การเปรียบเทียบความหลากหลายของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิค 16S rRNA clone library analysis

Comparison of Diversity of Bacteria and Actinomycetes Using the Culture-dependent Technique and 16S rRNA Clone Library Analysis Technique

ดาริกา วสุนธรากุล (Darika Vasoontarakul)[1]
สมภพ อินทสุวรรณ (Sompop Intasuwan)[2]
นุกูล อินทระสังขา (Nugul Intrasungkha)[2*]

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดของโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพองค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยเปรียบเทียบการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิค 16S rRNA clone library analysis ผลการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปท่อน ติดสีแกรมบวกและแอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มที่ทนหรือชอบความร้อน (Thermoduric หรือ thermophile) ผลการศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis พบว่าโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ชอบความเค็ม (Halophile) โดย แบคทีเรียอยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Halomonas* และแอคติโนมัยสีทอยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Dietzia* คิดเป็นร้อยละ 64 และ 71 ของจำนวนโคลนทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในสกุลดังกล่าวไม่พบจากการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ แม้ว่าผลการศึกษาจากสองเทคนิคจะไม่สอดคล้องกันเพราะข้อจำกัดของแต่ละเทคนิค แต่ผลจากการศึกษาทั้งสองเทคนิคทำให้พบความหลากหลายของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทมากกว่าการเลือกศึกษาเพียงเทคนิคเดียวซึ่งถ้านำทั้งสองเทคนิคเข้ามาใช้ศึกษาร่วมกันจะทำให้ผลการศึกษาสมบูรณ์ขึ้นและผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และการนำไปใช้พัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพต่อไปได้ในอนาคต

Abstract

The diversity of bacteria and actinomycetes in pelleted organic fertilizer from a biofertilizer plant at Takam Subdistrict Administrative Organization, Hat Yai district, Songkhla province was studied by comparing

[1]*นิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ*
[2]*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ*
**Corresponding author nugul@tsu.ac.th*

the culture-dependent technique and the 16S rRNA clone library analysis technique. The results of the culture-dependent method found Gram positive rod shape bacteria and thermoduric or thermophilic actinomycetes. Using the 16S rRNA clone library analysis technique, halophilic bacteria, namely *Halomonas* (64% of total clones) and halophilic actinomycetes, namely *Dietzia* (71% of total clones), were the most dominant groups which were not obtained by the culture-dependent technique. Although the results from the two techniques did not correlate, this may be due to some limitations of each technique. However, the results of the two techniques showed more diversity of bacteria and actinomycetes than only using one technique. Therefore, the results from this study can be beneficial not only for obtaining microbial biodiversity data from organic fertilizer production but also can be exploited for the development of bio-organic fertilizer production in the future.

คำสำคัญ: ปุ๋ยอินทรีย์, ปุ๋ยชีวภาพ, เทคนิค 16S rRNA
Keywords: Organic fertilizer, Biofertilizer, technique

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรเพิ่มสูงขึ้นและส่วนใหญ่ต้องนำเข้าปุ๋ยเคมีจากต่างประเทศทำให้สูญเสียเงินออกนอกประเทศจำนวนมาก รายงานจากสำนักงานวิจัยธุรกิจธนาคารกรุงไทยจำกัด (มหาชน) (2550) พบว่าประเทศไทยนำเข้าปุ๋ยเคมีในปี พ.ศ.2549 ปริมาณ 3.74 ล้านตันมูลค่า 37, 400 ล้านบาท ซึ่งนอกจากจะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศแล้ว ผลจากการใช้ปุ๋ยเคมีติดต่อกันเป็นเวลานานหรือใช้ไม่ถูกต้องขาดความระมัดระวังยังส่งผลกระทบในด้านลบต่อสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะกับทรัพยากรดินซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการทำการเกษตร

จากปัญหาดังกล่าวคณะรัฐมนตรีจึงมีมติเมื่อวันที่ 22 มิถุนายน พ.ศ. 2547 เสนอแนวทางการรณรงค์การผลิตและการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพให้แพร่หลายโดยให้ถือเป็นวาระแห่งชาติเรื่องเกษตรอินทรีย์เพื่อสนับสนุนและส่งเสริมให้เกษตรกรผลิตและใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพในการเกษตรให้มากขึ้น นอกจากนี้รัฐบาลมีแผนส่งเสริมการสร้างโรงงานผลิตปุ๋ยอินทรีย์กว่า 7,000 แห่งทั่วประเทศเพื่อผลิตปุ๋ยจำหน่ายแก่เกษตรกรในชุมชน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2547)

โรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพองค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้ามตั้งอยู่ที่หมู่ 4 บ้านเกาะปลัก ตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เป็นโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพตัวอย่างในระดับตำบลที่สร้างจากเงินกองทุนมิยาซาวาที่รัฐบาลจัดสรรให้แก่หมู่บ้านละ 1 ล้านบาท เมื่อปี พ.ศ. 2546 โรงงานแห่งนี้ตั้งขึ้นในรูปแบบสหกรณ์ที่เกิดจากการรวมกลุ่มของเกษตรกรในหมู่บ้านที่ประกอบอาชีพทำสวนยางพาราและทำนาซึ่งกระบวนการผลิตของโรงงานแห่งนี้ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีภายในหมู่บ้านคือ รำละเอียด รำหยาบ มูลไก่ แกลบเผา และแกลบหมัก นำมาผสมกับสารปรับปรุงดินคือผงซิลิกอนและโดโลไมต์ นอกจากนี้ใช้น้ำหมักชีวภาพที่ผลิตขึ้นเองและหัวเชื้อจุลินทรีย์ พด. 1 ของกรมพัฒนาที่ดินมาผสมด้วยจากนั้นนำวัตถุดิบต่างๆ ที่ผสมกันเข้าเครื่องอัดเม็ดแล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส นำปุ๋ยอัดเม็ดที่ได้ตากทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน แล้วบรรจุกระสอบพร้อมนำไปใช้

เมื่อพิจารณาจากลักษณะของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตและกระบวนการผลิตพบว่าปุ๋ยของโรงงานแห่งนี้ควรจะเรียกว่า "ปุ๋ยอินทรีย์" เนื่องจากวัสดุที่นำมาใช้ผลิตส่วนใหญ่เป็นอินทรียสารที่ช่วยเพิ่มปริมาณของอินทรียวัตถุในดินไม่ใช่ "ปุ๋ยชีวภาพ" ที่หมายถึงจุลินทรีย์ชนิดที่มี

ประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มธาตุอาหารหลักของพืชตามความหมายทางวิชาการ แม้ว่าปุ๋ยอินทรีย์เป็นอินทรียสารที่ถึงแม้จะมีธาตุอาหารหลักที่เป็นประโยชน์ต่อพืชน้อยกว่าปุ๋ยเคมีแต่การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ในปัจจุบันนิยมผลิตโดยการผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุที่นำมาผลิตหรือการเพิ่มธาตุอาหารหลักของพืช จากการศึกษาของ Vargas-García et al. (2006) ศึกษาการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์คือ *Bacillus shackletonni*, *Streptomyces thermovulgaris* และ *Ureibacillus thermosphaericus* ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักจากวัตถุดิบต่างชนิดกัน เมื่อนำปุ๋ยหมักที่ผลิตได้ไปใช้พบฮิวมัสในดินสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยหมักที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว

โดยทั่วไปวิธีการศึกษาจุลินทรีย์ในปุ๋ยนั้นใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture-dependent method) ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ในดินหรือปุ๋ยพบเพียงร้อยละ 1 เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Kirk et al., 2004) ต่อมาเป็นที่ยอมรับกันมากขึ้นว่าเทคนิคทางชีวโมเลกุลสามารถใช้ศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ได้โดยไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่อาศัยข้อมูลจากลำดับเบสของไรโบโซมอลอาร์เอนเอ (rRNA) เนื่องจากมีความสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตซึ่งไม่ว่าจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้ดีหรือไม่ดีก็ยังคงตรวจพบ rRNA ที่ใช้เป็นยีนเครื่องหมายทำให้สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบและตรวจหาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ Song et al. (2001) ศึกษาความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทที่ทนอุณหภูมิสูงในปุ๋ยหมักที่ทำจากเห็ดด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis พบแอคติโนมัยสีท 41 สายพันธุ์ ทั้ง 41 สายพันธุ์พบสกุล *Streptomyces* และ *Thermoactinomyces* เป็นส่วนใหญ่ Peter et al. (1999) ศึกษาชุมชนจุลินทรีย์ทุกๆ 2 วันของกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อพบ *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Xanthomonas* เท่านั้น ส่วนเทคนิคทางชีวโมเลกุลคือเทคนิค Single strand conformation polymorphism (SSCP) พบ *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Xanthomonas*, *Clostridium*, *Microbispora*, *Streptomyces* และ *Candida* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเทคนิค SSCP ศึกษาความหลากหลายและติดตามการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักได้ดีกว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาของพิทยากร และ ฉวีวรรณ (2540) พบแบคทีเรียมากที่สุดในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ประเภทต่างๆ รองลงมาคือ แอคติโนมัยสีท และราพบจำนวนน้อยที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทมีบทบาทในกระบวนการผลิตโดยเฉพาะการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ต่างๆ ที่นำมาผลิตปุ๋ย นอกจากนี้ สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ โดยเฉพาะอุณหภูมิ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดของโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพองค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิค 16S rRNA clone library analysis ผลการศึกษานอกจากจะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และยังสามารถนำไปใช้พัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพต่อไปได้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

จากการศึกษาเบื้องต้นในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ของโรงงานโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพองค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา พบว่าขั้นตอนการตากปุ๋ยทิ้งไว้ก่อนการบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้มีจุดสีขาวคล้ายผงปูนซีเมนต์ปกคลุมบนกองปุ๋ยซึ่งลักษณะดังกล่าวนั้นเป็นการบ่งชี้ถึงการเจริญของแอคติโนมัยสีท (ธงชัย, 2546) และเป็นเกณฑ์บ่งชี้ว่าปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตนั้นสามารถนำไปบรรจุกระสอบขายหรือนำไปใช้ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเก็บตัวอย่างในขั้นปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดพร้อมขายหรือนำไปใช้เพื่อเปรียบเทียบการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิค 16S rRNA clone library analysis

การศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดมาคัดแยกแบคทีเรีย และแอคติโนมัยสีท โดยเจือจางตัวอย่างในสารละลายเปปโตน 1% แต่ละระดับความเจือจางนำมาจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีการแบบ Pour plate ในอาหาร Trypic soy agar (TSA) (Glucose 1 g, K_2HPO_4 2.5 g, NaCl 5 g, Pancreatic digest of casein 17 g, Soy bean meal 3 g, Agar 15 g และ น้ำกลั่น 1 l) สำหรับคัดแยกแบคทีเรียและอาหาร Soil extract agar (SEA) (Glucose 1 g, K_2HPO_4 1 g, Peptone 1 g, Yeast extract 1 g, Soil extract 400 ml, Agar 15 g และ น้ำกลั่น 1 l) สำหรับคัดแยกแอคติโนมัยสีท จากนั้นนำไปบ่มโดยแบคทีเรียบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แอคติโนมัยสีทบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นับจำนวนและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการตามแนวทางของ Goodfellow (1989)

การศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis

นำตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดมาศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis สำหรับวิธีการศึกษาแอคติโนมัยสีทมีบางขั้นตอนที่แตกต่างจากการศึกษาแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งมีวิธีการศึกษาดังนี้

1. การสกัดดีเอ็นเอโดยการใช้วิธีการสกัดด้วย Phenol-Chloroform ซึ่งดัดแปลงวิธีการมาจาก Zhou et al. (1996)

2. การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.1 ด้วยการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27f และ 1492r (Lane, 1991) ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไป (Eubacteria)และไพรเมอร์ 243f และ 513r ซึ่งมีความจำเพาะกับบริเวณบางส่วนของยีน 16S rRNA ของแอคติโนมัยสีท (Heuer et al., 1997) ปฏิกิริยาประกอบไปด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 10 -100 นาโนกรัม, PCR buffer (10x), $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 200 μM, 27f 0.45 μM, 1492r 0.45 μM,243f 0.45 μM, 513r 0.45 μM, DNA polymerase 1 unit, น้ำและ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ร้อยละ 5 (สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแอคติโนมัยสีท) จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700) ด้วยรอบการทำงานจำนวน 30 รอบ แต่ละรอบการทำงานของการเพิ่มปริมาณยีน16S rRNA ของแบคทีเรียประกอบไปด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 48 องศาเซลเซียส 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที โดยรอบสุดท้ายเพิ่ม Extension 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ส่วนรอบการทำงานของการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแอคติโนมัยสีทประกอบด้วย Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 63 องศาเซลเซียส 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที โดยรอบสุดท้ายเพิ่ม Extension 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 %

3. การโคลนยีน 16S rRNA ศึกษาโดยใช้พลาสมิดทางการค้าจาก TOPO TA Cloning (Invitrogen, USA) โดยมีวิธีการศึกษาตามคู่มือของบริษัท

4. การจัดกลุ่มโคลนด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ทำ PCR เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของโคลนที่ได้โดยใช้เครื่อง Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700) ด้วยไพร-เมอร์ M13f และ M13r แล้วตัดยีน 16S rRNA โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hin*P1I และ *Msp*1 (BioLabs) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบ PCR products ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์โดยทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 3% แล้วจัดกลุ่มโคลนที่มีรูปแบบเหมือนกันให้เป็น Operational taxonomic unit (OTU) เดียวกัน จากนั้นเลือกตัวอย่างโคลนในแต่ละ OTU ไปหาลำดับของยีน

5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

บางส่วนของแบคทีเรียที่มีขนาดประมาณ 700 bp และยีน 16S rRNA บางส่วนของแอคติโนมัยสีทที่มีขนาดประมาณ 300 bp ศึกษาโดยส่งตัวอย่างโคลนไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะ GenBank โดยใช้วิธี Basic local alignment search tool (BLAST) แล้วสร้าง Phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์จากความแตกต่างด้านวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004)

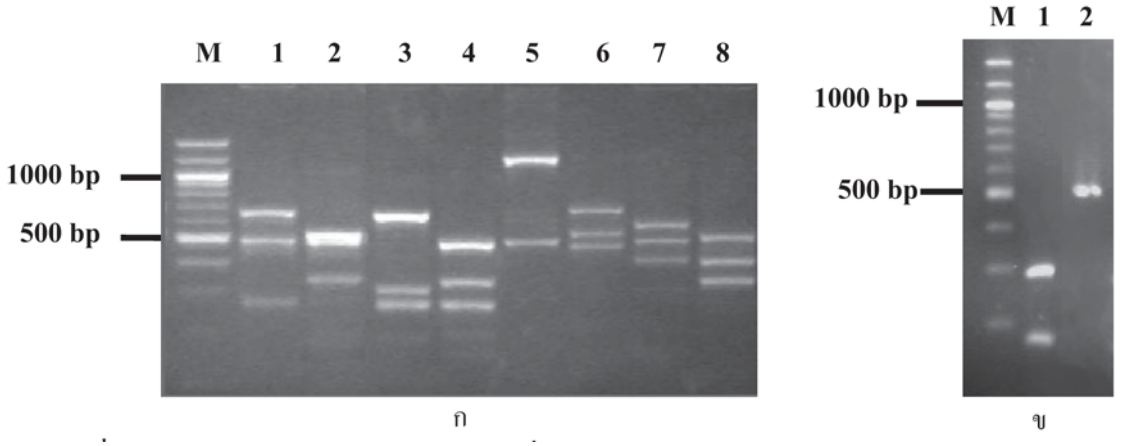
ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ

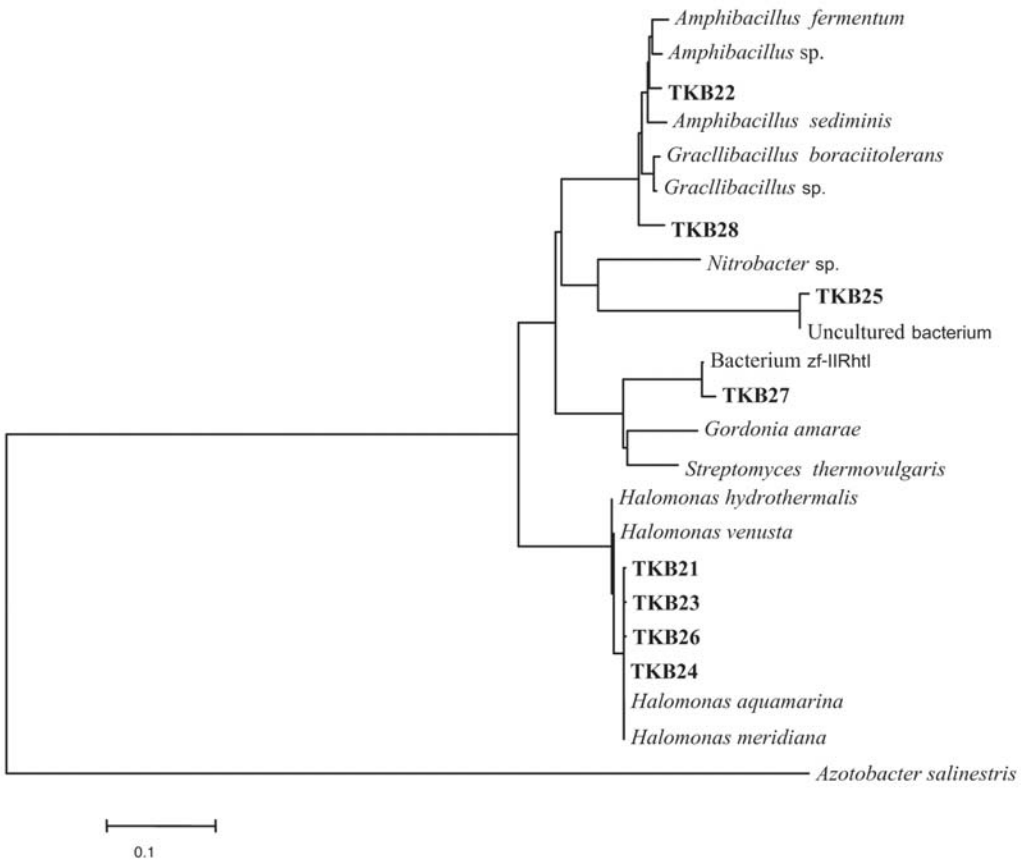
ผลการศึกษาแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดพบจำนวนเท่ากับ 7±0.08 และ 5.2±0.06 log CFU/กรัม ตามลำดับ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีลักษณะเป็นรูปท่อน ติดสีแกรมบวก ส่วนแอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มที่ทนหรือชอบความร้อน (Thermoduric หรือ thermophilic) เนื่องจากเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และพบว่าแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Non - acid fast จากการศึกษาของ ดาริกา (2550) พบว่าแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จำนวน 7 ไอโซเลตสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ที่เป็นสาเหตุโรครากและโคนเน่า (Root and stem rot)ได้ แบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทที่พบเป็นกลุ่มที่ทนหรือชอบความร้อนเนื่องจากขั้นตอนก่อนนำปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดบรรจุกระสอบพร้อมขายหรือนำไปใช้นั้นต้องผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส ทำให้แบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทที่ทนหรือชอบความร้อนเจริญได้โดยเฉพาะแบคทีเรียอาจเป็นชนิดที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้เช่นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* หรือเป็นเอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมแห้งแล้งและอุณหภูมิสูงได้ซึ่งมีรายงานว่าในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงมากกว่า 80 องศาเซลเซียสจะพบเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นส่วนใหญ่ (Beffa et al., 1996)

การศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis

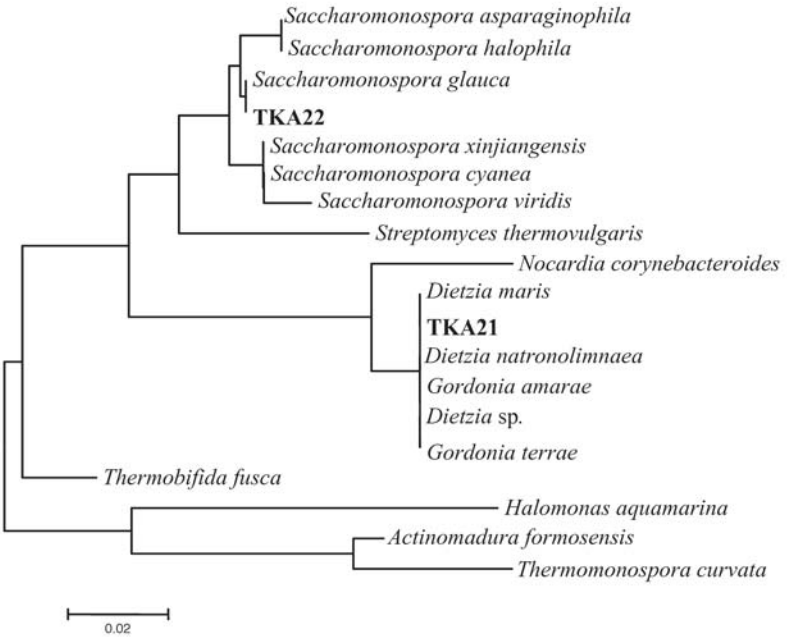
นำดีเอ็นเอ ของจุลินทรีย์ที่สกัดได้มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27f และ 1492r เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั่วไปพบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1500 bp และใช้ไพรเมอร์ 243f และ 513r เพิ่มปริมาณยีนบางส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทพบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 300 bp และสามารถโคลนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียได้ 84 โคลน จัดกลุ่มโคลนได้ทั้งหมด 8 OTU (รูปที่ 1) โคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทได้ 114 โคลน จัดกลุ่มได้ทั้งหมด 2 OTU (รูปที่ 1) เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะด้วยโปรแกรม BLAST และสร้าง Phylogenetic treeโดยใช้โปรแกรม MEGA 3.1 พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ชอบความเค็ม (Halophile) คือ TKB21, TKB23, TKB24 และ TKB26 เป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับสกุล *Halomonas* คิดเป็นร้อยละ 64 ของจำนวนโคลนทั้งหมด TKB22 เป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับสกุล *Amphibacillus* คิดเป็นร้อยละ 14 ของจำนวนโคลนทั้งหมด TKB28 เป็นแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับสกุล *Gracilibacillus* คิดเป็นร้อยละ 5 ของจำนวนโคลนทั้งหมด ส่วน TKB25 เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อและ TKB27 เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับโคลน Bacterium zf-IIRht1 คิดเป็นร้อยละ 14 และ 3 ตามลำดับ (รูปที่ 2) ส่วนแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มที่ชอบความเค็มเช่นเดียวกันคือ TKA21 เป็นแอคติโนมัยสีทที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Dietzia* คิดเป็นร้อยละ 71 ของจำนวนโคลนทั้งหมด ส่วน TKA22 คือแอคติโนมัยสีทที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Saccharomonospora* คิดเป็นร้อยละ 29 ของจำนวนโคลนทั้งหมด (รูปที่ 3)



รูปที่ 1. รูปแบบของตัวแทนแต่ละ OTU ที่ได้จากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย (หลุมที่ 1-8) (ก) และจากการจัดกลุ่มโคลนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท (หลุมที่ 1 และ 2) (ข) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*P1I และ *Msp*1 (DNA ladder หลุม M)



รูปที่ 2 . Phylogenetic tree ของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสจำนวน 700 เบสด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 บาร์สเกล 0.1 แสดงระยะห่างของการเปลี่ยนแปลงต่อนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 3 . Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่วิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสจำนวน 300 เบส ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 บาร์สเกล 0.02 แสดงระยะห่างของการเปลี่ยนแปลงต่อนิวคลีโอไทด์

แบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ชอบความเค็มซึ่งอาจเป็นเพราะคุณสมบัติของปุ๋ยที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงคือมากกว่า 3.5 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร หรือมีค่าความเข้มข้นของเกลือทั้งหมดประมาณร้อยละ 2 (สมศักดิ์, 2538) ซึ่งคาดว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตโดยเฉพาะมูลไก่อาจมีส่วนทำให้ปุ๋ยมีค่าการนำไฟฟ้าสูงดังนั้นแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่พบจึงเป็นกลุ่มที่ชอบความเค็ม

การเปรียบเทียบความหลากหลายของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิค 16S rRNA clone library analysis

ผลการศึกษาจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิคทางชีวโมเลกุลให้ผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกันกล่าวคือ แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบจากการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าเป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมบวก ไม่พบแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Halomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมลบ และเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบจากการศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis ส่วนการศึกษาแอคติโนมัยสีทด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าเป็นกลุ่มที่ทนหรือชอบความร้อน เนื่องจากเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและจัดอยู่ในกลุ่ม Non-acid fast ไม่พบแอคติโนมัยสีทในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล Dietzia ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทในกลุ่ม Acid fast สำหรับเหตุผลที่ไม่พบแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในสกุลดังกล่าวจากการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อเพราะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ศึกษาไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Halomonas* และ *Dietzia* เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ศึกษาไม่ได้มีส่วนประกอบของเกลือที่จะกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทดังกล่าว นอกจากนี้เป็นเพราะอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญจะเห็นได้จากการศึกษา

แอคติโนมัยสีทที่ต้องใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในการบ่มเนื่องจากถ้าใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่านี้จะไม่พบการเจริญของแอคติโนมัยสีท จึงทำให้แอคติโนมัยสีทบางกลุ่มที่มีอยู่ในปุ๋ยแต่อาจมีจำนวนน้อยที่ไม่ชอบหรือทนอุณหภูมิดังกล่าวสามารถเจริญได้ ดังนั้นจึงเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้เนื่องจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้ออาจไม่สามารถจำลองสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเหมือนในธรรมชาติที่แบคทีเรียชนิดนั้นๆ อาศัยอยู่ได้ นอกจากนี้ต้องปรับสภาพแวดล้อมของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ แสง ความชื้น เป็นต้น ซึ่งสภาพแวดล้อมดังกล่าวอาจเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น (Tabacchioni et al., 2000) ทำให้ไม่สามารถศึกษาแบคทีเรียทุกชนิดที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมนั้นๆ ได้ในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อก็ไม่สามารถศึกษาแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแบคทีเรียเหล่านั้นอาจมีบทบาทและความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่

สำหรับเทคนิค 16S rRNA clone library analysis มีข้อจำกัดที่ทำให้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทได้ไม่แม่นยำนัก จะเห็นได้จากผลการศึกษาที่ไม่พบแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกับสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในปุ๋ยอินทรีย์ประเภทต่าง ๆ และถึงแม้ว่า *Bacillus* จะเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งและอุณหภูมิสูงได้แต่เทคนิค 16S rRNA clone library analysis ไม่สามารถศึกษาเอนโดสปอร์ได้ (Koschinsky et al., 1999) ในขณะที่เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อนั้นสามารถศึกษาการสร้างเอนโดสปอร์ของ *Bacillus* ได้เช่นเดียวกับแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่พบทั่วไปในปุ๋ยอินทรีย์ประเภทต่างๆ แต่การศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis ไม่พบแอคติโนมัยสีทในสกุลดังกล่าวทั้งๆที่พบการเจริญของแอค-ติโนมัยสีทที่มีลักษณะเป็นจุดสีขาวคล้ายผงปูนบนกองปุ๋ย (ธงชัย, 2546) การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis มีข้อจำกัดที่ทำให้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียได้ไม่แม่นยำเหมือนเทคนิคอื่นๆ เนื่องจากเทคนิคนี้มีบางขั้นตอนที่ทำให้ลดความหลากหลายของแบคทีเรียไปได้โดยเฉพาะขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอและขั้นตอนการทำ PCR (Trevors, 1998) คือในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์อื่นๆที่มีในปุ๋ยนั้นส่วนใหญ่จะใช้วิธีการที่นำสารประกอบประเภท Polyphenol, กรดอินทรีย์บางชนิด และกรดฮิวมิก เป็นต้น ที่ปนเปื้อนกับดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยสกัดซ้ำด้วยการใช้ Phenol/Chloroform ซึ่งการใช้วิธีนี้ทำให้ดีเอ็นเอบางส่วนหายไปได้ (Wintzingerode et al., 1997) ส่วนในขั้นตอนการทำ PCR นั้นจะต้องปรับสภาพของปฏิกิริยาให้เหมาะสมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณเนื่องจากดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นคือ ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่มีลำดับเบสของยีนที่แตกต่างกัน ดังนั้นจำเป็นต้องปรับสภาพของปฏิกิริยาให้เหมาะสมโดยเฉพาะการเลือกใช้ไพรเมอร์และจำนวนรอบของการทำ PCR ซึ่งการตรวจสอบจำนวนรอบที่เหมาะสมต่อการเพิ่มความหลากหลายของยีน 16S rRNA อาจต้องใช้เทคนิคอื่นมาช่วยศึกษา เช่น เทคนิค Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) เป็นต้น

แม้ว่าเทคนิค 16S rRNA clone library analysis จะมีข้อจำกัดในการศึกษาและไม่ใช่เทคนิคที่ดีที่สุดแต่ด้วยความพร้อมของอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาและพื้นฐานความรู้จึงเลือกเทคนิคนี้มาใช้ในการศึกษาเพื่อเสริมกับการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากแต่ละเทคนิคก็มีข้อเด่นและข้อด้อยที่แตกต่างกันออกไปกล่าวคือ ในการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียหรือแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการเพิ่มธาตุอาหารหลักแก่พืชหรือความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งสาเหตุโรคพืชควรศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อพัฒนาแบคทีเรียหรือแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถดังกล่าวให้กลายเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้พัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพต่อไปได้ในอนาคต ในขณะเดียวกันการศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียและ

แอคติโนมัยสีทรวมถึงชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อควรใช้เทคนิค16S rRNA clone library analysis เข้ามาช่วยศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพ

สรุปผลการศึกษา

ผลการเปรียบเทียบความหลากหลายของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อและเทคนิค 16S rRNA clone library analysis พบว่าการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อพบแบคทีเรียส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปท่อนติดสีแกรมบวกและแอคติโนมัยสีทที่ทนหรือชอบความร้อน (Thermoduric หรือ thermophile) ผลการศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis พบว่าโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ชอบความเค็ม (Halophile) แบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่พบจากการศึกษาด้วยเทคนิค 16S rRNA clone library analysis ไม่พบจากการศึกษาด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นเพราะข้อจำกัดของแต่ละเทคนิค อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาทั้งสองเทคนิคทำให้พบความหลากหลายของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทมากกว่าการเลือกศึกษาเทคนิคใดเพียงเทคนิคเดียว ผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และการนำไปใช้พัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพต่อไปได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย รหัสโครงการ BRT T_649001 ผู้วิจัยขอขอบคุณองค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ในการให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีด้านสถานที่และข้อมูลการผลิต

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2547. กรมพัฒนาที่ดินเดินหน้ายุทธศาสตร์การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ปี 48. **จดหมายข่าวหมอดิน.** 1(6) : 1-7.

ดาริกา วสุนธรากุล. 2550. **การศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากโรงงานผลิตปุ๋ยชีวภาพขององค์การบริหารส่วนตำบลท่าข้าม อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา.** วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา.

ธงชัย มาลา. 2546. **ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ : เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์.**กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิทยากร ลิ่มทอง และฉวีวรรณ เหลืองวุฒิวิโรจน์. (2540). **คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องการปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ.** กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมศักดิ์ มณีพงศ์. 2538. **คู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์ดินและพืช.** สงขลา : คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานวิจัยธุรกิจ ธนาคารกรุงไทย จำกัด (มหาชน). 2550. **ปุ๋ยเคมี : แนวโน้มพอใช้.** (อ้างเมื่อวันที่ 6 พฤษภาคม 2550) จาก http://www.cb.ktb.co.th/prod/brnew.nsf.

Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P., Vogt, G., Marchiani, M. and Fischer, J. L. 1996. Isolation of Thermus strains from hot composts (60 to 80 °C). **Applied and Environmental Microbiology.** 62(5) :1723-1727.

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Welling, E. 1997. Analysis of actinomycetes communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology.** 63(8) : 3233-3241.

Goodfellow, M. 1989. **Bergey's manual of determinative bacteria.** Baltimore : Williams & Wilkins.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H. and Trevors, J. T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods.** 58 : 169-188.

Koschinsky, S., Peter, S., Schwieger, F. and Tebbe, C. C. 1999. Applying molecular techniques to monitor microbial communities in composting processes. **Microbial Ecology.** 47 : 205-208.

Kumar, S., Tamura, K . and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Bioinformatics.** 5 : 150 -163.

Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics,** (pp. 115-175). Chichester : Academic Press.

Peter, S., Koschinsky, S., Schwieger, F. and Tebbe, C. C. 1999. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation-polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology.** 66(3) : 930-936.

Song, J., Hang - Yeon, W., Sang - Hong, Y., Dong - Suk, P., Seung - Joo, G. and Joo - Won, S. (2001). - Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. Isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis,"**FEMS Microbiology Letters.** 202 : 97-102.

Tabacchioni, S., Chiarini, L., Bevivino, A., Cantale, C. and Dalmastri, C. 2000. Bias caused by using different isolation media for assessing the génetic diversity´of a natural microbial population. **Microbial Ecology.** 40 : 169-176.

Trevors, J. T. 1998. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically - contaminated soils **Water Air Soil Pollution.** 101 : 45-67.

Vargas - Garcia, M. C., Suarez - Estrella, F. F., Lopez, M. J. and Moreno, J. 2006. Influence of microbial inoculation and co - composting material on the evolution of humic - like substances during composting of horticultural wastes. **Process Biochemistry.** 41 : 1438-1443.

Wintzingerode, F. V., Gobel, U. B. and Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples : pitfalls of PCR - based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Review.** 21 : 213-229.

Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology.** 62 : 316-322.