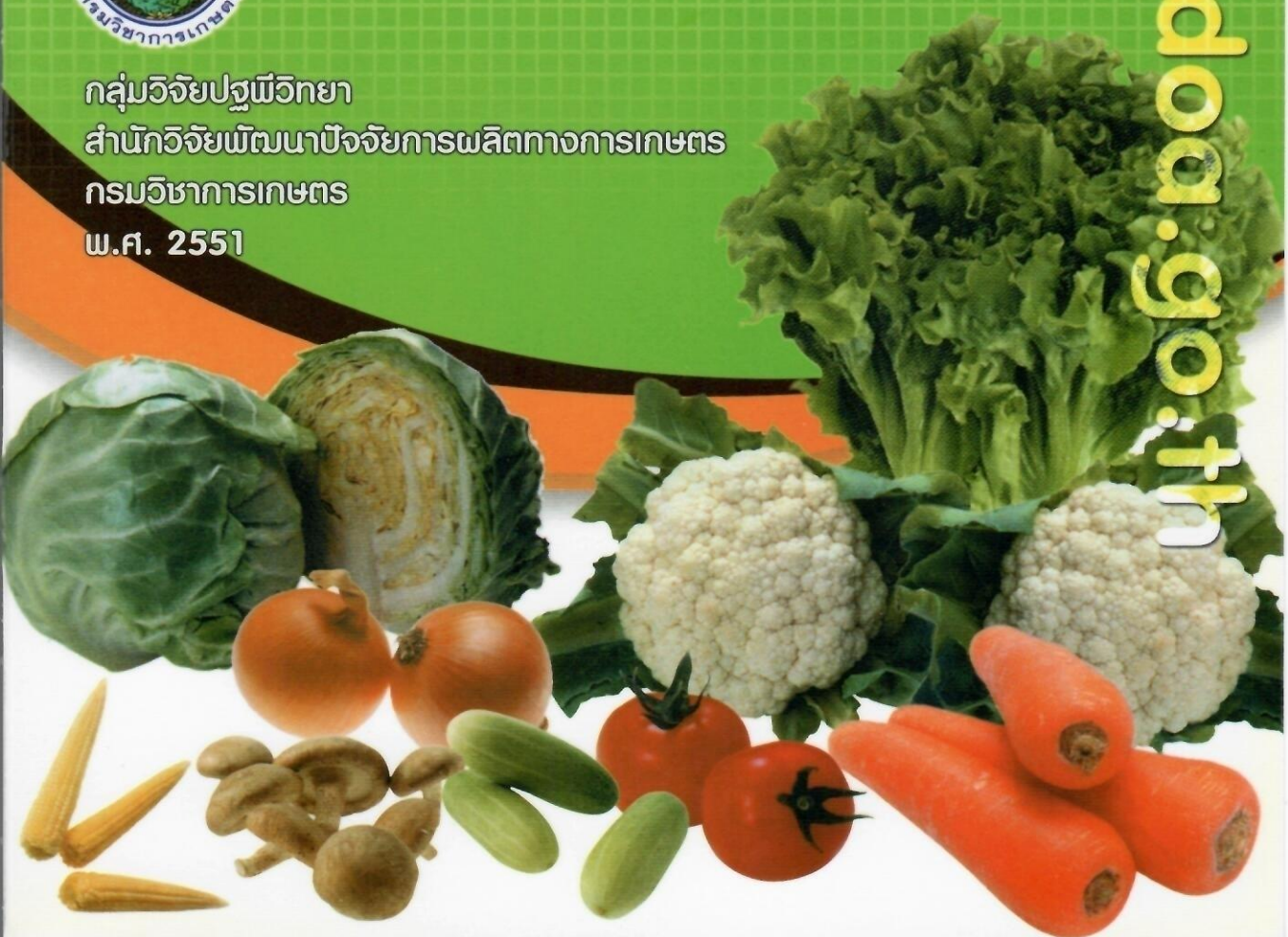
คู่มือ
วิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ

www.doa.go.th

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร
พ.ศ. 2551



เอกสารวิชาการ คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ

ISBN 978-974-436-694-8

ที่ปรึกษา

สมชาย ชาญณรงค์กุล	อธิบดีกรมวิชาการเกษตร
จิรากร โกศัยเสวี	รองอธิบดีกรมวิชาการเกษตร
พรรณพิมล ชัญญานุวัตร	รองอธิบดีกรมวิชาการเกษตร
ดำรงค์ จิระสุทัศน์	รองอธิบดีกรมวิชาการเกษตร
ดร. มัณฑนา มิลน์	ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ชุมพล นาควิโรจน์	หัวหน้ากลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
สมศักดิ์ โคตรพงศ์	หัวหน้ากลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน

ผู้เรียบเรียง

ดร. อัจฉรา นันทกิจ	นักวิชาการเกษตร 8 ว.
ภาวนา ลิกขนานนท์	นักวิชาการเกษตร 8 ว.
สุภาพร ธรรมสุระกุล	นักวิชาการเกษตร 7 ว.
ดร. สมปอง หมื่นแจ้ง	นักวิชาการเกษตร 7 ว.
สุปรานี มั่นหมาย	นักวิชาการเกษตร 7 ว.
ประไพ ทองระอา	นักวิชาการเกษตร 7 ว.
ดร. ศิริลักษณ์ จิตรอักษร	นักวิชาการเกษตร 6 ว.

ลิขสิทธิ์ของกรมวิชาการเกษตร

ห้ามคัดลอกข้อความ หรือส่วนใดส่วนหนึ่งของเอกสารวิชาการไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

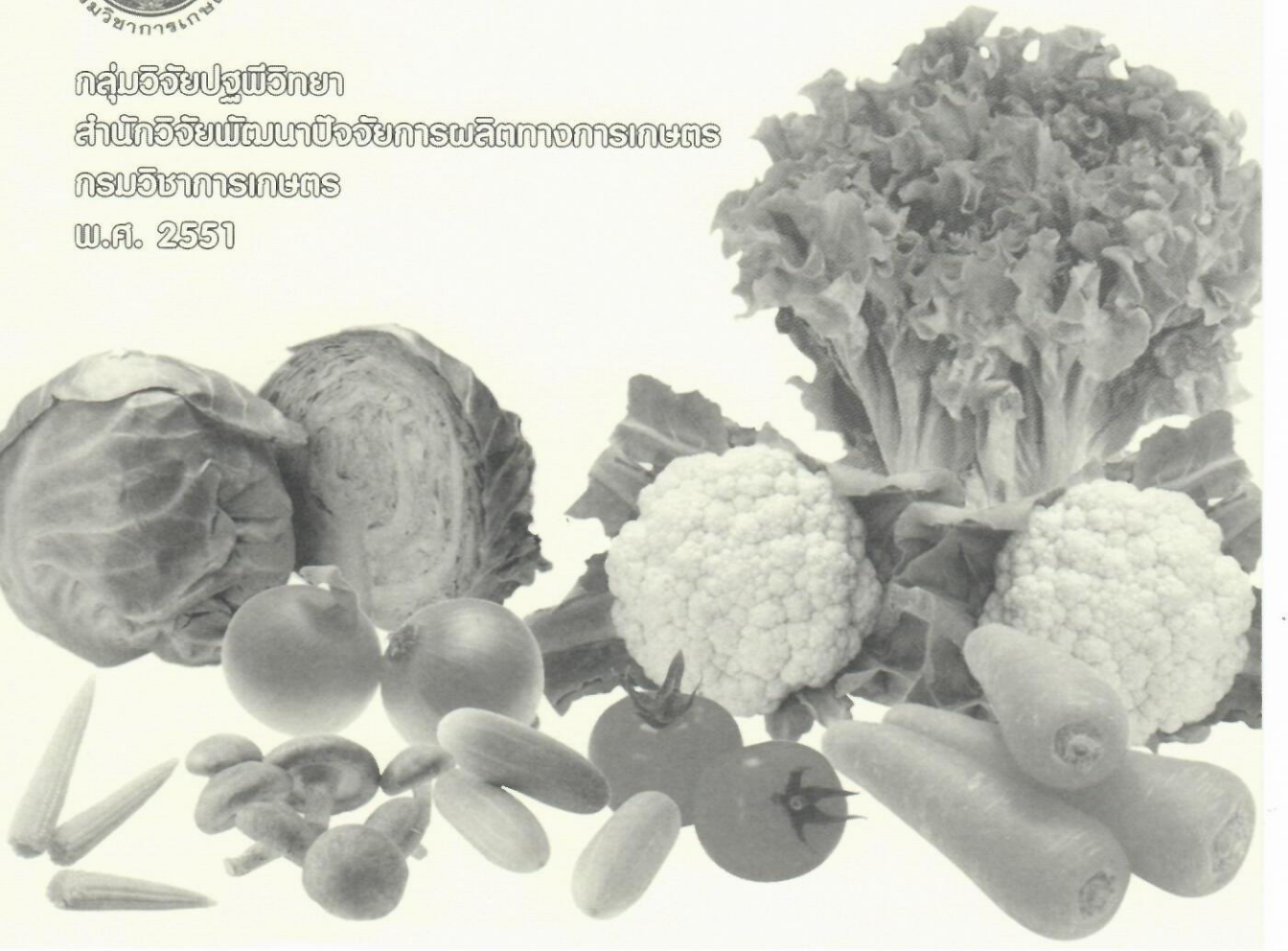
พิมพ์ครั้งที่ 1 กุมภาพันธ์ 2551

จำนวน 1,000 เล่ม

พิมพ์ที่ ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

คู่มือ
วิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร
พ.ศ. 2551



คำนำ

การวิเคราะห์จุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพเพื่อให้ได้มาตรฐาน ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในปุ๋ยชีวภาพมีบทบาทสำคัญในการให้สารประกอบธาตุอาหารแก่พืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีความรู้และความเข้าใจในหลักการวิเคราะห์จุลินทรีย์ รวมทั้งวิธีการและเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ตลอดจนสามารถปฏิบัติได้จนเกิดเป็นความชำนาญอีกทั้งยังสามารถนำประสบการณ์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในสายงานต่างๆ ได้อีกด้วย นอกจากนั้น หลักการวิเคราะห์และเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ยังสามารถใช้เป็นแนวทางพื้นฐานเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพให้มีคุณภาพดียิ่งขึ้น สามารถตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็ว แม่นยำ และน่าเชื่อถือ เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 จนสามารถพัฒนาไปสู่มาตรฐานสากล เพื่อให้เกษตรกรได้ใช้ปุ๋ยชีวภาพที่ดีมีคุณภาพในการผลิตพืช

หลักการ วิธีการและเทคนิคต่างๆในการวิเคราะห์ที่ได้รวบรวมและเรียบเรียงเป็นรูปเล่มในครั้งนี้ ได้อ้างอิงจากเอกสารวิชาการที่มีข้อมูลวิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพชนิดต่างๆ ที่สามารถยอมรับผนวกกับข้อมูลจากประสบการณ์ในการปฏิบัติจริงของนักวิชาการเกษตรด้านจุลินทรีย์ดิน ในสังกัดกรมวิชาการเกษตร ที่สะสมไม่น้อยกว่า 30 ปี เอกสารวิชาการ คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพเล่มนี้ จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพได้เป็นอย่างดีและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ และการควบคุมกำกับปุ๋ยชีวภาพ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่2) พ.ศ. 2550 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

(นายสมชาย ชาญณรงค์กุล)
อธิบดีกรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

ชื่อเรื่อง **หน้า**

การเจือจางตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเพื่อตรวจนับจุลินทรีย์ 1

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพ
โดยวิธีนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable plate count) 3

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียม
โดยวิธีหาค่า MPN (Most Probable Number) 5

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม aerobic 11

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม micro aerophilic
โดยวิธีหาค่า MPN (Most Probable Number) 14

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 19

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสปอร์อาบัสคูลาไมโคไรซ่า
ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ 23

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต 27

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ละลายโพแทสเซียม 31

วิธีการจำแนกสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยวิธีสัณฐานวิทยา 35

วิธีการจำแนกสกุลอาบัสคูลาไมโคไรซ่า โดยวิธีสัณฐานวิทยา 38

วิธีการจำแนกสกุลของแบคทีเรียและราในปุ๋ยชีวภาพ
โดยใช้ Carbon source utilization pattern 41

วิธีการจำแนกสกุลแบคทีเรียและราในปุ๋ยชีวภาพ โดยวิธี rDNA sequencing
และ phylogenetic analysis 43

การเจือจางตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเพื่อตรวจนับจุลินทรีย์

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อเจือจางปริมาณจุลินทรีย์จนถึงระดับที่สามารถตรวจนับได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และยอมรับได้ตามหลักการทางจุลชีววิทยา

2. หลักการ

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยวิธีต่างๆ นั้นจำเป็นต้องทำให้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเจือจางจนถึงระดับที่สามารถตรวจนับได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งมีข้อกำหนดไว้ในแต่ละวิธี และต้องทำให้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพกระจายอย่างทั่วถึงและเป็นเนื้อเดียวกันในน้ำยาสำหรับเจือจาง (diluent)ให้มากที่สุด ส่วนปริมาณตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่ใช้วิเคราะห์แต่ละครั้งนั้นขึ้นกับว่าปุ๋ยชีวภาพที่ใช้วิเคราะห์มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันมากน้อยเพียงใด อย่างไรก็ตามโดยปกติควรใช้ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 10 กรัม

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

เครื่องชั่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

ขวดบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตรและหลอดแก้วบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร

จานเพาะเชื้อที่เตรียมอาหารเพาะเชื้อไว้ข้ามคืน

ตู้ปลอดเชื้อ (safety lamina air flow)

ปิเปต 1 มิลลิลิตร

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

ตู้อบลมร้อน (hot-air oven)

เครื่องเขย่า (shaker)

เครื่องผสมสารเคมีแบบปั่น (vortex)

3.2 สารเคมี

3.2.1 Sodium chloride (NaCl) 0.85% (ในกรณีที่ใช้เป็นน้ำยาในการเจือจาง) หรือน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

4. วิธีการ

การเจือจางส่วนใหญ่นิยมทำการเจือจางแบบ 1:10 หรือ เรียกว่า dilution 1:10 ดำเนินการเป็นขั้นตอนดังนี้

4.1 เตรียมน้ำยาสำหรับเจือจาง ได้แก่ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หรือน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แบ่งใส่ขวด 90 มิลลิลิตร และใส่หลอดๆละ 9 มิลลิลิตร ตามลำดับความเจือจางที่ต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.2 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ 10 กรัม ใส่น้ำยาสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่า 180-200 รอบต่อนาที นาน 30-60 นาที

4.3 ทำให้เจือจาง ตามลำดับ (serial dilution) ตั้งแต่ 10^{-1} (1:10) 10^{-2} (1:100) 10^{-3} (1:1,000) 10^{-4} (1:10,000) 10^{-5} (1:100,000) 10^{-6} (1:1,000,000) จนถึงลำดับ ความเจือจางที่ต้องการ โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างเจือจาง 1:10 ในข้อ 4.2 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดบรรจุน้ำยาเจือจาง 9 มิลลิลิตร ผสมโดยปั่นด้วยเครื่องผสมแบบ vortex ก็จะได้หลอดที่มีความเจือจาง 1:100 และอื่นๆตามลำดับ โดยวิธีเดียวกัน จนถึงระดับความเจือจางที่ต้องการ ต้องเปลี่ยนปิเปตใหม่ทุกๆ ระดับความเจือจางที่เตรียม

4.4 นำตัวอย่างในน้ำยาเจือจางไปนับปริมาณจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการต่างๆ ต่อไป

4. เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. หลักการวิเคราะห์จุลินทรีย์. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

Zuberer, D. 1994. Recovery and numeration of viable bacteria, p.118-144. *In* R.W. Weaver et al. (eds.), Method of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Madison, WI.

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพ โดยวิธีนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable Plate Count)

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์สำคัญ ที่มีชีวิตทั้งหมดในปุ๋ยชีวภาพ ตามเกณฑ์ที่กำหนด ในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ เป็นการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเป็นรูปแบบโคโลนีได้บนอาหารวุ้นแข็ง (agar medium) โดยมีสมมติฐานว่า เซลล์หนึ่งเซลล์หรือกลุ่มของเซลล์ที่อยู่ใกล้ๆ กันจะเพิ่มจำนวนเจริญทับถมกันเป็นหนึ่งโคโลนี การตรวจนับจะมีความแม่นยำที่สุดเมื่อ 1) ตัวอย่างมีความเจือจางพอเหมาะ คือมีปริมาณจุลินทรีย์ในระดับที่เมื่อเจริญในอาหารวุ้นแล้วมีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ 2) จุลินทรีย์ในตัวอย่างมีการกระจายดีและเกาะกลุ่มน้อยที่สุด 3) อาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมกับจุลินทรีย์ 4) อุณหภูมิและสภาพแวดล้อมอื่นๆ เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่นับ

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องชั่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 3.1.2 ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพในน้ำยาเจือจางที่ระดับต่างๆ
- 3.1.3 จานเพาะเชื้อ
- 3.1.4 ตู้ปลอดเชื้อ
- 3.1.5 แท่งแก้วงอ
- 3.1.6 ปิเปต ขนาด 0.1 มิลลิลิตร
- 3.1.7 ตู้บ่มเชื้อ
- 3.1.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- 3.1.9 ตู้อบลมร้อน
- 3.1.10 เครื่องเขย่า
- 3.1.11 เครื่องผสมสารเคมีแบบปั่น

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อตามประเภท หรือชนิดจุลินทรีย์

4. วิธีการ

ทำการเกลี่ยสารละลายเจือจางของตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่ตรวจวิเคราะห์ซึ่งได้เตรียมไว้ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้นบนอาหารวุ้นแข็งโดยวิธี spread plate ดังนี้

4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งใส่จานเพาะเชื้อข้ามคืน

4.2 ดูดตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพในน้ำยาสารละลายเจือจางระดับความเจือจางต่างๆ ตั้งแต่ 10^{-1} จนถึงระดับความเจือจางที่ต้องการ ระดับความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร หยดบนผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อ แล้วเกลี่ยให้กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม ทำระดับความเจือจางละ 3 จานเพาะเชื้อ รอจนผิวหน้าจานเพาะเชื้อแห้ง

4.3 บ่มจานเพาะเชื้อในตู้บ่ม ที่ปรับระดับอุณหภูมิเหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด

5. คำนวณ

5.1 นับปริมาณจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อที่มีปริมาณโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี

5.2 รวมจำนวนโคโลนีจุลินทรีย์ที่นับได้จากทั้ง 3 จานเพาะเชื้อ แล้วหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 3

5.3 คูณจำนวนเฉลี่ยที่ได้ ด้วยส่วนกลับของการเจือจาง และคูณด้วย 10 (ปริมาณที่นำมาเพาะ 0.1 มิลลิลิตรต่อจาน)

5.4 รายงานจำนวนที่อ่านได้เป็นจำนวนเชื้อที่มีชีวิตต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

ตัวอย่าง

ก. ระดับความเจือจางของเชื้อที่ใช้เพาะ 10^{-4} จำนวน โคโลนีที่นับได้จากจานเพาะเชื้อ ทั้ง 3 จาน คือ 35 40 และ 45 ตามลำดับ

ข. รวมจำนวนเชื้อที่นับได้ เท่ากับ 35+40+45 = 120 โคโลนี

ค. หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่รวมกันด้วย 3 เท่ากับ 120/3 = 40

ง. คูณค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วยส่วนกลับของระดับความเจือจาง และ 10
= $40 \times 10^{4} \times 10 = 40 \times 10^{5}$ โคโลนี

จ. ปรับตัวเลขให้อยู่ค่าที่ใกล้เคียง = $40 \times 10^{5} = 4.0 \times 10^{6}$ โคโลนี

5.5 การรายงานผล จากตัวอย่างมีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ประมาณ 4.05×10^{6} หรือ 4,000,000 โคโลนีต่อกรัมของปุ๋ยชีวภาพ

6. เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. หลักการวิเคราะห์จุลินทรีย์. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

Knowles, R. and W.L. Barraquio. 1994. Free living dinitrogen-fiixing bacteria, p.179-197. *In* R.W. Weaver et al. (eds.), Method of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties, Soil Science Society of America, Madison, WI.

Zuberer, D. 1994. Recovery and numeration of viable Bacteria, p.118-144. *In* R.W. Weaver et al. (eds.), Method of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Madison, WI.

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียม โดยวิธีหาค่า MPN (Most Probable Number)

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมที่มีชีวิตแต่ละสกุลในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ตามเกณฑ์ที่กำหนด ในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมโดยวิธีการตรวจสอบการเข้าสร้างปมที่รากต้นถั่ว (plant infection method) เป็นวิธีการตรวจนับจำนวนไรโซเบียมที่มีชีวิตและมีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม เริ่มด้วยการเตรียมสารละลายปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมให้มีระดับของความเจือจางที่แตกต่างกัน และนำไปปลูกใส่ให้กับผิวรากของถั่วซึ่งปลูกในถุงปลูก โดยทั่วไปนิยมใช้ถั่วเซอราโตร (siratro) และถั่วที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับชนิดถั่วที่ระบุในฉลากปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ตรวจนับจำนวนถุงปลูกที่มีการสร้างปมเกิดขึ้นที่รากถั่วแล้วนำไปเปิดตารางหาค่า Most Probable Number (MPN) เพื่อประเมินปริมาณแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียมที่มีชีวิตอยู่ในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เมล็ดถั่วเซอราโตร และเมล็ดถั่วที่จำเพาะเจาะจงกับชนิดของไรโซเบียมที่ทำการตรวจวิเคราะห์

3.1.2 ถุงปลูกพืช (growth pouch) ทำด้วยถุงพลาสติกอย่างหนาและทนร้อน ขนาด 5x8 นิ้ว

3.1.3 กระดาษฟาง และหลอดพลาสติก

3.1.4 ชั้นวางถุงปลูก

3.1.5 ชั้นแสงพร้อมหลอดไฟให้แสงสว่าง

3.1.6 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.1.7 เครื่องแก้ว เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และวัสดุอื่นๆ ที่จำเป็นต้องใช้ในการปฏิบัติการวิเคราะห์

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหาร YMB (yeast mannitol broth medium) ประกอบด้วย

di-Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
D-mannitol	5.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม

Sodium chloride (NaCl)	0.1	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

การเตรียม ละลายส่วนผสมของ K_2HPO_4 , NaCl และ $MgSO_4.7H_2O$ ในน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร จากนั้นเติม D-mannitol และ yeast extract ทำให้ละลายเข้ากันได้ดีโดยคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง จากนั้นปรับ pH ของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 6.8 ด้วยสารละลาย sodium hydroxide ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล (1.0 N NaOH) และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.2.2 สารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free plant nutrients) เป็นสารละลายตั้งต้นชนิดเข้มข้น (stock) (Broughton and Dilworth, 1971) ประกอบด้วย

ก. Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	294.1	กรัม/ลิตร
ข. Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4)	136.1	กรัม/ลิตร
ค. Ethylene diamine tetraacetic acid ferric monosodium salt		
($FeNaH_2C_{10}H_{12}N_2O_8.2H_2O$, FeNa-EDTA)	6.926	กรัม/ลิตร
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	123.3	กรัม/ลิตร
Potassium sulfate (K_2SO_4)	87	กรัม/ลิตร
Manganese sulfate ($MnSO_4.H_2O$)	0.338	กรัม/ลิตร
ง. Boric acid (H_3BO_3)	0.247	กรัม/ลิตร
Zinc sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.288	กรัม/ลิตร
Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.1	กรัม/ลิตร
Cobalt sulfate ($CoSO_4.7H_2O$)	0.056	กรัม/ลิตร
Sodium molybdate ($NaMoO_4.2H_2O$)	0.048	กรัม/ลิตร

การเตรียม เติมสารละลายข้อ ข-ง อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 900 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันจึงเติม $CaCl_2.2H_2O$ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วยสารละลาย potassium hydroxide ความเข้มข้น 1.0 โมลล่าร์ (1.0 M KOH) และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

4. วิธีการ

4.1 การเตรียมถุงปลูก (growth pouch)

ถุงปลูกพืชทำจากถุงพลาสติกอย่างหนาขนาด 5x8 นิ้ว ภายในบรรจุกระดาษฟางพับขอบด้านหนึ่งของถุงปลูกใส่หลอดพลาสติกเพื่อสะดวกในการเติมสารละลายธาตุอาหารพืชปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหนึ่งถุงปลูก นำถุงปลูกที่เตรียมเรียบร้อยแล้วไปผ่านการฆ่าเชื้อปนเปื้อน นำถุงปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ปนเปื้อนแล้วไปจัดวางในชั้นวางถุงปลูก (rack) ที่ทำจากลวดสแตนเลสตัดเป็นกรอบสี่เหลี่ยมตอกลงบนแผ่นไม้โดยมีช่องห่างระหว่างกรอบลวด 1 เซนติเมตร

4.2 การเพาะเมล็ดถั่ว

นำเมล็ดถั่วเซอราโตรและเมล็ดถั่วที่จำเพาะเจาะจงกับไรโซเบียมที่ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพมาฆ่าเชื้อปนเปื้อนที่ผิวหุ้มเมล็ด เมล็ดถั่วเปลือกแข็ง เช่น เซอราโตร สามารถทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนลงได้โดยแช่เมล็ดถั่วในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 4-6 ครั้ง จากนั้นแช่เมล็ดถั่วในน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ส่วนเมล็ดถั่วที่มีเปลือกอ่อน เช่น ถั่วเหลือง ให้แช่เมล็ดถั่วใน hydrogen peroxide (H_2O_2) (5%) เป็นเวลา 15-20 นาที ล้างด้วยน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 4-6 ครั้ง จากนั้นแช่เมล็ดถั่วในน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำเมล็ดถั่วไปเพาะบนสำลีที่มีความชื้นพอเหมาะและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วซึ่งบรรจุในจานเพาะเมล็ดพร้อมฝาปิด เกลี่ยเมล็ดให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนเมล็ดงอกรากมีความยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร จึงนำไปปลูกในถุงปลูกต่อไป

4.3 การเตรียมสารละลายเจือจางของตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ

ชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่ทำการวิเคราะห์จำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่บรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าจำนวนเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยมือประมาณ 5 นาที จะได้สารละลายปุ๋ยชีวภาพที่มีความเจือจาง 10^{-1} เท่า จากนั้นทำสารละลายดังกล่าวให้มีความเจือจางเพิ่มขึ้นตามลำดับ (serial dilution) ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นทำตัวละลายเจือจาง (diluent)

4.4 การปลูกถั่วในถุงปลูก

นำถุงปลูกที่ผ่านมาฆ่าเชื้อแล้ววางในชั้นวางถุงปลูก เติมสารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากไนโตรเจนและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อถุงละ 30 มิลลิลิตร ใช้ปากคีบเจาะรูบนขอบกระดาษฟางที่พับไว้ 2 รู โดยมีระยะห่างประมาณ 5 เซนติเมตร จากนั้นใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนคีบเมล็ดถั่วเซอราโตรที่รากงอกแล้วโดยสอดรากลงไปในรูที่เจาะด้านใดด้านหนึ่งของถุงปลูกโดยตัวเมล็ดจะอยู่บนขอบกระดาษฟางที่พับไว้ ส่วนอีกรูที่เหลือให้ปลูกเมล็ดถั่วอีกชนิดหนึ่งที่จำเพาะเจาะจงกับชนิดของเชื้อไรโซเบียมที่ใช้ทำปุ๋ยชีวภาพ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน ดูดสารละลายปุ๋ยชีวภาพที่มีระดับของความเจือจางแตกต่างกัน ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} โดยเริ่มจากความเจือจางมากที่สุดไปถึงน้อยที่สุด คือ เริ่มจากความเจือจางที่ 10^{-8} ไปยัง 10^{-1} ในการปลูกเชื้อไรโซเบียมในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพให้แก่รากถั่วนั้น พยายามให้สารละลายปุ๋ยชีวภาพสัมผัสบริเวณรากถั่วมากที่สุด ทำการหยดสารละลายเจือจางปุ๋ยชีวภาพจำนวน 1 มิลลิลิตรต่อถุงปลูก ทำ 4 ซ้ำต่อความเจือจาง รวมทั้งถุงที่ปลูกถั่วอย่างเดียวโดยไม่มีการเติมสารละลายปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเพื่อเป็นต้นเปรียบเทียบ เมื่อปลูกถั่วเรียบร้อยแล้วให้นำชั้นวางถุงปลูกเหล่านั้นไปวางบนชั้นแสงซึ่งมีการให้แสงสว่างจากหลอดไฟแก่พืชประมาณ 40 วัตต์ เมื่อวัดจากระยะประมาณ 15-17 เซนติเมตร จากระดับปากถุง ให้แสงสว่างแก่พืช 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูแลให้สารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากไนโตรเจนเมื่อพืชต้องการ จนครบกำหนดเวลา 3 สัปดาห์

5. คำนวณ

เมื่อครบกำหนดเวลา 3 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนถุงที่ต้นถั่วติดปม และนำไปเปิดตารางที่เรียกว่า MPN (ตารางที่ 1) เพื่อหาค่าประเมินของจำนวนไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมที่รากต้นถั่ว (m) จากนั้นคำนวณจำนวนไรโซเบียมต่อกรัมของปุ๋ยชีวภาพดังนี้

$$X = \frac{m \times d}{v}$$

X = จำนวนไรโซเบียมต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

m = ตัวเลขที่ได้จากการเปิดตาราง MPN

d = ระดับความเจือจางต่ำสุดของสารละลายปุ๋ยชีวภาพที่ใส่ให้กับต้นถั่ว (10^1)

v = ปริมาตรสารละลายปุ๋ยชีวภาพที่ใส่ให้กับถั่ว (1 มิลลิลิตร)

ตัวอย่างเช่น เตรียมสารละลายเจือจางของตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่มีระดับของความเจือจาง 10 เท่า (tenfold) จำนวน 8 ระดับ คือ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} และ 10^{-8} (s = 8) ปลูกใส่สารละลายเจือจางของปุ๋ยชีวภาพจำนวน 1 มิลลิลิตรของแต่ละระดับความเจือจาง โดยกระทำ 4 ซ้ำ (n = 4) จำนวนถุงที่สังเกตเห็นการสร้างปมที่รากต้นถั่ว 20 ถุง เมื่อนำไปเปิดตาราง MPN จะได้ค่า m = 1.7×10^4 คำนวณจำนวนไรโซเบียม จากสูตร

$$X = \frac{m \times d}{v}$$

$$X = \frac{1.7 \times 10^4 \times 10^1}{1}$$

ปริมาณไรโซเบียมที่ตรวจพบ 1.7×10^5 เซลล์ต่อปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

6. เอกสารอ้างอิง

Broughton, W. J. and M. J. Dilworth. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. Biochem. J. 125:1075-1080.

Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in legume-*rhizobium* technology. University of Hawaii, NifTAL project, Paia, Hawaii

ตารางที่ 1 ตาราง MPN แสดงจำนวนไรโซเบียมที่ประเมินโดยวิธี plant infection method (ค่า m)

จำนวนถุงปลูกของพืชที่เกิดปมราก		ชั้นของความเจือจาง (s)	
จำนวนซ้ำ (n = 4)	s = 10		
40	$> 7 \times 10^8$		
39			
38	6.9		
37	3.4		
36	1.8		
35	1.0		
34	5.9×10^7		
33	3.1	s =8	
32	1.7	$> 7 \times 10^6$	
31	1.0		
30	5.8×10^6	6.9	
29	3.1	3.4	
28	1.7	1.8	
27	1.0	1.0	
26	5.8×10^5	5.9×10^5	
25	3.1	3.1	
24	1.7	1.7	
23	1.0	1.0	
22	5.8×10^4	5.8×10^4	
21	3.1	3.1	
20	1.7	1.7	
19	1.0	1.0	
18	5.8×10^3	5.8×10^3	
17	3.1	3.1	
16	1.7	1.7	
15	1.0	1.0	
14	5.8×10^2	5.8×10^2	
13	3.1	3.1	
12	1.7	1.7	
11	1.0	1.0	
10	5.8×10^1	5.8×10^1	
9	3.1	3.1	
8	1.7	1.7	
7	1.0	1.0	
6	5.8 x 1	5.8 x 1	
5	3.1	3.1	
4	1.7	1.7	
3	1.0	1.0	
2	0.6	0.6	
1	<0.6	<0.6	
0			

ที่มา : Somasegaran และ Hoben (1994)

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 1 แสดงการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียม

(ก) การเจือจางตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

(ข) การปลูกใส่เชื้อไรโซเบียมให้แก่รากถั่ว

(ค) การเพาะเลี้ยงต้นถั่วที่ได้รับการปลูกเชื้อไรโซเบียมในห้องแสงและตรวจนับด้วยวิธี MPN

(ง) ลักษณะปมรากถั่วที่สร้างโดยเชื้อไรโซเบียม

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม aerobic

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในกลุ่ม aerobic บางสกุล เช่น *Azotobacter Beijerinckia* และอื่นๆ ที่มีชีวิตทั้งหมด (viable cells) ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ตามเกณฑ์ที่กำหนด ในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเป็นการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณเจริญเติบโตเป็นรูปโคโลนีได้บนอาหารวุ้น (agar media) ที่จำเพาะสำหรับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนบางสกุล อาหารที่ใช้เป็นอาหารแข็งปราศจากไนโตรเจนแบคทีเรียที่เจริญในอาหารนี้ได้เป็นพวกที่สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาพที่มีออกซิเจนปกติได้ อาหารมักมีความแตกต่างกันในแต่ละสกุลของแบคทีเรีย

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องชั่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.1.2 จานเพาะเชื้อที่มีอาหารเฉพาะสำหรับสกุลแบคทีเรียที่จะนับ

3.1.3 ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.4 แท่งแก้วงอ

3.1.5 ปิเปต ขนาด 0.1 และ 1 มิลลิลิตร

3.1.6 ตู้บ่มเชื้อ

3.1.7 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.8 ตู้อบแบบ oven

3.1.9 เครื่องเขย่า

3.1.10 เครื่องผสมสารเคมีแบบปั่น (vortex)

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียสกุล *Azotobacter* หรือ อาหาร *Beijerinckia* (Dobereiner, 1980)

4 วิธีการ

4.1 เตรียมอาหารแข็งปราศจากไนโตรเจนตามสูตร ใส่จานเพาะเชื้อข้ามคืน

4.2 ทำการเจือจางตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-4}

4.3 ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วแต่ละระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-4} ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร หยดบนผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อ แล้วเกลี่ยด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมฆ่าเชื้อให้กระจายสม่ำเสมอ ทั่วผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อ จนผิวหน้าจานเพาะเชื้อแห้ง ระดับความเจือจางละ 3 จาน

4.4 คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วบ่มที่อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมแต่ละสกุล

5 คำนวณ

5.1 นับปริมาณและคำนวณปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ตามวิธีการ viable plate count

5.2 รายงานผลเป็นปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีชีวิตทั้งหมดต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

6 เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. หลักการวิเคราะห์จุลินทรีย์. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

Dobereiner, J. 1980. Forage grasses and grain crops. pp. 535-555. In Methods for Evaluating Biological Nitrogen fixation. Ed. F J Bergersen. John Wiley & Sons Ltd. New York.

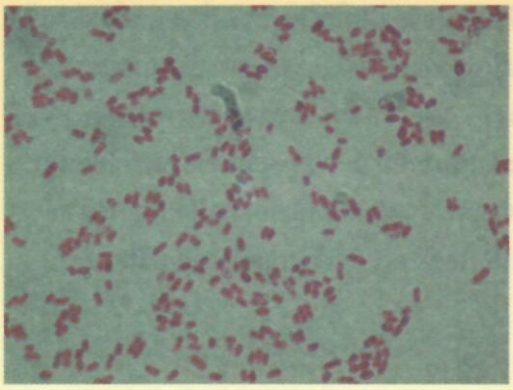
Knowles, R. and W.L. Barraquio. 1994. Free living dinitrogen-fiixing bacteria, p.179-197. *In* R.W. Weaver et al. (eds.), Method of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Madison, WI.

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.

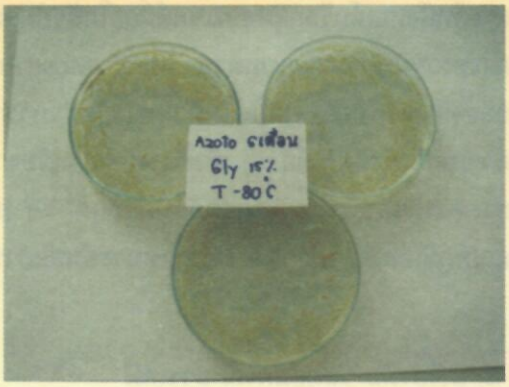
Zuberer, D. 1994. Recovery and numeration of viable Bacteria, p.118-144. *In* R.W. Weaver et al. (eds.), Method of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties, Soil Science Society of America, Madison, WI.

(ก)

(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 2 แสดงการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม aerobic โดยวิธี viable plate count

(ก) การเจือจางตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ

(ข) การ spread plate เพื่อเกลี่ยให้จุลินทรีย์กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร

(ค, ง) ลักษณะของเซลล์แบคทีเรียสกุล *Azotobacter* spp. และลักษณะโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็งหลังจากบ่มไม่น้อยกว่า 3 วัน

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน กลุ่ม micro aerophilic โดยหาค่า MPN (Most Probable Number)

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม micro aerophilic ที่มีชีวิตทั้งหมดในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ให้ได้มาตรฐานและมีคุณภาพเป็นไปตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

การตรวจวิเคราะห์เพื่อนับปริมาณแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม micro aerophilic ที่มีชีวิตในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพซึ่งสามารถเจริญเติบโตในอาหารกึ่งเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน โดยถือหลักการว่าเซลล์หนึ่งเซลล์หรือกลุ่มของเซลล์ที่อยู่ใกล้ๆกันจะเพิ่มจำนวนเจริญเติบโตในอาหารกึ่งเหลวที่จำเพาะได้ การตรวจนับปริมาณแบบหาค่า MPN (Most Probable Number) เป็นการคาดคะเนจำนวนมากที่สุดของจุลินทรีย์ที่อาจจะมีได้ในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ โดยใช้หลักการทางสถิติการตรวจนับจะมีความแม่นยำที่สุดเมื่อ 1) ตัวอย่างมีความเจือจางในระดับที่พอเหมาะ 2) จุลินทรีย์ในตัวอย่างมีการกระจายดีและมีการเกาะกลุ่มกันน้อยที่สุด 3) อาหารจำเพาะสำหรับแบคทีเรียสกุลที่จะนับปริมาณ 4) อุณหภูมิและสภาพแวดล้อมอื่นๆเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสกุลที่จะนับปริมาณ

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องชั่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.1.2 ขวดบรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร และหลอดแก้วบรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร

3.1.3 หลอดอาหารกึ่งเหลวเฉพาะสำหรับแบคทีเรียสกุลที่จะนับปริมาณ

3.1.4 ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.5 แท่งแก้วงอ

3.1.6 ปิเปต ขนาด 0.1 และ 1 มิลลิลิตร

3.1.7 ตู้บ่มเชื้อ

3.1.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.9 ตู้อบแบบ oven

3.1.10 เครื่องเขย่า

3.1.11 เครื่องผสมสารเคมีแบบปั่น (vortex)

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีในสูตรอาหารเลี้ยงแบคทีเรียสกุลที่จะนับปริมาณ เช่น *Azospirillum* ใช้อาหาร NFb (Dobereiner, 1980)

4. วิธีการ

4.1 เตรียมอาหารปราศจากไนโตรเจนกึ่งเหลวตามสูตร แบ่งใส่หลอดทดลอง ขนาด 20 มิลลิลิตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร

4.2 เจือจางตัวอย่างปุ๋ยโดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่มีอะโซสไปริลลัม เป็นส่วนประกอบ 10 กรัม ใส่ในขวดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร แล้วเจือจาง ตามลำดับ ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-7}

4.3 ดูดตัวอย่างปุ๋ยที่เจือจางแล้วแต่ละระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-7} ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร หยดใส่ในหลอดอาหารกึ่งเหลว ความเจือจางละ 5 หลอด

4.4 บ่มหลอดที่ใส่สารละลายตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทั้งหมดในตู้บ่มเชื้อ

4.5 บันทึกผลจำนวนหลอดของแต่ละระดับความเจือจางที่สร้างฝ้าบางๆ สีขาว (pellicle) ภายใต้ผิวหน้าให้เป็นผลบวก

4.6 นำผลที่ได้ไปเทียบหาค่า MPN จากตารางที่ 2

5. คำนวณ

5.1 สมมติในการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ โดยใช้ระดับความเจือจาง แบบ 10 เท่า คือ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} ระดับความเจือจางละ 5 หลอด ใส่ตัวอย่างระดับความเจือจาง ละ 0.1 มิลลิลิตร

5.2 ข้อมูลหลอดที่ให้ผลบวก 10^{-1}= 5, 10^{-2}=5, 10^{-3} =5, 10^{-4} =3 10^{-5} =1 ในการทดลองนี้ p^1=5, p^2=3, p^3=1 จึงใช้ตัวเลข 5-3-1 ไปเปิดตาราง MPN ตารางที่ 2 ได้ 1.1

5.3 นำค่า 1.1 ที่เปิดได้จากตาราง คูณด้วยค่าระดับความเจือจางที่ 2 เท่ากับ $1.1 \times 10^4 \times 10$ (ปริมาตรที่นำมาเพาะ 0.1 มิลลิลิตร) เท่ากับ 1.1×10^5 หรือ 110,000 เซลล์ต่อกรัม

6. เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. หลักการวิเคราะห์จุลินทรีย์. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

Alexandera, M. 1982. Most Probable Number Method for Microbial Population, p.815-820. *In* A.L. Page et al. (eds.), Method of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties, American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Madison, WI.

Cochran, W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number." Biometrics 6 : 105-116.

Dobereiner, J. 1980. Forage grasses and grain crops, p. 535-555. *In* Methods for Evaluating Biological Nitrogen fixation, Ed. F J Bergersen. John Wiley & Sons Ltd. New York.

Knowles, R. and W.L. Barraquio. 1994. Free living dinitrogen-fiixing bacteria, p.179-197. *In* R.W. Weaver et al. (eds.), Method of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties, Soil Science Society of America, Madison, WI.

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.

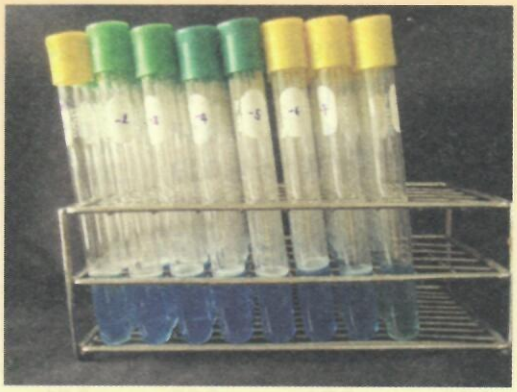
ตารางที่ 2 ตาราง MPN สำหรับตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่า เมื่อใช้ระดับความเจือจางละ 5 หลอด (Cochran, 1950)

		ค่า MPN ของระดับความเจือจางที่ 3 (p3)					
P1	P2	0	1	2	3	4	5
0	0	-	0.018	0.036	0.054	0.072	0.09
0	1	0.018	0.036	0.055	0.073	0.091	0.11
0	2	0.037	0.055	0.074	0.092	0.11	0.13
0	3	0.056	0.074	0.093	0.11	0.13	0.15
0	4	0.075	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17
0	5	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19
1	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12
1	1	0.04	0.061	0.081	0.10	0.12	0.14
1	2	0.061	0.082	0.10	0.12	0.15	0.17
1	3	0.083	0.10	0.13	0.15	0.17	0.19
1	4	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22
1	5	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22	0.24
2	0	0.045	0.068	0.091	0.12	0.14	0.16
2	1	0.68	0.092	0.12	0.14	0.17	0.19
2	2	0.093	0.12	0.14	0.17	0.19	0.22
2	3	0.12	0.14	0.17	0.20	0.22	0.25
2	4	0.15	0.17	0.20	0.23	0.25	0.28
2	5	0.17	0.20	0.23	0.26	0.29	0.32
3	0	0.078	0.11	0.13	0.16	0.20	0.23
3	1	0.11	0.14	0.17	0.20	0.23	0.27
3	2	0.14	0.17	0.20	0.24	0.27	0.31
3	3	0.17	0.21	0.24	0.28	0.31	0.35
3	4	0.21	0.24	0.28	0.32	0.36	0.40
3	5	0.25	0.26	0.32	0.37	0.41	0.45
4	0	0.13	0.17	0.21	0.25	0.30	0.36
4	1	0.17	0.21	0.26	0.31	0.36	0.42
4	2	0.22	0.26	0.32	0.38	0.44	0.50
4	3	0.17	0.21	0.24	0.28	0.31	0.35
4	4	0.34	0.40	0.47	0.54	0.62	0.69
4	5	0.41	0.48	0.56	0.64	0.72	0.81
5	0	0.23	0.31	0.43	0.58	0.76	0.95
5	1	0.33	0.46	0.64	0.84	1.1	1.3
5	2	0.49	0.7	0.95	1.2	1.5	1.8
5	3	0.79	1.1	1.4	1.8	2.1	2.5
5	4	1.3	1.70	2.2	2.8	3.5	4.3
5	5	2.4	3.5	5.4	9.2	16	-

ที่มา - Alexandera M. 1982.

(ก)

(ข)



(ค)

(ง)

ภาพที่ 3 แสดงการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกลุ่ม micro aerophilic โดยวิธี Most Probable Number

(ก) การเจือจางตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ

(ข) การปลูกเชื้อใส่ในอาหารกึ่งเหลวสำหรับ MPN

(ค) ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* หลังบ่ม 48 ชั่วโมง

(ง) การเจริญของแบคทีเรียสกุล *Azospirillum* จากซ้าย-ขวา ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-8} = 5-5-5-5-5-5-5-1 และนำค่า 3 ตัวสุดท้ายไปเปิดตาราง MPN และคำนวณปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตทั้งหมด (viable cells) ในปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ตามเกณฑ์ที่กำหนด ในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ การนับปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถดำเนินการได้เช่นเดียวกันกับการนับปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดโดยวิธี plate count โดยทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) และทำการสเปรดเพลดสารละลายเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน นำไปวางบนชั้นแสงโดยให้มีความเข้มของแสงประมาณ 7,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30-45 วัน เมื่อเชื้อเจริญทำการนับปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตทั้งหมดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องชั่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.3 ตะเกียง

3.1.4 ชั้นแสง

3.1.5 เครื่องเขย่า

3.1.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.7 ตู้อบแบบ oven

3.1.8 เครื่องผสมสารแบบปั่น (vortex)

3.1.9 ขวดบรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร และหลอดแก้วบรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร

3.1.10 จานแก้วเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11

3.1.11 ไมโครปิเปตต์

3.1.12 แท่งแก้วงอ

3.2 สารเคมี

อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินปราศจากไนโตรเจน ประกอบด้วย

3.2.1 น้ำกลั่น 999 มิลลิลิตร

3.2.2 Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) 0.037 กรัม

3.2.3 Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) 0.020 กรัม

3.2.4 Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$) 0.035 กรัม

3.2.5 Citric acid anhydrous (Citric acid) 6 มิลลิกรัม

3.2.6 Ferric ammonium citrate ($FeNH_4$ citrate) 6 มิลลิกรัม

3.2.7 Ethylenediamine tetraacetic acid (Na_2 EDTA) 1 มิลลิกรัม

3.2.8 di-Potassium hydrogen phosphate anhydrous (K_2HPO_4) 0.038 กรัม

3.2.9 Stock A-5 micronutrient จำนวน 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

3.2.9.1 น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3.2.9.2 Boric acid (H_3BO_3) 2.8 กรัม

3.2.9.3 Manganese sulphate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$) 1.56 กรัม

3.2.9.4 Molybdenum trioxide (MoO_3) 0.15 กรัม

3.2.9.5 Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$) 0.22 กรัม

3.2.9.6 Copper (II) sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$) 0.08 กรัม

3.2.9.7 Potassium chromium sulfate ($K_2Cr_2(SO_4)_4$ .24 H_2O) 0.10 กรัม

3.2.9.8 Nickel sulfate hexahydrate ($NiSO_4$. $6H_2O$) 0.045 กรัม

3.2.9.9 Cobalt (II) nitrate hexahydrate ($Co(NO_3)_2$.$6H_2O$) 0.05 กรัม

3.2.9.10 Sodium tungstate dihydrate (Na_2WO_4. $2H_2O$) 0.018 กรัม

3.2.9.11 Titanium dioxide (TiO_2) 0.017 กรัม

3.2.9.12 Ammoniummonovanadate (NH_4 VO_3) 0.02 กรัม

3.2.10 วุ้น 12 กรัม

ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.8 ด้วย 1.0 N NaOH นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. วิธีการ

4.1 เตรียมอาหารแข็งปราศจากไนโตรเจนใส่จานแก้วเพาะเชื้อ

4.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพที่มีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นส่วนประกอบ 10 กรัม ใส่ขวดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่า 180 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จะได้สารละลายเจือจาง 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างเป็นชุดลำดับโดยวิธี serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-5}

4.3 ถ่ายสารละลายในแต่ละความเจือจางโดยใช้ไมโครปิเปตต์ จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อในจานแก้ว จำนวน 3 ซ้ำ เกลี่ยสารละลายให้ทั่วจานแก้วโดยวิธีsprade plate พันจานแก้วด้วยพาราฟิล์ม วางไว้บนชั้นแสง นาน 30-45 วัน เมื่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญ ทำการนับโคโลนีจากจานแก้วที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี

5. คำนวณ

5.1 นับปริมาณและคำนวณปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ตามวิธีการ viable plate count

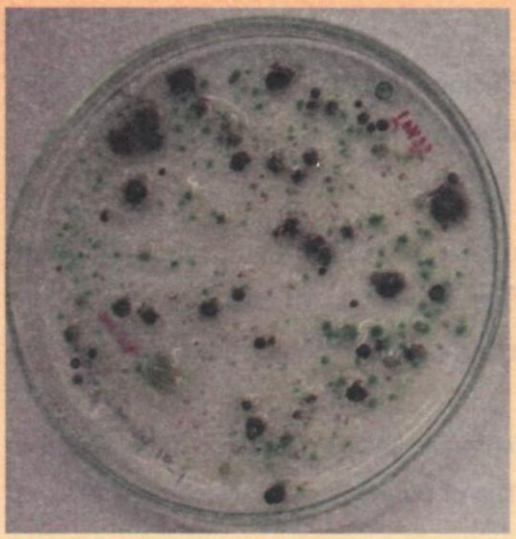
5.2 รายงานผลเป็นปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตทั้งหมดต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

6. เอกสารอ้างอิง

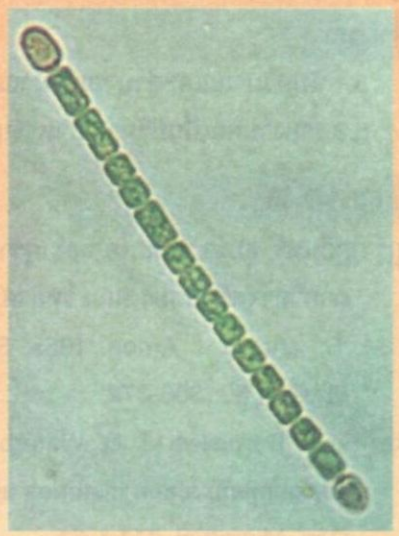
สุราษฎร์ กุฏอินทร์, อมรา จันทนโอ และ สุรางค์ สุธิราวุธ. 2538. วิทยาแบคทีเรียดีเทอร์มิเนตีฟปฏิบัติการ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 202 น.

Allen, M. B., and D. I. Arnon. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue- green algae. Plant Physiol. 30: 366-372.

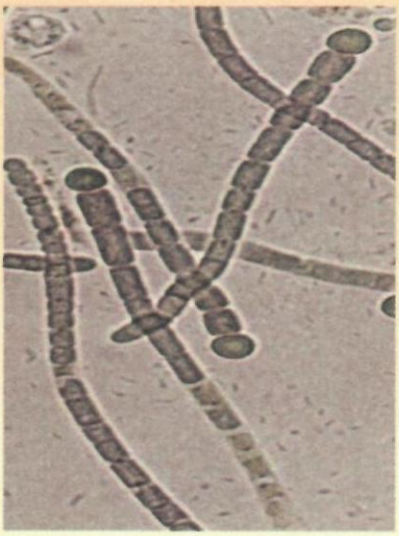
Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman, and R.Y. Stanier. 1979. Generic assignment, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. J. of Gen. Microbiol. 111:1-61.



(ก)



(ข)



(ค)

(ง)

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

(ก) ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11

(ข) ลักษณะเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Anabaena*

(ค) ลักษณะเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Calothrix*

(ง) ลักษณะเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Nostoc*

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสปอร์อาบัสคูลาไมโคไรซ่าด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อตรวจนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตของอาบัสคูลาไมโคไรซ่าในปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า (arbuscular mycorrhiza) ตามเกณฑ์ที่กำหนด ในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

ตรวจนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตของปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าโดยวิธีร่อนตัวอย่างแบบเปียกและปั่นเหวี่ยง (wet sieving and centrifugation) และวิธีการตรวจเข้าอาศัยในรากพืชแบบการวัดความยาวราก (slide method)

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 ตะแกรงร่อนมาตรฐาน ขนาดรูเปิด 45-425 ไมครอน

3.1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบ sieving-bucket rotor ที่มีความเร็วไม่ต่ำกว่า 2,000 รอบต่อนาที พร้อมหลอดขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีฝาปิด

3.1.3 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

3.1.4 เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.1.5 เครื่องกวนหลอมอาหาร (hot plate stirrer)

3.1.6 เครื่องนับจำนวนแบบมือกด

3.1.7 ขวดฉีดน้ำ

3.1.8 เข็มเขี่ยปลายแหลม ขนาดความยาว 14 เซนติเมตร

3.1.9 บีกเกอร์สแตนเลสขนาด 1 ลิตร

3.1.10 Petri dish

3.1.11 มีดผ่าตัด

3.1.12 สไลด์แก้ว ขนาด 2 x 3 นิ้ว

3.1.13 เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.2 สารเคมี

3.2.1 sucrose หรือน้ำตาลทรายขาว

3.2.2 potassium hydroxide (KOH) pellets

3.2.3 Lactic acid

3.2.4 Glycerol

3.2.5 Trypan blue

3.2.6 10% Clorox

3.3 วัสดุเกษตร

3.3.1 ถ้วยกระดาษ ขนาด 16 ออนซ์

3.3.2 ดินผสมทราย อัตราส่วน 1:1 นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3.3.3 เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

4. วิธีการ

4.1 การเตรียมตัวอย่างและน้ำเชื่อม 50%

4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่าง 100 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์สแตนเลสขนาด 1 ลิตร ใส่น้ำ 400 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นานอย่างน้อย 30 นาที

4.1.2 การเตรียมน้ำเชื่อม 50% โดยชั่งน้ำตาลทรายขาว 500 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 2 ลิตร เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปตั้งบน Hot plate ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส ใช้ แท่งแก้วคนจนน้ำตาลละลายเป็นน้ำเชื่อมใส และทิ้งไว้ให้เย็น นำเข้าแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 7-10 องศาเซลเซียส

4.1.3 การเตรียมสารละลาย 10% KOH โดยชั่ง KOH pellets 100 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

4.1.4 การเตรียมสารละลายสีย้อมรากพืช โดยตวง Lactic acid 100 มิลลิลิตร Glycerol 200 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสี trypan blue 0.16 กรัม คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4.1.5 การเตรียมสารละลาย 10% Clorox โดยตวง Clorox 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.2 การตรวจนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิต

4.2.1 นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ (จากข้อ 4.1.1) คนสารละลายตัวอย่างไปทางเดียวนาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 วินาที เทสารละลายลงในตะแกรงขนาด 425 ไมครอน และไหลผ่านลงมายังตะแกรงขนาด 45 ไมครอน ซึ่งเรียงซ้อนอยู่ด้านล่าง ตะกอนที่ยังเหลืออยู่ในบีกเกอร์ให้ทำซ้ำโดยเติมน้ำลงไปอีก 400 มิลลิลิตร แล้วคนไปทางเดียวนาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วินาที เทสารละลายลงในตะแกรงขนาด 425 ไมครอน และ 45 ไมครอน ซึ่งเรียงซ้อนกันอยู่ จากนั้นฉีดน้ำล้างตะกอนบนตะแกรงขนาด 425 ไมครอน จนแน่ใจว่าตะกอนขนาดเล็กได้หลุดผ่านลงไปในตะแกรงขนาด 45 ไมครอน นำตะกอนบนตะแกรงขนาด 425 ไมครอน เทใส่ลงใน petri dish พร้อมน้ำ แล้วนำไปตรวจนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

4.2.2 ส่วนตะกอนบนตะแกรงขนาด 45 ไมครอนนำไปใส่หลอดเซ็นตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำไปใส่ในเครื่องปั่นเหวี่ยง ปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที จากนั้น จะเกิดตะกอน เทน้ำส่วนบนทิ้งไปแล้วเติมน้ำเชื่อม 50% จนครบ 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ตะกอนละลายผสมกับน้ำเชื่อม นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นจะเกิดการตกตะกอน เทสารละลายส่วนบนลงในตะแกรง ขนาด 45 ไมครอน ส่วนตะกอนที่อยู่ก้นหลอด

เซ็นตริฟิวส์เททิ้งไป ใช้น้ำฉีดล้างตะกอนบนตะแกรง ขนาด 45 ไมครอน 3-4 ครั้ง จนน้ำที่ผ่านตะแกรงใส เทตะกอนบนตะแกรงที่ได้ลงใน Petri dish พร้อมน้ำ แล้วนำไปตรวจนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

4.2.3 นำสปอร์ที่ได้มาทั้งหมด มาทดสอบในพืชอาศัย (ข้าวโพด) โดยนำดินผสมทรายอัตราส่วน 1:1 ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 500 กรัม ใส่ถ้วยกระดาษเป็นจำนวน 10 ถ้วย เพาะ สปอร์อาบัสคูลาไมโคไรซ่า ถ้วยละประมาณ 100 สปอร์ จำนวน 7 ถ้วย ส่วนอีก 3 ถ้วย เป็น check จากนั้นปลูกข้าวโพดใช้ถ้วยละ 1 เมล็ด ซึ่งเมล็ดผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการแช่ในสารละลาย 10% Clorox นาน 3–5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนปราศจากสารละลาย Clorox ปลูกข้าวโพด จนอายุครบ 30 วัน นำรากข้าวโพดมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นต้มในสารละลาย 10% KOH ที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 – 10 นาที หรือดูรากที่ต้มใส จึงนำมาล้างด้วยน้ำให้หมดสารละลาย KOH ซับพอหมาด นำไปอุ่นในสารละลายสีย้อมรากพืชที่อุณหภูมิไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 นาที จากนั้นอาจจะทิ้งให้เย็นชั่วครู่ หรือทิ้งให้เย็นข้ามคืน เทสีย้อมทิ้ง สุ่มรากมาตัดเป็นชิ้นยาวชิ้นละ 1 เซนติเมตร จำนวน 100 ชิ้น วางบนสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากพบว่ารากมีเส้นใย หรือ เวสสิเคิล หรือ อาบัสคูล ซึ่งจะติดสีน้ำเงิน แสดงว่ารากมีการเข้าอาศัยของอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

5. คำนวณ

$$\text{จำนวนสปอร์ต่อกรัม} = \frac{\text{ผลรวมของสปอร์ที่นับได้บนตะแกรง 425 ไมครอน และ 45 ไมครอน}}{100}$$

6. เอกสารอ้างอิง

Brundrett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, and N. Malajezuk 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR. Canberra, Australia. 374 p.

Daniels, B. A. and H. D. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitativeestimation of propagules from soil. p. 29-35. *In* : Methods and Principles of Mycorrhizal Research, N.C. Schenck. (ed.), The American Phytopathological Society. Minnesota, U.S.A.

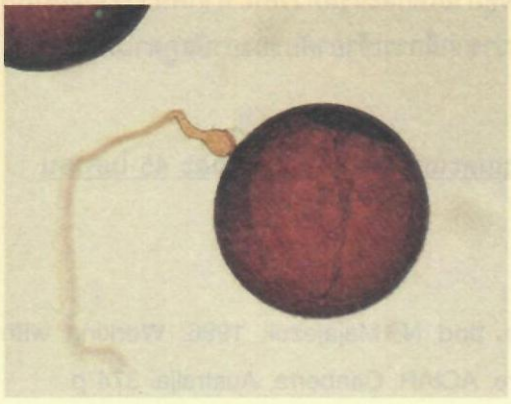
Giovanneti, M., and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84 : 489-500.

Komanik, P. P., W. C. Bryan, and R. C. Schultz. 1980. Procedures and equipment for Staining large numbers of plant roots for endomycorrhizal assay. Can. J. Microbiol. 26 : 536-538.

Phillips, J. A. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:158-161.

(ก)

(ข)



(ค)

(ง)

ภาพที่ 5 แสดงการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสปอร์อาบัสคูลาไมโคไรซ่า

(ก) การร่อนตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพไมโคไรซ่า

(ข) การตรวจนับสปอร์

(ค) ลักษณะสปอร์อาบัสคูลาไมโคไรซ่า

(ง) การเข้าสู่รากพืชของอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

1. ขอบเขตและวัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีชีวิตอยู่ในปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตและระดับของกิจกรรมการละลายตะกอน $CaHPO_4$ ของจุลินทรีย์ ในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

แยกหาจุลินทรีย์ที่มีชีวิตประเภทที่ระบุบนฉลากของปุ๋ยชีวภาพนั้นๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโดยวิธี serial dilution agar plating ตรวจนับจุลินทรีย์เฉพาะที่มีปริมาณไม่ต่ำกว่าหนึ่งร้อยล้านโคโลนีต่อปุ๋ยชีวภาพหนัก 1 กรัม พร้อมทำการเก็บจุลินทรีย์ดังกล่าวในลักษณะการเก็บเชื้อเดี่ยว ไม่มีการปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ ทำการวัดระดับกิจกรรมการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ เมื่อได้จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมการละลายฟอสเฟตในระดับที่กำหนดจึงทำการจำแนกสกุล

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- 3.1.2 ตู้เขี่ยเชื้อแบบลมเป่าแนวดิ่ง
- 3.1.3 เครื่องเขย่า
- 3.1.4 เครื่องปั่นเชื้อ vortex
- 3.1.5 ตู้บ่มเชื้อ
- 3.1.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ
- 3.1.7 กล้องจุลทรรศน์ 2 ตา
- 3.1.8 เครื่องนับโคโลนี
- 3.1.9 เครื่องแก้ว
- 3.1.10 เครื่องจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 nutrient agar
- 3.2.2 potato dextrose agar
- 3.2.3 plate count agar
- 3.2.4 สีย้อมแกรม
- 3.2.5 น้ำยา lacto-phenol cotton blue
- 3.2.6 สีย้อมสปอร์

3.2.7 น้ำเกลือ 0.85%

3.2.8 น้ำกลั่น

3.2.9 GYA double-layered agar medium ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชั้นดังนี้

ชั้นที่ 1 (ชั้นล่าง) basal agar medium

glucose	1.0%
yeast extract	0.5%
calcium chloride	0.01%
magnesium sulfate	0.025%
วุ้นผง	1.5%

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทใส่จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

ชั้นที่ 2 (ชั้นบน) ชั้นที่มีตะกอนฟอสเฟต

basal medium ที่หลอมละลาย	100 มิลลิลิตร
10% calcium chloride (sterile)	3 มิลลิลิตร
10% potassium monohydrogen phosphate (sterile)	2 มิลลิลิตร

ใส่ 10% calcium chloride (sterile) 3 มิลลิลิตร ลงใน basal medium ที่หลอมละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ 10% potassium monohydrogen phosphate (sterile) 2 มิลลิลิตร ลงไประหว่างใส่ให้กวนวนฟลาสก์บรรจุจนตะกอนสีขาวที่เกิดขึ้น ($CaHPO_4$) กระจายสม่ำเสมอ ปรับ pH ให้ได้ 7 โดย sterile 0.1 N sodium hydroxide แล้วเทส่วนผสมนี้ทันทีทับชั้นที่ 1 ที่แข็งตัวแล้ว ก่อนนำไปใช้ทำให้แห้งที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. วิธีการ

4.1 การแยกหาและนับปริมาณจุลินทรีย์ที่มีในปุ๋ยชีวภาพ

ทุกขั้นตอนจากนี้ กระทำแบบปลอดเชื้อปนเปื้อนและทำไม่ต่ำกว่า 3 ซ้ำ ทำการเจือจางตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเพื่อการตรวจนับจุลินทรีย์ ตามวิธีการข้างต้น ทำการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพ ตามวิธีการข้างต้น

4.2 การวัดระดับกิจกรรมการละลายฟอสเฟตของจุลินทรีย์ ทำ 3 ซ้ำ ดังนี้ การวัดความกว้างของวงใสจากขอบโคโลนีถึงขอบนอกของวงใส ตามวิธีของ Katznelson และ Boss (1959) มีขั้นตอนดังนี้

1. เพาะจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ในหลอดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYA double-layered agar medium ซึ่งมีตะกอน $CaHPO_4$ ผสมอยู่ โดยวิธีเพาะแบบจุด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

2. วัดความยาวของวงใสจากขอบโคโลนีจุลินทรีย์ถึงขอบนอกของวงใส เมื่อครบระยะเวลาบ่ม 3 และ 7 วัน

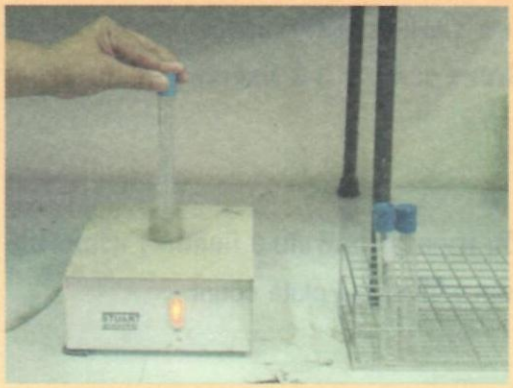
3. ประเมินระดับกิจกรรมการละลายตะกอน $CaHPO_4$ ของจุลินทรีย์ตามความกว้างของวงใสดังนี้ ระดับ1. 0 มิลลิเมตร ระดับ 2. 0-3 มิลลิเมตร ระดับ 3. 3-6 มิลลิเมตร ระดับ 4. 6-9 มิลลิเมตร และ ระดับ 5. มากกว่า 9 มิลลิเมตร

5. การวิเคราะห์ผล

5.1 นับปริมาณโคโลนีที่สร้างวงใส หลังบ่ม 3 วัน มากกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิเมตร หรือหลังบ่ม 7 วัน มากกว่าหรือเท่ากับ 6 มิลลิเมตร คำนวณปริมาณตามวิธี viable plate count

6. เอกสารอ้างอิง

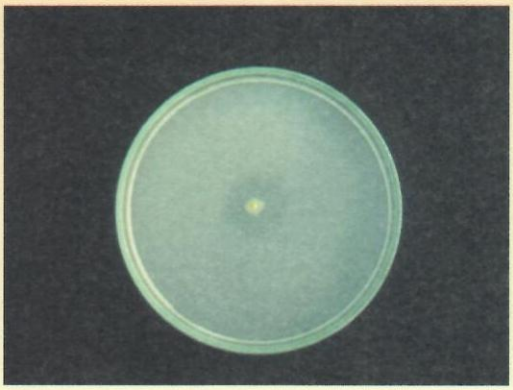
Katznelson, H. and B. Boss. 1959. Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots: rhizosphere and non-rhizosphere soil. Can. J. Microbiol. 5:79-85.



(ก)

(ข)

(ค)



(ง)

ภาพที่ 6 แสดงการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

(ก) การเจือจางตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

(ข) การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต

(ค) ลักษณะเชื้อราที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยง

(ง) การสร้างวงใสของจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ละลายโพแทสเซียม

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายโพแทสเซียมที่ตรวจพบในปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม ตามเกณฑ์ที่กำหนด ในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม โดยวิธี viable plate count โดยเตรียมสารละลายเจือจางของตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่ตรวจวิเคราะห์ให้มีความเจือจางแตกต่างกัน จากนั้นทำการแยกและนับปริมาณแบคทีเรียที่อยู่ในสารละลายปุ๋ยชีวภาพที่ความเจือจางต่างๆ นั้นในอาหารที่จำเพาะเจาะจง นับปริมาณแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารที่จำเพาะเจาะจงนั้น และบันทึกลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน ทำการตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการละลายโพแทสเซียมของแบคทีเรียที่แยกได้ข้างต้น วิเคราะห์ผลเฉพาะแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายโพแทสเซียมที่เป็นองค์ประกอบในสินแร่ให้โพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้อย่างน้อย 1.5 เปอร์เซ็นต์ (K_2O)

3. เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องชั่ง

3.1.2 ตู้เขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อปนเปื้อน

3.1.3 เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ อื่นๆ ที่จำเป็นในการปฏิบัติการวิเคราะห์

3.2 สารเคมี

- อาหารเลี้ยงเชื้อซิลิเกตแบคทีเรีย (Hebie Academy of Science, 1996) 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	0.5	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
Sucrose ($C_6H_{12}O_6$)	5	กรัม
Calcium carbonate ($CaCO_3$)	0.1	กรัม
di- Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	2	กรัม
Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$)	0.005	กรัม

แร่เฟลด์สปาร์ (feldspar) (หรือสินแร่อื่นที่ให้โพแทสเซียม 0.057 กิโลกรัมโพแทสเซียมต่อลิตร) 0.045 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจำนวน 15 มิลลิลิตร

(ก่อนใช้ต้องล้างสินแร่ที่มีโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบด้วย deionized water อย่างน้อย 3 ครั้ง)

วุ้น (agar)	15	กรัม
Bromthymol blue solution	5	มิลลิลิตร

(ละลาย bromthymol blue จำนวน 0.5 กรัม ในเอทธิลแอลกอฮอล์ จำนวน 50 มิลลิลิตร)

- สารละลาย sodium hydroxide ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล (1.0 N NaOH)

4. วิธีการ

4.1 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียแบบวุ้นแข็ง

ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อซิลิเกตแบคทีเรีย ยกเว้น สินแร่ที่มีโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบ เช่น แร่เฟลด์สปาร์ ในน้ำกลั่นจำนวน 900 มิลลิลิตร เมื่อส่วนผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับ pH เป็น 7.0±0.2 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร และใส่ bromthymol blue และ วุ้น 15 กรัม นำไปต้มให้วุ้นละลาย แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตรจำนวน 15 มิลลิลิตรและใส่สินแร่โพแทสเซียม เช่น แร่เฟลด์สปาร์จำนวน 0.045 กรัมลงไป ปิดจุกให้สนิทนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปเทใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปนเปื้อนแล้ว

4.1.2 การเตรียมสารละลายเจือจางของปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

ชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพที่ทำการวิเคราะห์จำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งบรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายเจือจางของปุ๋ยชีวภาพที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นทำให้สารละลายปุ๋ยชีวภาพมีความเจือจางเพิ่มขึ้นตามลำดับโดยวิธี serial dilution ตั้งแต่ 10^{-2} ถึง 10^{-7}

4.1.3 การแยกและตรวจนับปริมาณแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจือจางของปุ๋ยชีวภาพที่มีระดับความเจือจาง 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} และ 10^{-7} มาความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียซิลิเกตแบบวุ้นแข็งที่เตรียมไว้ข้างต้น ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อปนเปื้อนเกลี่ยสารละลายของปุ๋ยชีวภาพให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร ทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ รอจนกระทั่งผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งจึงคว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทุกวันจนไม่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียจึงทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและหาค่าเฉลี่ย พร้อมทั้งบันทึกลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แตกต่างกันเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการละลายโพแทสเซียมต่อไป

4.2 การตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการละลายโพแทสเซียม

4.2.1 การเตรียมสารละลายหัวเชื้อแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้ในข้อ 4.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียชนิดเหลว โดยใช้ KH_2PO_4 จำนวน 2 กรัมแทนการใช้สินแร่ที่มีโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบ และไม่ต้องใส่วุ้นผง และ bromthymol blue นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารละลายเซลล์ที่มีความเข้มข้นเทียบเท่า 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4.2.2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการละลายโพแทสเซียม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียชนิดเหลว โดยใช้สินแร่ที่มีโพแทสเซียม

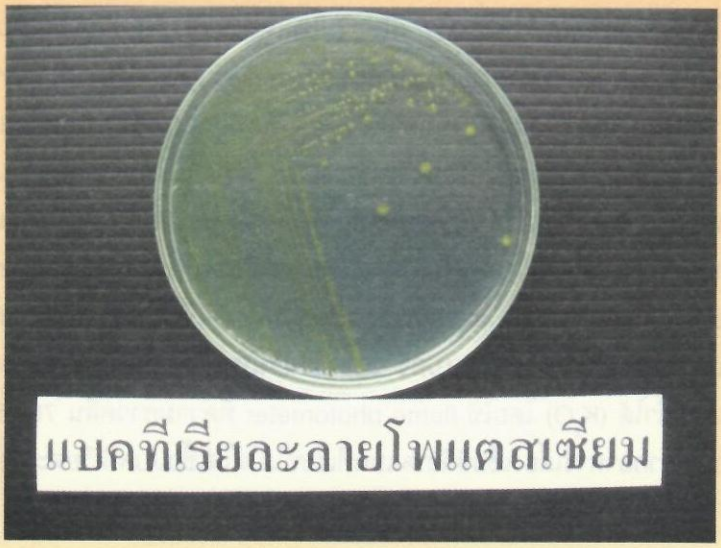
เป็นองค์ประกอบในปริมาณเทียบเท่า 0.057 กิโลกรัมโพแทสเซียม (K) ต่อลิตรแทนการใช้ KH_2PO_4 และไม่ต้องใส่ bromthymol blue บรรจุในขวดรูปชมพู่ (erlenmyer flask) นึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 25 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิเทียบเท่าอุณหภูมิห้อง ให้ใส่หัวเชื้อแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2.1 ลงไปในอาหารเหลวจำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน เมื่อครบกำหนดนำสารละลายแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์และส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) และนำ supernatant ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 นำส่วนเหลวที่กรองได้ไปวัดหาความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้ (K_2O) โดยใช้ flame photometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร โดยใช้ส่วนเหลวที่กรองได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อซิลิเกตแบคทีเรียที่ไม่ได้ใส่เชื้อแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมเป็น blank

5. การวิเคราะห์ผลการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

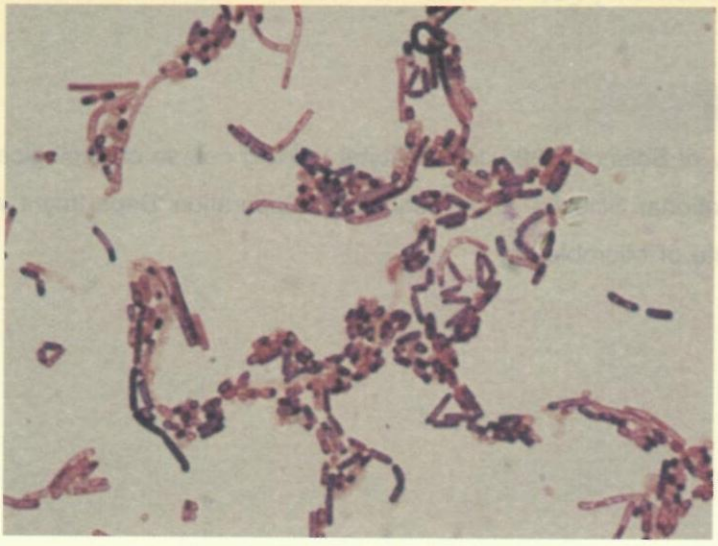
พิจารณาผลการวิเคราะห์เฉพาะแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการละลายโพแทสเซียมให้โพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้ (K_2O) อย่างน้อย 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณอย่างน้อย 10^8 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

6. เอกสารอ้างอิง

Hebei Academy of Science. 1996. International training course on biological fertilizer. The International Science and Technology Coperation Department of SSTCC The Institute of Microbiology.



(ก)



(ข)

ภาพที่ 7 แสดงการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ละลายโพแทสเซียม

(ก) ลักษณะแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อซิลิเกตแบคทีเรีย

(ข) ลักษณะเซลล์แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่ย้อม Gram's stain

วิธีการจำแนกสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยวิธีสัณฐานวิทยา

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อทราบสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นองค์ประกอบในปุ๋ยชีวภาพตามเกณฑ์ที่กำหนดในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีลักษณะคล้ายพืชเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ แต่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย การจำแนกสกุลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ใช้วิธีการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายฯ โดยตรวจดูจากลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น รูปร่าง และขนาดของ vegetative cells และลักษณะของเซลล์ปลายสุด ตำแหน่งการสร้าง heterocysts รูปร่างและขนาด ตำแหน่งการสร้าง akinetes รูปร่าง และขนาด การแตกแขนง และอื่นๆ เป็นต้น

3. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 กล้องจุลทรรศน์

3.1.2 ตะเกียง

3.1.3 สไลด์

3.1.4 กระจกปิดสไลด์ (cover slip)

3.1.5 ลูปเขี่ยเชื้อ

3.1.6 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.7 ตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกเชื้อบริสุทธิ์

3.2 สารเคมี

-

4. วิธีการ

4.1 หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ จำนวน 1-2 หยด

4.2 เผาลูปเขี่ยเชื้อให้ทั่วพอเย็น เขี่ยเชื้อสาหร่ายฯ ที่เตรียมไว้ smear บนสไลด์ และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

4.3 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ objective lens กำลังขยายสูง (x 40) ก็จะเห็นลักษณะต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

4.4 จำแนกสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ ต้องมี heterocysts สกุลที่นิยมนำมาผลิตปุ๋ยชีวภาพมีประมาณ 8 สกุล ได้แก่ *Anabaena, Calothrix, Cylindrospermum, Fischerella, Hapalosiphon, Nostoc, Scytonema* และ *Tolypothrix* ซึ่งแนววินิจฉัยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินระดับสกุลมีรายละเอียดดังนี้

1. สกุล *Anabaena*

tricome มีความกว้างใกล้เคียงกันตลอดสาย บางชนิดอยู่เดี่ยวๆ บางชนิดอยู่แบบเป็นกลุ่มใหญ่ มีรูปร่างของกลุ่มไม่จำกัด heterocysts ส่วนใหญ่จะอยู่ตรงกลางสายเซลล์ และพบบ้างที่มี heterocysts อยู่บริเวณตอนปลายหัวท้ายของสายเซลล์ akinete สร้างเดี่ยวๆ หรือเป็นสายยาวสร้างอยู่ติดกับ heterocyst หรืออยู่ระหว่าง heterocyst

2. สกุล *Calothrix*

filaments จะอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มเล็กๆ แต่ส่วนใหญ่ไม่ชอบอยู่เป็นกลุ่ม filaments ส่วนใหญ่ตรง ไม่มีกิ่งแขนง หรือมีกิ่งแขนงเทียมซึ่งไม่ค่อยพบ sheath ส่วนใหญ่แน่น บางครั้งจะเห็นบริเวณฐานของ filaments เท่านั้น heterocysts ส่วนใหญ่อยู่บริเวณฐาน ไม่ค่อยพบบริเวณตอนกลางสายเซลล์ เมื่อสร้างสปอร์จะสร้างเดี่ยวๆ หรือเป็นสายต่อจาก heterocysts บริเวณฐาน

3. สกุล *Cylindrospermum*

thallus เหนียวเป็นเมือก ส่วนใหญ่มีสีเขียวออกน้ำเงิน tricome มีความกว้างเสมอกันสั้นไม่มี sheath แต่จะอยู่ในเมือกที่บางมาก และมองไม่ค่อยเห็นเป็นส่วนใหญ่ เซลล์มีรูปร่างทรงกระบอก มีรอยแยกระหว่างเซลล์ heterocysts จะอยู่ส่วนปลาย อาจจะด้านเดียวหรือทั้งสองด้าน บางครั้งพบอยู่บริเวณกลาง tricome akinete อยู่ติดกับ heterocyst 1 ด้าน สร้างเดี่ยวๆ ไม่ค่อยพบสร้างติดต่อกันเป็นสาย

4. สกุล *Fischerella*

filaments หลักส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์หลายแถว ไม่ค่อยพบ filaments ที่ประกอบด้วยเซลล์แถวเดียว แตกกิ่งตั้งตรงบนด้านเดียวเท่านั้น กิ่งแขนงยาวและเซลล์แคบ filaments หลักประกอบด้วยเซลล์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ sheath ที่กิ่งแขนงเมื่ออายุน้อยจะบางและติดกับ tricome filaments ที่มีอายุมากจะมี sheath ที่หนากว่า heterocysts สร้างบริเวณตอนกลางและด้านข้างของสายเซลล์ สร้าง hormogonia ที่ส่วนปลายของกิ่งแขนง สปอร์พบในบางชนิด

5. สกุล *Hapalosiphon*

filaments หลักประกอบด้วยเซลล์ 1 หรือ 2 แถว มี sheath ห่อหุ้ม แตกกิ่งแขนงแท้บนด้านเดียวของ filaments หลักบ่อย ๆ มีกิ่งแขนงเทียม กิ่งแขนงอาจมีความกว้างเท่าๆ กับและคล้ายกับ filaments หลัก heterocysts สร้างบริเวณตอนกลางสายเซลล์ จะพบ heterocysts บริเวณด้านข้างในบางโอกาสเท่านั้น hormogonia สร้างจากกิ่งแขนงเป็นส่วนใหญ่ มีสปอร์

6. สกุล *Nostoc*

thallus เป็นเมือก เหมือนวุ้นหรือเหนียวคล้ายแผ่นหนัง ระยะแรกจะกลมถึงยาว ระยะหลังกลม เป็นแผ่น เป็นเส้นด้าย เป็นฟอง แข็งหรือเป็นรู filaments คดงอบิดไปมา หรือพันกันยุ่งเหยิง

เซลล์มีรูปร่างกลม กลมถูกบีบ ถังเบียร์ หรือทรงกระบอก heterocysts จะสร้างบริเวณกลางและตอนปลาย filaments ในระยะที่ยังอ่อนจะอยู่บริเวณตอนปลาย filaments สปอร์กลมหรือยาว สร้างเป็นสายยาวระหว่าง heterocysts

7. สกุล *Scytonema*

filaments มีความกว้างเท่ากันตลอดทั้งสาย เซลล์มีรูปร่างทรงกระบอก filaments ประกอบด้วยแขนงเทียม อาจจะเป็นแขนงเทียมเดี่ยวหรือแขนงเทียมคู่อยู่ระหว่าง heterocyst tricome ตรง สร้างเดี่ยวๆ อยู่ในแต่ละ sheath heterocyst สร้างบริเวณตอนกลางสายเซลล์ สร้าง hormogonia บริเวณตอนปลาย สปอร์พบบ้างใน 2-3 ชนิดเท่านั้น รูปร่างกลมหรือรูปไข่

8. สกุล *Tolypothrix*

filaments มีsheath หุ้ม อาจจะหนาหรือบาง โดยทั่วไปจะแน่น มีเพียง tricome เดียวในแต่ละ sheath แตกแขนงเทียมเดี่ยวๆ ส่วนใหญ่จะอยู่ติดกับ heterocysts hormogonia สร้างบริเวณยอด tricome มีการเจริญเติบโตบริเวณตอนปลาย ส่วนปลายของ tricome ประกอบด้วยเซลล์สั้นๆ และมีความกว้างมากกว่า สปอร์พบบ้างในบางชนิด

- ความหมายของคำที่ใช้

sheath หมายถึง colloidal matrix ซึ่งผลิตรอบๆ สายเซลล์ อาจจะติดแน่นหรืออยู่ในลักษณะหลวมๆ คล้ายน้ำ อาจจะใสหรือมีสี tricome หมายถึง สายของเซลล์ที่เกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์จากเซลล์แม่ โดยไม่มีชีทห่อหุ้ม

filament หมายถึง tricome ที่มี sheath ห่อหุ้ม sheath ที่ห่อหุ้มนี้ในสาหร่ายฯ บางชนิดอาจหนาจนเห็นได้ชัด บางชนิดอาจบางจนมองเห็นได้ไม่เด่นชัด

heterocyst หมายถึง เซลล์พิเศษที่ทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพวกที่เป็นเส้นสาย

akinete หมายถึง สปอร์ชนิดหนึ่งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยส่วนใหญ่จะมีขนาดใหญ่กว่า vegetative cell มาก ผนังหนา ภายในสปอร์มีสีเข้ม สร้างขึ้นในสาหร่ายฯ พวกที่เป็นเส้นสาย

hormogonia หมายถึง การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศชนิดหนึ่งของสาหร่ายฯ โดยการที่ tricome สายสั้นๆ ขาดออกไปจากสายเซลล์แม่และเจริญเติบโตต่อไป

thallus หมายถึง ลักษณะของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่ไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้น และใบที่แท้จริง

5. เอกสารอ้างอิง

Desikachary, T. V. 1959. Cyanophyta . Indian council of agricultural research, New Delhi. 686 p.

วิธีการจำแนกสกุลอาบัสคูลาไมโคไรซ่า โดยวิธีสัณฐานวิทยา

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อจำแนกสกุลของปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า (arbuscular mycorrhiza) ตามเกณฑ์ที่กำหนด ในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

จำแนกสกุลของปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า โดยวิธี Dicotomous key for separation of genera (Schenck N.C. and Y. Perez, 1987)

3. เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ สารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์

- ตะแกรงร่อนมาตรฐานขนาดรูเปิด 45-425 ไมครอน
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stero or dissecting microscope)
- ขวดฉีดน้ำขนาด 500 มิลลิลิตร
- เข็มเขี่ยปลายแหลม ขนาดยาว 14 เซนติเมตร
- บีกเกอร์สแตนเลสขนาด 1 ลิตร
- เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- Petri dish
- Hand pipette-pump
- Glass micropipette
- กระจกนาฬิกา
- ปากคีบปลายแหลมเล็ก หรือก้านไม้ไผ่ปลายตัดเฉียง
- Microscope slide และ cover glass
- เครื่องแก้วและวัสดุอื่น ๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.2 สารเคมี

- Glycerol ($CH_2OHCHOHCH_2OH$)
- Iodine (I_2)
- Lactic acid ($CH_3CHOHCOOH$)
- Polyvinyl alcohol (Sigma, No. P-8136)
- Potassium iodide (KI)
- น้ำกลั่น

4. วิธีการ

4.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลาย PVLG และสารละลายผสม Melzer's reagent กับ PVLG

4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่าง 100 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์สแตนเลสขนาด 1 ลิตร ใส่น้ำ 400 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นานอย่างน้อย 30 นาที

4.1.2 การเตรียมสารละลาย PVLG โดยชั่ง polyvinyl alcohol 8.33 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วเติม lactic acid 50 มิลลิลิตร คนจนสารละลายใสเข้ากันพอดี จากนั้นเติม glycerol 5 มิลลิลิตร

4.1.3 การเตรียมสารละลายผสม Melzer's reagent กับ PVLG โดยการเตรียม Melzer's reagent ก่อนโดยชั่ง Iodine 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นเติม KI ลงไปละลาย 5 กรัม เมื่อได้ Melzer's reagent แล้วผสมกับ PVLG ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เก็บไว้ในขวดสีชา

4.2 การแยกสปอร์ออกจากตัวอย่างเพื่อนำไปจำแนกสกุล

4.2.1 นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ (จากข้อ 4.1.1) คนสารละลายตัวอย่างไปทางเดียวนาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 วินาที เทสารละลายลงในตะแกรงขนาด 425 ไมครอน และไหลผ่านลงมายังตะแกรงขนาด 250 125 และ 45 ไมครอน ซึ่งเรียงซ้อนกันตามลำดับ ตะกอนที่ยังเหลืออยู่ในบีกเกอร์ให้ทำซ้ำ โดยเติมน้ำลงไปอีก 400 มิลลิลิตร แล้วคนไปทางเดียวนาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วินาที เทสารละลายลงในตะแกรง 425 250 125 และ 45 ไมครอน ซึ่งเรียงซ้อนกันอยู่ตามลำดับ จากนั้นฉีดน้ำล้างตะกอนบนตะแกรง ขนาด 425 ไมครอน จนวัตถุที่มีขนาดเล็กหลุดลงไปอยู่ตะแกรงอันล่างหมด เทตะกอนบนตะแกรง ขนาด 425 ไมครอน ลงใน petri dish พร้อมน้ำ นำไปตรวจแยกสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เพื่อตรวจหา sporocarp และ auxiliary cells บนตะแกรงแต่ละขนาดก็เช่นเดียวกัน หลังจากล้างตะกอนแล้วนำไปแยกสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2.2 ดูดสปอร์ที่อยู่ในน้ำของตะกอนด้วย Glass micropipetts มาไว้ในน้ำกลั่นในกระจกนาฬิกา ประมาณ 50-60 สปอร์ เลือกสปอร์ที่สมบูรณ์และสะอาดแล้วหนีบด้วยปากคีบปลายแหลมเล็กหรือใช้ ก้านไม้ไผ่ปลายตัดเฉียง ตักสปอร์ออกมาโดยให้มีน้ำมาด้วยน้อยที่สุดวางบน microscope slide ซึ่ง หยดน้ำกลั่นไว้ 2 จุดซ้ายขวาข้างละ 1 หยด วางสปอร์ลงในหยดน้ำกลั่นข้างละประมาณ 20 สปอร์ ปิดด้วยอย่างระมัดระวัง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ สปอร์ภายใน cover glass ข้างใดข้างหนึ่งไม่แตก ส่วนอีกข้างสปอร์จะต้องแตกแบบผนังสปอร์แยกออกซึ่งทำให้แตกโดยกดลงไป ตรงๆ บน cover glass อย่างเบามือ slide ที่ได้นี้พร้อมนำไปจำแนกสกุลต่อไป แล้วควรเตรียม slide เช่นนี้อีก slide แต่แทนที่จะเป็นหยดน้ำกลั่นให้ใช้สารละลายผสม Melzer's reagent กับ PVLG แทน เพื่อนำไปจำแนกสกุล Gigaspora และ Scutellospora

4.3 การจำแนกสกุลอาบัสคูลาไมโคไรซ่า

วิธีการ Dicotomous key for separation of genera : (Schenck N.C. and Y. Perez, 1987)

1a Spores produced as chlamydospores 2

1b Spores not produced as chlamydospores 3

2a Sporocarps only with spores radiating form a central core of hyphae ... SCLEROCYSTIS

2b Spores formed singly in soil or in sporocarps; if in sporocarps, spores not radiating from a central core of hyphae ..... GLOMUS

3a Azygospores formed near or below a swollen hyphal tip 4

3b Azygospores formed on a swollen hyphal tip 5

4a Spore formed laterally on hypha below a swollen hyphal tip ..... ACAULOSPORA

4b Spore formed within the hypha below a swollen hyphal tip ..... ENTROPHOSPORA

5a Spore with 2 or more wall groups, the inner containing a coriaceous or membraneous wall ..... SCUTELLOSPORA

5b Spore or only 1 wall group, auxiliary cells echinulate or finely papillate ... GIGASPORA

5. เอกสารอ้างอิง

Brundrett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, and N. Malajezuk. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR. Canberra, Australia. 374 p.

Daniels, B. A., and H. D. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil,. p. 29-35. *In* : Methods and Principles of Mycorrhizal Research, N.C. Schenck. (ed.), The American Phytopathological Society. Minnesota, U.S.A.

Schenck, N. C. and Y. Perez. 1987. A Manual for Identification of Vesicular – arbuscular Mycorrhizal Fungi. INVAM. University of Florida. Gainesville, Florida, U.S.A.

วิธีการจำแนกสกุลของแบคทีเรียและราในปุ๋ยชีวภาพ โดยใช้ Carbon source utilization pattern

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์สกุลและ/หรือชนิดของแบคทีเรียและราในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ ตามเกณฑ์ที่กำหนดในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจึงสามารถนำรูปแบบของการใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอน (carbon source utilization pattern) หรือที่รู้จักในอีกชื่อหนึ่งว่า ไบโอล็อก (BioLog System) มาใช้ในการจำแนกสกุลและ/หรือชนิดของจุลินทรีย์ได้ ในปัจจุบัน BioLog ได้รับความนิยมสูงในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราที่มีปฏิสัมพันธ์กับพืช และรวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เพราะมีความรวดเร็วและให้ความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง (Jacoby-Garrett and Stetzerbach, 1997; Uroz et al, 2007; Wielbo et al, 2007) โดยถาดหลุมที่เคลือบสารอาหารซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้ง 95 ชนิด (BioLog microplate) ติดฉลากกับ tetrazolium violet เมื่อเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้อาหารจะทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) ซึ่งจะเปลี่ยนสารติดฉลากเป็นสีม่วง จากนั้นวิเคราะห์ปฏิกิริยาการเกิดสีและประมวลผลโดยเปรียบเทียบกับรูปแบบการใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในฐานข้อมูลจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ได้มีการบันทึกก็จะทราบถึงสกุลและ/หรือชนิดของแบคทีเรีย และเชื้อราที่ตรงกันหรือมีความใกล้ชิดกันกับในฐานข้อมูล

3. เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องมืออ่านค่าการดูดกลืนแสงสำหรับถาดหลุม (absorbance microplate reader)
- 3.1.2 เครื่องวัดความขุ่นหรือความหนาแน่นของเซลล์ (turbidimeter unit)
- 3.1.3 เครื่องบ่มเลี้ยงจุลินทรีย์ (incubator)
- 3.1.4 ถาดหลุมแบบ 96 หลุม
- 3.1.5 ไมโครปิเปตแบบ 8 ช่อง (8-channel micropipettor)
- 3.1.6 เครื่องประมวลผลพร้อมซอฟท์แวร์ฐานข้อมูลการจำแนกจุลินทรีย์แต่ละประเภท
- 3.1.7 เครื่องมือและวัสดุ อุปกรณ์ อื่นๆ ที่จำเป็นในการปฏิบัติการวิเคราะห์

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด
- 3.2.2 ถาดหลุมที่บรรจุแหล่งคาร์บอน 95 ชนิด สำหรับจำแนกจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ
- 3.2.3 สารเคมีอื่นๆ ที่จำเป็นในการปฏิบัติการวิเคราะห์

4. วิธีการ

4.1 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (inoculum) โดยเลี้ยงในอาหารวุ้นแข็งที่จำเพาะสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ทำการวิเคราะห์ ตามคู่มือคำแนะนำของ BioLog

4.2 เตรียมสารละลายแขวนลอยของจุลินทรีย์ โดยใช้ก้านไม้ที่ปลายพันด้วยสำลีอย่างดีที่ปราศจากเชื้อเจือปนเขี่ยโคโลนี (แบคทีเรีย) หรือ conidia (เชื้อรา) ใส่ในสารละลายเหลว (inoculation fluid) ให้มีความเข้มข้นตามกำหนด ตามคู่มือคำแนะนำของ BioLog

4.3 ปิเปตสารละลายแขวนลอยของจุลินทรีย์ใส่ในแต่ถาดหลุมแบบ 96 หลุม แต่ละหลุม

4.4 บ่มเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิและเวลา ตามคำแนะนำในการวิเคราะห์จุลินทรีย์แต่ละชนิด

4.5 เมื่อครบกำหนดการบ่มเลี้ยงจุลินทรีย์ นำถาดหลุมไปอ่านผลของปฏิกิริยาโดยใช้ BioLog microplate reader

5. การแปลผลการวิเคราะห์

เปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในถาดหลุม 96 หลุมของจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์ว่าตรงกับหรือมีความใกล้ชิดกับจุลินทรีย์สกุล/ชนิดใด ในฐานข้อมูลจุลินทรีย์ ในรูปแบบของ dendrogram

6. เอกสารอ้างอิง

Jacoby-Garrett, P.M., and L. Stetzerbach. 1997. Use of BioLog™ system for fungal identification. Abstracts of the 97th General meeting of the American society for Microbiology, p.461. Seifert, K. A., J. Bissett, S. Giuseppin, and G. Louis-Seize. 1997. Proceedings of the 3rd International workshops on Penicillium and Aspergillus, Baarn, Netherlands, May.

Uroz, S., C. Calvaruso, M. P. Turpault, J. C. Pierrat, C. Mustin, and P. Frey-Klett. 2007. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. Appl. Environ. Microbial. 73(9): 3019-3027.

Wielbo, J., M. Marek-Kozaczuk, A. Kubik-Komar, and A. Skorupska. 2007. Increased metabolic potential of *Rhizobium* spp. is associated with bacterial competitiveness. Can. J. Microbiol. 53(8):957-967.

วิธีการจำแนกสกุลของแบคทีเรียและราในปุ๋ยชีวภาพ โดยวิธี rDNA sequencing และ phylogenetic analysis

1. ขอบข่ายและวัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์สกุลของแบคทีเรียและรา ในตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ ตามเกณฑ์ที่กำหนดในพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

2. หลักการ

สิ่งมีชีวิตสองชนิด อาจไม่ใกล้ชิดมากพอที่จะมี DNA คล้ายกันมาก แต่ยังมีไรโบโซมที่คล้ายกัน ไรโบโซมเป็นโครงสร้างเล็กๆภายในเซลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมประกอบด้วยโปรตีนและไรโบโซมัลอาร์เอนเอ (rRNA) rRNA สร้างโดยอาศัยคำสั่งจาก DNA ส่วนไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ซิสตรอน (ribosomal RNA cistron, rRNA cistron) ในจุลินทรีย์ทุกชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA ยีน พบว่ามีความคงตัวสูงมาก แม้จะมีวิวัฒนาการมานาน แต่ลำดับของนิวคลีโอไทด์ จะเปลี่ยนไปน้อยมาก ซึ่งหมายความว่าแม้สิ่งมีชีวิตสองตัว จะมีความใกล้ชิดกันน้อยและไม่มี DNA ที่คล้ายกัน แต่ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใน rRNA ซิสตรอนคล้ายกัน ความคล้ายคลึงกันนี้ สามารถใช้เป็นเครื่องวัดความใกล้ชิดกันระหว่างจุลินทรีย์ได้ แต่เพียงแค่ในระดับ สกุล ตระกูล หรือ อันดับ)

3. เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์

- หลอดทดสอบที่สามารถปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูง (centrifuge tubes)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
- ชุดเครื่องมืออิเล็กโตรโฟริซิส (assemble electrophoretic apparatus)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนช่วงแสง (spectrophotometer)
- เครื่องมือและวัสดุ อุปกรณ์ อื่นๆ ที่จำเป็นในการปฏิบัติการวิเคราะห์

3.2 สารเคมี

- อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด
- Absolute ethanol (Abs. Ethanol)
- Lysozyme solution ประกอบด้วย
  lysozyme 2 มิลลิกรัม ละลายใน TEN buffer 1 มิลลิลิตร
- สารละลาย Sodium chloride ความเข้มข้น 1 โมลล่าร์ (1 M NaCl)
- Phenol
- Chloroform
- Isoamyl alcohol

- Pronase solution ประกอบด้วย

  Pronase 2 มิลลิกรัม ละลายใน TEN buffer 1 มิลลิลิตร
- RNase buffer ประกอบด้วย

  สารละลาย sodium acetate pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลล่าร์ (0.1 M sodium acetate)

  สารละลาย ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt ($Na_2H_2C_{10}H_{12}N_2O_8.2HO_2$, EDTA) pH 8.0 ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลล่าร์
- RNase solution ประกอบด้วย

  RNase A 10 มิลลิกรัม ละลายใน RNase buffer 1 มิลลิลิตร
- สารละลาย sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa.3H_2O$) (pH 7.4 ความเข้มข้น 3.0 โมลล่าร์ (3.0 M sodium acetate)
- สารละลาย sodium dodecyl sulphate (SDS) ความเข้มข้น 25% (w/v)
- TE buffer ประกอบด้วย

  สารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลล่าร์

  สารละลาย ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt ($Na_2H_2C_{10}H_{12}N_2O_8.2HO_2$, EDTA) pH 8.0 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลล่าร์
- TEN buffer ประกอบด้วย

  สารละลาย sodium chloride (NaCl) ความเข้มข้น 0.1 โมลล่าร์ (0.1 M NaCl)

  สารละลาย Tris-HCl pH 7.6 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลล่าร์ (10 mM Tris-HCl)

  สารละลาย ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt ($Na_2H_2C_{10}H_{12}N_2O_8.2HO_2$, Na_2-EDTA) pH 8.0 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลล่าร์ (1 mM EDTA)
- Buffer , DNA primer, DNA Marker , ชุดสกัดเจล (Gel Extraction Kit)
- สารเคมีที่จำเป็นในการสกัด DNA ของเชื้อรา
- สารเคมี และเครื่องมืออื่นๆ ที่จำเป็นในการปฏิบัติการวิเคราะห์

4. วิธีการ

4.1 แยก genomic DNA ของจุลินทรีย์

(1) เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์บนอาหารที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด

(2) เพาะขยายโดยปลูกถ่ายเชื้อที่อยู่ในระยะกึ่งกลางที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด

(3) เก็บเซลล์บริสุทธ์ของจุลินทรีย์

(4) สกัด DNA และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.2 แยกยีนไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA gene isolation) โดยใช้เทคนิค polymerase change reaction (PCR) และ purify rRNA gene product

4.3 หาลำดับเบสของยีนไรโบโซมัลอาร์เอนเอโดยวิธีตรง (Direct sequence) ด้วย automated DNA sequencer ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ได้รับความนิยม

4.4 การหาลำดับเบสของยีนไรโบโซมัลอาร์เอนเอโดยวิธี cloning ดำเนินการดังนี้

4.4.1 เชื่อมต่อ ยีนไรโบโซมัลอาร์เอนเอ ที่บริสุทธิ์เข้ากับ พลาสมิด เวคเตอร์ เช่น pGEM-T Easy vector และถ่ายยีนคู่ผสมเข้าสู่ competent cell เช่น *E.coli* DH5 alpha หรือ JM 109

4.4.2 คัดเลือกโคลนที่มี พลาสมิดของยีนคู่ผสม และสกัดพลาสมิด นำไปดำเนินการหาลำดับเบสด้วย automated DNA sequencer

5. การคำนวณ

5.1 การหาความใกล้ชิดกันระหว่างจุลินทรีย์จากผล การหาลำดับเบส หาความใกล้ชิดหรือความเหมือนกันของลำดับเบส จำแนกโดยการส่งไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล DNA ของ GenBank/EMBL/DDBJ โดยใช้ BLAST หรือ FASTA algorithm

5.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันด้วยโปรแกรม Clustal W หรือ Clustal X

5.3 หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยการหา Phylogenetic relationship ประเมินจาก neighbor-joining method โดยใช้โปรแกรม MEGA 2.1 หรือโปรแกรมอื่นๆ โดยใช้ ลำดับเบสของ type strain จากฐานข้อมูล DNA เป็นตัวเปรียบเทียบ และ stability ในการจัดกลุ่มใช้วิธีการ Bootstrap analysis (1,000 replicates)

6. เอกสารอ้างอิง

Kumar, S. K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Bioinformatics. 17:1244-1245.

Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.

Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schmidt, E. L., M. J. Zidwick, and H. M. Abebe. 1986. *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 and diversity among member isolates. Appl. Environ. Microbiol. 51:1212-1215.

Thompson, J. D., D.G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22:4673-4680.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl. Acids Res. 25:4876-4882.