บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรีย

การศึกษาการคัดแยกแบคทีเรีย PGPR โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลังที่ปลูกในพื้นที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม ในเขตพื้นที่อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ขนาดพื้นที่ 400 เมตร x 400 เมตร (ภาพที่ 4.1) โดยการเก็บตัวอย่างจากดินรอบรากมันสำปะหลัง จำนวนทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4.2) นำมาคัดแยกแบคทีเรียที่มีศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ phosphate solubilization assay, siderophore production และ protease activity ผลการศึกษาพบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ทั้งหมด 17 ไอโซเลท

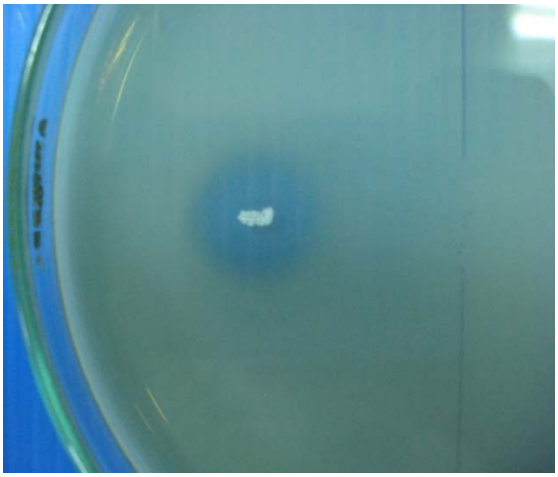
ภาพที่ 4.1 แปลงมันสำปะหลังในพื้นที่ทดลอง

ภาพที่ 4.2 รากมันสำปะหลังที่มีแบคทีเรียอาศัยอยู่รอบราก

2. การทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Activities) ของแบคทีเรียรอบรากพืช

2.1 Phosphate solubilization assay

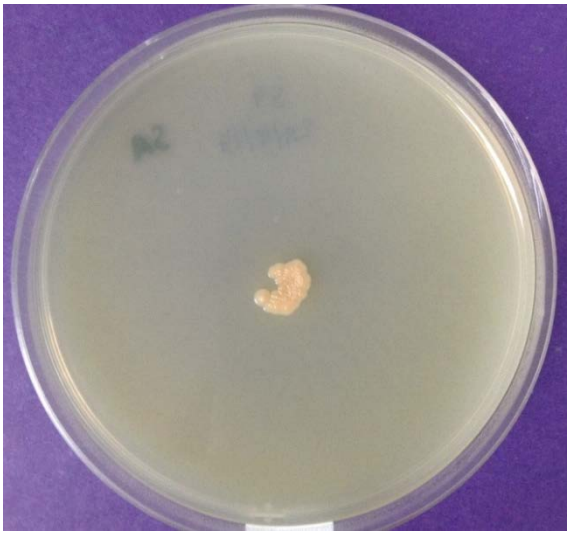
การศึกษาคุณสมบัติ phosphate solubilizer ของแบคทีเรียรอบรากพืชโดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลัง มาเพาะเลี้ยงเชื้อโดย spot เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติ phosphate solubilizer ซึ่งจะให้โคโลนีที่มี halo zone รอบโคโลนี พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันสำปะหลังทั้งหมด 17 ไอโซเลท ที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนี ประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 DK24 DK27 DK31 DK33 DK36 DK37 DK41 DK48 และ DK59 ตามลำดับ ตัวอย่างโคโลนีแบคทีเรียที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar แสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ตัวอย่างโคโลนีแบคทีเรียที่ให้ลักษณะ halo zone รอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar

2.2 Siderophore production

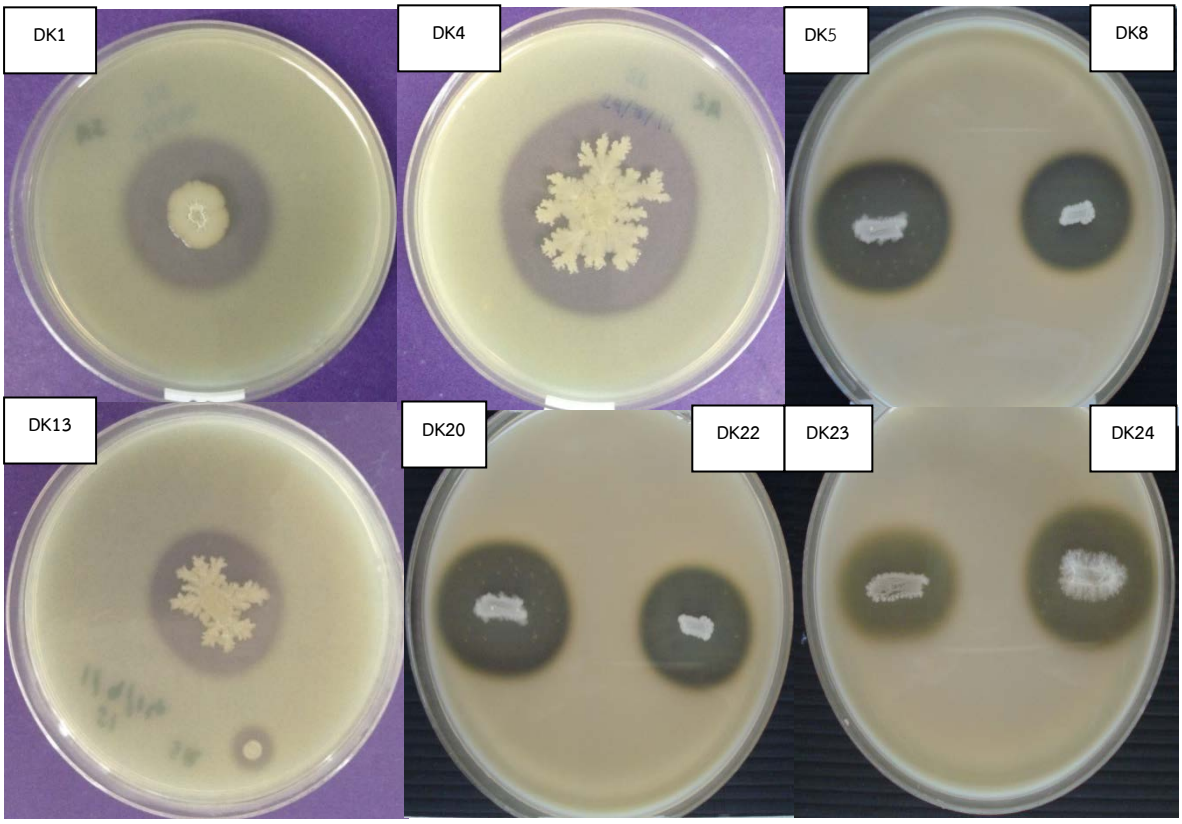
การศึกษาคุณสมบัติ phosphate solubilizer ของแบคทีเรีย โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลัง มาเพาะเลี้ยงเชื้อโดย spot เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เลือกโคโลนีที่ให้สีเหลือง-ส้มรอบๆ โคโลนี พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันสำปะหลังทั้งหมด 17 ไอโซเลท ที่สามารถสร้าง siderophore โดยให้โคโลนีที่มีสีเหลือง-ส้ม ประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 DK24 DK27 DK31 DK33 DK36 DK37 DK41 DK48 และ DK59 ตามลำดับ ตัวอย่างโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถสร้าง siderophore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar แสดงในภาพที่ 4.4



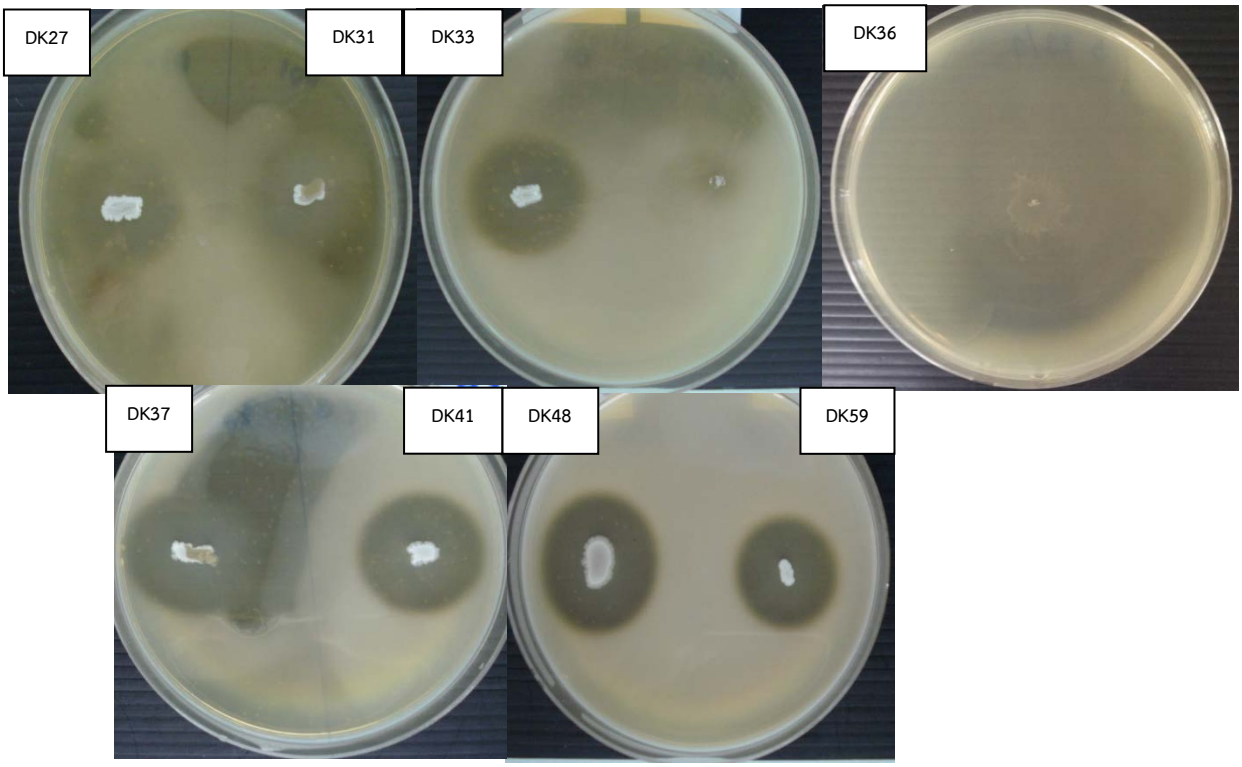
ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถสร้าง siderophore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAS agar

2.3 Protease activity

การศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสโดยนำแบคทีเรียที่แยกจากดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลังมาทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดย spot เชื้อลงบนอาหาร skimmed milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เลือกโคโลนีที่ให้โซนใสรอบๆ โคโลนี พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากมันสำปะหลังทั้งหมด 60 ไอโซเลท มีจำนวน 17 ไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยจะพบโซนใสรอบๆ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skimmed milk agar แบคทีเรียทั้ง 17 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 DK24 DK27 DK31 DK33 DK36 DK37 DK41 DK48 และ DK59 ตามลำดับ ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skimmed milk agar แบคทีเรียทั้ง 17 ไอโซเลท แสดงในภาพที่ 4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส แสดงในตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.5 ปฏิกิริยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skimmed milk agar เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยให้ลักษณะโซนใสรอบๆ โคโลนี ประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 และ DK24 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 ปฏิกิริยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skimmed milk agar เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยให้ลักษณะโซนใสรอบๆ โคโลนี (ต่อ) ประกอบด้วยไอโซเลท DK27 DK31 DK33 DK36 DK37 DK41 DK48 และ DK59 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสจากปฏิกิริยาการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skimmed milk agar

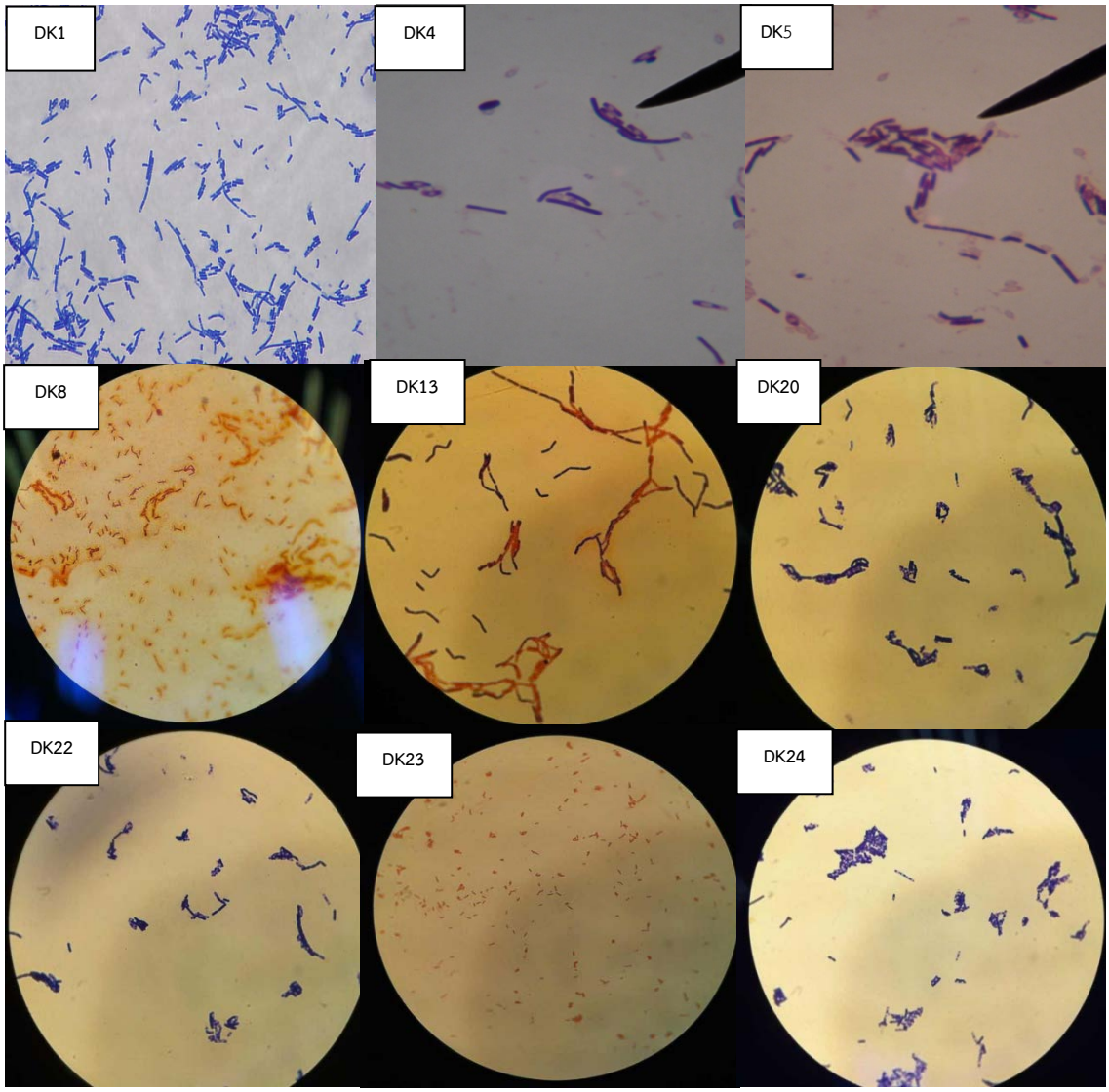
รหัสตัวอย่าง	**เส้นผ่านศูนย์กลาง (cm.)**
DK1	3.6
DK4	5.2
DK5	3.3
DK8	4.2
DK13	4.8
DK20	5.1
DK22	4.3
DK23	3.4
DK24	4.1
DK27	3.6
DK31	4.6
DK33	5.6
DK36	6.5
DK37	6.2
DK41	3.4
DK48	4.3
DK59	3.2
เฉลี่ย	**4.44**

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

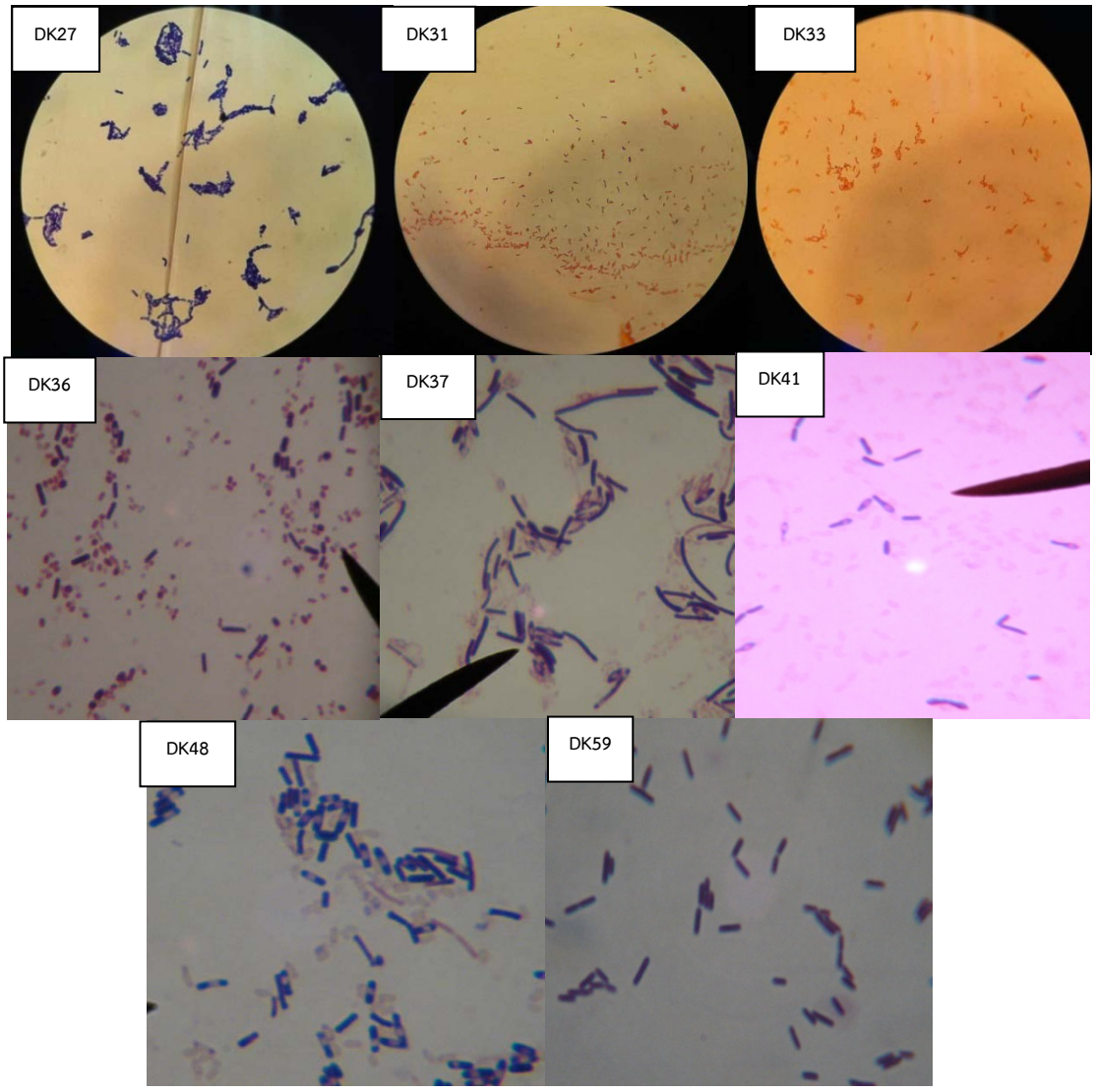
นำแบคทีเรียทั้ง 17 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช และมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 DK24 DK27 DK31 DK33 DK36 DK37 DK41 DK48 และ DK59 ตามลำดับ มาย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะของเซลล์ พบลักษณะเซลล์ของแต่ละไอโซเลทแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.6

ตารางที่ 4.2 ความสามารถของเอนไซม์โปรตีเอสในการย่อยสลายเคซีนเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะเซลล์
DK1	gram positive, long rod
DK4	gram positive, long rod, central spores
DK5	gram positive, long rod
DK8	gram negative, short rod
DK13	gram variable, long rod
DK20	gram positive, short rod
DK22	gram positive, short rod
DK23	gram negative, short rod
DK24	gram positive, short rod
DK27	gram positive, short rod
DK31	gram negative, short rod
DK33	gram negative, short rod
DK36	gram positive, long rod
DK37	gram positive, long rod, central spores
DK41	gram positive, long rod, subterminal spores
DK48	gram positive, long rod, central spores
DK59	gram positive, long rod



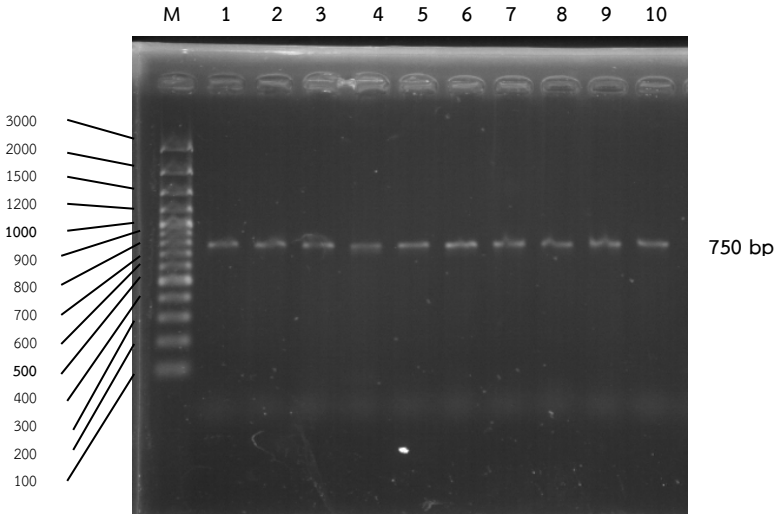
ภาพที่ 4.6 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย PGPR ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ประกอบด้วยไอโซเลท DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 และ DK24 ตามลำดับ



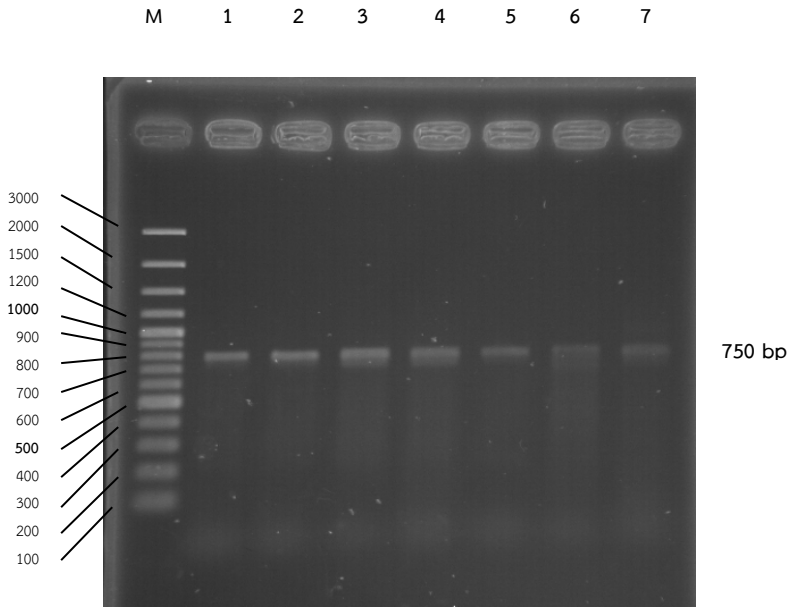
ภาพที่ 4.6 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย PGPR ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส (ต่อ) ประกอบด้วย ไอโซเลท DK27 DK31 DK33 DK36 DK37 DK41 DK48 และ DK59 ตามลำดับ

เมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved region ของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ และแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis ผลการศึกษาพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA ได้ PCR Product ขนาด 750 bp (ภาพที่ 4.7) นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ในระดับสปีชีส์

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ยีนของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทกับลำดับเบสอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST แสดงในตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.7 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ถึง 10 PCR product ขนาด 750 bp จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียรอบรากมันสำปะหลังไอโซเลทที่ DK1 DK4 DK5 DK8 DK13 DK20 DK22 DK23 DK24 และ DK27 ตามลำดับ



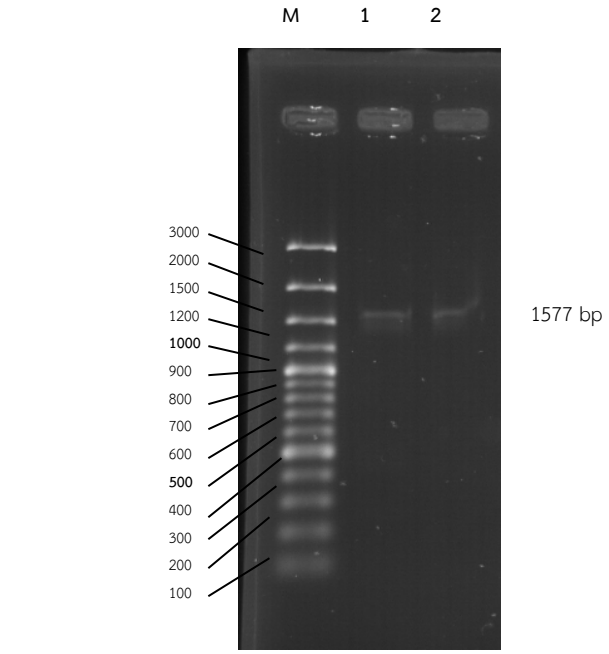
ภาพที่ 4.7 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (ต่อ) เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ถึง 7 PCR product ขนาด 750 bp จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียรอบรากมันสำปะหลังไอโซเลทที่ DK31 DK33 DK36 DK37 DK41 DK48 และ DK59 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส 16S rRNA ยีนของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทกับลำดับเบสอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI

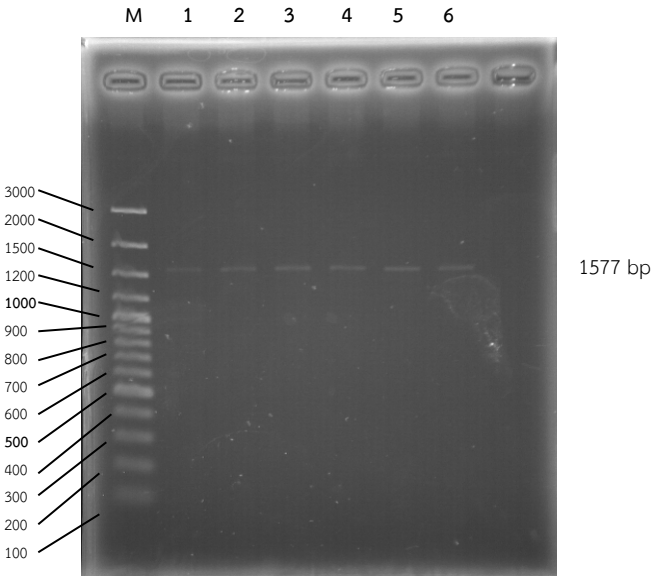
รหัสตัวอย่าง	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสv16S rRNA ยีนของแบคทีเรีย
DK1	*Bacillus megaterium* strain Y18-01
DK4	*Bacillus subtilis* strain V26
DK5	*Bacillus pumilus SAFR-032* strain SAFR-032
DK8	*Pseudomonas syringae*
DK13	*Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* strain FZB42
DK20	*Bacillus flexus* strain NBRC 15715
DK22	*Bacillus flexus* strain NBRC 15715
DK23	*Pseudomonas putida*
DK24	*Bacillus licheniformis* strain DSM 13
DK27	*Bacillus toyonensis* strain BCT-7112
DK31	*Bacillus atrophaeus* 1942 strain 1942
DK33	*Klebsila oxytoca*
DK36	*Bacillus subtilis* strain DL5-1
DK37	*Bacillus thuringiensis* Bt407
DK41	*Bacillus toyonensis* strain BCT-7112
DK48	*Bacillus toyonensis* strain BCT-7112
DK59	*Bacillus licheniformis* strain DSM 13

4. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีเอส การโคลนยีนและนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*

เลือกไอโซเลทของแบคทีเรีย PGPR ที่มีสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุด ได้แก่ ไอโซเลท DK4 และ DK36 นำแต่ละไอโซเลทมาสกัด DNA และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนโปรตีเอส ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ และแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนยีนโปรตีเอส ได้ PCR Product ขนาด 1,577 bp (ภาพที่ 4.8) นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปโคลนเข้าเวคเตอร์และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เพื่อชักนำให้เกิดการแสดงออก (expression) ของยีนโปรตีเอส (ภาพที่ 4.9)



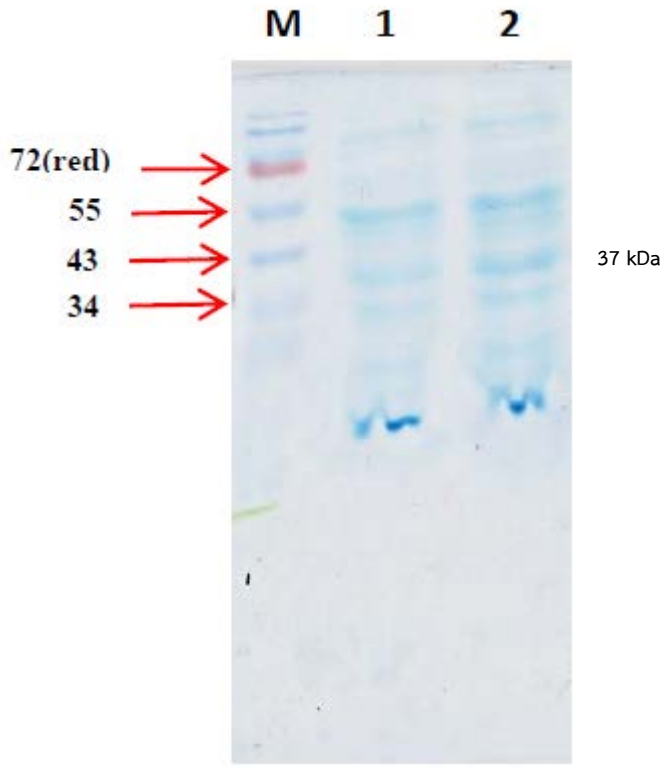
ภาพที่ 4.8 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนของยีนโปรตีเอสด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ยีนโปรตีเอสจากไอโซเลท DK4; เลน 2 ยีนโปรตีเอสจากไอโซเลท DK36



ภาพที่ 4.9 ผลการทำ PCR product ส่วนของยีนโปรตีเอสให้บริสุทธิ์ เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ถึง 3 ยีนโปรตีเอสจากไอโซเลท DK4; เลน 4 ถึง 6 ยีนโปรตีเอสจากไอโซเลท DK36

5. ศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีเอสใน *E. coli*

ผลการทดลอง พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบน SDS-PAGE โดยเมื่อย้อมสีด้วย Comassive brilliant blue R-250 มีขนาดโมเลกุล 37 kDa (4.10) แล้วเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้เพียงพอต่อการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ (ภาพที่ 4.11)

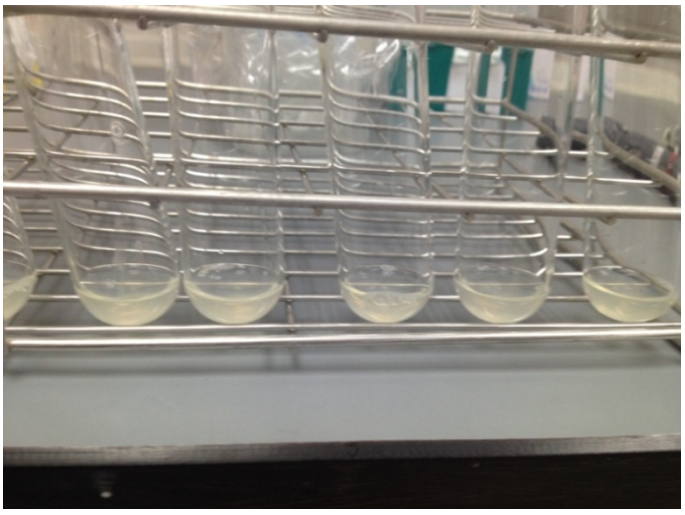


ภาพที่ 4.10 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีเอส บน SDS-PAGE โดยใช้ BL21 (DE3)

ภาพที่ 4.11 รีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส

จากการศึกษากิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสในการไฮโดรไลส์เคซีน (ภาพที่ 4.12) พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสจากไอโซเลทที่ DK4 และ DK36 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่ 151.83 และ 155.41 Uml^{-1} ตามลำดับ ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสแสดงในตารางที่ 4.4



ภาพที่ 4.12 การศึกษากิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส

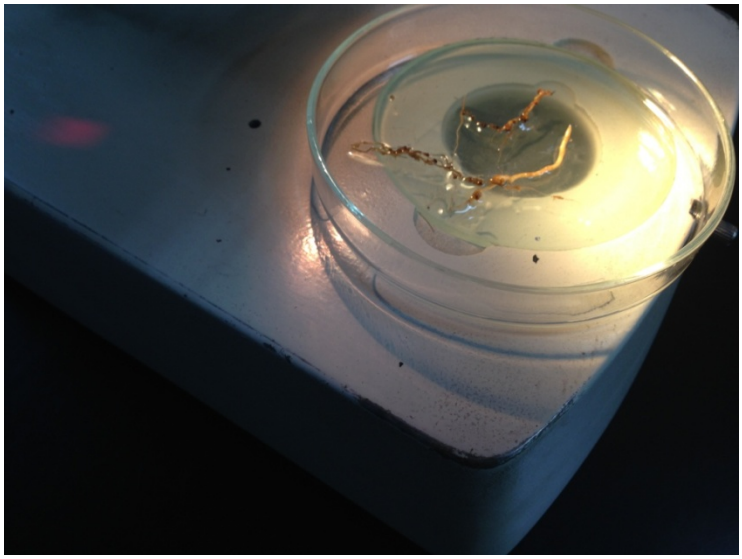
ตารางที่ 4.4 ความสามารถของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสในการย่อยสลายเคซีน เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	OD. 660 nm	Slop	Uml^{-1}
1	น้ำกลั่น	0.000	-	-
2	control	0.016	0.01	6.66
3	DK4	0.326	0.01	151.83
4	DK36	0.373	0.01	155.41

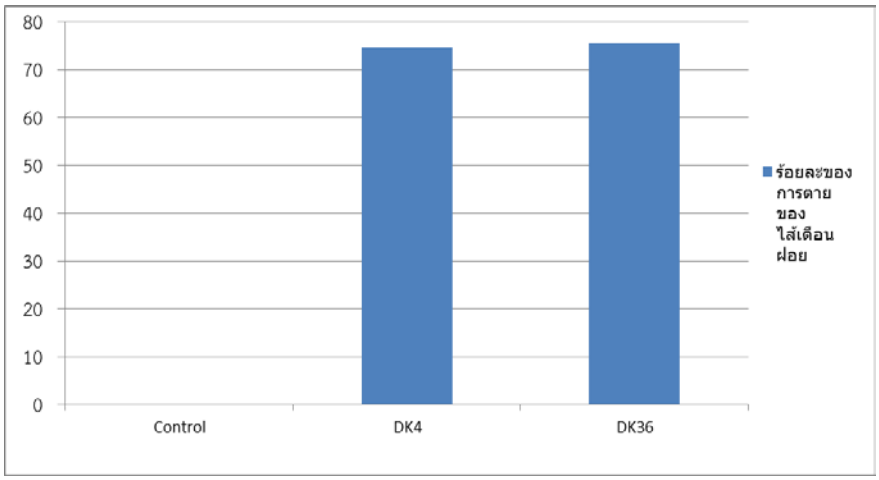
7. ศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสต่อตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita*

ภาพที่ 4.13 ประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสต่อตัวอ่อนระยะ J2 บริเวณรากพืช

นำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสจำนวน 300 µl ผสมกับตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita* 200 ตัว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำ 3 ซ้ำ) ส่วนชุดควบคุม (control) ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD เปล่าผสมน้ำกลั่นไม่ใส่ตัวอ่อน ระยะ J2 และ supernatant ที่ผ่านการต้ม 15 นาทีผสมกับตัวอ่อนระยะ J2 ตรวจนับจำนวนตัวอ่อนที่ตาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายตัวอ่อน *M. incognita* ระยะ J2 โดยเปรียบเทียบเป็นร้อยละของการตายของไส้เดือนฝอยรากปม (ภาพที่ 4.15) ผลการศึกษาพบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสจากไอโซเลทที่ DK4 และ DK36 สามารถทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปมได้ถึง ร้อยละ 74 และ 76 ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมไม่พบการทำลายตัวอ่อน



ภาพที่ 4.14 การทดสอบประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีเอสต่อร้อยละการตายของไส้เดือนฝอยรากปม



ภาพที่ 4.15 ร้อยละการตายของไส้เดือนฝอยรากปมต่อการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีเอส