Med. 95: 81-83.