รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การสลายคลอเรตโดยแบคทีเรียรีดิวส์คลอเรตที่แยกได้จากดินและกากตะกอนน้ำเสีย

Chlorate degradation by chlorate reducing bacteria isolated from soil and wastewater treatment sludge

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2554

จำนวน 192,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวศรีกาญจนา คล้ายเรือง

ผู้ร่วมโครงการ นายฐปน ชื่นบาล

นางปิยะนุช เนียมทรัพย์

นางสาวนลิน วงศ์ขัดดิยะ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

31 /12/2555

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลการทดลอง	20
สรุปผล	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	34

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เอนไซม์ดินที่ใช้บ่งบอกความสมบูรณ์ของดิน	12
2	ค่าความเป็นกรดด่าง ความชื้น และปริมาณคลอเรตของดินสวนลำไย จำนวน 11 สวน	21
3	กิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่างดินสวนลำไย	22
4	การสลายคลอเรตในระดับหลอดทดลองของเชื้อแบคทีเรียทีคัดเลือกได้	24
5	การสลายคลอเรตในตัวอย่างดินของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	25
6	การจำแนกชนิดของ chlorate reducing bacteria	26

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาการรีดิวส์คลอเรต	11
2	ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จำเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์	23
3	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เฉลี่ยในตัวอย่างดิน	23
4	ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท 9-5F-1 (ความยาว 461 คู่เบส) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. HR 26 99%	27
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท C2-3B (ความยาว 1031 คู่เบส) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. bD39(2011) 98%	28
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท K7-5C (ความยาว 1051 คู่เบส) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas sp.* B3(2010)	29

การสลายคลอเรตโดยแบคทีเรียรีดิวส์คลอเรตที่แยกได้จากดินและกากตะกอนน้ำเสีย

Chlorate degradation by chlorate reducing bacteria isolated from soil and wastewater treatment sludge

ศรีกาญจนา คล้ายเรือง ฐปน ชื่นบาล ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และนลิน วงศ์ขัตติยะ

Srikanjana Klayraung, Tapana Cheunbarn, Piyanuch Niumsup, and Nalin Wongkattiya

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการสลายโพแทสเซียมคลอเรต ($KClO_3$) ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเก็บตัวอย่างดินจากสวนลำไยจำนวน 45 ตัวอย่างจาก 11 สวนในจังหวัดเชียงใหม่ นำมาวิเคราะห์โดยวัดค่าพีเอช และหาปริมาณคลอเรตตกค้าง แยกเชื้อแบคทีเรียที่สลายคลอเรตโดยการเพิ่มจำนวนในตัวอย่างดินก่อน พบว่าดินที่นำมาใช้แยกเชื้อแบคทีเรีย มีค่าพีเอชเป็นกลาง มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.9-7.6 และมีปริมาณคลอเรตตกค้างอยู่ที่ 1.2-31.7 พีพีเอ็ม จากขั้นตอน การแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสลายคลอเรตในอาหารที่มีโพแทสเซียมคลอเรตความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ทั้งหมด 59 ไอโซเลต โดยมี 3 ไอโซเลตที่สามารถสลายคลอเรตได้ดี คือ หมายเลข 9-5F, C2-3B2 และ K7-5C สามารถสลายคลอเรตได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7 จากผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสลายคลอเรตคือที่พีเอชเป็นกลาง เมื่อเทียบกับพีเอชที่เป็นกรด และด่าง ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสลงใน minimal medium จะเป็นการลดการย่อยสลายคลอเรต สุดท้ายการเติมแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตลงในดินเป็นการส่งเสริมก ารสลายคลอเรตในดินด้วย ซึ่งผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* sp.

คำสำคัญ: คลอเรต, แบคทีเรียรีดิวส์คลอเรต จุลินทรีย์ในดิน

Abstract

This study was conducted in order toevaluate the capability of bacterial isolates to degrade potassium chlorate ($KClO_3$) under in vitro conditions. Forty-five soil samples were collected from eleven longan plantation areas in Chiang Mai Province. They were analyzed for pH, and residual chlorate concentration. Bacteria able to degrade $KClO_3$were isolated directly with the use of enrichment cultures from longan plantation soils. It was found that all the treated areas showed neutral pH (6.9-7.6) in the soil, whereas the residual chlorate was ranged from 1.2 to 31.7 ppm. Total of 59 bacterial isolates were capable to degrade chlorate in minimal medium containing 200 ppm of potassium chlorate. It was concluded that out of isolated strains, isolate no. 9-5F, C2-3B2 and K7-5C were better in potassium chlorate degradation. The degradations of chlorate by these selected isolates were more than 95% at pH 7. The results showed that neutral pH was more suitablefor the chlorate degradation than acidic and alkaline conditions. Furthermore, the addition of glucose in minimal medium decreased the chlorate decomposition. Finally, the application of the three selected isolates into the chlorate contaminated soil samples enhanced the decomposition of chlorate. These three bacterial isolates were identified using 16S rDNA sequence analysis as *Pseudomonas* sp.

Keywords: longan, potassium chlorate, chlorate reducing bacteria, soil microbial population

คำนำ

ลำไยเป็นผลไม้ที่ให้ผลผลิตที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งรูปลำไยสด และลำไยแห้ง จึงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งในภาคเหนือ สามารถทำรายได้จากการส่งออกปีละไม่ต่ำกว่า 5,000 ล้านบาท ปัญหาหนึ่งที่เกษตรกรผู้ปลูกลำไยมักเผชิญในอดีต คือการออกดอกไม่สม่ำเสมอของต้นลำไย เนื่องจากการออกดอกติดผลขึ้นอยู่กับความหนาวเย็น ในบางปีที่อากาศไม่หนาวเย็นพอต้นลำไยจะออกดอกติดผลน้อย แต่นับตั้งแต่ปี พ .ศ.2541 การค้นพบโดยบังเอิญว่าสารโพแทสเซียมคลอเรตสามารถกระตุ้นให้ลำไยออกดอกนอกฤดูได้ ทำให้เกิดความตื่นตัวในวงการลำไยเป็นอย่างมาก จึงมีเกษตรกรหลายรายนำสารประกอบดังกล่าวไปใช้ในหลายลักษณะ โดยสารที่ใช้มักเป็นสารผสมที่มีสารโพแทสเซียมคลอเรตอยู่สูง สำหรับรูปแบบของการใช้เพื่อเร่งการออกดอกของลำไยจะใช้โดยการราดลงดิน พ่นทางใบ หรือผสมเป็นปุ๋ย จากเหตุการณ์ดังกล่าวส่งผลให้มีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 1 ล้านไร่ ในปี พ .ศ.2549 และมีการใช้สารนี้ต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน (พาวิน และคณะ, 2550) อีกทั้งจากรายงานของ สมชาย และคณะ (2544) ในการตรวจผลลำไยสุกจากต้นที่มีการใช้โพแทสเซียมคลอเรต พบว่าไม่มีอนุมูลคลอเรตตกค้างในผลลำไยสุก จึงมีความปลอดภัยในการบริโภค

โพแทสเซียมคลอเรต (Potassium chlorate; $KClO_3$) เป็นสารที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการผลิตลำไยนอกฤดู โดยจากการรายงานของสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร พบว่า ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และจันทบุรี มีการใช้สารนี้ในการผลิตลำไยมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (สุภาภรณ์ และคณะ , 2553) โดยรูปแบบการใช้งานสารโพแทสเซียมคลอเรต จะใช้ในลักษณะการผสมน้ำราดลงในดินบริเวณทรงพุ่ม ถึงแม้ว่าจะไม่มีรายงานทางวิชาการ ที่ระบุว่ามีการปนเปื้อน หรือตกค้างของสารนี้ในดินในระดับที่อันตรายต่อมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตาม ในสารโพแทสเซียมคลอเรตเป็นสารที่สามารถใช้เหนี่ยวนำเชื้อราให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ อีกทั้งจากการวิจัยของ ปริศนา (2547) รายงานว่าสารนี้ทำให้เชื้อรา *Fusarium* ในดินสวนลำไยเกิดการกลายพันธุ์ ดังนั้นการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตในดิน เป็นระยะเวลาต่อเนื่องยาวนาน อาจมีผลกระทบต่อนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อความสมบูรณ์ของดิน และวัฏจักรสารในดินได้ ดังนั้นการศึกษาการสลายตัวของคลอเรตในดินให้ไม่ตกค้างในดินในระยะยาวเป็นเรื่องที่จะต้องให้ความใส่ใจ และบูรณาการให้เหมาะสมกับการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตในการผลิตลำไยของเกษตรกร

โดยการสลายตัวของสารประกอบคลอเรตในสิ่งแวดล้อมได้มีการรายงานถึงความสามารถของ แบคทีเรียรีดิวส์คลอเรต (chlorate reducing bacteria) ซึ่งสามารถเปลี่ยนอนุมูล

ของคลอเรต ไปเป็นคลอไรด์ และน้ำได้ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดคลอเรตในน้ำ ในขณะที่ สมชายและคณะ (2544) พบว่าการสลายตัวของคลอเรตในดินเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน จึงอาจสรุปได้ว่าการสลายตัวของคลอเรตนั้นเกิดจากกระบวนการทางชีวภาพเป็นหลัก

การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาหาผลกระทบของการใช้คลอเรตต่อนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในดิน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องวัฏจักรของสาร ซึ่งแสดงถึงความสมบูรณ์ของดิน นอกจากนี้ยัง ทำการแยก และจำแนกเชื้อ chlorate reducing bacteria ดิน เพื่อใช้ในการกำจัดคลอเรตส่วนเกินในดิน จากแปลงปลูกลำไย และกากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์ร่วมกับการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตในการกระตุ้นการออกดอกนอกฤดูของลำไย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน และ แนวทางการใช้ประโยชน์ร่วมกับการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตในการกระตุ้นการออกดอกนอกฤดูของลำไย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสมบูรณ์ของดินจากสวนลำไยที่มี และไม่มีการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตโดยดูจากจำนวนจุลินทรีย์ และกิจกรรมของเอนไซม์ในดิน

2. เพื่อคัดเลือก และจำแนกชนิดของ chlorate reducing bacteria ที่พบในดินสวนลำไยที่มีการใช้ และไม่ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต

3. ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ chlorate reducing bacteria ในการสลายอนุมูลคลอเรตส่วนเกินในตัวอย่างดิน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อแบคทีเรียรีดิวส์คลอเรต และทราบชนิดของแบคทีเรียรีดิวซ์คลอเรตในตัวอย่างดินสวนลำไย

2. ทราบถึงผลกระทบของคลอเรตต่อนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในดิน

3. นำความรู้ที่ได้ไปใช้วางแผนการใช้คลอเรดร่วมกับการใช้แบคทีเรียรีดิวซ์คลอเรดในการกระตุ้นการออกดอกนอกฤดูของลำไยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4. สามารถนำความรู้ที่ได้ใช้ลดความขัดแย้ง และสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภคที่ตระหนักถึงความสำคัญของสิ่งแวดล้อม

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลพื้นฐานของลำไย และผลิตลำไย

ลำไย เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Sapindaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ได้แก่ *Euphoria longana* Camb. *Eu phoria longa* Strend. *Nephelium longana* Camb. และ *Dimocarpus longan* Lour. เป็นไม้ผลกึ่งเมืองร้อนมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนตอนใต้ทางแถบอินเดียตอนใต้ และประเทศไทยตอนบน ปัจจุบันมีการกระจายการปลูกไปสู่ทวีปออสเตรเลีย อเมริกาเหนือ และเอเชียใต้ (พาวินและคณะ, 2547)

ลำไยจัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญในการสร้างสภาวะเศรษฐกิจให้แก่เกษตรกร โดยเฉพาะเกษตรกรในจังหวัดภาคเหนือของประเทศไทย เช่น จังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน โดยมีรายได้จากการส่งออกไม่ต่ำกว่า 5,000 ล้านบาทต่อปี รัฐบาลจึงมีนโยบายในการส่งเสริม สนับสนุนการปลูกและผลิตลำไย โดยกำหนดให้ลำไยเป็นผลไม้ยอดเยี่ยม 1 ใน 4 ชนิดที่ต้องผลักดันให้เกษตรกรขยายการปลูกและการผลิตให้เพิ่มมากขึ้น (พงษ์ศักดิ์และคณะ, 2542)

ในปี พ.ศ.2554 ได้มีรายงานการขยายการเพาะปลูกลำไยในประเทศไทยไปทั้งสิ้น 27 จังหวัด ครอบคลุมพื้นที่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง รวมเนื้อที่การเพาะปลูกทั้งสิ้น 966,589 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ซึ่งโดยปกติในการออกของลำไยจะต้องอาศัยความหนาวเย็น ดังนั้นจึงมีการใช้วิธีการบังคับให้ลำไยออกดอกฤดูกันเป็นอย่างมาก จากรายงานการผลิตของ สุภาภรณ์ และคณะ (2553) ในพื้นที่ 3 จังหวัด คือ เชียงใหม่ ลำพูน และจันทบุรี มีการบังคับให้ออกดอกนอกฤดูถึง 60.9%

การผลิตลำไยนอกฤดูเพื่อเป็นการแก้ปัญหาการผลผลิตล้นตลาดและการขาดแคลนแรงงานในการเก็บเกี่ยวผลผลิตรวมทั้งสภาพอากาศที่แปรปรวนมีผลต่อการออกดอกติดผลของลำไย วิธีการที่เกษตรกรนำมาใช้ในการบังคับให้ลำไยออกดอกที่เกษตรกรใช้มากที่สุด คือ การใช้สาร โพแทสเซียมคลอเรด (พาวินและคณะ, 2547)

การใช้สารโพแทสเซียมคลอเรดในการกระตุ้นให้ลำไยออกดอกเพื่อการผลิตลำไยจะใช้การพ่นทางใบ และการฉีดเข้าต้นลำไย ซึ่งการใช้ปริมาณที่ให้ผลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่ใช้ นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับฤดูกาล รวมทั้งอายุของใบ แต่วิธีการที่ทำได้ง่ายคือการผสมน้ำราดบนดินบริเวณใต้ทรงพุ่ม หรือการหว่านสารนี้บริเวณใต้ทรงพุ่มแล้วรดน้ำตาม โดยปริมาณสาร

โพแทสเซียมคลอเรตที่จะให้กับต้นลำไยจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ของลำไย และขนาดทรงพุ่มของลำไย โดยความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอเรตที่ใช้อยู่ที่ 10-900 กรัมต่อต้น ซึ่งเป็นแนวทางเท่านั้น จะต้องมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับพื้นที่เพาะปลูกด้วย (นพดลและคณะ, 2543; พาวินและคณะ, 2547; Manochai et al., 2005)

2. สารโพแทสเซียมคลอเรต

สารโพแทสเซียมคลอเรต (potassium chlorate; $KClO_3$) คือสารเคมีที่มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว ละลายน้ำได้ เมื่ออยู่ในรูปผลึกของสารบริสุทธิ์จะไม่มีสี มีสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ที่รุนแรง โดยสามารถให้ออกซิเจนในปริมาณที่มาก และรวดเร็วกว่าสารตัวอื่น สารนี้แตกตัวได้ง่ายเมื่อถูกแรงกระแทก แรงเสียดสี หรือถูกความร้อน ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในทาง อุตสาหกรรมกระดาษ และการฟอกย้อม (Germgard et al., 1981) การผลิตวัตถุระเบิด ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ รวมถึงในทางการเกษตรซึ่งนำมาใช้เป็นสารเร่งการออกดอกของต้นลำไย

3. ผลกระทบของสารประกอบคลอเรตต่อสิ่งมีชีวิต

เนื่องจากมีการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตการอย่างแพร่หลายในพื้นที่เพาะปลูกลำไย ทำให้มีผู้วิจัยถึงผลกระทบของสารนี้ต่อสิ่งมีชีวิตอื่นไว้เช่น

มีการรายงานว่าการมีปริมาณคลอเรตตกค้างในดินมากเกินไป สามารถทำลายระบบนิเวศของดิน และส่งผลต่อการเจริญของพืชได้ อย่างเช่น ข้าว (Borges et al., 2004)

กนกวรรณ (2446) รายงานถึงผลของโพแทสเซียมคลอเรตต่อเชื้อราอาบัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ซึ่งเป็นเชื้อราที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ไว้ว่า สารโพแทสเซียมคลอเรตมีผลต่อปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *Glomus pustulatum* และทำให้ความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยในรากพืชลดลง

ปริศนา (2547)ได้ทำการศึกษาผลกระทบของสารโพแทสเซียมคลอเรตที่มีต่อเชื้อรา *Fusarium* ในสวนลำไย พบว่า เชื้อราชนิดนี้ที่แยกได้จากสวนลำไยที่มีการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น

Li et al. (2008) ได้รายงานถึงปริมาณคลอเรตในดินที่สูง ได้แก่ 200-400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถยับยั้งการ colonize ของเชื้อรา arbuscular mycorrhiza อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการ

การดูดซึมฟอสฟอรัส และการเจริญเติบโตของพืชที่ทดสอบ 3 ชนิดคือ bermudagrass, bahiagrass และเมล็ดลำไยด้วย

นั่นคือคลอเรตที่ตกค้างในดินเมื่อส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่น หมายถึงส่งผลต่อคุณภาพดิน (soil quality) ด้วย

4. คุณภาพดิน (soil quality)

ดัชนีบ่งชี้ที่ใช้ในการบ่งบอกคุณภาพดินทางชีวภาพ ได้แก่ จุลินทรีย์ และเอนไซม์ในดิน

4.1 จุลินทรีย์ในดิน

จุลินทรีย์ที่พบในดิน มีทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท ฟังไจ ไซยาโนแบคทีเรีย และโปรโตซัว โดยปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ที่ประมาณ 10^8-10^9 CFU ต่อ ดิน 1 กรัม โดยเชื้อแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่พบมากที่สุดในดิน บทบาทของจุลินทรีย์ในดินคือ เป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ และปลดปล่อยธาตุอาหารให้แก่พืช และสิ่งมีชีวิตอื่น จึงเป็นกลุ่มสิ่งมีชีดที่มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรของสารในดิน ทั้งวัฏจักรคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และธาตุอื่นๆ (Sylvia et al., 2005) นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังมีบทบาทต่อคุณสมบัติทางกายภาพของตินด้วย การที่จุลินทรีย์สามารถบ่งชี้สุขภาพของดินได้ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการดอบสนองต่อต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้เร็วกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่าสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นๆ โดยที่การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และกายภาพบางอย่างที่ตรวจวัดไม่สามารถบอกสุขภาพของดิน ได้ (Das and Varma, 2011)

4.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียในดินพบอยู่เป็นอิสระได้น้อยมาก เพราะเซลล์ยึดเกาะกับอนุภาคของดิน หรือฮิวมัสเอาไว้ แบคทีเรียบางชนิดยังสร้างสารเมือกมาช่วยยึดเกาะอีกด้วย แบคทีเรียที่พบในดินมีชนิดและปริมาณแตกต่างกันไปตามอินทรียสารในดิน เ ช่น ในดินที่มีการเพาะปลูกพืช มีแบคทีเรียมากกว่าในดินที่ไม่มีการเพาะปลูก เพราะดินที่มีการเพาะปลูกได้รับอินทรียสารต่าง ๆ ที่รากขับออกมาในปริมาณมาก สารเหล่านี้แบคทีเรียนำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญและ เพิ่มจำนวนจำนวนต่อไป เชื้อ แบคทีเรียที่มักพบในดินได้แก่ *Agrobacterium, Bacillus, Clostridium, Flavobacterium, Pseudomonas , Sarcina* และ *Xanthomonas* เป็นต้น โดยแบคทีเรียจะมีส่วนเข้าไปเกี่ยวข้องกับวัฏจักรของสาร ผ่านปฏิกิริยา เช่น proteolysis, ammonification, nitrification, denitrification และ nitrate reduction

4.1.2 ฟังไจ

ฟังไจที่พบในดินมีหลายร้อยชนิด อาศัยอยู่บริเวณผิวหน้าดิน เพราะเจริญได้ดีในที่มีออกซิเจน ฟังไจที่พบอาจอยู่ในรูปของสปอร์ หรือ เส้นใย ส่วนจำนวนและชนิดที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความชื้น พีเอช ชนิดของดินและความลึกของดิน บางครั้งอาจพบ เส้นใยอยู่รวมกับอนุภาคของสารต่างๆ ในดิน อาจยึดเกาะกัน และแทรกเข้าไปในเนื้อดินบางชนิดเจริญข้างในหรือด้านบนของอนุภาคอินทรียสาร เป็นต้น โดยฟังไจสามารถเจริญได้รวดเร็วในดินที่มีส่วนประกอบของพืชอยู่ด้วย เช่น เซลลูโลส หรือลิกนิน บทบาทของฟังไจในดินคือ ช่วยย่อยอินทรียวัตถุให้แก่ดิน เป็นการเพิ่มสารประกอบพวกคาร์บอน และไนโตรเจนให้กับดินแล้ว ยังช่วยให้ดินมีคุณสมบัติอุ้มน้ำได้ดีขึ้น เนื่องจากทำให้อนุภาคของดินขนาดเล็ก ๆ รวมตัวกัน ฟังไจบางชนิดมีความสามารถในการอาศัยอยู่ร่วมกันกับรากพืชได้ซึ่ง เรียกว่า mycorrhiza ช่วยสลายอาหารให้แก่พืช เป็นตัวกลางในการส่งต่ออาหารให้แก่พืช และช่วยทำให้รากพืชที่ผิวมีการดูดอาหาร (Absorbing surface) ได้มากขึ้น แต่ฟังไจบางชนิดก็เป็นปรสิต

4.1.3 แอคติโนมัยซีส (Actinomycetes)

แอคติโนมัยซีสเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง ท่อน มีเส้นใยแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน แอคติโนมัยซีสแพร่กระจายเป็นจำนวนมาก ในแหล่งที่มีการเน่าเปื่อยของอินทรียวัตถุตลอดจนในสิ่งขับถ่ายจากสัตว์ พบมากบริเวณผิวหน้าดินเพราะต้องการออกซิเจนในการเจริญ เจริญได้ดีในดินที่เป็นด่าง การดำรงชีวิตส่วนมากเป็นแซโพรไฟท์ แต่บางชนิดเป็นปรสิต ทำให้เกิดโรคกับมนุษย์ พืชและสัตว์อื่นๆ ได้ แอคติโนมัยซีสที่พบในดินได้แก่ *Streptomyces, Nocardia* และ *Streptosporangium* เป็นต้น บทบาทของแอคติโนมัยซีสในดินคือ ทำหน้าที่ ย่อยสลายสารประกอบที่ซับซ้อนในเนื้อเยื่อพืชและ ทำให้สารเหล่านี้เปลี่ยนเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ช่วยควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ในดิน โดยสร้าง สารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ทำลายแบคทีเรียและฟังไจในดินได้ แต่บางชนิด เป็นปรสิตของพืช มนุษย์ และสัตว์ได้

4.2 เอนไซม์ในดิน

สำหรับเอนไซม์ในดิน (soil enzymes) คือกลุ่มของเอนไซม์ที่ปกติอยู่ในดิน และมีบทบาทสำคัญต่อการรักษาระบบนิเวศในดิน คุณสมบัติทางเคมี เอนไซม์ที่ใช้ในการบ่งชี้ความสมบูรณ์ และสุขภาพดินเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของจุลินทรีย์ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของสารภายในดิน ได้แก่ วัฏจักรคาร์บอน คือ dehydrogenase, β-glucosidase และ cellulose วัฏจักรไนโตรเจน คือ urease และ protease ส่วนเอนไซม์ phosphatase จะเกี่ยวข้องกับวัฏจักรของฟอสฟอรัส (ตารางที่ 1)

ดารางที่ 1 เอนไซม์ดินที่ใช้บ่งบอกความสมบูรณ์ของดิน

เอนไซม์ในดิน	ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง	กิจกรรมของจุลินทรีย์ที่บ่งชี้
Dehydrogenase	Electron transport system	วัฏจักรคาร์บอน
Cellulase	การย่อยสลายเซลลูโลส	วัฏจักรคาร์บอน
Urease	การย่อยสลายยูเรีย	วัฏจักรไนโตรเจน
Phosphatase	ปลดปล่อยฟอสเฟต	วัฏจักรฟอสฟอรัส

โดยเอนไซม์เหล่านี้จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในดิน ทำให้เกิดการปลดปล่อยธาตุอาหารออกมาในดิน โด ยแหล่งของเอนไซม์ภายในดินอาจมาจากจุลินทรีย์ พืช หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่อยู่ในดิน โดยดินที่ดีจะเกิดจา กความสมดุลของคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพซึ่งรวมถึงเอนไซม์ (Das and Varma, 2011) ตัวอย่างกิจกรรมของเอนไซม์ในดินเช่น

4.2.1 เอนไซม์ cellulase

เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส โพลีแซคคาไรด์ ที่มีการเชื่อมน้ำตาลกลูโคสด้วย β-1,4-glycosidic lingkage ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ โดยเซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมากที่สุดในโลกนี้ โดยเป็นองค์ประกอบของชีวมวลถึง 50% ดังนั้นการเจริญ และการมีชีวิตของจุลินทรีย์ในดินจะขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นแหล่งของเอนไซม์ cellulose ในดินจะมาจากซากพืช และจุลินทรีย์ในดินคือ ฟังไจ และแบคทีเรียในดิน ดัง ตังนั้นสิ่งที่มีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในดินจะมีผลกระทบต่อเอนไซม์นี้ด้วย เช่นมีรายงานว่าถ้าในดินมีปริมาณของ fungicide เพิ่มขึ้น จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ cellulose ลดลง

4.2.2 เอนไซม์ dehydrogenase

เอนไซม์ dehydrogenase โดยปกติจะอยู่ในดินชั้นบน เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องหับระบบหายใจ ซึ่งสิ่งมีชีวิตจะใช้ในการสร้าง พลังงานสำหรับการดำรงชีวิต โดยจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์สารประกอบอินทรีย์โดยการเคลื่อนย้ายอะตอมไฮโดรเจน 2 อะตอม ดังนั้นจึงสามารถใช้เอนไซม์นี้บ่งบอกการทำงานของจุลินทรีย์ได้ เอนไซม์สามารถบ่งชี้ถึงมลภาวะทางดินที่เกิดขึ้นได้ เช่น ดินที่มีการปนเปื้อนขอ งน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษจะมีกิจกรรมของ

dehydrogenase สูง (McCarthy et al., 1994) หรือถ้าดินมีปริมาณสารปราบศัตรูพืชสูงจะมีกิจกรรมของเอนไซม์นี้ต่ำ (Baruah and Mishra, 1986) เป็นต้น

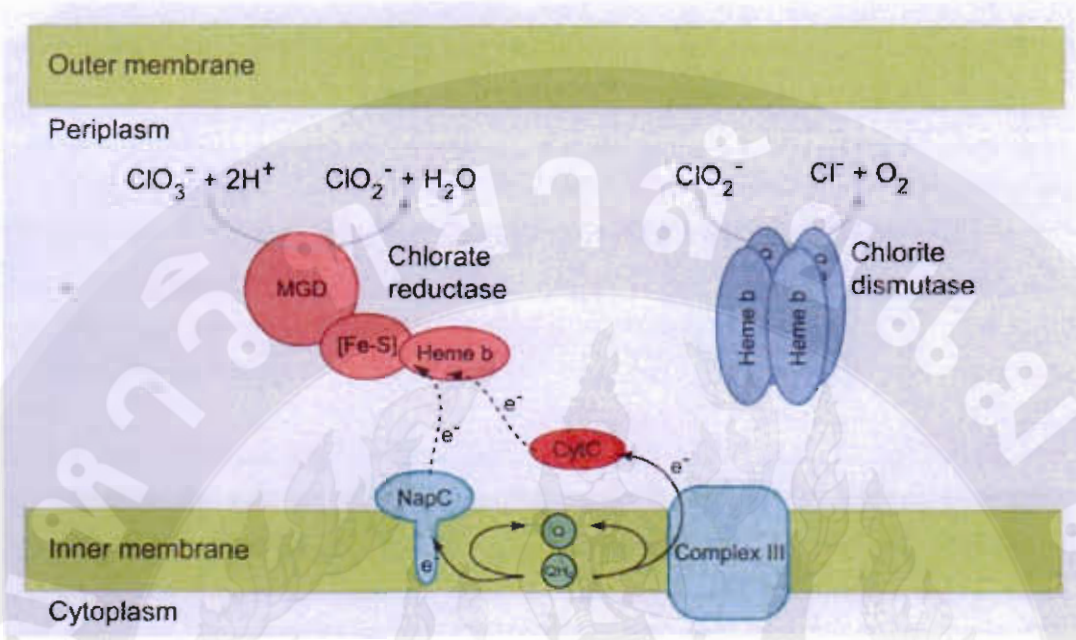
5. การสลายตัวของคลอเรต

สมชายและคณะ (2544) ได้ศึกษาการสลายตัวของคลอเรตที่ผ่าน และไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากผลการทดลองพบว่า ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่พบการสลายตัวของคลอเรต ในขณะที่ดินที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อมีปริมาณของสารโพแทสเซียมคลอเรตต่ำกว่าปริมาณเริ่มต้น จึงสรุปว่า การสลายตัวของคลอเรตในดินเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน

Ginkel et al. (1995) และ Wu et al. (2001) สรุปไว้ว่าการสลายทางชีวภาพในสิ่งแวดล้อมเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่ม chlorate reducing bacteria (CRB) โดยจะสลายจาก chlorate ไปเป็น chlorite และได้ chloride กับน้ำในที่สุด ซึ่ง CRB จะใช้คลอเรตเป็นแหล่งของพลังงานในการเจริญ

6. แบคทีเรียรีดิวส์คลอเรต (Chlorate reducing bacteria)

แบคทีเรียรีดิวส์คลอเรต (chlorate reducing bacteria; CRB) คือ แบคทีเรียที่สามารถใช้ chlorate (ClO_3^-) เป็นตัวรับอิเลคตรอนในกระบวนการหายใจ โดยแบคทีเรียจะสามารถรีดิวส์ chlorate ไปเป็น chlorite โดยเอนไซม์ chlorate reductase ในขั้นแรก จากนั้นในขั้นที่ 2 chlorite จะแตกตัวเป็น chloride และ ออกซิเจน โดยมี chlorite dismutase เป็นตัวเร่ง (Oltmann et al., 1976 และ Rikken et al., 1996) โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นบริเวณ periplasm ดังแสดงในภาพที่ โดยทั่วไปแบคทีเรียที่สามารถรีดิวส์ chlorate ได้จะอยู่ในกลุ่มของ facultative anaerobe (Logan, 1998) นอกจากนี้ denitrifying bacteria บางกลุ่มยังสามารถรีดิวส์ chlorate ได้อีกด้วย (Oltmann et al., 1976) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีการรายงานว่าสามารถรีดิวส์คลอเรต ได้แก่ *Vibrio dechloraticans, Acinetobacter thermotoleranticus* (Ginkel et al., 1995) และ *Ideonella dechloratans* (Thorell et al., 2003) ซึ่งแยกได้จากกากตะกอนน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้ Steinberg et al. (2005) ได้ศึกษาความแตกต่างในการรีดิวส์ chlorate ของ *Pseudomonas* sp. กับการรีดิวส์ perchlorate ของ *Azospira* sp. พบว่ามีความแตกต่างกันของเอนไซม์ chlorate และ perchlorate reductase ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาการรีดิวส์คลอเรต (Oltmann et al., 1976 และ Rikken et al., 1996)

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายคลอเรตโดยจุลินทรีย์

การศึกษาปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการย่อยสลายคลอเรต Germgard (1989) พบว่าการเติมปุ๋ยอินทรีย์ในดินสวนลำไยมีผลต่อการย่อยสลายคลอเรต นอกจากนี้ Sutigoolabud (2005) รายงานว่าการเติมน้ำตาลในดินส่งผลในอัตราการย่อยสลายคลอเรตเกิดได้เร็วขึ้น

Jiang et al. (2009) ได้ศึกษาผลของการเติม activated sludge ต่อการย่อยสลายคลอเรตในดินที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ กัน พบว่า อัตราการย่อยสลายคลอเรตจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ และการย่อยสลายคลอเรตจะเกิดได้ดีที่ pH เป็นกลาง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

1.1	ตู้ปลอดเชื้อชนิด Bioharzard	(Microflow, USA)
1.2	ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ	(Binder, Germany)
1.3	ตู้อบลมร้อน	(Binder, Germany)
1.4	เครื่องฆ่าเชื้อความดันไอ	(Astell, England)
1.5	เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	(Mettler-Toledo, Switzerland)
1.6	เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	(Mettler-Toledo, Switzerland)
1.7	กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ	(Olympus, Japan)
1.8	เครื่องปั่นเหวี่ยง Spectrafuge™ 7M Microcentrifuge	(Labnet Hermle, USA)
1.9	เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง GENESYS™ 20	(Thermo Scientific, USA)
1.10	PCR Mastercycler Personal	(Eppendorf, Canada)
1.11	Electrophoresis	(Labnet, USA)
1.12	Transluminator	(Bio-rad, USA)
1.13	ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit	(Geneaid, Taiwan)
1.14	ชุดทำ PCR Product ให้บริสุทธิ์สำเร็จรูป GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit	(RBC Bioscience, Taiwan)
1.15	อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่	

- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- หลอดทดลอง
- บีกเกอร์
- ปิเปต
- กระบอกตวง
- ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
- กระดาษกรอง เบอร์ 1, 42
- เครื่องวัดพีเอช
- ห่วงถ่ายเชื้อ
- เข็มเขี่ยเชื้อ

- ปากคีบ
- สไลด์
- Microcentrifuge tube
- PCR reaction tube
- Micropipette

2. สารเคมี

	สารเคมี	บริษัท
2.1	Glacial acetic acid	Merck, Germany
2.2	Ammonium dihydrogen phosphate	J.T. baker, USA
2.3	Ammonium sulfate	Merck, Germany
2.4	Boric acid	Merck, Germany
2.5	Carboxymethyl cellulose (CMC)	Union Science, Thailand
2.6	Calcium chloride	Merck, Germany
2.7	Citric acid	BDH, England
2.8	Cobalt chloride	UNIVAR, Australia
2.9	Copper sulfate	J.T. baker, USA
2.10	Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	J.T. baker, USA
2.11	Ferric ammonium sulphate	UNIVAR, Australia
2.12	Ferrous sulphate	J.T. baker, USA
2.13	Folin-Ciocalteu reagent	Merck, Germany
2.14	Glucose monohydrate	Merck, Germany
2.15	Hydrochloric acid	UNIVAR, Australia
2.16	Indigo carmine	Sigma, USA
2.17	Magnesium sulphate	UNIVAR, Australia
2.18	Maleic acid	QRec, New Zealand
2.19	Manganese chloride	UNIVAR, Australia
2.20	MethanoI	LAB-SCAN
2.21	p-nitrophenyl	Fluka, Japan
2.22	p-nitrophenyl phosphate di sodium salt	Sigma, Austria

2.23	Phenol	Fisher Scientific, UK
2.24	Potassium chlorate	Merck, Germany
2.25	Potassium chloride	EMSURE, Germany
2.26	Potassium cyanide	J.T. baker, USA
2.27	Potassium ferrocyanide	Fisher Scientific, UK
2.28	di-potassium hydrogen phosphate	BDH, England
2.29	Potassium sodium tartrate	CARLO ERBA REAGENTI
2.30	Sodium acetate	Merck, Germany
2.31	Sodium carbonate	Fisher Chemicals, UK
2.32	Sodium dihydrogen phosphate	Merck, Germany
2.33	Sodium dodecyl sulphate	Fisher Chemicals, UK
2.34	Disodium hydrogen phosphate	Fisher Chemicals, UK
2.35	Sodium hydroxide	LABSCAN
2.36	Sodium hypochlorite	Union Science, Thailand
2.37	Disodium molybdate	J.T. baker, USA
2.38	Sodium nitroprusside	Merck, Germany
2.39	Sulfuric acid	LABSCAN
2.40	Trichloroacetic acid	Merck, Germany
2.41	Triphenyl formazan	Sigma, Japan
2.42	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride	Merck, Germany
2.43	Tris (hydroxyl methyl) amino methane	Vivantis, USA
2.44	Tyrosine	Fluka Biochemike, Switzerland
2.45	Urea	CODEX CARLOERBA
2.46	Zinc sulphate	J.T. baker, USA
2.47	สารเคมีที่ใช้ในการย้อมแกรม	(Bio-Medical Laboratory, ประเทศไทย)
2.48	สารละลาย/สารเคมี ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	(Geneaid, Taiwan)
2.49	สารเคมี สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	
	- PCR Master Mix	(Fermentas, USA)
	- 16S rDNA primer คือ 27F และ 1522R	(Operon, Germany)
2.50	สารเคมีที่ใช้ในการทำ electrophoresis	

- Loading dye (Fermentas, USA)
- GeneRuler ™100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, USA)
- สารละลาย Gel star (Lonza, Switzerland)
- Agarose gel Vivantis, USA

2.51 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR purification (BC Bioscience, Taiwan)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ข)

3.1. mineral salts medium (Ginkel et al., 1995)

3.2 nutrient broth (Criterion, Hardy Diagnostic, USA)

3.3 nutrient agar (Criterion, Hardy Diagnostic, USA)

3.4 Starch casein agar

3.5 Streptomycin rose Bengal agar

4. วิธีการทดลอง

4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างดินจากสวนลำไย

เก็บตัวอย่างดินจากสวนลำไยในพื้นที่ จ.เชียงใหม่ โดยเป็นสวนที่มีการใช้สารคลอเรตเพื่อเร่งการออกดอกนอกฤดูกาลของลำไย

4.2 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของตัวอย่างดิน

4.2.1 การวิเคราะห์ทางเคมี และทางกายภาพ

1) วัดความเป็นกรดด่างของดิน (Kalra, 1995)

2) วิเคราะห์ความชื้น

3) วิเคราะห์ปริมาณคลอเรต (Chiswell and Keller-Lehmann, 1993)

4.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในดิน (ภาคผนวก ค)

1) Dehydrogenase activity

2) Urease activity

3) phosphatase

4) Protease activity

5) Cellulase activity

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างดิน

ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย เชื้อแอคติโนมัยซีส และเชื้อรา โดยวิธี serial dilution plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (ผสม nystatin) sodium caseinate agar และ streptomycin rose bengal agar ตามลำดับ

4.3 คัดแยก chlorate reducing bacteria จากดินในสวนลำไย

นำตัวอย่างดินมาผ่านขั้นตอน enrichment โดยการดัดแปลงวิธีของ Ginkel et al. (1995) และแยกเชื้อโดยการทำ serial dilution ใน agar tube และบน agar plate (Bruce et al., 1999) นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญขึ้นมาไปทำให้บริสุทธิ์ และเก็บไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.4 การทดสอบการสลายคลอเรต และการผลิตเอนไซม์โดยแบคทีเรียรีดิวส์ในระดับหลอดทดลอง

4.4.1 นำเชื้อแบคทีเรียรีดิวส์ที่บริสุทธิ์ที่แยกได้จากดิน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอเรต 200 มิลลิกรัม/ลิตร และมีค่าพีเอชของอาหารที่แตกต่างกันคือ 5, 7 และ 8 นาน 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์ปริมาณคลอเรต

4.4.2 นำเชื้อแบคทีเรียรีดิวส์ที่บริสุทธิ์ที่แยกได้จากดิน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอเรต 200 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลกลูโคส 200 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7 นาน 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์ปริมาณคลอเรต

5. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียรีดิวส์คลอเรต

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการสลายคลอเรต มาจำแนกชนิดโดยใช้คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้มาทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา รูปร่าง และการติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound microscope) กำลังขยายของภาพ 1000 เท่า

5.2 การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย โดยการหาลำดับเบส 16S rRNA

5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อบริสุทธิ์เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหาร NB โดยการนำไปปั่น เหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เซลล์แบคทีเรียจะตกตะกอนอยู่ที่ก้น Microcentrifuge tube ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) (Geneaid, Taiwan)

5.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (agarose gel electrophoresis)

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่อง PCR Mastercycler Personal โดยใช้ primer คือ 27F (5'AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3') และ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCRCCGCA -3') จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel clectrophoresis โดยนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Dark readerทำให้สังเกตเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏขึ้น จากนั้นนำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ดีเอ็นเอบรรจุอยู่ภายใน Microcentrifuge tubeและนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5.2.3 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย โดยการหาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA

นำ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ววิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้จัดส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท First BASE Laboratories ณ ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National

Center for Biotechnology Information (NCBI) (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

6. ศึกษาผลของการใช้เชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียรีดิวส์คลอเรตต่อการสลายคลอเรตในตัวอย่างดิน จำนวนจุลินทรีย์ในดิน และกิจกรรมของเอนไซม์ในดิน

6.1 ผลของพีเอชของดิน

6.1.1 นำตัวอย่างดิน มาผสมกับโพแทสเซียมคลอเรตให้มีความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อดิน 1 กิโลกรัม จากนั้นนำดินดังกล่าว ปริมาณ 100 กรัม ใส่ในขวดปราศจากเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5, 7 และ 8 เติมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงไป ปริมาณต่างๆกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่าง ที่ระยะเวลา 0, 7, 14, และ 21 วัน (Jiang et al., 2009)

6.2 นำตัวอย่างดินที่ช่วงเวลาต่างๆ มาวิเคราะห์ปริมาณคลอเรต ปริมาณจุลินทรีย์ และทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในดิน

ผลการทดลอง

1. ข้อมูลการสำรวจและเก็บตัวอย่างดินสวนลำไย

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ อ .สันทราย อ .พร้าว และ อ .จอมทอง จ.เชียงใหม่ จำนวน 11 สวน ซึ่งมีการปลูกลำไยจำนวน 30-100 ต้นต่อสวน พบว่าทุกสวนมีประวัติการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตเพื่อเร่งการออกดอกของลำไยในการผลิตลำไยนอกฤดูกาล โดยให้เหตุผลในการใช้งานใกล้เคียงกันคือลำไยนอกฤดูมีราคาสูงกว่าในฤดู ซึ่งการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตนี้จะมีการใส่ให้ต้นลำไยตั้งแต่เดือนธันวาคม ปริมาณโดยเฉลี่ยที่ใช้คือ 1 กิโลกรัมต่อต้น ด้วยวิธีการผสมน้ำราดรอบต้นลำไย จำนวนครั้งที่ให้มีตั้งแต่ 2 ครั้ง จนถึง 15 ครั้งต่อปี

2. ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของตัวอย่างดินสวนลำไย

จากการเก็บตัวอย่างดินทั้งสิ้น 47 ตัวอย่าง จากสวนลำไยจำนวน 11 สวน เมื่อนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติของดินทางกายภาพ คือ ความเป็นกรดด่าง และความชื้น และวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีงฃวภาพคือ กิจกรรมของเอนไซม์ในดิน และปริมาณ เชื้อจุลินทรีย์ในดินได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

2.1 ความเป็นกรดด่างของตัวอย่างดิน

ค่าความเป็นกรดด่างของดินจากสวนลำไย มีค่าเฉลี่ยที่เป็นกลาง คือ ค่าพีเอชอยู่ที่ 6.9-7.9 จากการเก็บตัวอย่างดินสวนละ 3-10 จุด ดังแสดงในตารางที่ 1

2.2 ความชื้นของตัวอย่างดิน

ความชื้นของตัวอย่างดินคำนวณในค่าของ เปอร์เซ็นต์ความชื้น โดยตัวอย่างดินที่เก็บมาทั้ง 47 ตัวอย่าง จากความลึก 15 เซนติเมตร มีความชื้นอยู่ที่ 3.9-13.0% (ตารางที่ 2)

2.3 ปริมาณคลอเรตในตัวอย่างดิน

ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอเรตหลังจากมีการเติมคลอเรตนาน 6 เดือน มีปริมาณคล อเรตตกค้างในดิน 0.2-1.3 ppm (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าความเป็นกรดด่าง ความชื้น และปริมาณคลอเรตของดินสวนลำไย จำนวน 11 สวน

สวนลำไยที่	จำนวนตัวอย่าง	ค่าพีเอช	ความชื้น (%)	ปริมาณคลอเรต (ppm)
1	11	6.9±0.2	12.6	28.8±24.5
2	5	7.2±0.1	10.2	10.6±8.8
3	3	7.6±0.1	9.6	5.8±5.3
4	3	7.5±0.1	5.8	7.2±1.5
5	3	7.4±0.1	7.0	5.5±2.0
6	3	7.3±0.0	7.9	31.7±9.9
7	5	7.4±0.1	10.5	7.3±8.6
8	3	7.4±0.1	3.9	1.2±1.1
9	5	7.3±0.1	9.3	4.9±2.2
10	3	7.4±0.0	11.0	10.0±5.6
11	3	7.4±0.1	13.0	6.8±3.8

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพของตั วอย่างดินที่เก็บจากสวนลำไยครั้งนี้ ในกรณีของความเป็นกรดด่งของดินซึ่งแสดงในค่าพีเอช แสดงให้เห็นว่าดินจากสวนลำไยที่มีการใช้คลอเรตต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานานนั้นมีค่าพีเอชเป็นกลาง สอดคล้องกับงานวิจัยของ รุจิรา และคณะ (2554) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ค่าพีเอช ควา มชื้น รวมทั้งปริมาณคลอเรตตกค้างในดิน โดยใช้ตัวอย่างดิน 3 กลุ่ม คือ ดินที่ไม่มีการใช้คลอเรด ดินที่ใช้คลอเรตติดต่อกันนานเกิน 5 ปี และกลุ่มสุดท้ายคือดินที่ใช้คลอเรตติดต่อกันนาน 2 ปี และหยุดใช้เป็นระยะเวลานาน 3 ปี สรุปรายงานไว้ว่าความเป็นกรดต่างของดินที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร มีค่าพีเอชเป็นกลาง และดินแต่ละกลุ่มมีค่าพีเอช และความชื้นในดินไม่แตกต่างกันในเชิงสถิติ แต่ตรวจไม่พบคลอเรตที่ดินระดับความลึกนี้ โดยให้เหตุผลไว้ว่า เนื่องจากการเก็บตัวอย่างดินที่มีการใช้คลอเรต เป็นการเก็บภายหลังจากมีการใส่สารลงไปแล้ว 203 วัน จึงอาจเกิดการสลายตัวไปตามธรรมชาติ ในขณะที่การวิจัยครั้งนี้ตรวจพบคลอเรตตกค้างในตัวอย่างดินอยู่เฉลี่ยอย่างน้อย 1.2 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นตัวอย่างดินที่เก็บหลังจากมีการใส่คลอเรตนาน 6 เดือน อาจเป็นเพราะจำนวนครั้งที่ใส่ต่อปีมากกว่า และมีระยะการใช้ต่อเนื่องมาตลอด

2.4 กิจกรรมของเอนไซม์ในดิน

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรสารในดิน และแสดงถึงความสมบูรณ์ของดิน ได้แก่ dehydrogenase urease phosphatase protease และ cellulose นั้น ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

การวิคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างดิน

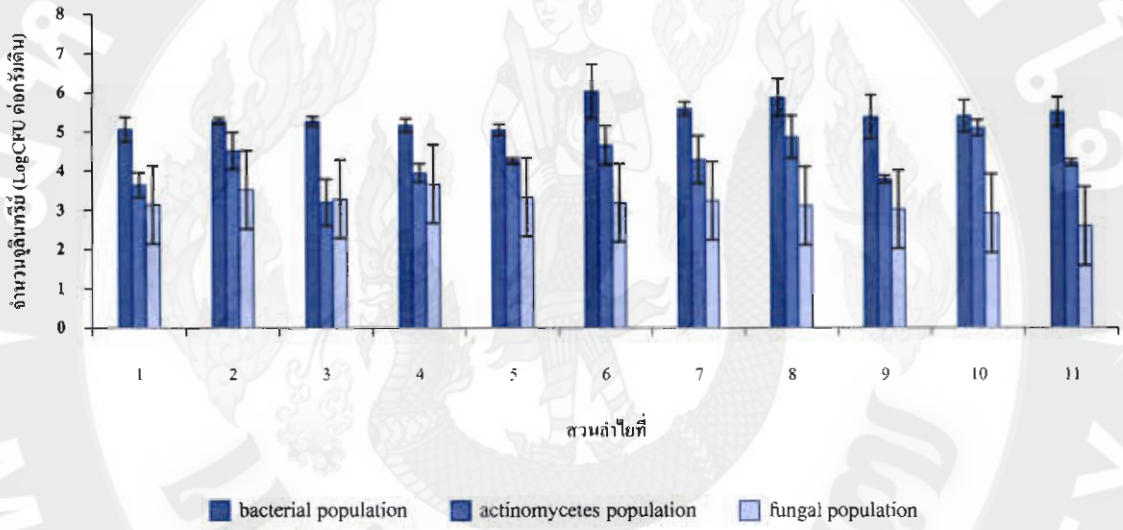
จากการตรวจปริมาณเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซีท ในอาหาร nutrient agar ผสม nystatin (NA) streptomycin rose bengal agrar (SRA) และ starch casein agar (SCA) (ภาพที่ 1) โดยปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างอยู่ที่ 4.6-6.6 Log CFU ต่อกรัมดิน จำนวนแอคติโนมัยซีท 2.8-5.3 Log CFU ต่อกรัมดิน และมีปริมาณเชื้อราอยู่ในช่วง 2.3-4.4 Log CFU ต่อกรัมดิน (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่างดินสวนลำไย

สวนลำไยที่	กิจกรรมของเอนไซม์ในดิน				
	Dehydrogenase	Urease	Phosphatase	Protease	Cellulose
1	1.2	0.4	0.5	8.6	1.2
2	0.5	1.0	0.5	6.9	1.2
3	1.4	0.4	4.4	7.2	1.1
4	0.4	0.5	2.0	7.7	4.4
5	0.5	0.5	3.8	8.8	2.0
6	0.5	1.0	2.9	8.6	3.8
7	1.0	0.5	0.4	5.5	2.9
8	1.0	0.5	1.0	10.3	0.4
9	0.4	0.5	1.0	5.2	0.4
10	0.5	1.4	0.4	5.5	1.4
11	1.0	1.0	0.5	5.5	0.9

แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซีท

ภาพที่ 2 ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จำเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์



ภาพที่ 3 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เฉลี่ยในตัวอย่างดิน

การคัดแยก chlorate reducing bacteria จากดินสวนลำไย และกากตะกอนน้ำเสีย

หลังจากการทำการ enrichment ตัวอย่างดินในอาหาร minimal medium และทำมาแยกเชื้อแบคทีเรียอีกครั้งใน agar tube และ agar plate ซึ่งมีการเติมโพแทสเซียมคลอเรต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เจริญได้ในอาหารดังกล่าว ได้ทั้งสิน 59 ไอโซเลต จากการทดสอบเบื้องต้นเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน จำนวน 47 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อนและมีการสร้างสปอร์ 4 ไอโซเลต อีก 8 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการสลายคลอเรตในอาหารเหลวที่มีการเติมโพแทสเซียมคลอเรตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พบว่า การสลายโพแทสเซียมคลอเรตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 59 ไอโซเลต สามารถสลายคลอเรตได้ 86-98

เปอร์เซ็นต์ โดยมีเชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการสลายคลอเรตได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ คือ 9-5F, C2-3B และ K7-5C โดยสามารถสลายได้ 98.1, 97.2 และ 97.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการศึกษาผลของความเป็นกรดด่าง การเติมน้ำตาลกลูโคสต่อการย่อยสลายคลอเรต

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต มาศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการสลายคลอเรตในอาหารเหลวที่มีค่าพีเอช 5, 7 และ 9 พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตที่ทดสอบ มีความสามารถในการย่อยสลายคลอเรตที่สภาวะที่เป็นกรด และต่างต่ำกว่าในสภาวะที่เป็นกลาง รวมทั้งในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสลงไป ดังแสดงใน ตารางที่ 4 ซึ่งจากผลการทดลองนี้ในเรื่องของผลของความเป็นกรดด่างต่อการสลายคลอเรตนั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiang et al. (2009) ซึ่งได้รายงานสภาวะที่เหมาะสมของการสลายคลอเรตในดินที่มีการเติมกากตะกอนจุลินทรีย์คือ ค่าพีเอชที่เป็นกลาง แต่สำหรับการเติมน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของการเจริญของจุลินทรีย์ลงไป ทั้งในงานวิจัยของ Ongprasert et al. (2002) รวมทั้ง Jiang et al. (2009) ได้เคยทดสอบการใส่สารละลายกากน้ำตาลลงไปในดินเพื่อดูผลต่อการสลายคลอเรตพบว่าการเติมกากน้ำตาลส่งเสริมการสลายตัวของคลอเรต แต่ในการทดลองในอาหารเหลว minimal medium ให้ผลในเชิงลบต่อการสลายคลอเรต ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมแทบอลิซึมของของเชื้อแบคทีเรียที่สลายคลอเรตซึ่งได้ทราบภายหลังว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้น้ำตาลผ่านกระบวนการออกซิเดชั่น ดังนั้นในกระบวนการดังกล่าวจะใช้ออกซิเจนทำหน้าที่เป็น electron acceptor ในขณะที่สารประกอบคลอเรตซึ่งในเชื้อแบคทีเรียใช้เป็น electron acceptor เช่นเดียวกัน (Weelink et al., 2008; Coates et al., 1999) จึงถูกสลายไปได้น้อย

ตารางที่ 4 การสลายคลอเรตในระดับหลอดทดลองของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

Isolate no.	เปอร์เซนต์การสลายคลอเรต*			
	pH5	pH7	pH9	เติมกลูโคส
9-5F1	90.1	98.1	74.5	89.6
C2-3B	89.2	97.2	88.6	89.4
K7-5C	91.6	97.0	87.7	88.9

* ค่าเฉลี่ย (n=2)

จากนั้นได้ทำการศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลตนี้ ในการย่อยสลายคลอเรตในตัวอย่างดิน โดยปรับให้ดินมีค่าพีเอชที่เริ่มต้นแตกต่างกันคือ 5, 7 และ 8 ที่ระยะเวลาทดสอบนาน 7 วัน พบว่า ในตัวอย่างดินที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายคลอเรตลงไปมีอัตราการย่อยสลายคลอเรตสูงกว่าดินที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรียลงไป ดังแสดงใน ตารางที่ 5 โดยการสลายคลอเรตความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในแต่ละค่าพีเอชไม่มีค วามแตกต่างกันเมื่อมีการเติมเชื้อแบคทีเรียลงไป ดังแสดงใน ตารางที่ 5 และในตัวอย่างดินที่ไม่มีการเติมเชื้อก็มีการสลายตัวของคลอเรตด้วยเช่นกัน เนื่องจากในการเตรียมตัวอย่างดินครั้งนี้ไม่มีการฆ่าเชื่อตัวอย่างดินก่อน ดังนั้นในตัวอย่างดินนี้จึงมีเชื้อจุลินทรีย์ทั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และแอคติโนมัยซีทอยู่ก่อนหน้านี้อยู่แล้วโดยประมาณ คือ 10^5-10^7 CFU ต่อกรัมของดิน ซึ่งเป็นข้อมูลที่เก็บไว้ก่อนที่จะมีการเติมเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบลงไป ซึ่ง Ongprasert et al. (2002) ได้สรุปไว้ว่าจุลินทรีย์ในดินมีบทบาทสำคัญในการสลายคลอเรตในดิน โดยได้สรุปจากการศึกษาการสลายตัวของคลอเรตในดินที่ฆ่าเชื้อ และไม่ได้ฆ่าเชื้อ อย่างไรก็ดีในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเมื่อมีการเติมเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงไป อัตราการสลายคลอเรตจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสามารถของเชื้อที่ลงไปร่วมกับเชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติของดิน หรืออาจเกิดจากในดินที่มีการเติมเชื้อลงไปทำให้มีปริมาณเชื้อมากกว่าดินที่ไม่ได้เติม ซึ่งจะต้องมีการทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่าหากใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อในการทดลอง เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตนี้จะยังสามารถสลายคลอเรตในดินได้หรือไม่

ตารางที่ 5 การสลายคลอเรตในตัวอย่างดินของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

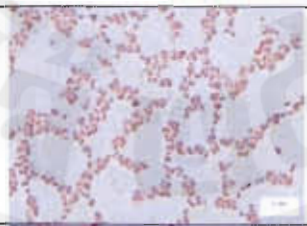
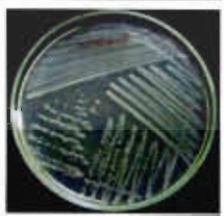
Isolate no.	เปอร์เซ็นต์การสลายคลอเรต (±SD)*		
	pH5	pH7	pH9
Control	40.5±0.3b	50.5±0.8b	39.5±1.2b
9-5F1	92.3±0.5a	93.4±0.8a	93.5±1.1a
C2-3B	90.4±0.7a	93.7±0.1a	93.3±0.9a
K7-5C	93.3±2.8a	92.4±1.0a	92.0±1.0a

* Mean±SD (n=3)

การจำแนกชนิดของ chlorate reducing bacteria

จากการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสลายคลอเรต โดยการศึกษาลักษณะพื้นฐานทางสรีรวิทยา พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และรูปร่างเป็นท่อน ซึ่งเมื่อจำแนกชนิดโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www. ncbi.nlm.nih.gov) พบว่า เชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตนี้มีความคล้ายกับ *Pseudomonas* sp. (96-99%) ดังแสดงในตารางที่ และภาพที่ ซึ่งจากรายงานของ Logan (1998) และ Steinberg และคณะ (2005) กล่าวไว้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Proteus*, *Pseudomonas* และ *Rhodobacter* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้ หรือสลายคลอเรตได้ แต่ในการสลายคลอเรตโดยแบคทีเรียเหล่านี้มักถูกยับยั้งโดยออกซิเจน ยกเว้นแต่จีนัส *Pseudomonas* เท่านั้น ซึ่งจากขั้นตอนในการแยกไม่ได้ใช้สภาวะที่ไร้ออกซิเจนดังนั้นโอกาสเป็นไปได้สูงที่เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการรสลายคลอเรตที่แยกได้คือ เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* เพราะไม่ถูกยับยั้งโดยออกซิเจน

ตารางที่ 6 การจำแนกชนิดของ chlorate reducing bacteria

ชื่อไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย
9-5F1			*Pseudomonas* sp. HR 26
C2-3B			*Pseudomonas* sp. bD39(2011)
K7-5C			*Pseudomonas sp.* B3(2010)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

GAGCGGCAGCGGGTCCTTCGGGATGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCT
AGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAC
GTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGT
CGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCT
GAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAGTTAA
TACCTGGTTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCG
CCCGCGG

ภาพที่ 4 ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท 9-5F-1 (ความยาว 461 คู่เบส) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. HR 26 99%

GAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA
GGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACG
TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTC
GGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTG
AGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTG
AAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAAT
ACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGC
GTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATC
CATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATAC
TGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCT
AACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGGTTAAAACTCAAATG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGGGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCCC
GAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCCGAACCTTGCAGAAATTCCGAGGGTGCC
TTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTTGCAGGGCTTGCCTCCAGCTCCGTGCCGCGAG
ATGTTGGGGTT

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท C2-3B (ความยาว 1031 คู่เบส) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. bD39(2011) 98%

TCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCC

TAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATA

CGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGG

TCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTC

TGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG

CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT

GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTT

AATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAG

CAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG

CGCGTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC

ATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGG

TGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGA

TACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG

TCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA

ACCTAACGCGATAAAGTCGACCCGCCTGGGGAAGTACGGGCCGCAAGGGTAAAAAC

TCAAATTGAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAGCCGGTGGAAGAATGTGGGTTTAATT

TCGAAGCAACCGCGAAAAAACCTTTACCTGGGCCTTTGACATTGTCCCGGAAACCTT

TGCAAGAGATTGCAAGGGTGTGCCTTCGCGGAAATCCGGAAACACAAGGTTGCTTGC

ATGGGCTTGTCCGTCAGCCTCGTGTGTCCTG

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท K7-5C (ความยาว 1051 คู่เบส) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยแสดงความเหมือนต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Pseudomonas sp.* B3(2010)

สรุปผลการทดลอง

1. จากงานวิจัยพบปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างอยู่ที่ 4.6-6.6 Log CFU ต่อกรัมดิน จำนวนแอคติโนมัยซีท 2.8-5.3 Log CFU ต่อกรัมดิน และมีปริมาณเชื้อราอยู่ในช่วง 2.3-4.4 Log CFU ต่อกรัมดิน คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีพบว่า ดินมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.9-7.6 ปริมาณคลอเรตในดินไม่เกิน 10 พีพีเอ็ม และในตัวอย่างดินตรวจพบเอนไซม์ดินที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรสาร

2. สามารถคัดแยก chlorate reducing bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการสลายคลอเรตได้สูง จำนวน 3 ไอโซเลท โดย การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย โดยการหาลำดับเบส 16S rRNAพบว่า มีความใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* sp.

3. อุณหภูมิที่ทดสอบว่าเชื้อสามารถสลายคลอเรตได้ในอัตราสูงที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส และในดินทีมีมีค่าพีเอชที่ 7

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ ชูฉัตร. 2546. ผลของสารโพแทสเซียมคลอเรตต่อเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในลำไย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 97 น.

ปริศนา วิริยะจิตสมบูรณ์. 2547. ผลกระทบสารโพแทสเซียมคลอเรตต่อเชื้อรา *Fusarium* ในสวนลำไย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 101 น.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์, พาวิน มะโนชัย, นพมณี โทปุญญานนท์, ธีรนุช จันทรชิต, วินัย วิริยะอลงกรณ์, และพิชัย สมบูรณ์วงศ์. 2543. การผลิตลำไย. โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตลำไยและลิ้นจี่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. สิรินาฎการพิมพ์. 128 น.

พาวิน มะโนชัย, วรินทร์ สุทนต์, จิรนันท์ เสนานาญ, พิชัย สมบูรณ์วงศ์, ธีรนุช เจริญกิจ, ยุทธนา เขาสุเมรุ, จริยา วิสิทธิ์พานิช, ชาตรี สิทธิกุล. 2550. การผลิตลำไยนอกฤดู. โรงพิมพ์ยูเนี่ยนออฟเซต. เชียงใหม่. 34 น.

พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์, ดุษฎี ณ ลำปาง, และรำไพพรรณ อภิชาตพงศ์ชัย. 2542. **ลำไย: ไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรม.** พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: โรงพิมพ์มิ่งเมือง. 137 น.

รุจิรา เนตรผาบ, สกุณณี บวรสมบัติ, เบ็ญจวรรณ รัตนเสถียร, ประศักดิ์ ถาวรยุติการด์. 2554. ผลกระทบของสารกลุ่มคลอเรตต่อสมบัติดินในสวนลำไย. การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11. 408-414.

สมชาย องค์ประเสริฐ, ปฏิภาณ สุทธิกุลบุตร, และศุภธิดา อ่ำทอง. 2544. **การประเมินผลกระทบของการใช้สารคลอเรตในสวนลำไยต่อสิ่งแวดล้อม.** วารสารเคหเกษตร. 25: 142-144.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. ลำไย: เนื้อที่ยืนต้น เนื้อที่ให้ผลผลิต ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2554. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/fruit/images/production/longan/longan010655.pdf (11 ตุลาคม 2555).

สุภาภรณ์ สาชาติ, เกษมสันต์ ผลากร, จารุพรรณ มนัสสากร และวิทย์ นามเรืองศรี. 2553. วิจัยโครงสร้างการผลิต การตลาด และผลกระทบจาก FTA. แหล่งที่มา http://puparn.rid.go.th:8080/pikmas/handle/123456789/14783 (11 ตุลาคม 2555).

Bruce, R.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D. 1999. Reduction of (per)chlorate by novel organism isolate from paper mill waste. **Environmental Microbiology**. 44: 319-329

Chiswell, B. and Keller-Lehmann, B. 1993. Spectroscopic method for the determination of chlorite and chlorate. **Analyst**. 118: 1457-1459.

Das Shonkor Kumar and Varma Ajit. 2010. Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. In. Soil Enzymology. Girish Shukla and Ajit Varma (eds.). **Springer-Verlag, Germany.** 22: 25-42

Ginkel, C.G, Plugge, C.M., Stroo, C.A. 1995. Reduction of chlorate with various energy substrates and inocula under anaerobic. **Chemosphere**. 31: 4057-4066.

Jiang, C., Li, H., Lin, C. 2008. Effects of activated sludge on the degradation of chlorate in soils under varying environmental conditions. **Hazardous Materials**. 162: 1053-1058.

Kalra, Y.P. 1995. Determination of pH of soils by different methods: Collaborative study, **AOAC INTERNATIONAL**. 78: 310-321.

Lima, J.A., Nahas, E., Gomes, A.C. 1996. Microbial population and activities in sewage sludge and phosphate fertilizer-amended soil.

Manochai, P., P. Sruamsiri, W. Wiriya-alongkorn, D. Naphrom, M. Hegele and F. Bangerth. 2005. Year around off season flower induction in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) trees by KClO3 applications: potentials and problems. Scientia Horticulture 104:379-390.

Oliver, C.E., Beier, R.C., Hume, M.E., Horrocks, S.M., Casey, T.A., Caton, J.S., Misbet, D.J., Smith, D.J., Krueger, N.A., Anderson, R.C. 2009. Effect of chlorate, molybdate, and

shikimic acid on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in aerobic and anaerobic cultures. Anaerobe. Doi:10.1016/j.anaerobe.2009.05.006.

Oltmann, L.F., Reifnders, W.N., Stouthamar, A.H. 1976. The correlation between the protein composition of cytoplasmic membranes and the formation of nitrate reductase A, chlorate reductase C and tetrathionate reductase in *Proteus mirabilis* wild type and some chlorate resistant mutants. Arch. Microbiol. 111, 25-35.

Pascual, J.A., Harnandez, T., Garcia, C., Ayuso, M. 1998. Enzymatic activities in arid soil amended with urban organic wastes: Laboratoru experiment. Bioresource Technology. 64, 131-138.

Steinberg, L.M., Trimble, J.J., Logan, B.E. 2005. Enzymes responsible for chlorate reduction by *Pseudomonas* sp. are different from those used for perchlorate reduction by *Azospira* sp. FEMS Microbiology. Letters, 247. 153-159.

Sutigoolabud, P., Senoo, K., Ongprasert, S., Mizuno, T., Mishima, T., Hisamatsu, M., Obata, H. 2005. Decontamination of chlorate in longan plantation soils by biostimulation with molasses amendment, Soil Sci. Plant Nutr.,51, 583–588.

Sylvia, D., J. Fuhrmann, P. Hartel and D. Zuberer. 2005. Principles and applications of soil microbiology. 2nd ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. 640 p.

Thorell, H.D., Stenklo, K., Karlsson, J., Nilsson, T. 2003. A gene cluster for chlorate metabolism in *Ideonella dechloratans*. Applied and Environmental Microbiolgy. 69, 5585-5592.

Wu, J., Unz, R.F., Zhang, H., Logan, B.E. 2001. Peristence of perchlorate and the relative numbers of perchlorate- and chlorate-respiring microorganisms in natural waters, soils, and wastewater. Bioremediation Journal. 5, 119-130.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลพื้นที่เก็บตัวอย่างดินสวนลำไย

1. **เจ้าของสวน** คุณอาทิตย์ จุมแก้ว **บ้านเลขที่** 195 ม. 3 ต.แม่แฝก อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 1 ไร่ 2 งาน **จำนวนต้นลำไย** 30 ต้น **อายุต้นลำไย** 10 ปี

การใส่ปุ๋ย ปุ๋ยสูตร 25-0-7 และมูลไก่

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต และปุ๋ยขี้ไก่ ใส่ 2 ครั้งต่อ 1 ปี

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต ทำให้ต้นลำไยสูงขึ้น มีการเจริญเติบโตดี มีผลผลิตสูงขึ้น

2. **เจ้าของสวน** คุณ ปราณี จันต๊ะวงค์ **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 4 **ไร่** **จำนวนต้นลำไย** 100 ต้น **อายุต้นลำไย** 20 ปี **การใส่ปุ๋ย** ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ,13-13-21

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน กรกฎาคม โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 1 kg/ต้น เพื่อเร่งให้ลำไยออกตอกนอกฤดูกาล

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต ทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น ลูกดก และผิวสวย

3. **เจ้าของสวน** คุณ สุธรรม อุดอารมณ์ **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 1ไร่ 2 งาน **จำนวนต้นลำไย** 25 ต้น **อายุต้นลำไย** 12 ปี

การใส่ปุ๋ย ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ,18-24-24 และปุ๋ยชีวภาพ

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน พฤษภาคม ทำการใส่ 7 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 0.5 kg/ต้น นำมาผสมน้ำแล้วฉีดพ่นรอบๆ ต้นลำไย

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต เพื่อให้ได้ลำไยนอกฤดูกาล ลูกดก และผิวสวย

4. **เจ้าของสวน** คุณ พนัสชัย เตจ๊ะ **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 2 **ไร่** **จำนวนต้นลำไย** 30 ต้น **อายุต้นลำไย** 15 ปี **การใส่ปุ๋ย** ปุ๋ยสูตร 15-15-15

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน มิถุนายน ทำการใส่สาร จำนวน 6 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 2 kg/ต้น ราดบริเวณรอบๆทรงพุ่มลำไย

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต เพื่อให้ได้ลำไยนอกฤดูกาล เพราะขายได้ในราคาแพง

5. **เจ้าของสวน** คุณ คำปัน ปัญญาจักร **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 2 **ไร่** 2 **งาน** **จำนวนต้นลำไย** 56 ต้น **อายุต้นลำไย** 10 ปี

การใส่ปุ๋ย ปุ๋ยสูตร 15-15-15, 5-3-4 และ ปุ๋ยคอก

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน พฤษภาคม ทำการใส่ สาร จำนวน 15 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 1-2 kg/ต้น นำมาทำราดบริเวณรอบๆ ทรงพุ่มลำไย

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต เพื่อให้ได้ลำไยนอกฤดูกาล เพราะขายได้ในราคาแพง

6. **เจ้าของสวน** คุณ จันคำ อินถานันท์ **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 1 **ไร่** 2 **งาน** **จำนวนต้นลำไย** 12 ต้น **อายุต้นลำไย** 8 ปี

การใส่ปุ๋ย ปุ๋ยสูตร 15-15-15, 13-21-0 และ ปุ๋ยคอก

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน พฤษภาคม ทำการใส่สาร จำนวน 4 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 1 kg/ต้น ราดบริเวณรอบๆทรงพุ่มลำไย

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต เพื่อให้ได้ลำไยนอกฤดูกาล เพราะขายได้ในราคาแพง

7. **เจ้าของสวน** คุณจันทร์แก้ว ถาวร **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 1 ไร่ 55 ตารางวา **จำนวนต้นลำไย** 30 ต้น **อายุต้นลำไย** 15 ปี **การใส่ปุ๋ย** ปุ๋ยคอก, ปุ๋ยชีวภาพ

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน ธันวาคม ทำการใส่สาร จำนวน 7 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 1 kg/ต้น ราดบริเวณรอบๆทรงพุ่มลำไย

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต เพื่อให้ได้ลำไยนอกฤดูกาล เพราะขายได้ในราคาแพง

8. **เจ้าของสวน** คุณสาย กันยารัด **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 2 ไร่ 1 งาน **จำนวนต้นลำไย** 60 ต้น **อายุต้นลำไย** 12 ปี

การใส่ปุ๋ย ปุ๋ยสูตร 15-15-15 , ปุ๋ยคอก และปุ๋ยชีวภาพ

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน ธันวาคม ทำการใส่สาร จำนวน 5 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 1 kg/ต้นลำไยต้นเล็ก และที่ความเข้มข้น 1.5 kg/ต้นลำไยต้นใหญ่ราดบริเวณรอบๆทรงพุ่มลำไย บางครั้งก็ทำการฉีดพ่นสลับกับการราด

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต เพื่อให้ได้ลำไยนอกฤดูกาล เพราะขายได้ในราคาแพง

9. **เจ้าของสวน** คุณ บุญเท่ง แดงดำ **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 2 ไร่ **จำนวนต้นลำไย** 50 ต้น **อายุต้นลำไย** 18 ปี

การใส่ปุ๋ย ปุ๋ยสูตร 15-15-15,4-16-0, 12-6-33, ปุ๋ยคอกและปุ๋ยชีวภาพ

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน ธันวาคม ทำการใส่สาร จำนวน 10 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 1-2 kg/ต้น ราด บริเวณรอบๆทรงพุ่มลำไย

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต เพื่อให้ได้ลำไยนอกฤดูกาล เพราะขายได้ในราคาแพง

10. เจ้าของสวน คุณจันทร์นวล สละดีจันทร์ **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 5 **ไร่** 2 งาน **จำนวนต้นลำไย** 100 ต้น **อายุต้นลำไย** 22 ปี

การใส่ปุ๋ย ปุ๋ยสูตร 25-7-7, 0-0-60, ปุ๋ยชีวภาพ, ปุ๋ยคอกและขี้ค้างคาว

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน ธันวาคม ทำการใส่สาร จำนวน 10 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 1-1.5 kg/ต้น ราดบริเวณรอบ ๆทรงพุ่ม ลำไย

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต เพื่อให้ได้ลำไยนอกฤดูกาล เพราะขายได้ในราคาแพง

11. **เจ้าของสวน** คุณดา คณะเป็ง **ตำแหน่งที่เก็บ** บ้านหนองคัน ต.แม่สอย อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

พื้นที่ 4 **ไร่** 2 งาน **จำนวนต้นลำไย** 104 ต้น **อายุต้นลำไย** 22 ปี

การใส่ปุ๋ย ปุ๋ยสูตร 15-15-30, 15-15-60, ปุ๋ยชีวภาพและ ปุ๋ยคอก

การใช้สารกลุ่มคลอเรต ใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยเริ่มใช้สารในช่วงเดือน ธันวาคม ทำการใส่สาร จำนวน 5 ครั้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรต ที่ 1 kg/ต้น ราดบริเวณรอบๆทรงพุ่มลำไย

เหตุผลที่ใช้สารกลุ่มคลอเรต เพื่อให้ได้ลำไยนอกฤดูกาล เพราะขายได้ในราคาแพง

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Mineral medium for enrichment chlorate reducing bacteria (Ginkel et al., 1995)

$KClO_3$	1	กรัม/ลิตร
K_2HPO_4	1.55	กรัม/ลิตร
NaH_2PO_4	0.85	กรัม/ลิตร
$NH_4H_2PO_4$	0.5	กรัม/ลิตร
$MgSO_4$	0.1	กรัม/ลิตร
EDTA	10	มิลลิกรัม/ลิตร
$ZnSO_4$	2	มิลลิกรัม/ลิตร
$CaCl_2$	1	มิลลิกรัม/ลิตร
$FeSO_4$	5	มิลลิกรัม/ลิตร
Na_2MoO_4	0.2	มิลลิกรัม/ลิตร
$CuSO_4$	0.2	มิลลิกรัม/ลิตร
$CoCl_2$	0.4	มิลลิกรัม/ลิตร
$MnCl_2$	1	มิลลิกรัม/ลิตร

Starch Casein Agar

Soluble starch	10	กรัม/ลิตร
K_2HPO_4	2	กรัม/ลิตร
KNO_3	2	กรัม/ลิตร
NaCl	2	กรัม/ลิตร
Casein	0.4	กรัม/ลิตร
$MgSO_4$	0.5	กรัม/ลิตร
$CaCO_3$	0.1	กรัม/ลิตร
$FeSO_4$	0.01	กรัม/ลิตร
Agar	15	กรัม/ลิตร

Streptomycin Rose Bengal Agar

Glucose	10	กรัม/ลิตร
Peptone	5	กรัม/ลิตร
KH_2PO_4	1	กรัม/ลิตร
$MgSO_4$	0.5	กรัม/ลิตร
Rose Bengal	30	มิลลิกรัม/ลิตร
Streptomycin	30	มิลลิกรัม/ลิตร
Agar	20	กรัม/ลิตร

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์เอนไซม์

1. การวิเคราะห์เอนไซม์ protease

สารละลายสำหรับการวิเคราะห์

1) Tris buffer (50 mM, pH 8.1)

2) 2% sodium caseinate (2%)

ละลาย sodium caseinate 10 กรัม ในสารละลาย 50 mM Tris buffer pH 8.1 ปรับด้วย สารละลาย NaOH ให้ได้ pH 8.1 ด้วย ปรับปริมาตรด้วย Tris buffer (50 mM, pH 8.1) เป็น 500 มิลลิลิตร โดยขวดปรับปริมาตร

1. 15%Trichloroacetic acid (TCA)

ละลาย TCA 75 กรัม ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ในขวดปรบปริมาตร

2. Alkaline reagent

สารละลาย A : นำ NaOH เข้มข้น 1 M ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่น จากนั้นละลาย Na_2CO_3 50 g มาละลายจากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย B : ละลาย copper sulphate 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C : ละลาย Potassium sodium tartrate 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย B 20 มิลลิลิตร กับ สารละลาย C 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยสารละลาย A

3. Folin –Ciocalteu eagent (33%)

4. สารละลายมาตรฐาน Tyrosine ความเข้มข้น 500 µg/มิลลิลิตร

ละลาย tyrosine 50 มิลลิลกรัม ใน tris buffer pH 8.1 ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วย Tris buffer pH 8.1

การเตรียมกราฟมาตรฐานของ tyrosine

1) เติมสารละลายมาตรฐาน Tyrosine สารละลาย sodium caseinate และ Tris buffer pH 8.1 ในปริมาตร ตามตาราง ลงในหลอดทดลอง ตามลำดับ
2) เติมสารละลาย TCA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3) นำไป Centrifuge ที่ 5000 rpm นาน 5นาที
4) ดูดส่วนใส 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดใหม่
5) เติม alkaline reagent ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร
6) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นเติม Folin reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
7) ตั้งไว้นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังที่ความยาวคลื่น 700 nm (A700)
8) สร้างกราฟสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น tyrosine และ A700

ตาราง การเตรียมกราฟมาตรฐาน tyrosine

สารละลายมาตรฐาน tyrosine (มิลลิลิตร)	Tris buffer pH8.1 (มิลลิลิตร)	สารละลาย sodium caseinate (มิลลิลิตร)
0	5	5
1	4	5
2	3	5
3	2	5
4	1	5
5	0	5

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ protease

1) ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม
2) เติม Tris buffer pH 8.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ สารละลาย sodium caseinate 5 มิลลิลิตร
3) เขย่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4) Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm นาน 5 นาที

5) นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ เทียบกับกราฟมาตรฐาน tyrosine ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น

การวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

การเตรียมสารละลาย

1. **2 M acetate buffer pH 5.5**
   1) ชั่ง Sodium acetate 164.08 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร
   2) ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.5 ด้วย acetic acid แล้วทำการปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร
2. **Caboxymethyl cellulose sodium salt solution (0.7% w/v)**
   1.) ชั่ง CMC 7 g ละลายในสารละลาย acetate buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
   2.) กวน โดยใช้ Hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
   3.) สารละลายที่เตรียมได้ ใช้ได้ 1 สัปดาห์ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. **Reagent A**
   1.) ชั่ง anhydrous sodium carbonate ปริมาตร 16 g
   2.) ชั่ง Potassium cyanide 0.9 g.
   3.) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เป็น 1000 มิลลิลิตร
4. **Reagent B**
   1.) ชั่ง Potassium ferric haxacyanide 0.5 g.
   2.) ปรับปริมาตร ให้เป็น 1000 มิลลิลิตร. เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา
5. **Reagent C**
   1.) ชั่ง Ferric ammonium sulphate 1.5 g.
   2.) ชั่ง Sodium dodecyl sulphate 1 g.
   3.) เติม sulfuric acid ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตรที่ละลายในน้ำกลั่นและอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
   4.) ปรับปริมาตรสารละลายที่ได้ 1000 มิลลิลิตร
6. **สารละลายมาตรฐานกลูโคส**
   1.) ชั่ง Glucose monohydrate 28 mg ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างดินชื้นหนัก 10 กรัม บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลาย acetate buffer ปริมาตร 15 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย CMC ปริมาตร 15 มิลลิลิตร
4. ปิด flask นำเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 เพื่อแยกดินออกจากสารละลาย
6. ดูดสารละลายที่กรองแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร. มาเจือจางในน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร
7. ปิเปตสารละลายที่ทำการเจือจางแล้วมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
8. เติมสารละลาย Reagent A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร. และ สารละลาย Reagent B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร. ปิดฝาหลอดทดลอง
9. ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มใน น้ำที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
10. หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้รอให้อุณหภูมิลดลง ประมาณ 5 นาที
11. เติมสารละลาย Reagent C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
12. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความเข้มข้นของแสงที่ 690 nm บันทึกผลเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

การทำ Callibration curve

1. ปิเปตสารละลาย Glucose monohydrate solution ใส่ลงในหลอดทดลอง ใช้ปริมาตรดังนี้

0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร.

2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 1 มิลลิลิดร
3. เติม Reagent A, Reagent B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
4. ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มใน น้ำที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5. หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้รอให้อุณหภูมิลดลง ประมาณ 5 นาที
6. เติมสารละลาย Reagent C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
7. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความเข้มข้นของแสงที่ 690 nm. นำไปทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

การคำนวณ

Glucose equivalent (µg/g dwf 24 /h)

แทนค่าในสูตร $\frac{C \times V \times f}{Sw \times dwf}$

C คือ ความเข้มข้นของกลูโคส (µg/มิลลิลิตร)

V คือ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ทดสอบในระบบ (30 มิลลิลิตร)

f คือ dilution factor (20 มิลลิลิตร)

Sw คือ น้ำหนักดินชื้นที่ใช้ (10 g)

dwf คือ น้ำหนักแห้งของตัวอย่างดิน 1 g.

ขั้นตอนการหาน้ำหนักแห้งของดิน โดยใช้วิธีเดียวกันกับวิธีการหาความชื้นในดิน

1. นำตัวอย่างดินชื้นไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร
2. นำ moisture can ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะอบให้เปิดฝา
3. นำ moisture can ที่อบแล้ว ปิดฝา .ใส่ dessicator ทิ้งไว้ให้เย็น
4. ชั่งน้ำหนัก moisture can ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนัก
5. ชั่งน้ำหนักดินประมาณ 1 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ moisture can
6. นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง
7. นำออกจากตู้อบ ใส่ใน dessicator เพื่อให้เย็นลง หลังจากนั้น ทำการชั่งน้ำหนัก และบันทึกผล
8. คำนวณหาความชื้นในตัวอย่างดินเทียบกับดิน 1 กรัมจะได้น้ำหนักดิน dry
9. weight / 1 g soil

การวิเคราะห์เอนไซม์ dehydrogenase

การเตรียมกราฟมาตรฐานของ triphenyl formazan (TPF)

1) เตรียมสารละลาย TPF ใน methanol ที่มีความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทั้งหมด 5 จุด

2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

3) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ TPF กับค่าการดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์เอนไซม์ dehydrodenase

1) ชั่งดิน 2 กรัม

2) เติมสารละลาย substrate (1% TTC) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในที่มืด นาน 24 ชั่วโมง โดย blank คือ ชุดการทดลองคือเติม Tris buffer แทน substrate

3) เติม methanol 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4) แยกส่วนของของเหลว ไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4500 rpm นาน 10 นาที

5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

6) เทียบหาความเข้มข้นของ TPF กับกราฟมาตรฐาน

7) คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์เอนไซม์ urease

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

1. สารละลาย 1M
2. สารละลาย 2M KCl
3. สารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
4. สารละลาย Phenol- Sodium nitroprusside
   - ชั่ง phenol 1 กรัม. ละลายในน้ำอุ่น เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
   - ละลาย Sodium nitroprusside 0.05 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
5. สารละลาย 0.02 M sodium hypochlorite
6. สารละลาย 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0

วิธีการวิเคราะห์เอนไซม์ urease

1) ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง
2) เติม 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
3) เติมสารละลาย 1 M Urea ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
4) บ่ม 30 นาที ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
5) เติมสารละลาย 2 M KCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
6) ผสม แช่ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์
7) Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5000 rpm นาน 5 นาที
8) นำส่วนใสปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเท่าปฏิกิริยากับสารละลาย phenol sodium nitroprusside ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
9) เติมสารละลาย 0.02 M sodium hypochlorite 5 มิลลิลิตร
10) บ่มที่มืด 30 นาที
11) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

การวิเคราะห์เอนไซม์ฟอสฟาเตส

สารละลายสำหรับการวิเคราะห์

1. Modified universal buffer (MUB) stock solution

Tris	12.1	กรัม
Maleic acid	11.6	กรัม
Citric acid	14.0	กรัม
Boric acid	6.3	กรัม

ละลายส่วนผสมลงในสารละลาย 1M sodium hydroxide ปริมาตรประมาณ 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. MUB pH 6.5

นำ MUB stock solution ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาปรับ pH ด้วยสารละลาย 0.1M hydrochloric ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

3. MUB pH 11

นำ MUB stock solution ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาปรับ pH ด้วยสารละลาย 0.1M sodium hydroxide ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 11 จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

4. สารละลาย p-nitrophenyl phosphate (PNPP) ความเข้มข้น 15 mM ใน MUB pH 6.5 หรือ MUB pH 11

5. สารละลาย 0.5M calcium chloride ($CaCl_2$)

วิธีการวิเคราะห์

1) ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงให้หลอดทดลอง เติม toluene 0.25 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลาย MUB pH 6.5 หรือ MUB pH 11 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

3) เติมสารละลาย 15 mM PNPP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

5) นำมาเติมสารละลาย 0.5M $CaCl_2$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.5M NaOH ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6) นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

7) นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm

8) นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ p-nitrophenyl

การเตรียมกราฟมาตรฐานของ p-nitrophenyl (PNP)

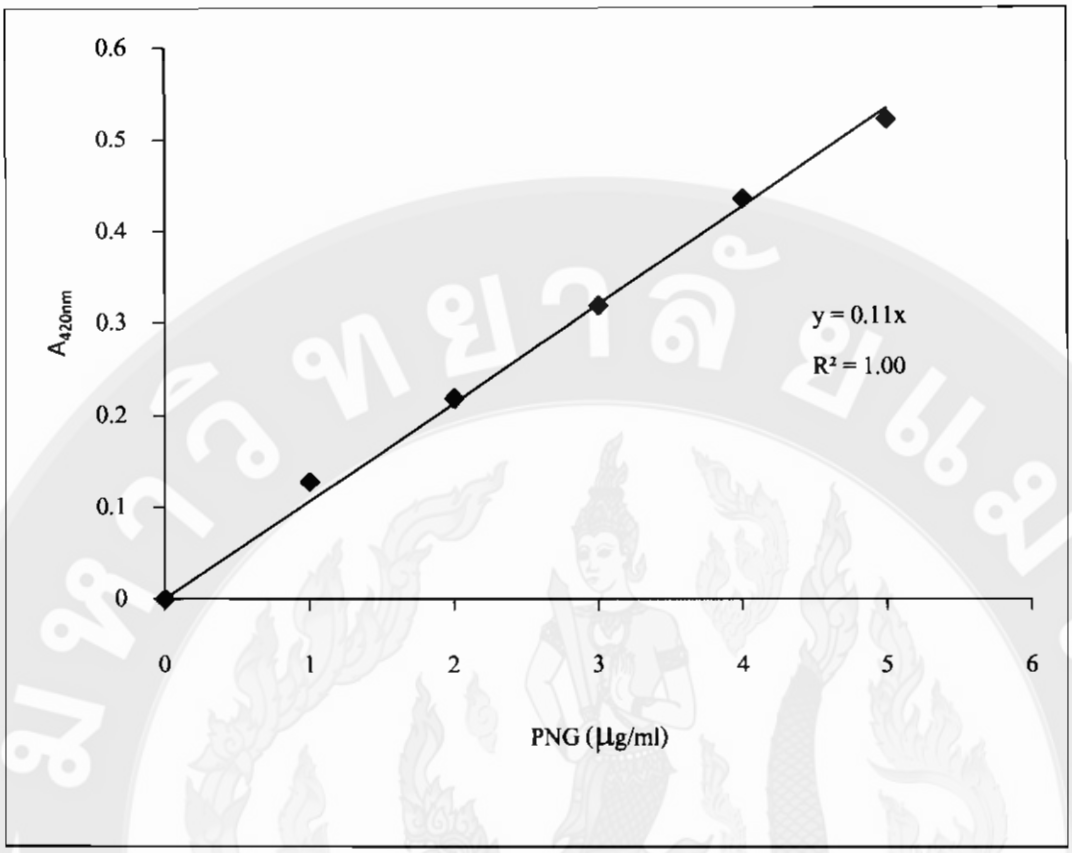
1) เตรียมสารละลาย PNP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางเป็น working solution ให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) นำ working solution ของ PNP มาใส่ในหลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้น 0-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแต่ละหลอดมีปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร

3) นำมาเติมสารละลาย 0.5M $CaCl_2$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.5M NaOH ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4) นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

5) นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร


0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
A_{420nm}
y = 0.11x
R^2 = 1.00
0
1
2
3
4
5
6
PNG (µg/ml)