



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาคุณสมบัติการกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพจากพืช

ต่อความทนทานภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันในข้าว

**Study of Biostimulant Properties from Biologically Fermented Product from
Plants to Enhance Oxidative Stress Tolerance in Rice**

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ร้อยตำรวจเอกหญิง ดร.สุชาดา สุขหรั่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นากุล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

27 พฤศจิกายน 2552

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาคุณสมบัติการกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพจากพืช
ต่อความทนทานภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันในข้าว

**Study of Biostimulant Properties from Biologically Fermented Product from
Plants to Enhance Oxidative Stress Tolerance in Rice**

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ร้อยตำรวจเอกหญิง ดร.สุชาดา สุขหรั่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

27 พฤศจิกายน 2552

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยและขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนเครื่องมือที่จำเป็นเพื่อใช้ในการวิจัย นอกจากนี้ยังขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยกลาง BIOTEC ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สว.ทช. ที่สนับสนุนข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5080015

ชื่อโครงการ: การศึกษาคุณสมบัติการกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพจากพืชต่อความทนทานภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันในข้าว

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ร้อยตำรวจเอกหญิง ดร.สุชาดา สุขหรั่ง คณะเภสัชศาสตร์
รองศาสตราจารย์ ดร.วรุณี จุฬาลักษณ์นากุล คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: suchada.su@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี 6 เดือน 1 ธันวาคม 2549 – 30 พฤษภาคม 2552

งานวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงจากดินและน้ำหมักจากฟางข้าวในแปลงเกษตรอินทรีย์ได้ ซึ่งได้แก่เชื้อ *Rhodospseudomonas palustris* ไอโซเลทที่ 59 ที่สามารถสร้างสาร 5-aminolevulinic acid (ALA) ที่มีรายงานว่า เป็นสารที่มีประโยชน์กับพืช และนำไปใช้ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพจากพืช โดยสามารถใช้สาร ALA นี้เป็นสารเครื่องหมาย (marker) ในการควบคุมคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ การเจือจางน้ำหมักชีวภาพที่ความเข้มข้น 1:500 เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการเป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพซึ่งทำให้ข้าวมีความสูง การเจริญเติบโต การออกความยาวราก และดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำเปล่า

ผลของน้ำหมักชีวภาพที่มีต่อความทนทานของข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำจากสารเคมี aminotriazole (AT) buthionine sulfoximine (BSO) และ methyl viologen (MV) โดยวัดการทำงานของเอนไซม์แอนติออกซิแดนท์และการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), และ catalase (CAT) พบว่าสามารถเหนี่ยวนำต้นข้าวอ่อนให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชันสารเคมีได้โดยใช้สารเคมี ถึงแม้ว่าจะสังเกตเห็นลักษณะที่ทนทานทาง phenotype ได้ไม่ชัดเจนในต้นข้าวอ่อนกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพเมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด แต่ได้มีการเปลี่ยนแปลงในระดับของยีนและเอนไซม์กลุ่มต้านออกซิเดชัน

ต้นข้าวอ่อนกลุ่มที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนพบว่า มีระดับ transcript ของยีนและการทำงานของเอนไซม์ SOD APX และ CAT สูงอยู่ก่อนแล้ว ต้นข้าวอ่อนกลุ่มนี้มีการตอบสนองต่อสารเคมีที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดได้ไวกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพ เหมือนเป็นการเตรียมพร้อมให้กับต้นข้าวอ่อน เมื่อเวลาผ่านไประดับของ transcript และการทำงานของเอนไซม์จะลดลงสู่สภาวะปกติได้เร็วกว่า ซึ่งให้เห็นว่าเมื่อต้นข้าวอ่อนกลุ่มที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพสามารถที่จะกระตุ้นกลไกการป้องกันตนเองให้จัดการกับภาวะเครียดได้อย่างรวดเร็วและลดลงสู่สภาวะปกติได้เร็ว

คำหลัก: น้ำหมักชีวภาพ สารกระตุ้นทางชีวภาพ ข้าว สภาวะเครียดจากออกซิเดชัน กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก

Abstract

Project Code: MRG5080015

Project Title: Study of Biostimulant Properties from Biologically Fermented Product from Plants to Enhance Oxidative Stress Tolerance in Rice

Investigators: Suchada Sukrong, Ph.D.

Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.

Chulalongkorn University

E-mail address: suchada.su@chula.ac.th

Project Period: 2 years 6 months (Dec 1, 2006 – May 30, 2009)

Photosynthetic bacteria, *Rhodopseudomonas palustris* isolate 59, was isolated from soil and rice straw in organic fields and used for the production of biologically fermented product in this research. It can produce 5-aminolevulinic acid (ALA) which has been reported beneficial to plants. ALA is also used as a marker compound for quality control of biologically fermented product. Dilution at 1:500 is an optimum ratio for biostimulant that can promote development, height, root length, germination, and germination index of plants better than water control group.

The effect of biologically fermented product to the oxidative stress tolerance in rice which chemically induced by aminotriazole (AT), buthionine sulfoximine (BSO), and methyl viologen (MV) was determined by gene expression and enzyme activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), and catalase (CAT). Although, the effect on phenotypes was not obvious in the experimental groups, non-pretreated and pretreated with biologically fermented product, but transcripts and activity of enzymes were changed.

Pretreated with biologically fermented product of rice seedlings showed higher level of antioxidant enzyme transcripts and activities than non-pretreated group. When both were subjected to oxidative stress, pretreated rice seedlings were responded faster. The changes in the gene expression patterns and activities were also declined faster. It indicated that pretreated seedlings could trigger the defense mechanisms fast enough for dealing with oxidative stress and back to almost normal level.

Keyword: Biologically Fermented Product, Biostimulant, Rice, Oxidative stress, 5-aminolevulinic acid

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	3
บทคัดย่อ.....	4
สารบัญ.....	6
บทที่ 1 บทนำ.....	10
บทที่ 2 การพัฒนาสูตรน้ำหมักชีวภาพที่เหมาะสมที่ได้จากพืช และตรวจสอบคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ.....	12
2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในทดลอง.....	12
2.2 วิธีทดลอง.....	12
2.2.1 การคัดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสง.....	12
2.2.2 การผลิตน้ำหมักชีวภาพที่เหมาะสมที่ได้จากพืช.....	13
2.2.3 การตรวจสอบคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ.....	14
2.2.3.1 การหาปริมาณ ALA ของน้ำหมักชีวภาพ.....	14
2.2.3.2 การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ ของน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์.....	14
2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	14
2.3.1 การคัดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสง.....	14
2.3.2 การผลิตน้ำหมักชีวภาพที่เหมาะสมที่ได้จากพืช.....	15
2.3.3 การตรวจสอบคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ.....	15
2.4 สรุป.....	19
บทที่ 3 ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพ ที่ได้จากพืช.....	20
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....	20
3.2 วิธีทดลอง.....	20
3.2.1 ทดสอบสัดส่วนการเจือจางน้ำหมักชีวภาพ.....	20
3.2.2 ทดสอบการงอกของเมล็ดข้าว.....	21
3.2.3 ทดสอบการเจริญของเมล็ดข้าว.....	21
3.3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	22
3.3.1 สัดส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำหมักชีวภาพ.....	22
3.3.2 ผลของน้ำหมักชีวภาพต่อการงอกและการเจริญของเมล็ดข้าว	23
3.4 สรุป.....	25
บทที่ 4 ศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพที่มีต่อความทนทานของข้าว ภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำจากสารเคมี.....	26

4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....	26
4.2 วิธีทดลอง.....	26
4.2.1 การชักนำข้าวให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชันด้วยสารเคมี.....	26
4.2.2 การวัดการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน.....	28
4.2.3 การวัดการทำงานของเอนไซม์แอนติออกซิแดนท์.....	29
4.3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	30
4.3.1 การเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน SOD, APX, และ CAT ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำ ด้วยสารเคมี AT+BSO.....	30
4.3.2 การเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน SOD, APX, และ CAT ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำ ด้วยสารเคมี MV.....	31
4.3.3 การทำงานของเอนไซม์แอนติออกซิแดนท์ SOD, APX, และ CAT ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี AT + BSO และ MV.....	33
4.4 สรุป.....	34
บทที่ 5 สรุป.....	35
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต.....	37
เอกสารอ้างอิง.....	38
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.....	40
ภาคผนวก.....	41

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์.....	17
ตารางที่ 3.1	แสดงค่าเปรียบเทียบของการงอก ความยาวราก และดัชนีการงอก ของเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1	22
ตารางที่ 4.1	ไพรเมอร์สำหรับ RT-PCR ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน.....	28

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1	การเตรียมน้ำหมักฟางข้าว.....	12
รูปที่ 2.2	น้ำหมักชีวภาพจากพืชไอโซเลทต่างๆเมื่อหมักนาน 28 วัน.....	15
รูปที่ 2.3	กราฟแสดงปริมาณ ALA ในน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่หมักเป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, และ 4 สัปดาห์.....	16
รูปที่ 2.4	รายงานผลการทดสอบตัวอย่างปุ๋ย โดยสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทาง การเกษตร กรมวิชาการเกษตร จตุจักร.....	18
รูปที่ 3.1	แสดงลักษณะการปลูกเมล็ดข้าวในวัสดุปลูก vermiculite ที่อยู่ในขวดแก้ว.....	21
รูปที่ 3.2	การงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เมื่อได้รับน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรีย ไอโซเลทต่างๆ เทียบกับน้ำและปุ๋ย ณ วันที่ 9 ของการงอก.....	23
รูปที่ 3.3	ต้นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 รดด้วยน้ำกลั่น สารละลายปุ๋ยยูเรีย และน้ำหมักชีวภาพ จากไอโซเลทที่ 52, 53, 54, 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์ และเจือจางขนาด 1:500 โดยรดตั้งแต่เริ่มปลูก (A) อายุ 5 วันและ (B) อายุ 14 วัน.....	24
รูปที่ 4.1	แสดงการปลูกข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 (A) บนกระดาดทรงในถาด และต้นอ่อนข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 อายุ 7 วัน (B).....	27
รูปที่ 4.2	แผนผังแสดงการทดลองการชักนำข้าวให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ด้วยสารเคมี.....	27
รูปที่ 4.3	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน SOD, APX, และ CAT โดยวิธี RT-PCR ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วย สารเคมี AT 4 มิลลิโมลาร์และ BSO 50 มิลลิโมลาร์.....	30
รูปที่ 4.4	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน SOD, APX, และ CAT โดยวิธี RT-PCR ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วย สารเคมี MV 10 ไมโครโมลาร์.....	31
รูปที่ 4.5	Enzyme activity ของ SOD, APX, และ CAT ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะ เครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี AT 4 มิลลิโมลาร์ และ BSO 50 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะที่ไม่ได้รับและได้รับการ pretreat ก่อน ด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 ณ เวลา 0, 1, 2, 4, และ 8 ชั่วโมง...	33
รูปที่ 4.6	Enzyme activity ของ SOD, APX, และ CAT ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะ เครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี MV 10 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะที่ไม่ได้รับและได้รับการ pretreat ก่อนด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรีย ไอโซเลท 59 ณ เวลา 0, 1, 2, 4, และ 8 ชั่วโมง.....	33

บทที่ 1

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจอันดับหนึ่งของประเทศไทย ไทยส่งออกข้าวเป็นหนึ่งของโลกถึงปีละประมาณ 4.5 ล้านตัน ข้าวยังเป็นพืชที่มีประโยชน์ทางโภชนาการสูง เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ มีวิตามินและเกลือแร่หลากหลายชนิด ปัจจุบันข้าวเกษตรอินทรีย์กำลังได้รับความนิยมทั่วโลกเนื่องจากผลผลิตมีคุณภาพดี ไม่มีสารพิษตกค้าง และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เกษตรกรไทยหันมาสนใจการผลิตข้าวเกษตรอินทรีย์กันมากขึ้น เนื่องจากราคาดีกว่า และไม่ต้องซื้อปุ๋ยเคมีในราคาแพง ทำให้ต้นทุนน้อยกว่าการปลูกข้าวแบบเดิม และยังทำให้สิ่งแวดล้อมสะอาดและปลอดภัย

อย่างไรก็ตาม สิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลอย่างมากต่อการปลูกข้าว โดยเฉพาะประเทศไทยซึ่งพื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่เป็นพื้นที่แห้งแล้ง ดินเค็ม หรือเป็นพื้นที่แห้งแล้งสลับน้ำท่วม พื้นที่ที่เหมาะสมจะพบน้อยมาก สภาวะดังกล่าวล้วนก่อให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ทั้งสิ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อข้าวในแง่ผลผลิตลดลง

สภาวะเครียดจากออกซิเดชันเป็นสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นจากการตอบสนองของข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้งแล้ง ความเค็ม แสงแดดที่แรงเกินไป ภาวะน้ำท่วม สารเคมีในดิน หรือโรคต่างๆ ที่คุกคามพืช ส่วนหนึ่งของการตอบสนองดังกล่าวคือการสร้างสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ (free radical species หรือ reactive oxygen species) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แรดิคัล (superoxide radical) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไฮดรอกซีแรดิคัล (hydroxyl radical) ซึ่งถ้าถูกสร้างขึ้นมากเกินไปพืชจะควบคุมได้ด้วยระบบป้องกันตนเอง (defense system) จะทำให้เกิดความเสียหายแก่พืช ผลผลิต และนำไปสู่การตายได้ โดยปกติระบบป้องกันตนเองของพืชโดยทั่วไปประกอบด้วย สารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant molecule) เช่น แอสคอร์เบต (ascorbate) กลูตาไธโอน (glutathione) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และเอนไซม์แอนติออกซิแดนท์ (antioxidant enzyme) เช่น เอนไซม์คาตาเลส (catalase) แอสคอร์เบตเปอร์ออกซิเดส (ascorbate peroxidase) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) และเอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase)

ปัจจุบันมีความก้าวหน้าไม่มากนักในการใช้เทคโนโลยีทางการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบ conventional breeding เพื่อปรับปรุงให้พันธุ์ข้าวมีความทนทานต่อสภาวะเครียดต่างๆ จากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือการปรับปรุงพันธุ์โดยการตัดต่อยีนก็มีข้อถกเถียงเรื่องความปลอดภัย ประกอบกับแนวโน้มการทำเกษตรอินทรีย์กำลังได้รับความนิยมเนื่องจากไม่มีการใช้สารเคมีในการผลิต จึงไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม ดังนั้นกลุ่มวิจัยนี้จึงมีแนวคิดเรื่องการใช้น้ำหมักชีวภาพเป็นสารกระตุ้นทางชีวภาพ (biostimulant) ให้ข้าวมีความทนทานต่อสภาวะเครียดต่างๆ จากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แต่สภาวะเครียดต่างๆ ที่สุดแล้วก็คือการผลิตสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ให้ออกมาเพิ่มขึ้นหรือที่เรียกว่าเกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

นั่นเอง ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้อีกอย่างหนึ่งว่ากลุ่มวิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาถึงการใช้น้ำหมักชีวภาพเป็นสารกระตุ้นทางชีวภาพเพื่อให้ข้าวมีความทนทานต่อสภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการจะเหี่ยวนำไปให้ข้าวเกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหี่ยวนำไปจากสารเคมี เช่น AT BAO และ MV และศึกษาการตอบสนองโดยการวัดการทำงานของเอนไซม์แอนติออกซิแดนท์และการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน 3 ชนิด ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), และ catalase (CAT)

น้ำหมักชีวภาพที่จะใช้ในการทดลองเป็นน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชและผลิตเองโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากดินและฟางข้าวในพื้นที่ทำนาเกษตรอินทรีย์ในการหมัก น้ำหมักชีวภาพ (biologically fermented product) มีลักษณะเป็นของเหลวเข้มข้นสีน้ำตาล มีจุลินทรีย์และสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืช โดยทั่วไปวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักสามารถใช้ได้จากทุกส่วนของพืช เช่น ใบ ราก ผล เมล็ด ยอดอ่อน หัวใต้ดิน แต่ในการทดลองนี้เราเลือกใช้ฟางข้าวในการหมักนิยมนาน 15-30 วันหรือนานกว่านั้น ต้องคำนึงถึงประโยชน์ที่จะนำไปใช้เพราะระยะเวลาของการหมักที่เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงของสารเคมีและจุลินทรีย์ในน้ำหมักจะเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบไปด้วย จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในน้ำหมักชีวภาพมักเป็น lactic acid bacteria หรืออาจเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ (aerobic bacteria) หรือไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ในการดำรงชีวิต เช่น Photosynthetic bacteria, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Azotobacter* หรือ *Actinomyces* ในน้ำหมักแต่ละสูตรอาจใช้เชื้อร่วมกันทั้งหมด ร่วมกันบางส่วน หรือใช้ชนิดเดียวก็ได้ มีรายงานว่าน้ำหมักชีวภาพมีสารที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นทางชีวภาพของพืชหลายชนิด เช่น กรดอะมิโนลิวเลนิก (amino levulinic acid) ซึ่งในปริมาณที่พอเหมาะจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอินทรีย์อื่นๆที่มีประโยชน์ต่อพืชอีกหลายชนิด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะ

1. ผลิตน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชและตรวจสอบคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ
2. ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืช
3. ศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพที่มีต่อความทนทานของข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหี่ยวนำไปจากสารเคมี โดยวัดการทำงานของเอนไซม์แอนติออกซิแดนท์และการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน 3 ชนิด ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), และ catalase (CAT)

บทที่ 2

การพัฒนาสูตรน้ำหมักชีวภาพที่เหมาะสมที่ได้จากพืช และตรวจสอบคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ

องค์ประกอบในการพัฒนาน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชมีหลายประการ ได้แก่ หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้หมัก จุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารอินทรีย์ในสิ่งมีชีวิตให้กลายเป็นสารที่เกิดประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช พืชที่ใช้ในกระบวนการหมักซึ่งจะเป็นแหล่งของสารอินทรีย์ รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการหมักก็เป็นองค์ประกอบสำคัญที่จะทำให้ได้เกิดคุณสมบัติที่ต่างกันของน้ำหมักชีวภาพ ดังนั้นต้องทราบว่าช่วงเวลาใดที่เหมาะสมในการนำน้ำหมักไปใช้ประโยชน์ เพราะจะได้น้ำหมักที่มีจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเจริญ การวิจัยนี้จะคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic bacteria) ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียที่สร้างสาร 5-aminolevulinic acid (ALA) ได้และจะควบคุมมาตรฐานน้ำหมักชีวภาพโดยใช้ ALA เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker)

2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ดินและฟางข้าวในพื้นที่ทำนาเกษตรอินทรีย์จำนวน 18 จังหวัด (สุโขทัย ศรีสะเกษ อำนาจเจริญ ขอนแก่น หนองคาย ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ สรินทร์ นครพนม อุดรธานี มุกดาหาร มหาสารคาม เลย อุบลราชธานี นครราชสีมา สิงห์บุรี อัญญา พัทลุง) รวม 114 ตัวอย่าง

2.2 วิธีทดลอง

2.2.1 การคัดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสง

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงได้ออกเป็น isolate ต่าง ๆ จากตัวอย่างดินและฟางข้าวในพื้นที่ทำนาเกษตรอินทรีย์ ดังนี้ เตรียมน้ำหมักฟางข้าวโดยใส่ตัวอย่างดินในขวดพลาสติกขนาด 600 มิลลิลิตร ใส่ฟางข้าวที่ตัดเป็นท่อนเล็กๆประมาณ 3 ใน 4 ของขวด เติมน้ำละลายเกลือ 0.25% ปิดฝาขวดให้สนิท นำไปส่องไฟที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 การเตรียมน้ำหมักฟางข้าว

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงดังนี้ ปิเปิดน้ำหมักฟางข้าว 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ G5 5 มิลลิลิตร เททับด้วยพาราฟฟิน ปิดฝาให้สนิท นำไปส่องไฟที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองจะเปลี่ยนเป็นสีแดงซึ่งแสดงว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงซึ่งมีรายงานว่า เป็นแบคทีเรียที่สร้างสาร ALA ได้ หลังจากนั้นปิเปิดพาราฟฟินออก นำอาหารเลี้ยงเชื้อ G5 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที เขี่ย (streak) ตะกอนที่ได้ลงบนอาหารแข็ง G5 นำไปส่องไฟที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าจะสังเกตเห็นโคโลนีเดี่ยวสีแดง ตรวจสอบโดยการย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เก็บรักษาเชื้อโดยการ stab ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารแข็ง G5 ปมที่ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทำการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงที่เจริญได้ดีรอบที่หนึ่ง (primary screening) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ใน G5 broth 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น subculture เชื้อจากหลอดที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลองใหม่ที่มีอาหาร G5 broth ที่ผสมสารละลายเกลือ 0.25% โดยใส่อาหารให้เกือบเต็มหลอดทดลอง ให้เหลือพื้นที่ว่างจากขอบบนประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเลี้ยงในสภาพ microaerobic dark ทำการคัดเลือก isolate ที่เจริญได้ดีที่สุด 15 isolate โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

ทำการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อแบคทีเรีย กลุ่มที่สังเคราะห์แสงเพื่อทำการคัดกรองในรอบที่สอง (secondary screening) ดังนี้ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากรอบที่หนึ่งในสภาพ microaerobic light โดยใช้วิธีคล้ายที่กล่าวมาแล้ว เพียงแต่เปลี่ยนสภาพการเลี้ยงจากที่มืด เป็นส่องด้วยไฟที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้แบคทีเรียเกิดการสังเคราะห์ด้วยแสงจนกว่าอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีแดง จากนั้นปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรให้ได้ 0.5 การคัดกรองเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงที่เจริญได้ดีในรอบที่สองทำดังนี้ ดูดหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร G5 broth ที่ผสมสารละลายเกลือ 0.25% โดยใส่อาหารให้เกือบเต็มหลอดทดลอง ให้เหลือพื้นที่ว่างจากขอบบนประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เลี้ยงในสภาพ microaerobic light ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือก isolate ที่เจริญได้ดีที่สุดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

2.2.2 การผลิตน้ำหมักชีวภาพที่เหมาะสมที่ได้จากพืช

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่แยกได้ ในอาหาร G5 broth เมื่อเชื้อเจริญจนถึง log phase ปั่นเหวี่ยง ได้ตะกอนเซลล์ (cell pellet) ใช้ตะกอนเซลล์ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ เตรียมน้ำหมักชีวภาพโดยผสมส่วนต่างๆลงในถังพลาสติกขนาด 20 ลิตร ดังนี้ ฟางข้าวที่ตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 1 นิ้ว (autoclave แล้ว) 750 กรัม ดินจากพื้นที่ทำนาเกษตรอินทรีย์ (autoclave แล้ว) 30 กรัม เติมเกลือ 37.5 กรัม และน้ำสะอาด 20 ลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดหมักในถังพลาสติกปิดฝาสนิทในสภาวะ

microaerobic dark ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสุ่มตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ ALA

2.2.3 การตรวจสอบคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ

2.2.3.1 การตรวจสอบปริมาณ ALA ของน้ำหมักชีวภาพ

การวัดปริมาณ ALA เริ่มจากการเตรียมกราฟมาตรฐาน ALA โดยวิธีที่ปรับปรุงจาก Sasaki et al., 1987 โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ เติม 2 มิลลิลิตร Acetate buffer 1 M pH 4.7 ลงในสารละลายมาตรฐาน ALA ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เติม acetylacetone 10 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว เติม modified Ehrlich's reagent 3.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{553} เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ALA กับค่า OD_{553} จากนั้นนำน้ำหมักที่หมัก ณ เวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 1, 2, 3, และ 4 สัปดาห์ มาตรวจสอบหาปริมาณ ALA

2.2.3.2 การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์ถูกส่งไปทดสอบที่สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร จตุจักร รายงานผลการตรวจสอบตัวอย่างบรรจุในภาคผนวก

2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

2.3.1 การคัดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสง

สามารถคัดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสงจากน้ำหมักดินและฟางข้าวซึ่งมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ G5 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรได้ 130 isolate เมื่อนำมาผ่านการคัดกรองรอบที่หนึ่งเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงที่เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ G5 ในสภาพ microaerobic dark สามารถแยกได้ 15 isolate เมื่อนำมาผ่านการคัดกรองรอบสองและเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ 4 isolate ได้แก่ isolate ที่ 52, 53, 54, และ 59 ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.3 ซึ่งสูงเป็น 4 อันดับแรกของ isolate ทั้งหมดจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.18 จากทุกตัวอย่าง ซึ่งหมายถึงเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง

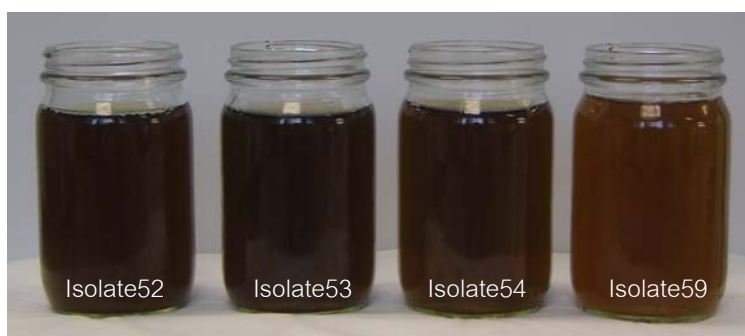
จากการส่งตัวอย่างเชื้อ isolate ที่ 52, 53, 54, และ 59 ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ที่ MU-OU-CRC มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ผลว่าเชื้อทั้ง 4 isolate เป็นเชื้อตัวเดียวกันคือ *Rhodospseudomonas palustris* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม purple non-sulfur phototropic bacteria ที่พบได้ในดินและมีรายงานว่าสามารถผลิตฮอร์โมนพืชได้หลายชนิด เช่น cytokinin, kinetin, และ ALA ได้

(Kobayashi, 2000) แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากแหล่งที่มาของเชื้อต่างกัน อาจส่งผลให้การปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของเชื้อต่างกัน ทำให้มีการเจริญเติบโตที่ต่างกัน

ในการคัดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสงจากน้ำหมักดินและฟางข้าวจะมีการเปลี่ยนสภาพการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากในที่ไม่มีแสง (คัดกรองรอบแรก) เป็นที่มีแสง (คัดกรองรอบสอง) เนื่องจากต้องการเพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญได้ดีทั้งสองสภาวะซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์มากที่สุดในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ

2.3.2 การผลิตน้ำหมักชีวภาพที่เหมาะสมที่ได้จากพืช

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 52, 53, 54, และ 59 ที่แยกได้ในอาหาร G5 broth เมื่อเชื้อเจริญจนถึง log phase ปั่นเหวี่ยง ได้ตะกอนเซลล์ และใช้ตะกอนเซลล์ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพในถังพลาสติกที่ปิดฝาสนิทในสภาวะ microaerobic dark ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อตรวจน้ำหมักที่ระยะเวลาหมักตั้งแต่ 1 ถึง 4 สัปดาห์ เมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ ALA พบว่ามีในปริมาณที่แตกต่างกัน รูปที่ 2.2 แสดงถึงลักษณะของน้ำหมักเมื่อหมักนาน 4 สัปดาห์ พบว่าน้ำหมักมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่น ดูป่าใช้ กลุ่มผู้วิจัยคิดว่าวิธีการผลิตน้ำหมักชีวภาพด้วยวิธีนี้สะดวกและเหมาะสมที่จะนำไปใช้ต่อไปในการทำการทดลองต่อไป



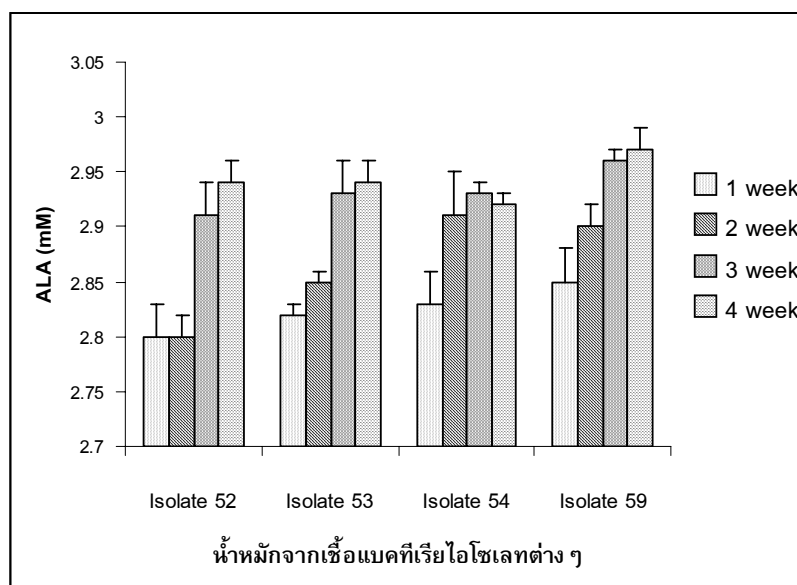
รูปที่ 2.2 น้ำหมักชีวภาพจากพืชไอโซเลทต่างๆเมื่อหมักนาน 28 วัน

2.3.3 การตรวจสอบคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ

เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของน้ำหมักชีวภาพขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด เช่น เชื้อจุลินทรีย์ วัตถุดิบของการหมัก และระยะเวลาการหมัก ดังนั้นเพื่อควบคุมมาตรฐานของการใช้น้ำหมักชีวภาพ และเพื่อการวิเคราะห์ข้อมูลในการวิจัย จึงจำเป็นต้องหาตัวบ่งชี้หรือเครื่องหมาย (marker) ของน้ำหมัก ซึ่งในที่นี้จะใช้ปริมาณสาร ALA (5-aminolevulinic acid) เป็นเครื่องหมาย

จากผลการวัดปริมาณ ALA ในน้ำหมักชีวภาพที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 52, 53, 54, และ 59 ที่เวลาเริ่มหมักจนถึง 4 สัปดาห์ (รูปที่ 2.3) พบว่าน้ำหมักชีวภาพที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทมีปริมาณ ALA เพิ่มขึ้นจากการหมัก และน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อ

แบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์มีปริมาณ ALA สูงที่สุดคือ 2.97 mM จึงตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพอย่างละเอียด



รูปที่ 2.3 กราฟแสดงปริมาณ ALA ในน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ที่หมักเป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, และ 4 สัปดาห์ เส้น verticle bar แสดงถึงค่า SE (n=3)

ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์ โดยสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ปรากฏผลดังตารางที่ 2.1 และรูปที่ 2.4 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนดที่ยอมรับได้ในการใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ (คู่มือการขอรับบริการตรวจวิเคราะห์ ดิน น้ำ ปืช ปุ๋ย และวัตถุเคมีการเกษตร, 2549) ของกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ตารางที่ 2.1 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ
จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์

รายการทดสอบ		ผลทดสอบ
1	pH	7.0
2	Specific gravity ที่อุณหภูมิ 27 °C	1.0
3	Total nitrogen (%)	0.1
4	Total phosphate (%)	ND
5	Total potash (%)	ND
6	Total calcium (%)	0.02
7	Total magnesium (%)	0.01
8	Total sulfur (%)	ND
9	Total iron (%)	0.002
10	Total zinc (%)	0.001
11	Total manganese (%)	0.001
12	Total copper (%)	ND
13	Total boron (%)	0.001
14	Total chloride (%)	0.1867
15	Sodium (%)	0.1
16	EC (dS/m)	0.68
17	Organic carbon (%)	0.1
18	Organic matter (%)	0.18
19	C/N	1/1

ที่ กษ 0916.003.1/

4687



สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

10 มิถุนายน 2552

เรื่อง แจ้งผลการทดสอบตัวอย่างปุ๋ย

เรียน ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหรั่ง

อ้างถึง หนังสือคณะกรรมการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ ศร 0512.14/1214 ลงวันที่ 23 เมษายน 2552

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ขอแจ้งผลการทดสอบตัวอย่างปุ๋ยตามหนังสือที่อ้างถึง ดังรายละเอียดในคอนท้ายของหนังสือนี้

ขอแสดงความนับถือ



(นางสาวประภากร อังประคณัฐนันท์) 52

นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

รักษาการแทน ผอ.สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร



TESTING

No.0028

รายงานผลการทดสอบตัวอย่างปุ๋ย

ชื่อตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพ ลักษณะตัวอย่างน้ำ สีน้ำตาล			ค่าขอที่ 4055	Lab.No. 52G-993	
ผู้ส่งตัวอย่าง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหรั่ง			ใบเสร็จเลขที่ 47	เล่มที่ 50744	
คณะกรรมการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330			วันที่	24 เม.ย. 52	
			วันรับ/ทดสอบตัวอย่าง	24 เม.ย. 52	
			วันส่งรายงาน	8 มิ.ย. 52	
รายการทดสอบ	ผลทดสอบ	ผู้ทดสอบ	รายการทดสอบ	ผลทดสอบ	ผู้ทดสอบ
1. pH	7.0	ฉินดดา	11. Total Manganese (%)	0.001	พงศ์พิศ
2. Specific Gravity ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส	1.00	ฉินดดา	12. Total Copper (%)	ND	พงศ์พิศ
3. Total Nitrogen (%)	0.1	ทองจันทร์	13. Total Boron (%)	0.001	สุพิศดา
4. Total Phosphate (%)	ND	จริยา	14. Total Chloride (%)	0.1867	สงกรานต์
5. Total Potash (%)	ND	ชฎาพร	15. Sodium (%)	0.1	ชฎาพร
6. Total Calcium (%)	0.02	พงศ์พิศ	16. EC (dS/m)	0.68	สงกรานต์
7. Total Magnesium (%)	0.01	พงศ์พิศ	17. Organic Carbon (%)	0.10	รัตนกรณ์
8. Total Sulphur (%)	ND	พงศ์พิศ	18. Organic Matter (%)	0.18	รัตนกรณ์
9. Total Iron (%)	0.002	พงศ์พิศ	19. C/N	1/1	
10. Total Zinc (%)	0.001	พงศ์พิศ	รวมทั้งสิ้น 19 รายการ		

รายงานนี้ - รับรอง เฉพาะตัวอย่างที่ส่งมาเท่านั้น ห้ามนำไปโฆษณาเพื่อการค้าใดๆทั้งสิ้น

- ถ้ามีชุด จา ซิต ตก ไม่รับรองรายงาน

- วิธีทดสอบ Inhouse method based on AOAC and OMAF

- ND = Non Detection

* หมายถึง การทดสอบที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 จากกรมวิทยาศาสตร์บริการ

หัวหน้ากลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย.....

(นางอมรา หาญจวนิช)

หัวหน้ากลุ่มวิจัยเกษตรเคมี.....

(นางจิตรา คล้ายมนต์)

หน้า 1/1

กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

FS-5.10-01 : 30 ตุลาคม 2551

ครั้งที่ 3 : 1/1

รูปที่ 2.4 รายงานผลการทดสอบตัวอย่างปุ๋ย โดยสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2.4 สรุป

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงได้จากดินและน้ำหมักฟางข้าวจำนวน 4 isolate คือไอโซเลทที่ 52, 53, 54, และ 59 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ได้ผลว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท เป็นเชื้อตัวเดียวกันคือ *Rhodopseudomonas palustris* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม purple non-sulfur phototropic bacteria ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตฮอร์โมนพืชได้หลายชนิด เช่น cytokinin, kinetin, รวมทั้งสามารถสร้างสาร 5-aminolevulinic acid (ALA) ที่เป็นประโยชน์กับพืชได้ น้ำหมักที่เกิดจากการใช้เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 หมักนาน 4 สัปดาห์ สามารถผลิต ALA ได้มากที่สุด ในการทดลองต่อไปจึงจะใช้น้ำหมักที่หมักโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 และหมักนาน 4 สัปดาห์ซึ่งสอดคล้องกับระยะเวลาที่เกษตรกรใช้ในการผลิตด้วย ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์ โดยสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ปรากฏค่าวิเคราะห์ต่างๆที่อยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนดที่ยอมรับได้ในการใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพของกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

บทที่ 3

ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืช

งานวิจัยหลายฉบับตีพิมพ์ว่าการใช้น้ำหมักชีวภาพให้ได้ผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชนั้น ต้องใช้ในปริมาณน้อย หมายถึงต้องทำการเจือจาง (dilution) ก่อนนำไปใช้ ดังนั้นการวิจัยต่อไปคือการศึกษาว่าเจือจางในความเข้มข้นเท่าใดจึงจะเหมาะสม ตัวชี้วัดที่ใช้ในการเลือกระดับการเจือจาง ได้แก่ ค่าเปรียบเทียบของการงอกของเมล็ดข้าว ค่าเปรียบเทียบการเจริญของรากของเมล็ดข้าว และดัชนีการงอกของเมล็ด

เนื่องจากวัตถุประสงค์ขั้นต่อไปคือการศึกษากการแสดงออกของยีนในกลุ่ม antioxidant ของข้าวเมื่อได้รับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และเมื่อได้รับน้ำหมักชีวภาพ ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองเพื่อควบคุมก่อนว่าน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆที่จะใช้ไม่ได้ยับยั้งการงอกและการเจริญของเมล็ดข้าว ถึงแม้ว่าเราตัดสินใจเลือกใช้น้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 เท่านั้นในการทดลองต่อเรื่องสภาวะเครียดแต่ในการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชก็จะขอทำการทดลองโดยใช้น้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทไปด้วยพร้อมกัน

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ในการทดลองใช้ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆที่หมักนาน 4 สัปดาห์

3.2 วิธีทดลอง

3.2.1 ทดสอบสัดส่วนการเจือจางน้ำหมักชีวภาพ [Kim et al, International Biodeterioration & Biodegradation 59 (2007) 156-165]

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 แช่น้ำ 1 คืน ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ในสารละลาย Clorox (Sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 10 %v/v นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง นำเมล็ดวางบนกระดาษกรอง 4-5 ชั้นที่ชุ่มด้วยน้ำและน้ำหมักชีวภาพที่หมักจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆและหมักนาน 4 สัปดาห์ เก็บในที่มืด นับเมล็ดข้าวที่งอก วัดความยาวรากในวันที่ 3 ของการทดลอง (n= 30 เมล็ด, ทดลอง 3 ซ้ำ) คำนวณหาตัวชี้วัดที่ใช้ในการเลือกระดับการเจือจาง ได้แก่ ค่าเปรียบเทียบของการงอกของเมล็ดข้าว ค่าเปรียบเทียบการเจริญของรากของเมล็ดข้าว และดัชนีการงอกของเมล็ด ตามสูตร

ค่าเปรียบเทียบของการงอกของเมล็ดข้าว (Relative seed germination) (% RSG) คือค่าเปรียบเทียบการงอกของเมล็ดข้าวในน้ำหมักชีวภาพต่อการงอกของเมล็ดข้าวในน้ำกลั่น

ค่าเปรียบเทียบการเจริญของรากของเมล็ดข้าว (Relative root growth) (% RRG) คือค่าเปรียบเทียบความยาวรากเฉลี่ยของเมล็ดข้าวในน้ำหมักชีวภาพต่อการงอกของเมล็ดข้าวในน้ำกลั่น

ดัชนีการงอกของเมล็ด (Germination index) (% GI) คือ $(RSG \times RRG)/100$

3.2.2 ทดสอบการงอกของเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด วางบนกระดาษทิชชูหนา 6 ชั้น ที่เปียกชุ่มไปด้วย สารละลายต่างๆ ดังนี้

1. น้ำกลั่น
2. สารละลายปุ๋ยยูเรีย (16-16-16) (0.25 g/L)
3. สารละลายน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 52 (1:500)
4. สารละลายน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 53 (1:500)
5. สารละลายน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 54 (1:500)
6. สารละลายน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 (1:500)

หมายเหตุ ควรทำให้กระดาษทิชชูนี้เปียกชื้นอยู่เสมอ โดยการรดสารละลายแต่ละชนิดลงไป

3.2.3 ทดสอบการเจริญของเมล็ดข้าว

ทดสอบการเจริญของเมล็ดข้าวโดยสังเกตความสูงของต้นที่ปลูกในขวดแก้ว โดยมี vermiculite (แร่ดินเหนียว $3\text{Mg}\cdot\text{O}\cdot\text{Fe}_2\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 3\text{SiO}_2$) เป็นวัสดุปลูก วิธีการทดสอบดังนี้ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 นำเมล็ดข้าวไปปลูกในวัสดุปลูก vermiculite ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วปริมาตร 240 มิลลิลิตร วางขวดแก้วบนชั้นที่มีหลอดไฟส่องด้านบน ให้แสงสว่างวันละ 12 ชม. อุณหภูมิ 24-28 °C ปลูกขวดละ 6 เมล็ด ดังรูปที่ 3.1

แบ่งการทดลองเป็น 6 ชุด ปลูกชุดละ 3 ขวด และรดด้วยสารละลายชนิดต่างๆ ปริมาตร 25 มิลลิลิตรตั้งแต่เริ่มปลูก ได้แก่

- ชุดที่ 1 กลุ่มควบคุม (control) รดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- ชุดที่ 2 รดด้วยสารละลายปุ๋ยยูเรีย (ความเข้มข้น 0.25 g/L) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- ชุดที่ 3 รดด้วยน้ำหมัก isolate 52 (หมัก 4 สัปดาห์) เจือจาง 1:500 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- ชุดที่ 4 รดด้วยน้ำหมัก isolate 53 (หมัก 4 สัปดาห์) เจือจาง 1:500 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- ชุดที่ 5 รดด้วยน้ำหมัก isolate 54 (หมัก 4 สัปดาห์) เจือจาง 1:500 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- ชุดที่ 6 รดด้วยน้ำหมัก isolate 59 (หมัก 4 สัปดาห์) เจือจาง 1:500 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะการปลูกเมล็ดข้าวในวัสดุปลูก vermiculite ที่อยู่ในขวดแก้ว

3.3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.3.1 สัดส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำหมักชีวภาพ

ค่าเปรียบเทียบของการงอก ความยาวราก และดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 แสดงดังตารางที่ 3.1 จากผลการทดลองถ้าใช้น้ำหมักชีวภาพที่ไม่ได้ทำการเจือจางเลยทำการทดสอบร้อยละของการงอกของเมล็ดข้าว (% RSG) ร้อยละของการเจริญของรากของเมล็ดข้าว (% RRG) และดัชนีการงอกของเมล็ด (% GI) พบว่าไม่เกิดผลดีต่อเมล็ดข้าว แต่เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และการเจริญของรากดีขึ้น ถ้าใช้น้ำหมักชีวภาพที่เจือจางขนาด 1:500 ของทุกไอโซเลท

จากผลการทดลอง เราตัดสินใจเลือกใช้น้ำหมักชีวภาพที่ใช้เวลาหมัก 4 สัปดาห์ ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1:500 ในการวิจัยต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าเปรียบเทียบของการงอก ความยาวราก และดัชนีการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เมื่อปลูกบนกระดาษกรองชุบน้ำหมักชีวภาพที่หมักนาน 4 สัปดาห์จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ และเก็บในที่มืด วัดการงอกและความยาวของรากในวันที่ 3 (n= 30 เมล็ด, ทดลอง 3 ซ้ำ)

	Isolate ที่ 52			Isolate ที่ 53			Isolate ที่ 54			Isolate ที่ 59		
แบบการ เจือจาง	% RSG	% RRG	GI	% RSG	% RRG	GI	% RSG	% RRG	GI	% RSG	% RRG	GI
Undilute	16.7	8.93	1.49	60	15.53	9.32	82.21	32.85	27	53.3	13.01	6.93
Dilute 1:25	93.3	104.71	97.69	100	102.13	102.13	103.64	105.11	108.94	100	74.39	74.39
Dilute 1:50	100	124.57	124.57	100	100.43	100.43	100	114.36	114.36	93.3	80.08	74.72
Dilute 1:75	100	112.41	112.41	100	76.38	76.38	100	122.14	122.14	96.7	74.80	72.33
Dilute 1:100	96.7	93.05	89.98	96.7	86.81	83.94	103.64	120.68	125.08	100	85.16	85.16
Dilute 1:200	100	98.76	98.76	100	94.68	94.68	107.18	125.3	134.3	96.7	68.5	66.24
Dilute 1:500	100	124.81	124.81	96.7	105.96	102.46	103.64	134.55	139.45	96.7	89.02	86.09
Dilute 1:1000	100	78.41	78.41	100	97.45	97.45	107.18	112.17	120.22	96.7	60.37	58.37

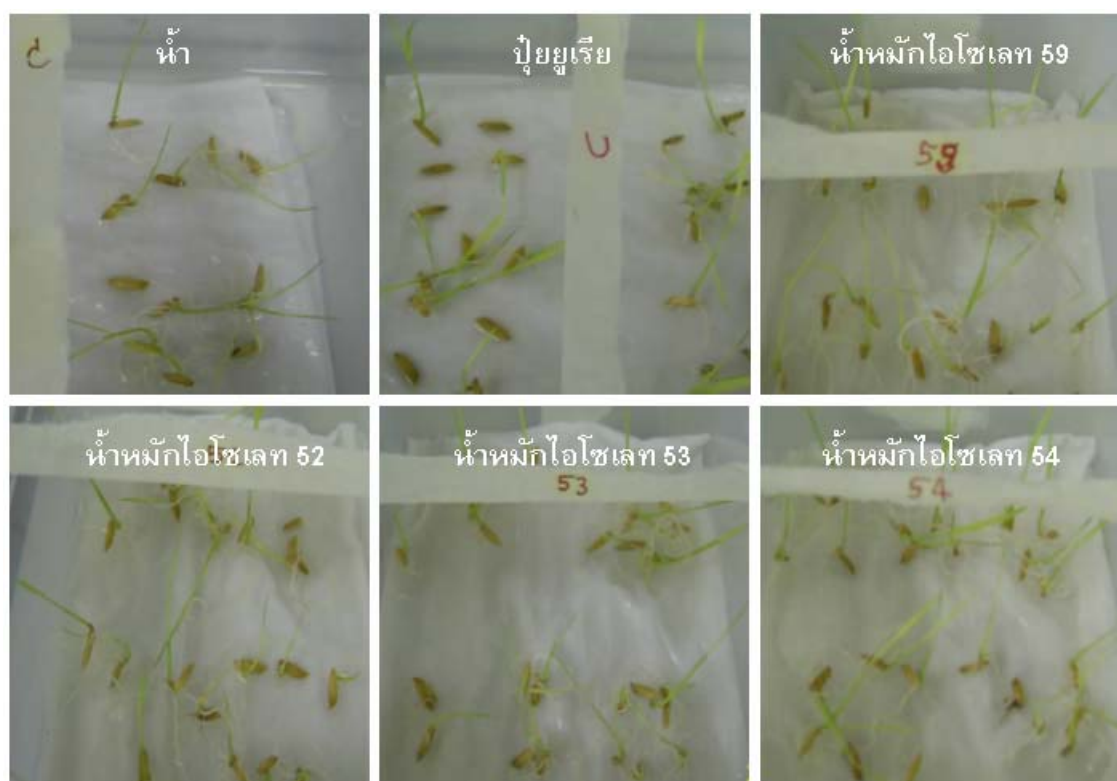
3.3.2 ผลของน้ำหมักชีวภาพต่อการงอกและการเจริญของเมล็ดข้าว

การงอกของเมล็ดข้าว เมื่อได้รับน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ที่หมักนาน 4 สัปดาห์และเจือจางในสัดส่วน 1:500 เทียบกับน้ำและปุ๋ย ณ วันที่ 9 แสดงดังรูปที่ 3.2 จากการทดลองพบว่าเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 สามารถงอกได้บนกระดาษที่ชุ่มด้วยสารละลายน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ น้ำ และปุ๋ย ในอัตราการงอกที่เท่าๆกัน ไม่มีข้าวในกลุ่มใดที่ไม่งอก สามารถใช้สารละลายต่างๆ ดังที่กล่าวมาสำหรับการทดลองต่อไปได้

เมล็ดข้าวเริ่มงอกรากในวันที่ 3 ดังนั้นต้นอ่อนข้าวหลังงอก 3 วัน จนถึง 9 วัน น่าจะใช้ในการทดลองเพื่อดูการแสดงออกของยีนกลุ่ม antioxidant enzymes ได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการทดลอง ส่วนการ treatment ด้วยสภาวะเครียดจากออกซิเดชันชนิดต่างๆ ต้องพิจารณาอายุของต้นข้าวอีกทีหนึ่ง

ต้นอ่อนข้าวอายุ 9 วัน ต้นอ่อนยังเจริญได้ดีแต่ มีใบค่อนข้างยาว ต้นกล้าเริ่มเหี่ยวเพราะไม่มีวัสดุประคอง จึงไม่เหมาะสมที่จะเลี้ยงให้เจริญเติบโตบนกระดาษที่ชุ่มอีกต่อไป ไม่สามารถจะทำการทดลองต่อใน square plate ขนาดหนา 1 เซนติเมตรได้ ควรย้ายไปปลูกลงในภาชนะอื่น เช่นใน magenta box หรือขวดที่สูงพอสมควรและควรมีวัสดุช่วย support

จากการทดลองอาจสรุปได้ว่า ปุ๋ย และน้ำหมักจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆที่ใช้ ไม่ได้ยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว เราจึงสามารถนำไปการทดลองเพื่อดูการแสดงออกของยีนกลุ่ม antioxidant enzymes ได้



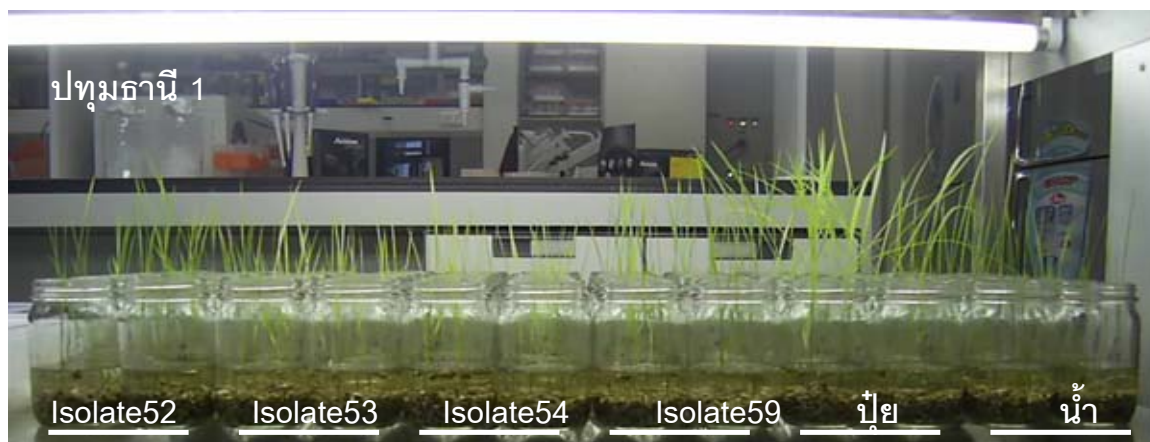
รูปที่ 3.2 การงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เมื่อได้รับน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ เทียบกับน้ำและปุ๋ย ณ วันที่ 9 ของการงอก

เมื่อทดสอบการเจริญของเมล็ดข้าวที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียไฮโดรไลต์ต่างๆ (เจือจาง 1:500) โดยสังเกตความสูงและการเจริญเติบโตของต้นที่ปลูกในขวดแก้ว โดยมี vermiculite (แร่ดินเหนียว $3\text{Mg}\cdot\text{O}\cdot\text{Fe}_2\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 3\text{SiO}_2$) เป็นวัสดุปลูก พบว่าต้นข้าวที่ได้รับปุ๋ยมีการเจริญเติบโตมากที่สุด รองลงมาได้แก่ต้นข้าวที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียไฮโดรไลต์ที่ 59 ส่วนต้นข้าวที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียไฮโดรไลต์อื่นๆ และน้ำ มีการเจริญเติบโตเท่าๆกัน แสดงดังรูปที่ 3.3

(A)



(B)



รูปที่ 3.3 ต้นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 รดด้วยน้ำกลั่น สารละลายปุ๋ยยูเรีย และน้ำหมักชีวภาพจากไฮโดรไลต์ที่ 52, 53, 54, 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์ และเจือจางขนาด 1:500 โดยรดตั้งแต่เริ่มปลูก (A) อายุ 5 วันและ (B) อายุ 14 วัน

3.4 สรุป

การใช้น้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆที่เราคัดเลือกได้ รวมทั้งไอโซเลทที่ 59 และหมักนาน 4 สัปดาห์เป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพนั้น การเจือจางที่ความเข้มข้น 1:500 เป็นสัดส่วนที่เหมาะสม และจะเป็นความเข้มข้นที่จะใช้ในการวิจัยต่อไป ผลของน้ำหมักชีวภาพต่อการงอกของเมล็ดข้าวพบว่าปุ๋ยและน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่ใช้ ไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าว โดยต้นอ่อนข้าวหลังงอก 3 วัน จนถึง 9 วันเป็นช่วงที่เหมาะสมที่จะนำไปทำการทดลองเพื่อดูการแสดงออกของยีนกลุ่ม antioxidant enzymes

การจะวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ antioxidant หรือวัด antioxidant enzyme activity ของข้าวที่ปลูกในโรงเรือนก็เป็นไปได้ แต่ปัจจัยที่จะต้องควบคุมมีมาก เนื่องจากระบบ antioxidant ของพืชค่อนข้างไวต่อการตอบสนอง อีกทั้งยังต้นข้าวอายุมากขึ้นอาจเห็นผลได้ไม่ชัดเท่าต้นข้าวที่มีอายุน้อย ดังนั้นเพื่อลดปัจจัยที่อาจมีผลต่อการทดลองและเพื่อการควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆให้ได้มากที่สุด จึงจะเลือกทำการทดลองในระยะต้นอ่อน (seedlings) ของข้าว

ผลจากการวัดความสูงของข้าวที่ปลูกในขวดโดยมีวัสดุ vermiculite เป็นวัสดุประคองพบว่าต้นข้าวที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 52, 53, 54, และ 59 มีความสูงมากกว่าต้นข้าวที่ได้รับน้ำ แต่ก็ยังสูงน้อยกว่าต้นข้าวที่ได้รับปุ๋ย (16-16-16) อย่างไรก็ดี การที่ต้นข้าวที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆแสดงถึง performance ที่ดีกว่าต้นข้าวที่ได้รับน้ำ (กลุ่มควบคุม) ผลขั้นต้นแสดงถึงความเป็นไปได้ว่าน้ำหมักชีวภาพสูตรที่เราคัดเลือกมาน่าจะให้ผลการทดลองที่ดี

บทที่ 4

ศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพที่มีต่อความทนทานของข้าวภายใต้สภาวะเครียด จากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำจากสารเคมี

ในการศึกษาผลของน้ำหมักชีวภาพในด้านการทำงานและการแสดงออกของยีนกลุ่ม antioxidant enzymes ที่มีต่อความทนทานของข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันนั้น จะใช้การเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยใช้สารเคมีซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ในระบบ antioxidant อันซับซ้อนของพืช สารเคมีที่เลือกใช้ได้แก่ AT (aminotriazole) ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์คาตาเลส (catalase) สารเคมี BSO (buthionine sulfoximine) จะยับยั้งเอนไซม์ γ -glutamylcysteine synthetase ที่ใช้ในการสร้าง กลูตาไธโอน (small molecule glutathione) ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้ยังใช้ MV (methyl viologen) ซึ่งจะเพิ่มการสร้าง superoxide radical ในคลอโรพลาสต์ซึ่งเป็น free radical species ให้มากขึ้น

4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ต้นอ่อนข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 หลังออก 7 วันบนกระดาดรอง และน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59

4.2 วิธีทดลอง

4.2.1 การชักนำข้าวให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชันด้วยสารเคมี

นำข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 แชน้ำ 1 คินในที่มีด แบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกปลูกบนกระดาดรอง 5-6 ชั้นที่ชุ่มน้ำในถาด กลุ่มที่สองปลูกบนกระดาดรอง 5-6 ชั้นที่ชุ่มน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ปลูกที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ด้วยแสงสว่าง $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.1 (a) แสดงการปลูกข้าวบนกระดาดรอง เมื่อต้นข้าวอ่อนอายุได้ 7 วันดังรูปที่ 4.1 (b) คัดเลือกต้นอ่อนข้าวที่มีขนาดเท่าๆกันเข้าสู่วิธีการทดลอง

ในการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ต้นอ่อนข้าวจากทั้งสองกลุ่มจะถูกย้ายสู่ขวดที่มีสารเคมี AT 4 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BSO 50 มิลลิโมลาร์ และ MV 10 ไมโครโมลาร์ ภาพการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.2 หลังจากนั้น 0, 1, 2, 4, 8 ชั่วโมง เก็บต้นข้าวอ่อน (whole seedlings) เพื่อสกัด RNA ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและสกัดโปรตีนเพื่อศึกษา activity ของเอนไซม์กลุ่ม antioxidant

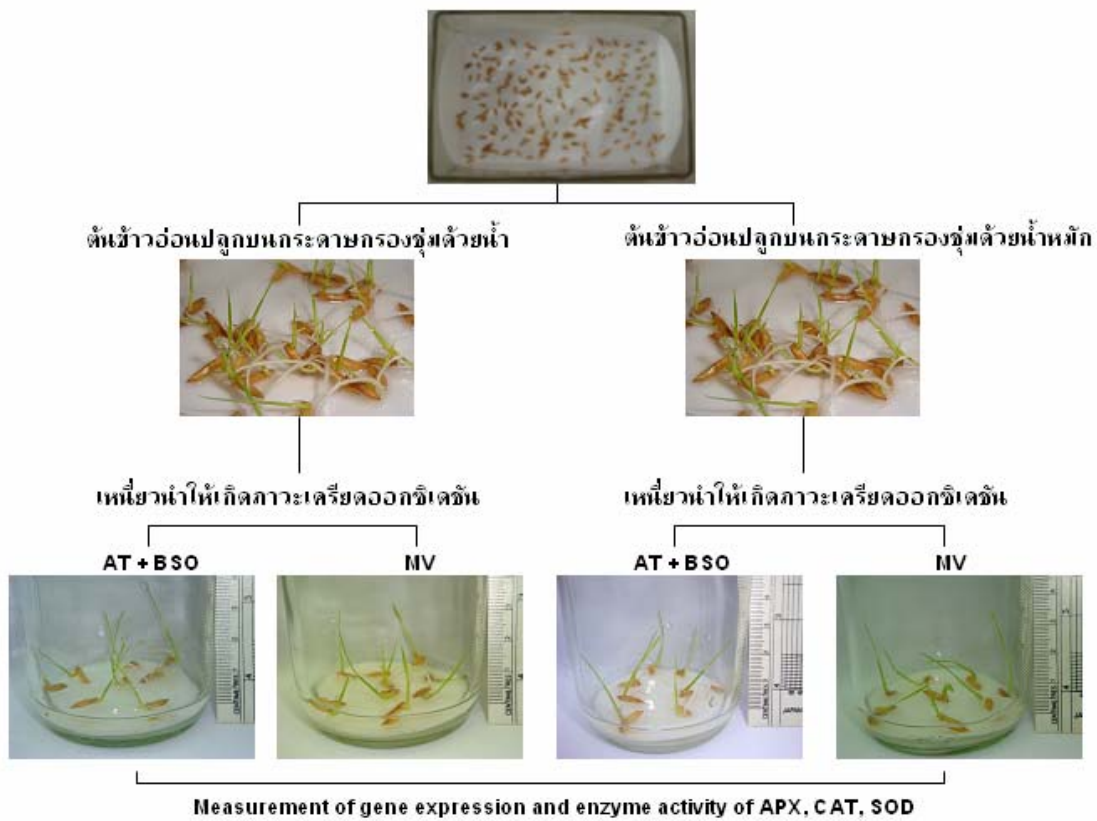
A)



B)



รูปที่ 4.1 แสดงการปลูกข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 (A) บนกระดาษกรองในถาดและต้นอ่อนข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 อายุ 7 วัน (B)



รูปที่ 4.2 แผนผังแสดงการทดลองการชักนำข้าวให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชันด้วยสารเคมี

4.2.2 การวัดการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน

สกัด RNA จากต้นข้าวอ่อนโดยใช้ชุดสกัด Qaigen RNeasy Kit RNA ที่ได้ถูก treated ด้วย DNaseI (Invitrogen) ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยชุด SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) ปฏิบัติ RT-PCR โดยใช้ gene-specific primers ดังตารางที่ 4.1 ได้ถูกเตรียมโดยใช้ปริมาณ cDNA เริ่มต้นเท่าๆกัน และใช้ยีน actin เป็น internal control

superoxide dismutase (SOD) (Seong et al., 2007) ปฏิบัติ RT-PCR เริ่มจาก prenaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 25 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที, แล้ว final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

ascorbate peroxidase (APX) ปฏิบัติ RT-PCR ดัดแปลงเล็กน้อยจาก Hong et al., 2007 เริ่มจาก prenaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 6 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวนรอบที่ใช้ตามที่ระบุในตารางที่ 4.1 แล้ว final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

catalase (CAT) ปฏิบัติ RT-PCR เริ่มจาก prenaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาตามจำนวน 25 รอบ ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที, แล้ว final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

actin ปฏิบัติ RT-PCR ดัดแปลงเล็กน้อยจาก Hong et al., 2007 เริ่มจาก prenaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 6 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 20 รอบ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

ตารางที่ 4.1 ไพร์เมอร์สำหรับ RT-PCR ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	product (bp)	Cycles
OsAPX2	AGA GTC AGT ACG ATC AAG AC	TCT TGA CAG CAA ATA GCT TGG	183	22
OsAPX4	GAT TGC TAT GTT CTT CAT CA	GAG CAC ACA GAA GAC GGA AT	203	25
OsAPX8	TGG TCT GAT GAC CTC CTC TGA	CAT GAG CCA TGA CAA CTA GA	222	28
OsSodA	GCT ACT TCT GCC ACT TGC	GTG CTC CAT GCT CCT TTC	300	25
OsSodB	GGC TCG ACA TGT GGA CGG	GCC CAG AGA CAC TTC CCG	300	25
OsCatA	CCG TGG GGC GCC TCG TTC TCA	TGG CGC CGT CGT AGT GGT TGT TGT	237	25
OsCatB	CGC CCC CGT CTG GAA CAA CA	ACC AGG AGC ACG GAG AAA ATC AGC	217	25
OsCatC	GGC GCC CCC GTA TGG AAC AA	CGG GGC GCG GAG GAA GTC	216	25
OsActin	ATG CTC TCC CCC ATG CTA TC	TCT TCC TTG CTC ATC CTG TC	465	20

4.2.3 วัดการทำงานของเอนไซม์แอนติออกซิแดนท์

บดต้นอ่อนของข้าวให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติม 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) ที่มี 2 mM EDTA และ 1% polyvinylpyrrolidone-40 (PVP-40) ถ้าใช้ในการศึกษา activity ของเอนไซม์ APX ให้เติม 1 mM ascorbic acid ลงไปด้วย นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที ใช้ supernatant ในการศึกษา activity ของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนวัดโดยใช้วิธีของ Bradford, 1976 วิธีวัดการทำงานของเอนไซม์ APX และ CAT ที่ใช้ปรับปรุงจากวิธีของ Rao et al., 1996 activity ของเอนไซม์คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่เปลี่ยนแปลงไปในเวลาที่กำหนดต่อ extinction coefficient (ϵ) ส่วนวิธีวัดการทำงานของเอนไซม์ SOD ปรับปรุงจากวิธีของ Giananpolitis and Ries, 1977

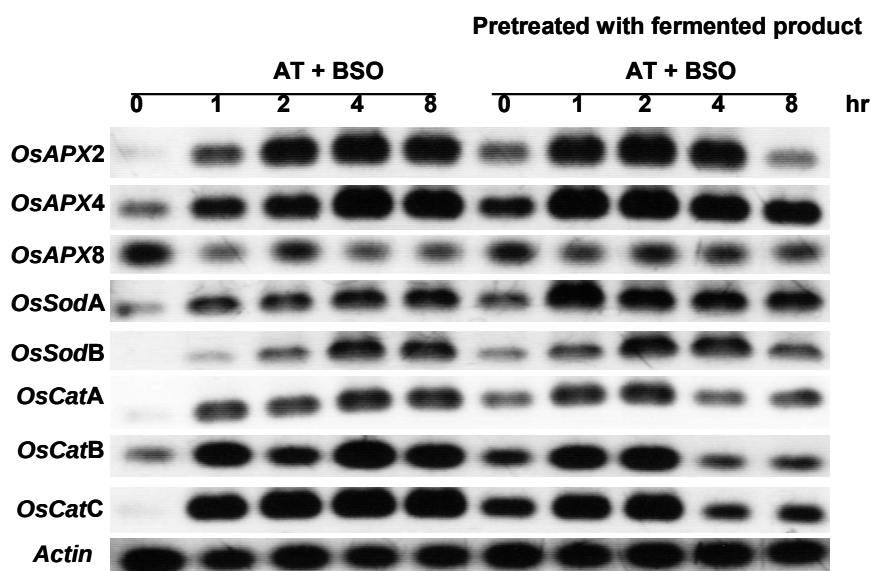
superoxide dismutase (SOD) activity ของเอนไซม์คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ 560 nM เนื่องจากการยับยั้งปฏิกิริยา reduction ของ Nitroblue tetrasolium (NBT) ได้ 50% ใน 5 มิลลิเมตรของปฏิกิริยาผสมซึ่งประกอบด้วย 50 mM HEPES (pH 7.6), 0.1 mM EDTA, 50 mM Na_2CO_3 (pH 10.4), 13 mM methionine, 75 μM NBT, 2 μM riboflavin และสารสกัดเอนไซม์ของต้นอ่อนข้าว โดย 1 unit ของเอนไซม์หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการยับยั้งปฏิกิริยา reduction ของ Nitroblue tetrasolium (NBT) 50%

ascorbate peroxidase (APX) activity ของเอนไซม์คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ 290 nM เนื่องจากการปฏิกิริยา oxidation ของ ascorbate ในช่วงเวลา 3 นาที ใน 1 มิลลิเมตรของปฏิกิริยาผสมซึ่งประกอบด้วย 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), 0.2 mM H_2O_2 , 0.5 mM ascorbate และสารสกัดเอนไซม์ของต้นอ่อนข้าว (extinction coefficient = $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

catalase (CAT) activity ของเอนไซม์คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ 240 nM เนื่องจากการสลายตัวของ H_2O_2 ในช่วงเวลา 5 นาที ใน 3 มิลลิเมตรของปฏิกิริยาผสมซึ่งประกอบด้วย 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 10 μl ของ 30% H_2O_2 และสารสกัดเอนไซม์ของต้นอ่อนข้าว (extinction coefficient = $39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

4.3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน *superoxide dismutase (SOD)*, *ascorbate peroxidase (APX)*, และ *catalase (CAT)* ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี AT + BSO



รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *SOD*, *APX*, และ *CAT* โดยวิธี RT-PCR ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี AT 4 มิลลิโมลาร์ และ BSO 50 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะที่ไม่ได้รับและได้รับการ pretreat ก่อนด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 โดยมียีน actin เป็น internal standard ณ เวลา 0, 1, 2, 4, และ 8 ชั่วโมง

ต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนจะ treat ด้วย AT+BSO มีระดับ transcript เริ่มต้นของ *APX1* และ *APX4* ซึ่งเป็นยีนที่พบใน cytosol และ peroxisome ตามลำดับสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้รับการ pretreat

เมื่อต้นข้าวอ่อนได้รับสภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วย AT+BSO พบว่า มีระดับ transcript ของ *APX2* และ *APX4* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงแรกหลังได้รับการเหนี่ยวนำ ส่วนต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 ก็มีระดับ transcript ของ *APX2* และ *APX4* เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันแต่ในปริมาณที่มากกว่าและลดปริมาณลงเร็วกว่าด้วยโดยเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 4 หลังได้รับสภาวะเครียด เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมงต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพมีระดับ transcript ของ *APX2* เท่ากับเวลา 0 ชั่วโมง

ส่วนระดับ transcript ของ *APX8* ซึ่งเป็นยีนที่พบใน chloroplast ของต้นข้าวอ่อนทั้งสองกลุ่มมีปริมาณเท่าๆกันและไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับสภาวะเครียดจาก AT+BSO ซึ่งมีรายงานว่า *APX8* จะตอบสนองได้ไวต่อความเค็ม (Hong et al., 2007)

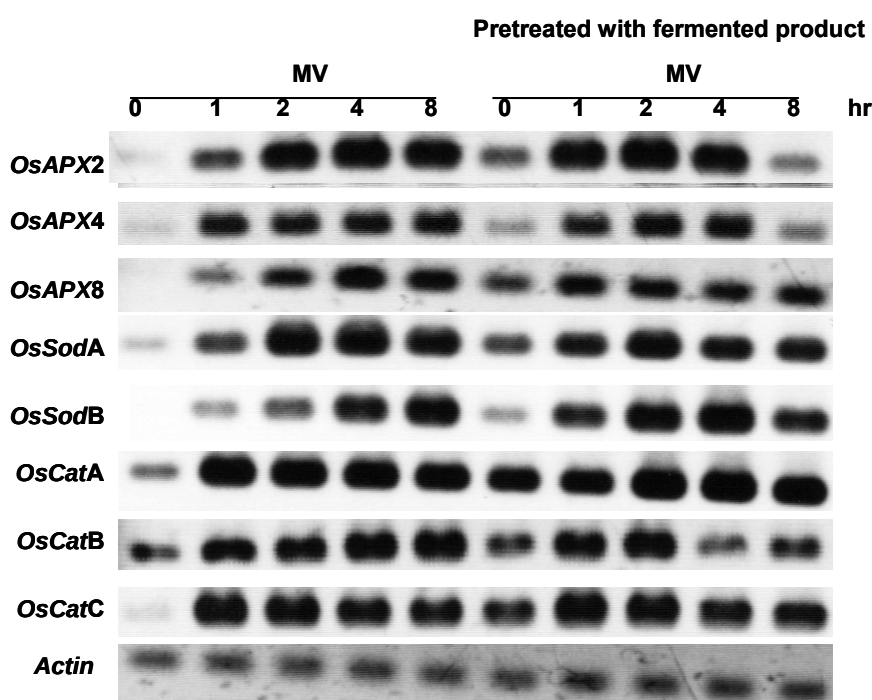
การแสดงออกของยีน *SodA* ในต้นข้าวอ่อนทั้งสองกลุ่มเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสภาวะเครียดจาก AT+BSO โดยต้นข้าวอ่อนที่ไม่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆถึงชั่วโมงที่

8 แต่ต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพจะมีระดับ transcript เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 1 ชั่วโมงและหลังจากนั้นจะเริ่มลดลง

การแสดงออกของยีน *SodB* ในต้นข้าวอ่อนเมื่อได้รับสภาวะเครียดจาก AT+BSO ในกลุ่มที่ไม่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนมีระดับ transcript เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 8 แต่ในกลุ่มที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพจะมีระดับ transcript สูงขึ้นในชั่วโมงที่ 2 และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเริ่มลดลง

เมื่อต้นข้าวอ่อนได้รับสภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วย AT+BSO พบว่าต้นข้าวกลุ่มที่ไม่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนมีระดับ transcript ของ *Catalase* ทั้ง 3 isoform อันได้แก่ *CatA*, *CatB*, และ *CatC* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1, 2 จนถึงชั่วโมงที่ 4 และลดลงในชั่วโมงที่ 8 ในขณะที่ต้นข้าวกลุ่มที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนมีระดับ transcript ของ *Catalase* ทั้ง 3 เพิ่มขึ้นแต่ในระดับที่น้อยกว่าและเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 4

4.3.2 การเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน *superoxide dismutase (SOD)*, *ascorbate peroxidase (APX)*, และ *catalase (CAT)* ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี MV



รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *SOD*, *APX*, และ *CAT* โดยวิธี RT-PCR ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี MV 10 ไมโครโมลาร์ในสภาวะที่ไม่ได้รับและได้รับการ pretreat ก่อนด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 โดยมียีน actin เป็น internal standard ณ เวลา 0, 1, 2, 4, และ 8 ชั่วโมง

ต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ treat ด้วย MV มีระดับ transcript APX2 ซึ่งเป็นยีนที่พบใน cytosol สูงกว่า APX4 และ APX8 ซึ่งเป็นยีนที่มีใน chloroplast และ peroxisome

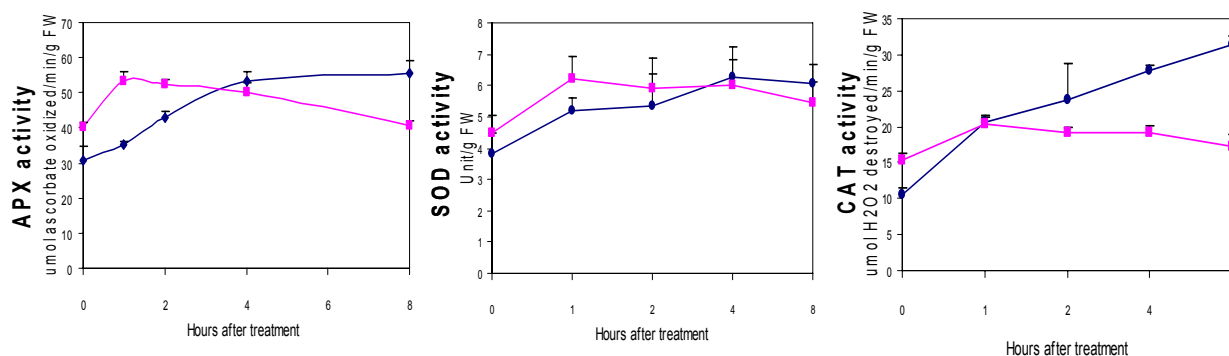
เมื่อต้นข้าวอ่อนได้รับสภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วย MV พบว่ามีระดับ transcript ของ APX2 และ APX4 เพิ่มขึ้นเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงแรกหลังได้รับการเหนี่ยวนำ ต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 ก็มีระดับ transcript ของ APX2 และ APX4 เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันแต่ลดปริมาณลงเร็วกว่าด้วยโดยเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 8 หลังได้รับสภาวะเครียด

ส่วนระดับ transcript ของ APX8 ซึ่งเป็นยีนที่พบใน chloroplast ของต้นข้าวอ่อนทั้งสองกลุ่มมีปริมาณเท่าๆกันและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ APX1 และ APX4 เมื่อได้รับสภาวะเครียดจาก MV ซึ่งมีรายงานว่า APX8 จะตอบสนองได้ดีที่สุดต่อความเค็ม (Hong et al., 2007)

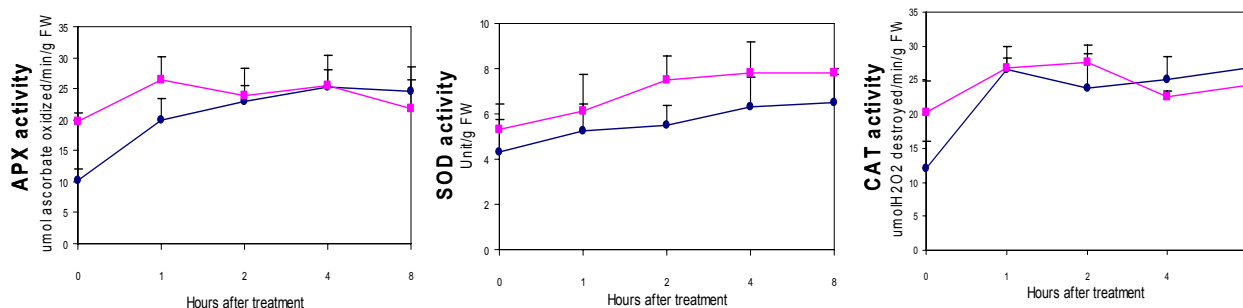
การแสดงออกของยีน SodA และ SodB ในต้นข้าวอ่อนทั้งสองกลุ่มเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสภาวะเครียดจาก MV โดยระดับของ SodA จะเพิ่มขึ้นมากกว่าและระดับ transcript SodA และ SodB ของต้นข้าวอ่อนทั้งสองกลุ่มยังคงที่ระดับสูงจนถึงชั่วโมงที่ 8

เมื่อต้นข้าวอ่อนได้รับสภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วย AT+BSO พบว่าต้นข้าวกลุ่มที่ไม่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนมีระดับ transcript ของ Catalase ทั้ง 3 isoform อันได้แก่ CatA, CatB, และ CatC เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1, 2 จนถึงชั่วโมงที่ 8 ในขณะที่ต้นข้าวกลุ่มที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนมีระดับ transcript ของ Catalase ทั้ง 3 เพิ่มขึ้นแต่ในระดับที่น้อยกว่าและเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 4 ซึ่งเห็นได้ชัดเจนใน CatB และ CatC

4.3.3 การทำงานของเอนไซม์แอนติออกซิแดนท์ superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), และ catalase (CAT) ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี AT + BSO และ MV



รูปที่ 4.5 Enzyme activity ของ SOD, APX, และ CAT ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี AT 4 มิลลิโมลาร์และ BSO 50 มิลลิโมลาร์ในสภาวะที่ไม่ได้รับ(●) และได้รับการ pretreat ก่อน(□) ด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 ณ เวลา 0, 1, 2, 4, และ 8 ชั่วโมง



รูปที่ 4.6 Enzyme activity ของ SOD, APX, และ CAT ของต้นอ่อนข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี MV 10 ไมโครโมลาร์ในสภาวะที่ไม่ได้รับ (●) และได้รับการ pretreat (□) ก่อนด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 ณ เวลา 0, 1, 2, 4, และ 8 ชั่วโมง

จากการทดลองจะเห็นว่าต้นอ่อนข้าวที่ได้รับการสภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี AT, BSO และ MV มีการตอบสนองที่ต่างกันต่อ enzyme activity ของ SOD, APX, และ CAT

ต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนจะ treat ด้วยสารเคมี AT+BSO และ MV มีระดับ enzyme activity เริ่มต้นสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้รับการ pretreat น้ำหมักชีวภาพหลังจากนั้นต้นข้าวอ่อนทั้งสองกลุ่มจะมีการเพิ่มของ enzyme activity เช่นเดียวกันแต่ในปริมาณที่

ต่างกัน สภาวะเครียดที่เหนียวนำด้วย AT+BSO จะมี enzyme activity ของ CAT ต่างกันมากที่สุด ระหว่างต้นข้าวอ่อนทั้งสองกลุ่ม ส่วนสภาวะเครียดที่เหนียวนำด้วย MV จะมี enzyme activity ของ SOD ต่างกันมากที่สุด

ผลการทดลองที่ได้จากการแสดงออกของยีนกลุ่ม antioxidant และ enzyme activity เมื่อให้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันในต้นข้าวอ่อนพบว่าสอดคล้องไปในทำนองเดียวกันคือในกลุ่มต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ก่อนด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 เอนไซม์จะมี activity สูงขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าต้นข้าวอ่อนที่ไม่ได้รับการ pretreat และเมื่อเวลาผ่านไปพบว่า activity ของเอนไซม์ในกลุ่มต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ก่อนด้วยน้ำหมักจะลดลงเร็วกว่า ซึ่งการที่ระดับเอนไซม์สูงขึ้นอย่างรวดเร็วนั้นอาจจะช่วยในเรื่องการฟื้นตัว (recovery) ของข้าวภายหลังได้รับ stress treatment หลังจากสภาวะ stress หมดไปต้นอ่อนข้าวจึงมี enzyme activity ลดลง ผลที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากสาร ALA ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำหมักชีวภาพซึ่งมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของพืชได้

4.4 สรุป

สามารถเหนียวนำต้นข้าวอ่อนให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชันสารเคมีได้โดยการใช้สารเคมี AT, BSO และ MV ถึงแม้ว่าจะสังเกตเห็นลักษณะที่เปลี่ยนแปลงทาง phenotype ได้ไม่ชัดเจนในต้นข้าวอ่อนกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพเมื่อถูกเหนียวนำให้เกิดความเครียด แต่เมื่อทดสอบทางชีววิทยาโมเลกุลพบว่ายีนและเอนไซม์กลุ่มต้านออกซิเดชันได้ถูกกระตุ้นให้ทำงานแล้ว

ต้นข้าวอ่อนกลุ่มที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนพบว่ามีระดับ transcript ของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงอยู่ก่อนแล้ว ต้นข้าวอ่อนกลุ่มนี้มีการตอบสนองต่อสารเคมีที่ใช้เหนียวนำให้เกิดความเครียดได้ไวกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพ และระดับของ transcript จะลดลงสู่สภาวะปกติได้เร็วกว่า เหมือนเป็นการเตรียมพร้อมให้กับต้นข้าวอ่อน เมื่อพบกับภาวะเครียดก็สามารถที่จะจัดการกับภาวะเครียดได้อย่างรวดเร็วและลดลงสู่สภาวะปกติได้เร็ว ผลที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากสาร ALA ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำหมักชีวภาพซึ่งมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของพืชได้

บทที่ 5

สรุป

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงได้จากดินและน้ำหมักฟางข้าวจำนวน 4 isolate คือไอโซเลทที่ 52, 53, 54, และ 59 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ ได้ผลว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท เป็นเชื้อตัวเดียวกันคือ *Rhodospseudomonas palustris* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม purple non-sulfur phototropic bacteria ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตฮอร์โมนพืชได้หลายชนิด เช่น cytokinin, kinetin, รวมทั้ง ALA น้ำหมักที่เกิดจากการใช้เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 หมักนาน 4 สัปดาห์ สามารถผลิต ALA ได้มากที่สุดคือ 2.97 mM ในการทดลองต่อไปจึงจะใช้น้ำหมักที่หมักโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 และหมักนาน 4 สัปดาห์ซึ่งสอดคล้องกับระยะเวลาที่เกษตรกรใช้ในการผลิตด้วย ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 59 ที่หมักนาน 4 สัปดาห์ โดยสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ปรากฏค่าวิเคราะห์ต่างๆที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ในการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ

การใช้น้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆที่เราคัดเลือกได้ รวมทั้งไอโซเลทที่ 59 และหมักนาน 4 สัปดาห์เป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพนั้น การเจือจางที่ความเข้มข้น 1:500 เป็นสัดส่วนที่เหมาะสม และจะเป็นความเข้มข้นที่จะใช้ในการวิจัยต่อไป ผลของน้ำหมักชีวภาพต่อการงอกของเมล็ดข้าวพบว่าปุ๋ยและน้ำหมักชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่ใช้ ไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าว โดยต้นอ่อนข้าวหลังงอก 3 วัน จนถึง 9 วันเป็นช่วงที่เหมาะสมที่จะนำไปทำการทดลองเพื่อดูการแสดงออกของยีนกลุ่ม antioxidant enzymes

การจะวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ antioxidant หรือวัด antioxidant enzyme activity ของข้าวที่ปลูกในโรงเรือนก็เป็นไปได้ แต่ปัจจัยที่จะต้องควบคุมมีมาก เนื่องจากระบบ antioxidant ของพืชค่อนข้างไวต่อการตอบสนอง อีกทั้งยังต้นข้าวอายุมากขึ้นอาจเห็นผลได้ไม่ชัดเท่าต้นข้าวที่มีอายุน้อย ดังนั้นเพื่อลดปัจจัยที่อาจมีผลต่อการทดลองและเพื่อการควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆให้ได้มากที่สุด จึงจะเลือกทำการทดลองในระยะต้นอ่อน (seedlings) ของข้าว

ผลจากการวัดความสูงของข้าวที่ปลูกในขวดโดยมีวัสดุ vermiculite เป็นวัสดุประคองพบว่าต้นข้าวที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 52, 53, 54, และ 59 มีความสูงมากกว่าต้นข้าวที่ได้รับน้ำ แต่ก็ยังสูงน้อยกว่าต้นข้าวที่ได้รับปุ๋ย (16-16-16) อย่างไรก็ดี การที่ต้นข้าวที่ได้รับน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆแสดงถึง performance ที่ดีกว่าต้นข้าวที่ได้รับน้ำ (กลุ่มควบคุม) ผลขั้นต้นแสดงถึงความเป็นไปได้ว่าน้ำหมักชีวภาพสูตรที่เราคัดเลือกมาน่าจะให้ผลการทดลองที่ดีและน้ำหมักชีวภาพสูตรที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 ซึ่งต้นอ่อนข้าวมีการเจริญเติบโตดีที่สุดในสูตรที่เราเลือกใช้ในการทดลองการแสดงออกของยีนกลุ่ม antioxidant และ enzyme activity ในข้าวที่เหนียวทำให้เกิดความเครียดจากออกซิเดชัน

ผลการทดลองที่ได้จากการแสดงออกของ ascorbate peroxidase (APX) superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม antioxidant และผลของ enzyme activity เมื่อให้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันในต้นข้าวอ่อนพบว่าสอดคล้องไปในทำนองเดียวกันคือ

ในกลุ่มต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ก่อนด้วยน้ำหมักชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลท 59 เอนไซม์จะมี activity สูงขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าต้นข้าวอ่อนที่ไม่ได้รับการ pretreat และเมื่อเวลาผ่านไปพบว่า activity ของเอนไซม์ในกลุ่มต้นข้าวอ่อนที่ได้รับการ pretreat ก่อนด้วยน้ำหมักจะลดลงเร็วกว่า ซึ่งการที่ระดับเอนไซม์สูงขึ้นอย่างรวดเร็วนั้นอาจจะช่วยในเรื่องการฟื้นตัว (recovery) หรือแสดงถึงความทนทาน (tolerance) ของข้าวภายหลังได้รับ stress treatment หลังจากภาวะ stress หดไปต้นอ่อนข้าวจึงมี enzyme activity ลดลง ผลที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากสาร ALA ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำหมักชีวภาพซึ่งมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของพืชได้

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ศึกษา metabolomics ของน้ำหมักชีวภาพสูตรต่างๆ และหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อจะได้ยืนยันประโยชน์ของน้ำหมักชีวภาพแก่ประชาชนได้ เพราะปัจจุบันคาดว่าสารที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อพืชนั้นน่าจะเป็นสาร ALA ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นแต่อาจจะเนื่องจากสารชนิดอื่นๆอีกก็ได้ ในด้านฤทธิ์ทางชีวภาพอาจลงลึกถึง mechanism และอาจศึกษาถึงผลของน้ำหมักชีวภาพสูตรต่างๆ ที่มีต่อ protoplast เปรียบเทียบกับ whole seedlings ของพืช

เอกสารอ้างอิง

1. คู่มือการขอรับบริการตรวจวิเคราะห์ ดิน น้ำ พืช ปุ๋ย และวัตถุเคมีการเกษตร (2549). กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ควิกปรินท์ ออฟเซต กทม. หน้า 29.
2. Giananpolitis CN, Ries SK. (1977) Superoxide dismutases - occurrence in higher plants. *Plant Physio.* 59: 309-314.
3. Guo Z, Huang M, Lu S, Yaqing Z, Zhong Q. (2007) Differential response to paraquat induced oxidative stress in two rice cultivars on antioxidants and chlorophyll a fluorescence. *Acta Physiol Plant.* 29:39-46.
4. Hong CY, Hsu YT, Kao CH. (2007) Expression of *ascorbate peroxidase 8* in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. *J Exp Bot.* October 4, 2007; erm174v1.
5. Huang M, Guo Z. (2005) Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biol Plant.* 49(1): 81-84.
6. Iwamoto M, Higo H, Higo K. (2000) Differential diurnal expression of rice catalase genes: the 5'-flanking region of *CatA* is not sufficient for circadian control. *Plant Science* 151:39-46.
7. Kobayashi M. (2000) Waste remediation and treatment using anoxygenic phototrophic bacteria. *Anoxygenic Phototrophic Bacteria.* p. 1269-1282.
8. Luksiene Z, Danilcenko H, Taraseviciene Z, Anusevicius Z, Marozienė A, Nivinskas. (2007) New approach to the fungal decontamination of wheat used for wheat sprouts: effects of aminolevulinic acid. *Inter J Food Micro.* 116:153-158.
9. Menezes-Benavente L, Teixeira FK, Kamei CLA, Margis-Pinheiro M. (2004) Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science.* 166:323-331.
10. Nishihara E, Kondo K, Parvez MM, Takahashi K, Watanabe K, Tanaka K. (2003) Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). *J Plant Physio.* 160:1085-1091.
11. Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110:125-136.
12. Sasaki K, Ikeda S, Nishizawa Y, Hayashi M. (1987) Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J Ferment Technol.* 65:511-515.

13. Sasaki K, Ikeda S, Konishi T, Nishizawa Y, Hayashi M. (1989) Influence of the iron on the excretion of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. J Ferment Bioeng. 68: 378–381.
14. Seong ES, Guo Jia, Kin YH, Cho JH, Lim CK, Hur JH, Wang MH. (2007) Regulations of marker genes involved in biotic and abiotic stress by overexpression of the *AtNDPK2* gene in rice. Biochem Biophys Res Commun. 363:126-132.
15. Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvao VC, Margis R, Margis-Pinheiro M. (2006) Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. Planta. 224:300-314.
16. Watanabe K, Tanaka T, Hotta Y, Kuramochi H, Takeuchi Y. (2000) Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. Plant Growth Regul. 32:99-103.
17. Zhang ZJ, Li HZ, Zhou WJ, Takeuchi Y, Yoneyama K. (2006) Effect of 5-aminolevulinic acid on development and salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers in vitro. Plant Growth Regul. 49:27-34.
18. Zhao F, Zhang H. (2006) Salt and paraquat stress tolerance results from co-expression of the *Suaeda salsa* glutathione S-transferase and catalase in transgenic rice. Plant Cell Tissue Organ Cult. 86:349-358.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ อยู่ในระหว่างการเตรียมต้นฉบับสำหรับส่ง
 - Journal of Plant Regulation (Impact factor 0.903) เรื่อง Improving chemically-induced oxidative stress tolerance of rice seedlings with biologically fermented product from plants ซึ่งเป็นเรื่องเกี่ยวกับผลการแสดงออกของ antioxidant gene และ enzyme activity เมื่อต้นข้าวได้รับความเครียดแบบ oxidative stress
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ ยังไม่มี
 - เชิงนโยบาย ยังไม่มี
 - เชิงสาธารณะ ยังไม่มี
 - เชิงวิชาการ มีการใช้โมเดลการกระตุ้นข้าวให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันคล้ายกับงานวิจัยนี้ในการเรียนการสอนระดับบัณฑิตศึกษา วิชา Drug Bioscreening 3307 751 หัวข้อ Bioscreening for antioxidative activity in plants
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
การนำเสนอผลงานในที่ประชุมที่เกี่ยวข้องกับการใช้น้ำหมักชีวภาพ
 - 3.1 เสนอผลงานโปสเตอร์
เรื่อง Isolation of photosynthetic bacteria and its effect on rice growth
ชื่องาน งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Bioasia 2007 Thailand
วันที่ 5 – 9 พฤศจิกายน 2550
สถานที่ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ
 - 3.2 เสนอผลงานโปสเตอร์
เรื่อง Effect of photosynthetic bacteria on rice growth
ชื่องาน งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Agricultural Biotechnology for Better Living and a Clean Environment (ABIC 2009)
วันที่ 22 – 25 กันยายน 2552
สถานที่ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่

เกษตรกรใช้น้ำหมักชีวภาพซึ่งเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านเป็นปุ๋ยอินทรีย์แทนปุ๋ยเคมีในการปลูกข้าวมากขึ้น ซึ่งมีรายงานว่าน้ำหมักชีวภาพมีส่วนผสมของแบคทีเรียกลุ่มที่สังเคราะห์แสงและสารอาหารหลายชนิดและทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีถึงแม้จะไม่ดีเท่าปุ๋ยเคมีแต่ก็ปลอดภัยต่อเกษตรกรผู้ใช้และต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาว ประกอบกับปัจจุบันสภาพแวดล้อมของโลกมีการเปลี่ยนแปลง เช่น ร้อนขึ้น มีปัญหาภัยแล้ง น้ำท่วม โรคพืช ดินเค็ม ฯลฯ สภาวะเหล่านี้ก่อให้เกิดการผลิตและสะสมอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นหรือเรียกว่าเกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ส่งผลให้พืชชนิดต่างๆ รวมทั้งข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเจริญเติบโตได้น้อยลงและทำให้ผลผลิตน้อยลงตามไปด้วย จึงน่าจะศึกษาถึงผลของน้ำหมักชีวภาพที่มีต่อความทนทานของข้าวภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การผลิตน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชต้องเริ่มจากการได้เชื้อแบคทีเรียที่ดีก่อน จากงานวิจัยนี้เราสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ดีได้จากดินและน้ำหมักฟางข้าว ซึ่งได้แก่เชื้อ *Rhodopseudomonas palustris* ไอโซเลทที่ 59 แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสังเคราะห์แสงได้และมีรายงานว่าสามารถสร้างสารเคมีชนิดหนึ่งที่เรียกว่ากรด 5-อะมิโนลิวูลินิกซึ่งมีรายงานว่าเป็สารที่มีประโยชน์กับพืชได้ การเตรียมน้ำหมักทำโดยผสมส่วนต่างๆลงในถังพลาสติกขนาด 20 ลิตร ดังนี้ ฟางข้าวที่ตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 1 นิ้ว 750 กรัม ดินจากพื้นที่ทำนาเกษตรอินทรีย์ 30 กรัม เติมน้ำเกลือ 37.5 กรัม และน้ำสะอาด 20 ลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดหมักในถังพลาสติกปิดฝาสนิทในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ การตรวจสอบคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตในแต่ละครั้งจะใช้การวัดสารเคมีชนิดดังกล่าวเป็นหลัก

เมื่อศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชพบว่า การใช้น้ำหมักชีวภาพจากเชื้อ *Rhodopseudomonas palustris* ไอโซเลทที่ 59 ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:500 ในการปลูกข้าวจะทำให้ต้นข้าวมีความสูง การเจริญเติบโต การออก ความยาวราก และดัชนีการออกของเมล็ดข้าวดีขึ้น

ถ้าปลูกต้นข้าวอ่อนในน้ำหมักชีวภาพประมาณ 7 วันก่อนจะเหนียวทำให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชันจากสารเคมี aminotriazole (AT) buthionine sulfoximine (BSO) และ methyl viologen (MV) พบว่าข้าวต้นข้าวอ่อนจะมีความทนทานภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้มากขึ้น โดยต้นข้าวอ่อนจะมีการแสดงออกของยีน 3 ชนิด ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), และ catalase (CAT) มากขึ้น รวมทั้งมีการทำงานของเอนไซม์แอนติออกซิแดนท์ SOD, APX และ CAT มากขึ้นด้วย ถึงแม้ว่าจะสังเกตเห็นลักษณะที่ทนทานทาง phenotype เมื่อถูกเหนียวทำให้เกิดความเครียดได้ไม่ชัดเจนในต้นข้าวอ่อนกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพ แต่เมื่อทดสอบทางชีววิทยาโมเลกุลพบว่ายีนและเอนไซม์กลุ่มต้านออกซิเดชันได้ถูกกระตุ้นให้ทำงานแล้ว

ต้นข้าวอ่อนกลุ่มที่ได้รับการ pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพก่อนพบว่ามีระดับ transcript ของยีนและการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดจากออกซิเดชันสูงอยู่ก่อนแล้ว ต้นข้าวอ่อนกลุ่มนี้มีการตอบสนองต่อสารเคมีที่ใช้เหนียวทำให้เกิดความเครียดได้ไวกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการ

pretreat ด้วยน้ำหมักชีวภาพ เหมือนเป็นการเตรียมพร้อมให้กับต้นข้าวอ่อน เมื่อเวลาผ่านไประดับของ transcript และการทำงานของเอนไซม์จะลดลงสู่สภาวะปกติได้เร็วกว่า เมื่อพบกับภาวะเครียดก็สามารถที่จะจัดการกับภาวะเครียดได้อย่างรวดเร็วและลดลงสู่สภาวะปกติได้เร็ว จึงเป็นไปได้ว่าน้ำหมักชีวภาพมีคุณสมบัติในการกระตุ้นทางชีวภาพในต้นข้าวอ่อนให้เกิดความทนทานภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เกษตรกรจึงน่าจะได้ประโยชน์ในการใช้น้ำหมักชีวภาพ