บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองดำเนินการ ณ ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ ห้องปฏิบัติการกลาง ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติจุลชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการรวบรวมจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส
ขั้นตอนที่ 2 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส
ขั้นตอนที่ 3 เป็นการทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสในการต่อต้านจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช
ขั้นตอนที่ 4 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในการปลดปล่อยธาตุอาหารพืชจากวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร
ขั้นตอนที่ 5 เป็นการจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลสที่ผ่านการคัดเลือก

3.1 การรวบรวมจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส

รวบรวมจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส โดยใช้ตัวอย่างแหล่งต่างๆในการแยกเชื้อจำนวน 10 แหล่ง ดังต่อไปนี้

1. หัวเชื้อเร่งปุ๋ยหมักพด. 1 จากกรมพัฒนาที่ดิน จ.เชียงใหม่
2. มูลวัวแห้งจาก อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่
3. มูลวัวสดจาก อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่
4. ปุ๋ยหมักจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. ปุ๋ยหมักจากศูนย์วิจัยและฝึกอบรมแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
6. ดินบริเวณกองใบไม้แห้งทับถมบริเวณดอยสุเทพ จ.เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ดินบริเวณกองใบไม้แห้งจากจากศูนย์วิจัยและฝึกอบรมแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
8. กองข้าวเปลือกเหลือใช้จากจากศูนย์วิจัยและฝึกอบรมแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
9. ตะกอนหม้อกรอง (Filter cake) จากโรงงานน้ำตาลนครเพชร จังหวัดกำแพงเพชร
10. ดินจากพื้นที่ของเกษตรกรที่ปลูกสตอเบอรี่ ณ บ้านบ่อแก้ว อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง จากแหล่งตัวอย่างในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดกำแพงเพชร ใช้วิธีเลือกเก็บ 2 – 3 จุดต่อพื้นที่ บรรจุตัวอย่างในถุงพลาสติก แล้วนำมาหาชนิดและแยกเชื้อจุลินทรีย์ ในกรณีที่ไม่สามารถแยกเชื้อได้ทันทีจะเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 48 ชั่วโมง

การหาชนิดและแยกเชื้อจุลินทรีย์

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างแต่ละประเภทด้วยวิธี dilution plating technique ใช้อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มี Carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน สำหรับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราใช้สูตรอาหารของ Hankin and Anagnostakis (1977) (ภาคผนวก ก) ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีสใช้สูตรอาหารของ Weaver (1944) (ภาคผนวก ก) ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการใส่วุ้นลงในอาหาร ต้มเพื่อให้วุ้นละลาย เทอาหารใส่ขวดปิดจุกแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ต่อ 1 จาน ทิ้งไว้จนแข็งตัวจึง ปิดฝาแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อไว้ใช้ต่อไป

ในการทำ dilution ใช้ตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ในขวดน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 95 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดแก้วบรรจุน้ำ 9 มิลลิลิตรที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็น dilution ที่ 2 (10^{-2}) ทำเช่นเดียวกันจนถึง 10^{-6} ดูดสารละลายจาก dilution ที่ 10^{-6}, 10^{-5} และ 10^{-4} มา dilution ละ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารเกลี่ยให้ทั่วด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล รอให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งจึงคว่ำจานเพาะเชื้อ ปิดพาราฟิลที่ขอบจานเพาะเชื้อให้เรียบร้อย ใช้อุณหภูมิในการเพาะเชื้อ 2 ระดับ คือที่อุณหภูมิห้อง (Mesophile) และ 55 องศาเซลเซียส (Thermophile) เป็นเวลา 3 วัน คัดเลือกจุลินทรีย์ซึ่งมีลักษณะของโคโลนีที่ต่างกันทุกโคโลนี โดยใช้ loop แตะที่โคโลนีนั้นนำมา steak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์มากขึ้น จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ไว้ใน slant agar medium และเก็บรักษาไว้โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์

ตรวจสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท ด้วยวิธีของ Teacher และWood (1982) (ภาคผนวก ก) ซึ่งพิจารณาจากการเกิด clear zone ของจุลินทรีย์แต่ละประเภท โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทุกๆไอโซเลทที่แยกได้ในอาหารแข็ง CMC บ่มแยกตามประเภทของจุลินทรีย์ คือ Mesophile และ Thermophile เป็นเวลา 3 วัน ทดสอบ 3 ซ้ำต่อไอโซเลท วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและเส้นผ่าศูนย์กลาง clear zone ในแต่ละไอโซเลทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อใช้ในการดำเนินงานต่อไป โดยถือว่าจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีจะให้อัตราส่วนของขนาด clear zone ต่อขนาดโคโลนีมากที่สุด (clear zone ratio)

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

นำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่รวบรวมจากขั้นตอนที่ 1 โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (CZ) กับ colony (CL) (clear zone ratio)มากที่สุด 5 ไอโซเลทแรกของแต่ละประเภทจุลินทรีย์ทั้ง Mesophile และ Thermophile มาทดสอบประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส โดยนำจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี carboxymethyl cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน (CMC broth) เขย่าตลอดเวลา (shake culture) ที่อุณหภูมิห้องและ 55 องศาเซลเซียส ตามประเภทของจุลินทรีย์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อไอโซเลท แล้วนำมาสกัดเอนไซม์ (crude enzyme) โดยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อหาค่าการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ด้วย DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959) (ภาคผนวก ก) และการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) (ภาคผนวก ก) และคำนวนค่าการทำงานเฉพาะของเอนไซม์ (specific activity) (ภาคผนวก ก)

การสกัด crude enzyme ของเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมหัวเชื้อ (starter) ของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลทที่เป็นโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (ภาคผนวก ก) นำมาเพาะเลี้ยงใน nutrient broth (Atlas, 1993) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 30.0 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 125.0 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 20 นาที นำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิห้องและ 55 องศาเซลเซียส ตามประเภทของจุลินทรีย์ จนกระทั่งความเข้มข้นของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 10^9 cfu/ml จากนั้นนำ starter ของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน nutrient broth ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงลงใน CMC broth ที่มี 0.5% CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร ตลอดช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวจะเขย่า flask ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิห้องและ 55 องศาเซลเซียส ตามประเภท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของจุลินทรีย์ ความเร็ว 170 rpm ทำการเก็บเอนไซม์ที่เวลา 0 6 12 24 36 48 60 78 96 120 และ 168 ชั่วโมง โดยการนำน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร มาเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง high speed centrifuge ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนของเหลวใส (supernatant) มาเป็น crude enzyme ในกรณีที่ไม่สามารถใช้ของเหลวดังกล่าวได้ทันที จะเก็บรักษาตัวอย่างโดยการแช่แข็งไว้แต่ไม่เกิน 3 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำต่อไอโซเลท

การสกัด crude enzyme ของเชื้อแอคติโนมัยซีสและเชื้อรา

เตรียมหัวเชื้อ (starter) ของเชื้อแอคติโนมัยซีสและเชื้อรา โดยใช้ nutrient agar ที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีสหรือเชื้อราเจริญอยู่บนผิวหน้าของอาหารอย่างเต็มที่และตัดให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 8 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร ด้วย cork borer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำไปทำ spore suspension โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร (ศรีวรรณ, 2542) ใช้เครื่อง vortex ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายอยู่ในน้ำอย่างทั่วถึงและนำ spore suspension ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงลงใน CMC broth ที่มี 0.5% CMC เป็นแหล่งคาร์บอนปริมาตร 30.0 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 50.0 มิลลิลิตร ตลอดช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงจะเขย่า flask ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิห้องและ 55 องศาเซลเซียส ตามประเภทของจุลินทรีย์ ความเร็ว 170 rpm ทำการเก็บเอนไซม์ที่เวลา 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 วัน โดยนำน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมดมาเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง high speed centrifuge ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บ supernatant มาเป็น crude enzyme หากไม่นำตัวอย่างเอนไซม์ดังกล่าวไปใช้ทันที จะเก็บรักษาตัวอย่างโดยการแช่แข็งไว้ได้แต่ไม่เกิน 3 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำต่อไอโซเลท

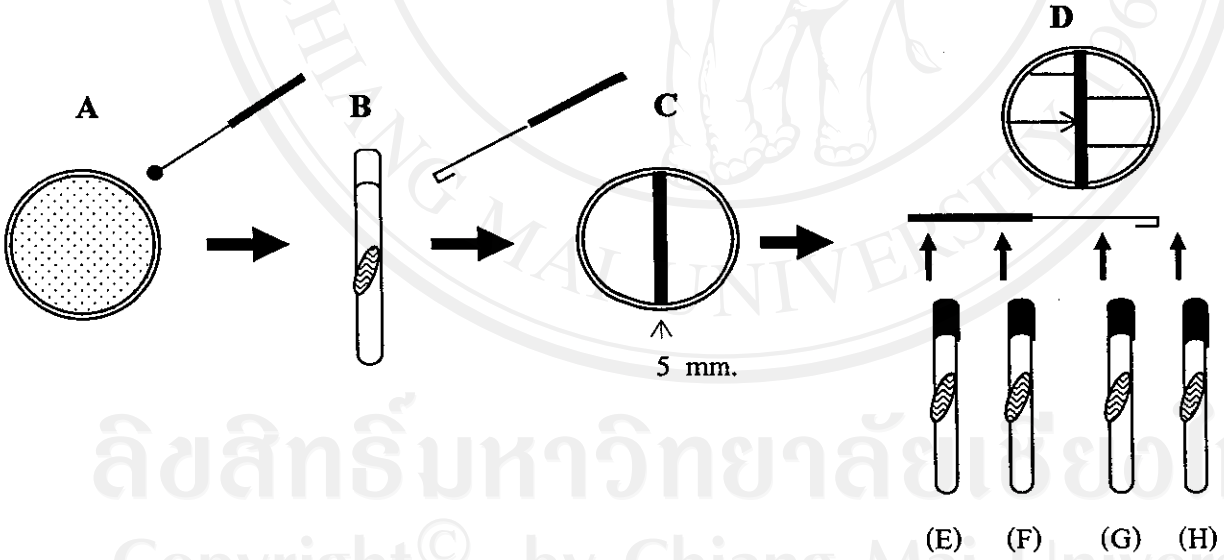
3.3 การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสในการต่อต้านจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

นำเชื้อจุลินทรีย์จากขั้นตอนที่ 2 ทุกไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ซึ่งได้จากพื้นที่เกษตรกรรมภายใต้การดูแลของมูลนิธิโครงการหลวง จำนวน 4 ตัวอย่าง ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อ	สาเหตุโรค	พืช	แหล่งที่มา
Fusarium spp.	โรคโคนเน่า	ลินิน	ขุนห้วยแห้ง
Collectotrichum fragariae	โรคแอนแทรกโนส	ไหลสตรอเบอรี่	บ่อแก้ว อ.สะเมิง
Rhizoctonia spp.	โรครากเน่า	ข้าว	แม่สะป๊อก
Sclerotium rolfsii	โรคลำต้นและผลเน่า	มะเขือเครือ	ทุ่งเริง

ทดสอบด้วยวิธี Cross-streak test (Pramer and Schmidt, 1967) โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ใน slant agar medium (B) ที่มีอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 มิลลิลิตร ลงใน slant tube ใช้ loop ฆ่าเชื้อขูดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเป็น suspension ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ใช้เข็มเขี่ยรูปตัวแอลที่ฆ่าเชื้อจุ่มลงใน suspension นำมา streak ผ่านเส้นผ่าศูนย์กลางของ plate ที่มีอาหารแข็ง PDA (C) โดย streak จากขอบด้านหนึ่งของ plate จนถึงอีกด้านหนึ่งและให้เส้น streak มีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร ให้ทำอย่างรวดเร็วและหลีกเหลี่ยงการกระเด็น บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิด (E-H) มา streak ลงใน plate เดิม (D) โดยเริ่ม streak จากขอบด้านข้างของ plate มาสิ้นสุดตรงกลางของจุลินทรีย์ทดสอบ ดังรูป วัดระยะห่างระหว่างการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชและเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำต่อไอโซเลท



3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในการปลดปล่อยธาตุอาหารพืชจากวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในการปลดปล่อยธาตุอาหารจากวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรเป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการภายใต้อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีทั้งหมด 12 การทดลอง (ตารางที่ 8) โดยใช้ตัวอย่างวัสดุเหลือใช้จาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรที่มีในปริมาณมากในภาคเหนือ และมีปริมาณธาตุอาหารพืชในวัสดุจำนวน 4 ชนิด คือ กากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสีย (N1) จากบ่อบำบัดน้ำเสียของบริษัทเคซี อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ ขี้เลื่อยหลังการใช้เพาะเห็ด (N2) ของบริษัทแพนสตาร์ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย ตะกอนหม้อกรองโรงงานน้ำตาล (P1) ของโรงงานน้ำตาลนครเพชร จ.กำแพงเพชร และ ใบยาสูบ (K1) ของสถานียาสูบ อ.ร้องกวาง จ.แพร่ สำหรับปริมาณธาตุอาหาร N P และ K และธาตุ C ในวัสดุเหลือใช้ทั้ง 4 ชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 9

วัสดุเหลือใช้แต่ละประเภทจะอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. ก่อนนำมาใช้

การใส่เชื้อจุลินทรีย์จะใช้เชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองขั้นที่ 1 - 3 ว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด 2 ลำดับแรก คือ เชื้อแบคทีเรียทนร้อนที่ได้จากกองใบไม้แห้ง ของศูนย์วิจัยและฝึกอบรมแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไอโซเลทที่ 4 และ เชื้อแอคติโนมัยซีสที่ได้จากกองปุ๋ยหมักคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไอโซเลทที่ 6 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละประเภทที่ใช้ในการทดลองในอาหารเหลวที่มี CMC เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องและ 55 องศาเซลเซียส ตามประเภทของจุลินทรีย์ ซึ่งความเข้มข้นของเซลล์ในอาหารเหลวไม่ต่ำกว่า 10^9 cfu/ml ใส่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดในอัตรา 10^7 เซลล์/กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 ชนิดของดิน วัสดุเหลือใช้ และ วิธีการฆ่าเชื้อในดินและวัสดุเหลือใช้ที่ใช้ในการศึกษาผลของจุลินทรีย์ดินที่ย่อยสลายเซลลูโลส ต่อการปลดปล่อยธาตุอาหารพืช ในวัสดุเหลือใช้ ด้วยวิธีการบ่มดิน

การทดลองที่	ชนิดดิน	ประเภทของวัสดุเหลือใช้	วิธีการฆ่าเชื้อ	ธาตุอาหาร
1	ดินสันทราย	กากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสีย	ไม่ฆ่าเชื้อ	ไนโตรเจน
		ของเหลือใช้หลังการใช้เพาะเห็ด	ไม่ฆ่าเชื้อ	ไนโตรเจน
2	ดินแม่เหียะ	กากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสีย	ไม่ฆ่าเชื้อ	ไนโตรเจน
		ของเหลือใช้หลังการใช้เพาะเห็ด	ไม่ฆ่าเชื้อ	ไนโตรเจน
3	ดินสันทราย	กากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสีย	ฆ่าเชื้อ	ไนโตรเจน
		ของเหลือใช้หลังการใช้เพาะเห็ด	ฆ่าเชื้อ	ไนโตรเจน
4	ดินแม่เหียะ	กากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสีย	ฆ่าเชื้อ	ไนโตรเจน
		ของเหลือใช้หลังการใช้เพาะเห็ด	ฆ่าเชื้อ	ไนโตรเจน
5	ดินสันทราย	ตะกอนหม้อกรองโรงงานน้ำตาล	ไม่ฆ่าเชื้อ	ฟอสฟอรัส
6	ดินแม่เหียะ	ตะกอนหม้อกรองโรงงานน้ำตาล	ไม่ฆ่าเชื้อ	ฟอสฟอรัส
7	ดินสันทราย	ตะกอนหม้อกรองโรงงานน้ำตาล	ฆ่าเชื้อ	ฟอสฟอรัส
8	ดินแม่เหียะ	ตะกอนหม้อกรองโรงงานน้ำตาล	ฆ่าเชื้อ	ฟอสฟอรัส
9	ดินสันทราย	เศษเหลือใบยาสูบ	ไม่ฆ่าเชื้อ	โพแทสเซียม
10	ดินแม่เหียะ	เศษเหลือใบยาสูบ	ไม่ฆ่าเชื้อ	โพแทสเซียม
11	ดินสันทราย	เศษเหลือใบยาสูบ	ฆ่าเชื้อ	โพแทสเซียม
12	ดินแม่เหียะ	เศษเหลือใบยาสูบ	ฆ่าเชื้อ	โพแทสเซียม

ในการทดลอง 1-4 ใช้แผนการทดลองแบบ 3x3 factorial มี 3 ซ้ำ มีปัจจัยในการทดลองมี 2 ปัจจัย ในการทดลองมี 2 ปัจจัย ได้แก่ การใส่วัสดุเหลือใช้ซึ่งมี 3 ตำรับ ได้แก่ การไม่ใส่วัสดุเหลือใช้ และการใส่วัสดุเหลือใช้ 2 ชนิด ดังระบุไว้ในตารางที่ 8 ในอัตราที่ให้ไนโตรเจน 200 มก.N ต่อดิน 1 กก. ส่วนปัจจัยที่ 2 คือ การใส่เชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมี 3 ตำรับ ได้แก่ การไม่ใส่เชื้อ การใส่เชื้อ และแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสอย่างละ 1 isolate ดังระบุไว้ข้างต้น

การทดลองที่ 4-8 ใช้แผนการทดลองแบบ 2x3 factorial มี 3 ซ้ำ ประกอบด้วย การใช้วัสดุ 2 ตำรับ ได้แก่ การไม่ใส่วัสดุและการใส่ตะกอนหม้อกรองจากโรงงานน้ำตาล ในอัตราที่ให้ฟอสฟอรัส 200 มก.P ต่อดิน 1 กก. และการใช้เชื้อจุลินทรีย์ 3 ตำรับ เหมือนกับที่ใช้ในการทดลองที่ 1-4

การทดลองที่ 9-12 ใช้แผนการทดลองแบบ 2x2 factorial มี 3 ซ้ำ ประกอบด้วยการใส่วัสดุเหลือใช้ 2 ตำรับ ได้แก่ การไม่ใส่วัสดุและการใส่เศษเหลือจากใบยาสูบในอัตราที่ให้โพแทสเซียม 200 มก.K ต่อดิน 1 กก. และการใส่เชื้อจุลินทรีย์ 3 ตำรับ ดังเช่นที่ระบุไว้ในการทดลอง 1-4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการฆ่าเชื้อ ใช้วิธีการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที ใช้ดินที่ไม่ฆ่าเชื้อในการทดลอง ดินชุดสันทรายเป็นดินร่วนปนทรายเนื้อหยาบซึ่งเก็บมาจากบริเวณศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ส่วนดินแม่เหียะเก็บมาจากศูนย์วิจัยและฝึกอบรมแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใช้ดิน 500 กรัมต่อถุง ดินแต่ละชนิดจะตากให้แห้งในที่ร่ม บดและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 2 มม. ก่อนการใช้สำหรับสมบัติทางเคมีของดินที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ pH ปริมาณของ available P exchangeable K ปริมาณอินทรียวัตถุ ตลอดจนเนื้อดิน แสดงไว้ดังตารางที่ 10

ผสมดิน วัสดุเหลือใช้ และเชื้อจุลินทรีย์แล้วคลุกเคล้าให้เข้ากัน ปรับความชื้นของดินทุกตำรับให้อยู่ในระดับ 75 % ของความชื้นที่ดินสามารถอุ้มไว้ได้ทั้งหมด บ่มดินทุกตำรับในถุงพลาสติกเป็นเวลา 2 เดือน แล้ววิเคราะห์หาสมบัติบางประการของดิน ในดินทุกตำรับ ทุกๆ 1 เดือน ได้แก่ อนินทรีย์ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้ (available P) และโพแทสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ในดิน (exchangeable K) วิธีการที่ใช้วิเคราะห์สมบัติดิน แสดงไว้ในตารางที่ 11 และรายละเอียดในภาคผนวก ก

ตารางที่ 9 ปริมาณธาตุอาหารพืชในวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตรซึ่งได้ศึกษาความเป็นประโยชน์ได้ในดิน

ประเภทของวัสดุ	% ธาตุอาหาร				
	N	C	C: N	P	K
1. กากตะกอนจากบ่อเกรอะ	4.91	32.33	27:1	0.34	0.56
2. ขี้เลื่อยหลังการใช้เพาะเห็ด	1.04	33.24	32:1	0.32	0.79
3. ตะกอนหมักกรองโรงงานน้ำตาล	1.74	23.05	14:1	1.84	0.92
4. ใบยาสูบ	4.51	34.87	8:1	0.24	1.39

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 10 สมบัติของดินที่ใช้ศึกษาความเป็นประโยชน์ของวัสดุเหลือใช้

สมบัติของดิน	ดินชุดสันทราย	ดินศูนย์วิจัยฯแม่เหียะ
pH	6.09	5.10
available P (Bray II)	37 mg/kg	4 mg/kg
exchangeable K (NH_4OAc1 N pH 7)	179 mg/kg	51 mg/kg
organic matter (Walkley Black)	2.37 %	1.40 %
soil texture	Sandy loam	Loam
%sand	71.2	40.8
%silt	12.8	42.4
%clay	16.8	10.0

ตารางที่ 11 วิธีการวิเคราะห์สมบัติของดิน

วิเคราะห์	วิธีการ	เอกสารอ้างอิง
pH	ดิน:น้ำ 1:1 วัดด้วย pH meter	เนาวรัตน์, 2527
Mineralized N	Aerobic incubation ในห้องปฏิบัติการ	Mulvaney, 1996
Available P	สกัดด้วย Bray II พัฒนาสีด้วย ammonium molybdate,antimony potasium tartrate, ascorbic acid วัดด้วยเครื่องspectrophotometer	Houba *et al.*, 1988b
Exchangeable K	สกัดด้วยNH_4OAc 1 M pH 7วัดโดย Flame photometer	Helmkeและ Sparks, 1996

3.5 การจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลสที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

แบคทีเรีย

การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

1. เลี้ยงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง CMC บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
2. ใช้เข็มเขี่ยกวาดเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อ ใส่ลงในหลอดทดลอง (micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer (ภาคผนวก ก) 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex)นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. นำหลอดทดลองออกจากตู้บ่ม วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติม Neutralizer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปวางบนน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. แยกของเหลวใสส่วนบนโดยใช้ micropipette ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ เติม 500 ไมโครลิตร ของ Trapping Buffer ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 xg เป็นเวลา 3 - 5 วินาที จากนั้นค่อยๆเทส่วนใสทิ้ง
5. เติม Washing buffer I 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 xg เป็นเวลา 3 - 5 วินาที จากนั้นค่อยๆ เทส่วนใสทิ้ง
6. เติม Washing buffer II 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 xg เป็นเวลา 3 - 5 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าของเหลวจะระเหยออกจากตะกอนจนหมด
7. เติม Elution Buffer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมา) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000xg เป็นเวลา 3 – 5 วินาที
8. แยกส่วนใสที่เป็นดีเอ็นเอ ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer
9. นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็น DNA template โดยใช้ primer 1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') และ 9F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCAG-3') ในการทำปฏิกิริยาใช้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

องค์ประกอบปฏิกิริยา PCR (PCR Condition)

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. DNA template (20 ng)	2
2. 10X PCR buffer (10X)	2
3. dNTP mix(1 mM)	4
4. primer F (9F)	1
R (1541R)	1
5. Taq DNA polymerase (1 unit)	0.4
6. dH_2O	9.6
7. Total	20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดสำหรับทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำเข้าเครื่อง จากนั้นตรวจสอบผลที่ได้โดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสบน agarose gel

ขั้นตอนในการทำ PCR

ขั้นตอนที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

ขั้นตอนที่ 2 template denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 primer ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอแบคทีเรียจากปฏิกิริยา PCR โดยการทำ gel electrophoresis

นำดีเอ็นเอที่ได้(PCR product) มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis โดยเตรียม agarose gel 1.5% ใน 1% Tris acetate buffer (TAE buffer) โดยชั่ง agarose 1.5 g ผสม 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมละลายและตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม 1X EtBr (Ethidium bromide) 50 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นจึงนำ gel ไปเทลงถาดเจลที่มีหวี (ทำให้เกิดช่องเล็ก; well) เทให้หนาประมาณ 0.4 cm.

นำเจลที่เตรียมมาวางลงใน electrophoresis โดยเอาด้านที่มี well อยู่ใกล้ขั้วลบ เติม 1X TAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล จากนั้นผสม loading buffer 1 ไมโครลิตร กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ 5 ไมโครลิตร จากนั้นหยอดลงใน well ปิดฝากล่อง เปิดเครื่อง ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางโดยอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที สังเกตจากสีของ loading buffer ให้เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่น agarose gel แล้วจึงปิดสวิทซ์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จึงนำแผ่นเจลที่ย้อมแล้วไปตรวจดูภายใต้ UV Tran illuminator แถบ DNA จะเรืองเป็นแถบสว่าง

การแยกผลผลิตดีเอ็นเอแบคทีเรียจากปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำผลิตผลจากการทำ PCR มาแยกโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 600-700 คู่เบส จากนั้นจึงทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่มีการเรืองแสงแล้วนำมาแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดทดลองสำเร็จรูป (JETSORB kit) โดยชั่งน้ำหนักเจลที่มีแถบ DNA ที่เรืองแสงมาใส่หลอดทดลองใหม่ แล้วเติมสารละลาย A1 buffer (ภาคผนวก) อัตราส่วน 1:3 (w/v) จากนั้นผสม Jetsorb ปริมาตร 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลายเจลออก และให้ดีเอ็นเอมาเกาะติดกับอนุภาคของ Jetsorb จากนั้นปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไป

การทำผลผลิตดีเอ็นเอแบคทีเรียจากปฏิกิริยา PCR ให้บริสุทธิ์

ทำการล้างตะกอนด้วยสารละลาย A1 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้น นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้ง

ทำการล้างตะกอนด้วย low salt buffer โดยเติมสารละลาย A2 buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อได้ตะกอนแล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วทำการล้างตะกอนอีกครั้งด้วย A2 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วปั่นแยกให้ตกตะกอนอีกครั้ง เทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง

จากนั้นเติมสารละลาย TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วให้เข้ากัน จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แยกสารละลายส่วนบน (สารละลายดีเอ็นเอ) ไว้ สารละลายดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแม่พิมพ์ในการหาลำดับเบสในขั้นต่อไป

การวิเคราะห์หาลำดับเบสบน rDNA (rDNA sequencing) ของแบคทีเรีย

นำดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่บริสุทธิ์แล้วมาหาลำดับการเรียงตัวของเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequencing kit version 3.1 ที่ผลิตโดยบริษัท Applied Biosystems Inc., Japan ซึ่งใช้ primer 4 ชนิดคือ 357R, 802R, 1115R และ 1541R

Primer	Nucleotide sequence (5′-3′)
357R	CTGCTGCCTCCCGTA
802R	TACCAGGGTATCTAATCC
1115R	AGGGTTGCGCTCGTTG
1541R	AAGGAGGTGATCCAGCC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอคติโนมัยซีส

การสกัดดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซีส

1. เลี้ยงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง CMC บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน
2. ใช้เข็มเขี่ยกวาดเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อ ใส่ลงในหลอดทดลอง (micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Quartz sand ขนาด -50 ถึง +70 mesh (ประมาณ 90 mm. diameter) ที่ผลิตโดยบริษัท Sigma Co. (product # S-9887)
3. เติม 2x C-TAB 200 ไมโครลิตร บดด้วยปลาย pestle ขนาด 150 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex)
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำหลอดทดลองออกจากตู้บ่ม แล้วกลับหลอดไปมา (gentle mixed) 20 นาที
5. เติม Chloroform : Isoanyl (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลาย DNA แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. แยกของเหลวใสส่วนบนโดยใช้ micropipette ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ ทำซ้ำข้อ 3 อีก 2 ครั้ง (รวมเป็น 3 ครั้ง) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆเทส่วนใสทิ้ง
7. เติม 70% alcohol 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (incubate over night)
8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆเทส่วนใสทิ้ง
9. เติม 70% alcohol 500 ไมโครลิตร แล้ว gentle mix 10 ครั้ง จากนั้นค่อยๆ เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษชำระ จนตะกอน DNA แห้ง
10. เติม TE buffer 50 ไมโครลิตร แยกส่วนใสที่เป็นดีเอ็นเอ ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่
11. นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (ภาคผนวก)
12. นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแอคติโนมัยซีสด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็น DNA template โดยใช้ primer ดังตาราง ในการทำปฏิกิริยาใช้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

Primer	Nucleotide sequence (5′-3′)
FD1	AGAGTTGATCCTGGCTCAG
RD2	ACGGCTACCTTGTTACGAACTT

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

องค์ประกอบปฏิกิริยา PCR (PCR Condition)

		ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. DNA template (20 ng)		4
2. 10X PCR buffer (10X)		5
3. dNTP mix(0.1 mM)		0.1
4. primer	F (FD1)	0.4
	R (RD2)	0.4
5. Taq DNA polymerase (1 unit)		1.25
6. dH2O		7.35
7. MgCl		1.5
Total		20

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดสำหรับทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำเข้าเครื่อง จากนั้นตรวจสอบผลที่ได้โดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสบน agarose gel

ขั้นตอนในการทำ PCR

ขั้นตอนที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

ขั้นตอนที่ 2 template denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
primer annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 นาที
ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 primer ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอแอคติโนมัยซีสจากปฏิกิริยา PCR โดยการทำ gel electrophoresis โดยนำดีเอ็นเอที่ได้(PCR product) มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis โดยเตรียม agarose gel 1.2% แล้วทำการแยกผลผลิตดีเอ็นเอแอคติโนมัยซีสจากปฏิกิริยา PCR จากนั้นทำผลผลิตดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซีสจากปฏิกิริยา PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาลำดับเบสบน rDNA (rDNA sequencing) ของแอคติโนมัยซีส

นำดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่บริสุทธิ์แล้วมาหาลำดับการเรียงตัวของเบส โดยใช้ ABI Terminator cycle sequencing kit ที่ผลิตโดยบริษัท Applied Biosystems Inc., Japan ซึ่งใช้ primer คือ

Primer	Nucleotide sequence (5′-3′)
FD1	AGAGTTGATCCTGGCTCAG

สารละลายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ตรวจหาลำดับเบสของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีส

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (Reaction mix) ในหลอด PCR tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับต่อไปนี้

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Premix	4*
DNA (PCR product) (0.5-2.0 μg)	1
Primer (5 pmol)	1
dH_2O	4
ปริมาตรรวม	10

*Premix จากชุด kit และ 5x TBE buffer ในอัตราส่วน 1:1

โดยเริ่มจากการผสมส่วนผสมทุกอย่างแล้ว นำสารละลายที่ได้ไป incubate เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับทำปฏิกิริยา โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที
   extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที
   ในขั้นตอนที่ 2 นี้ ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วดูดสารละลายทั้งหมดไปใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ เพื่อทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยมีขั้นตอนดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ตรวจหาลำดับเบสของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีส

ทำการตกตะกอน DNA ด้วย 195 ไมโครลิตร ของ mix reagent ที่ประกอบด้วย

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
- 96% ethanol	150
- H_2O	40
- 3M pH5.2 sodium actate	5
- ปริมาตรรวม	195

จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทของเหลวบนทิ้ง นำหลอดทดลองที่มีตะกอนไปคว่ำบนกระดาษชำระให้ตะกอนแห้ง จากนั้นเติม ethanol 70% ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วคว่ำหลอดทดลองที่มีตะกอน DNA บนกระดาษชำระเพื่อให้ตะกอนแห้ง โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 4 ไมโครลิตร ของ formamide loading dye แล้วรักษาไว้ในน้ำแข็ง แล้วจึงนำไปตรวจหาลำดับเบสต่อไป หรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภายใต้สภาพไม่มีแสง แล้วนำไปตรวจหาลำดับเบสภายใน 1 เดือน)

การเตรียม Polyacrylamide gel เพื่อใช้ตรวจหาลำดับเบสของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีส

ทำการประกอบชุดแผ่นกระจกเตรียมไว้ แล้วเตรียมสารละลายโพลีอะคีลามายด์ โดยเริ่มจากการชั่ง urea 18.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Acrylamide solution ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (อาจใช้ hot plate ช่วยในการละลาย) หลังจากนั้นเติม 10X TBE (ภาคผนวก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติม 0.5 กรัม Amberlite แล้วนำสารละลายไป incubate ในเครื่อง vacuum ประมาณ 10 นาที เพื่อไล่ฟองอากาศในสารละลายเจล จากนั้นเติม 10% ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติม N, N, N', N' tetramethylethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำสารละลายที่ได้เทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นกระจกนี้ไปประกอบเข้าเครื่อง ABI PRISM 377 DNA (สำหรับแบคทีเรีย) ABI PRISM 3730XL DNA sequencer (สำหรับแอคติโนมัยซีส) เติม running buffer (1X TBE) ลงใน chamber เตรียมพร้อมเพื่อตรวจหาลำดับเบส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจหาลำดับเบสของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีส

นำตะกอนดีเอ็นเอที่เตรียมไว้มาละลายด้วย loading dye ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไป incubate ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2-5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเดี่ยว จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับเบสโดยการหยอดลงในเจลที่เตียมไว้สำหรับการตรวจหาลำดับเบส ปิดฝาครอบแล้วเปิดสวิทซ์เครื่องเพื่อให้เครื่องทำงาน การทำงานของเครื่องจะเป็นไปแบบอัตโนมัติ โดยตั้งข้อมูลเครื่องตามคู่มือที่ติดมากับเครื่อง และข้อมูลลำดับเบสที่ได้จะถูกบันทึกไว้ในคอมพิวเตอร์

การจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์

ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยนำลำดับเบสของตัวอย่างเทียบกับคลังเก็บข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่เก็บรวบไว้จาก 4 ศูนย์หลักคือ The DNA Databank of Japan (DDBJ) The European Molecular Biology Laboratory (EMBL) The Brookhaven Protein Data Bank (PDB) และ The Gene Bank ที่มีการเชื่อมโยงข้อมูลเข้าด้วยกันผ่านเว็บไซท์ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved