รายงานการวิจัย

เรื่อง

การใช้เทคนิค Fluorescence in-situ Hybridyzation (FISH) ในการศึกษาชนิดและลักษณะของ Acetoclastic Methanogens ในนาข้าว

Fluorescence in-situ hybridyzation (FISH) technique in the determination and localization of acetoclastic methanogens in paddy field

ศันสนีย์ ชวนะกุล

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ประจำปีงบประมาณ 2548

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี ผู้เขียนขอขอบคุณงานส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่สนับสนุนทุนรายได้อุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ รศ ดร. ภาวิณี ชัยประเสริฐหัวหน้าห้องปฏิบัติการ Biogas lab, Waste treatment, utilization and minimization Unit, PDTI clusters, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน ขอขอบคุณ ดร. สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์แห่งสถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (NSTDA-BIOTEC) หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาชีวเคมีของและโรงงานต้นแบบ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียนสำหรับคำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการฝึกอบรมทำ FISH ให้แก่ผู้ช่วยนักวิจัย โดยเฉพาะคุณวิวัฒน์ จูประพัทธศรี สำหรับการดูแล คำแนะนำ อำนวยความสะดวกในการทำ FISH ให้แก่ผู้ช่วยนักวิจัยเป็นอย่างดี ขอขอบคุณนายศุภชัย มหาแสนที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จเป็นอย่างดี และสุดท้ายขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตรชีวภาพ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัยในครั้งนี้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำเทคนิค FISH (Fluorescence in situ Hybridyzation) มาใช้ในการศึกษาชนิดและลักษณะของ Acetoclastic Methanogens จากตัวอย่างดินในนาข้าว จ. อุบลราชธานี โดยศึกษาลักษณะและการกระจายตัวของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตมีเทนโดยใช้ acetate เป็นแหล่งอาหาร (Acetoclastic methanogens) ในดินนาข้าว โดยใช้หลักการเปรียบเทียบลำดับเบสของ rDNA จากกลุ่มจุลินทรีย์ 16S rDNA libraries ของ *Archaea* ใช้ Specific probe (rRNA targeted probes หรือ phylogenetic strain) ที่ให้มีความจำเพาะกับจุลินทรีย์กลุ่ม Methanogens ได้แก่ Eub 338, ARC 915, MPB 1 และ MSMX 860 ลักษณะจุลินทรีย์ภายหลังจากการทำ whole cell hybridization มาศึกษาโดยกล้อง Epifluorescence microscopy พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบอยู่ในกลุ่มของ Acetoclastic methanogens ได้แก่ *Methanosaeta sp.* และ *Methanosarcina sp* มีลักษณะเป็นแท่งยาวคล้าย *Methanosaeta* sp. การนำเทคนิค FISH (Fluorescence in situ Hybridyzation) มาใช้ในการศึกษาชนิด ลักษณะ ตำแหน่ง การกระจายตัวของประชากรกลุ่ม Acetoclastic Methanogens จากตัวอย่างดินในนาข้าว จ. อุบลราชธานี FISH จะลดขั้นตอนในการศึกษา ชนิดและลักษณะการกระจายตัวของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์ได้รวดเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับการศึกษาแบบ MPN หรือวิธีการทางชีวเคมีและประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี

คำสำคัญ (Keywords): Rice field, Acetoclastic methanogens, FISH, Methane production

ABSTRACT

Microbial community characterization of a rice field microorganism, Ubon Ratchathani province was investigated by FISH technique (Fluorescence in situ Hybridization). The use of rRNA-targeted probes or phylogenetic strains can provide a unique insight microbial ecology, enabling both the visualization of whole cell and in situ microbial ecosystem. This technique correlated the characterization, composition, the abaundance of cells and relationship within microbial communities. *In situ* fluorescent hybridization were used with the methanogen-specific probe (Eub 338, ARC 915, MPB 1 และ MSMX 860) in this study. Almost of 16S rDNA of Archaea clone library were affiliated into Methanosaeta sp. and Methanosarcina sp. The group of *Bacterial* clones revealed into different cluster, all of them were clustered into anaerobic or facultative anaerobic cultures. By the epifluorescence microscopy, methanogens were characterized the majority of long sheathed filament *Methanosaeta*-like morphology, with a similar result to the *Archaea*- specific probe hybridization. This FISH technique was successfully applied for *in situ* detection of microbial communities in particular an acetate microbial communities from paddy fields.

Keywords: Rice field, Acetoclastic methanogens, FISH, Methane production

คำอธิบายสัญลักษณ์

FISH	=	Fluorescent *in situ* Hybridization
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
DAPI	=	4', 6-diamidin0-2-phenyllindole, dihydrochloride
g	=	Gram
mg	=	Miligram
mM	=	Milimole
ml	=	Mililitre
MPB	=	Methane Producing Bacteria
ng	=	Nanogram
O.D.	=	Optical density
rpm	=	Round per minute
RNAse	=	Ribonuclease
RNA	=	Ribonucleic acid
rDNA	=	Ribosomal deoxyribonucleic acid
rRNA	=	Ribosomal ribonucleic acid
MPN	=	Most probable number
Tg	=	Teragram per year (1 Tg = 10^{12} gram)

การใช้เทคนิค Fluorescence in-situ Hybridization (FISH) ในการศึกษาชนิดและลักษณะของ Acetoclastic methanogens ในนาข้าว

1. บทนำ

Acetoclastic methanogens จะเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ acetate เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ในการเกิดปฏิกริยา Methanogensesis และได้ก๊าซมีเทนเป็นผลผลิต จุลินทรีย์กลุ่ม Methanogens เหล่านี้ บางกลุ่มสามารถดำรงชีวิตที่อุณหภูมิที่ค่อนข้างต่ำ (psychrophile) ไปจนถึงพวกทนร้อน (extremely thermophile) ในสภาวะไร้ออกซิเจน ในดินชุ่มน้ำ ดินตะกอนและดินนาข้าว ซึ่งเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซมีเทน (Cicerone and Oremland, 1988; Conrad, 1989).

มีเทนที่ถูกปลดปล่อยจากขวนการในนาข้าวจะอยู่ในช่วง 20-100 Teragram (Tg) ($1Tg=10^{12}$ g) ต่อปี โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 60 Tg (Prinn, 1994; IPCC, 1995; Roger, 2001) การเพิ่มขึ้นของมีเทนในบรรยากาศจะส่งผลต่อภาวะโลกร้อน (Global warming) ซึ่งจะสัมพันธ์กันกับอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกเป็นสัดส่วนติดตามมา (Denier van der Gon, 1996) ความต้องการต่อการผลิตข้าวในโลกคาดว่าจะเพิ่มเป็น 760 million Tons ต่อปี หรือ เพิ่มขึ้น 47 % ที่จะเลี้ยงประชากรโลกให้เพียงพอต่อความต้องการของประชากร จากปี ค.ศ 1992 ที่เพิ่มขึ้น เป็นจำนวนถึง 3 พันล้านคนในปี ค.ศ. 2020 (Neue, 1993) โดยผลที่ตามมาก็คือ พื้นที่ทำนาข้าวจำเป็นต้องขยายติดตามมาอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ในศตวรรษหน้า (IRRI, 2000) และจะส่งผลให้นาข้าวในเขตร้อนที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตมีเทน เป็นสาเหตุที่น่าคำนึงถึงเป็นอย่างยิ่งของการผลิตมีเทนสู่บรรยากาศ (Neue and Roger, 1994; Neue and Sass, 1994).

ก๊าซมีเทนที่ถูกปลดปล่อยออกสู่บรรยากาศ (Atmospheric methane) เป็นตัวการสำคัญชนิดหนึ่งของปัญหาเรือนกระจก (Greenhouse effect) และโลกร้อน (Global warming) ในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากมีเทนจะมีความสามารถในการดูดซับรังสีอินฟราเรด (Infrared-absorbing capacity) ในบรรยากาศได้มากกว่า CO_2 15-30 เท่า (IPCC, 1996) ทำให้ค่า Global warming potential (GWP) สูงกว่า CO_2 23-25 เท่า (Sass, et al., 1990; IPCC, 2001) อีกทั้ง ก๊าซมีเทนสามารถตกค้างในบรรยากาศ เป็นระยะเวลาได้นานถึง 10-12 ปี ดังนั้น มีเทนในบรรยากาศจึงมีความสำคัญและเป็นตัวการประการหนึ่งของปัญหาสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน ก๊าซมีเทนที่ตกค้างในบรรยากาศ (Methane loads) ล่าสุดมีค่าเท่ากับ 4,700 Tg จากอัตรามีเทนที่ปลดปล่อยออกสู่

บรรยากาศต่อปี ซึ่งเท่ากับ 550 Tg โดย 375 Tg เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ (Cicerone and Oremland, 1988) กิจกรรมเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในบรรยากาศ (Cicerone and Oremland, 1988; Khalil, et al., 1993; IPCC, 1996) มีเทนที่ถูกปลดปล่อยในบรรยากาศจะเป็นสาเหตุของปัญหาโลกร้อน 15-20% จากมีเทนที่ตกค้างอยู่ในบรรยากาศทั่วโลก (IPCC, 1990; Neue, 1993, Denier van der Gon, 1996).

ความเข้มข้นของมีเทนในบรรยากาศ (Methane concentration)ได้เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าในปัจจุบัน จาก 1.7 ppm ในช่วงศตวรรษที่ผ่านมา และคาดว่าจะเพิ่มเป็น 4 ppm ในปี 2100 โดยมีเทนที่ถูกปลดปล่อยสู่บรรยากาศเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การทำถ่านหินและเหมืองแร่ ก๊าซธรรมชาติ มูลสัตว์ การเผาเชื้อเพลิง และหลุมฝังกลบแบบถูกสุขลักษณะ (Sanitary landfill) คิดเป็น 72% และที่เหลือจากธรรมชาติ (Hydrates and ocean) และพื้นที่ชุ่มน้ำ (Wetlands) 16% และการทำนาข้าว (Rice cultivation) คิดปืน 12% (Augenbraun et al, 2003) ดังนั้น นาข้าวจึงเป็นแหล่งหนึ่งของการปลดปล่อยมีเทนในปัจจุบัน

การศึกษาชนิดและลักษณะจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตมีเทน (Methanogens)โดยใช้เทคนิค Fluorescence in-situ hybridization (FISH) จะนำไปสู่การการศึกษาการดำรงชีวิตของกลุ่ม Methanogens ในรากข้าว โดยส่วนใหญ่ 67% จะเป็น Acetoclastic methanogens ที่ใช้ acetate เป็นวัตถุดิบในขบวนการ Methanogensesis (Conrad, 1999) FISH จะลดขั้นตอนในการศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ Methanogens ในนาข้าว เมื่อเทียบกับการศึกษาแบบ MPN หรือศึกษาโดยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน (Electron microscope) และลดขั้นตอนในการจำแนกชนิดและลักษณะของจุลินทรีย์จากการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) FISH technique จะสามารถศึกษาชนิด ลักษณะและการกระจายตัวของจุลินทรีย์ได้รวดเร็วขึ้น นำไปสู่การวิจัยการปรับปรุงแก้ไข จัดการปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการลดการปลดปล่อยมีเทนสู่บรรยากาศ และการนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้ (Methanogens) มาใช้ประโยชน์ต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือก Acetoclastic methanogens จากรากข้าว ที่มีการผลิตมีเทนสูง
2. เพื่อตรวจสอบชนิดและลักษณะของ Acetoclastic methanogens จากนาข้าว โดยใช้เทคนิค Fluorescence in-situ Hybridyzation (FISH) เพื่อที่จะนำไปสู่การศึกษาวิจัยต่อไป

3. การตรวจเอกสาร

3.1 การปลดปล่อยมีเทนออกสู่บรรยากาศ

โดยทั่วไป ก๊าซมีเทนในธรรมชาติ (Biogenic methane) เกิดจากจุลินทรีย์ผลิตก๊าซมีเทน (Methane producing bacteria or Methanogens) ซึ่งจะย่อยสลายอินทรีย์สารภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Anaerobic condition) มีทั้งจุลินทรีย์กลุ่ม Hydrogenotrophic methanogens ที่ผลิตก๊าซมีเทนจาก H_2 และ CO_2 จุลินทรีย์อีกกลุ่มคือ Acetoclastic methanogens ที่ผลิตก๊าซมีเทนจาก acetate ก๊าซมีเทนเหล่านี้จะถูกผลิตจากจากแหล่งต่างๆ เช่น มูลสัตว์ การฝังกลบของเสียต่างๆ และนาข้าว เป็นต้น นาข้าวชุ่มน้ำ (Irrigated ricefield) เป็นแหล่งหนึ่งของการผลิตมีเทนที่ปลดปล่อยออกสู่บรรยากาศ (Sass et al., 1990; Wassmann et al., 1996, IPCC, 1996)

ตารางที่ 1 แหล่งของก๊าซมีเทน (Source and sink) ที่ปลดปล่อยออกสู่บรรยากาศ

Sources	Estimate	Uncertainty ($Tg\ year^{-1}$)	Total
Sources			
Natural			
Wetlands	115	55-150	
Termite	20	10-50	
Oceans	15	5-50	
Other	15	10-40	
Total		110-210	160
Anthropogenic			
Fossil fuel related	100	70-120	
Cattle (Enteric fermentation)	85	65-100	
Rice paddies	60	20-100	
Landfills	40	20-70	
Animal waste	25	20-30	
Biomass burning	40	20-80	
Total		300-450	375
Total of identified source		**410-660**	**535**
Sinks			
Reaction with OH		330-560	445
Removal in Stratosphere		25-55	40
Removal by soil		15-45	30
Total			515
Atmospheric increase		35-40	37
Total of sink (sinks + atmospheric increase)			**552**

Source: adapted from IPCC, 1995, Denier van de Gon, 1996, Leisack et al 2000; Roger, 2001)

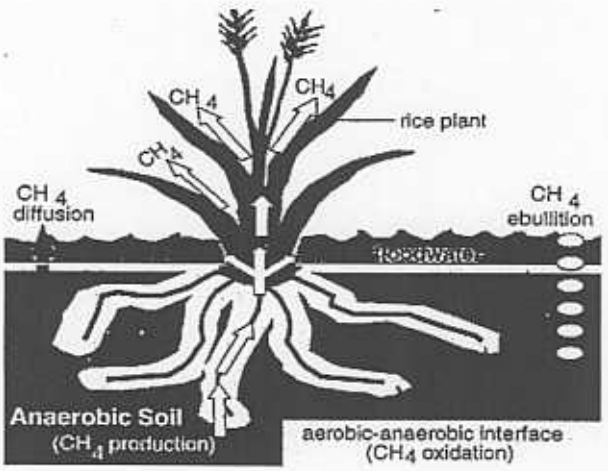
โดยปล่อยมีเทนออกสู่บรรยากาศจากพื้นที่นาข้าวชุ่มน้ำจะอยู่ในช่วง 20-100 Tg ต่อปี. (Prinn, 1994, IPCC, 1996) ดังแสดงในตารางที่ 1 ก๊าซมีเทนที่ถูกปลดปล่อยออกมานี้ คิดเป็น 20 % ของมีเทนที่ปลดปล่อยจากกิจกรรมของมนุษย์ทั้งหมดทั่วโลก (Denier van der Gon, 1996)

การผลิตมีเทนในนาข้าวเกิดจาก Methanogens ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อขบวนการผลิตมีเทน (Methanogensesis) ในสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งต้องการสภาพที่เหมาะสมในการย่อยสลายวัตถุดิบ acetate หรือ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอนในขบวนการ Methanogensesis โดยปกติ ดินนาข้าวจะมีคุณสมบัติเฉพาะทางชีววิทยาที่มีออกซิเจนลดน้อย (Oxygen reduction) ลงตามระยะเวลาที่ผ่านไป ความชื้นสูง อุณหภูมิดินเฉลี่ยในช่วงประมาณ 30-35 ^{0}C และอุดมสมบูรณ์ไปด้วยสารอินทรีย์ที่เหมาะสมกับกิจกรรมของ Methane-producing bacteria or Methanogens นาข้าวเป็นแหล่งปลดปล่อยก๊าซมีเทนทางชีวภาพขนาดใหญ่แหล่งหนึ่งเพราะการปลูกข้าวก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรียและ อนินทรีย์ในดิน ก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์โดยน้ำที่ท่วมขังต้นข้าวและจะหลุดลอดไปสู่บรรยากาศ ปัจจุบันโลกมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวเพิ่มขึ้นโดยควบคู่ไปกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรในโลก ทำให้ส่งผลทำให้ความเข้มข้นของก๊าซมีเทนในบรรยากาศเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการปลูกข้าวมากกว่าครึ่งหนึ่งของการเพาะปลูกพืชอื่นๆ ทั้งหมด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2540) สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย (2540) ได้ประเมินปริมาณการปลดปล่อยก๊าซมีเทนจากนาข้าวของประเทศไทย กำหนดระยะเวลาการปลูก 140 วัน สำหรับข้าวนาปี และ 120 วันสำหรับข้าวนาปรัง สำหรับพื้นที่ปลูกข้าวของประเทศไทยในปี ค.ศ. 1989 แบ่งเป็น 80,670 ตารางกิโลเมตรสำหรับข้าวนาปี และเท่ากับ 8,420 ตารางกิโลเมตรสำหรับข้าวนาปรัง จากการคำนวณคาดว่าปริมาณการปล่อยก๊าซมีเทนจากนาข้าวของประเทศไทยมีค่าอยู่ระหว่าง 2.34 – 8.49 ล้านตันต่อปี ในขณะที่ปริมาณการปล่อยก๊าซมีเทนจากนาข้าวทั่วโลกมีค่าอยู่ระหว่าง 25 – 150 ล้านตันต่อปี นาข้าวของประเทศไทยปลดปล่อยก๊าซมีเทนคิดเป็นร้อยละ 5.66-9.36 ของปริมาณการปล่อยก๊าซมีเทนจากนาข้าวทั่วโลก อัตราการปลดปล่อยมีเทนจะเกี่ยวข้องและสัมพันธ์กับการผลิตมีเทนในนาข้าว

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตมีเทนก็จะส่งผลต่อการปลดปล่อยมีเทนออกสู่บรรยากาศเช่นเดียวกัน ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ชนิดของดินและการจัดการน้ำในนาข้าว (Neue et al., 1996, Wassmann et al., 2002) โดยปัจจัยเหล่านี้ จะส่งเสริมต่อการเจริญเติบโตและดำรงชีวิตของกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในขบวนการผลิตมีเทน (Methanogensic communities) เป็นอย่างดีในนาข้าว ดังนั้น นาข้าวจึงเป็นแหล่งที่สำคัญในการผลิตในการเก็บสำรองมีเทน (Methane sink) และปลดปล่อยมีเทน (Methane source) ออกสู่สิ่งแวดล้อม

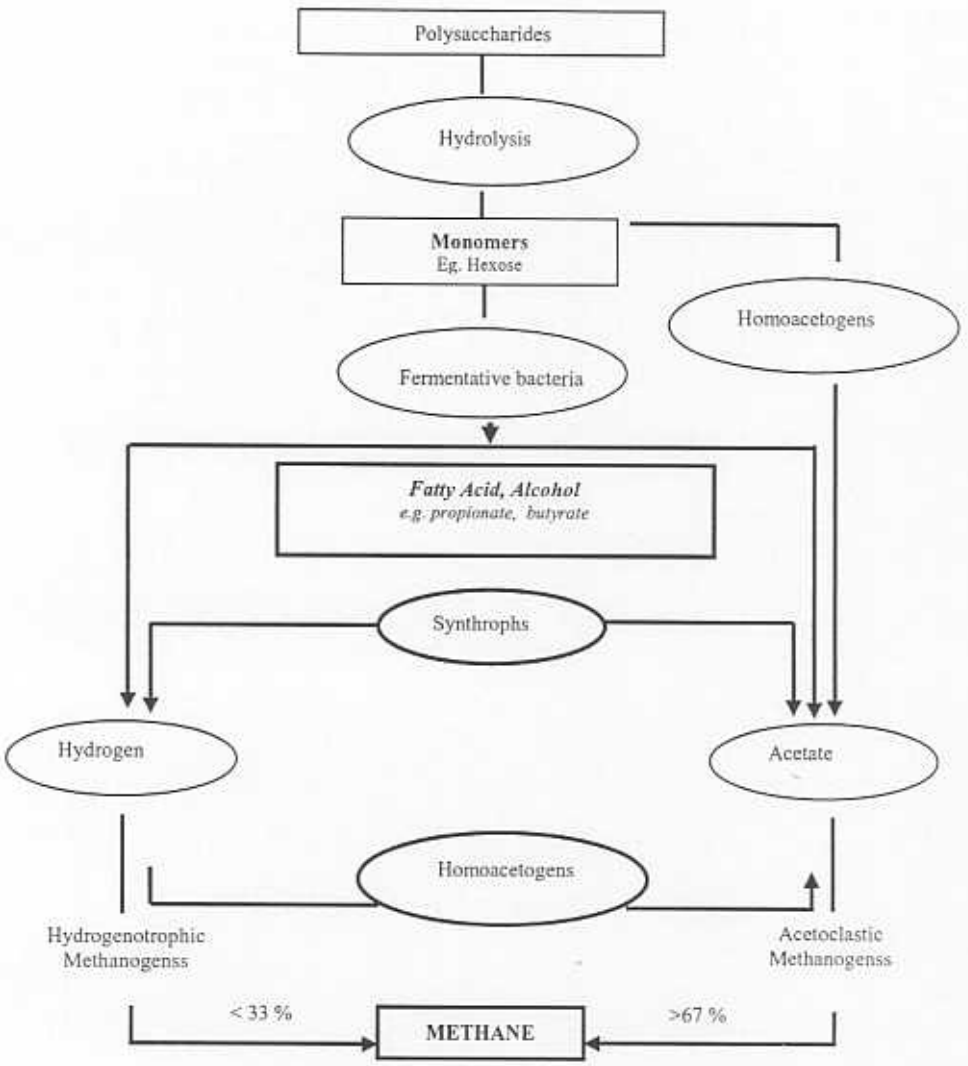
โดยปกติ ก๊าซมีเทนจากนาข้าวจะถูกปลดปล่อยสู่บรรยากาศได้ 3 ทาง (รูปที่ 1) คือ 90% เคลื่อนที่ผ่านต้นข้าวจากรากออกสู่ที่บริเวณกาบใบและใบ (Plant mediate active transport) 1% เคลื่อนที่ผ่านน้ำที่เหนือผิวดินโดยกระบวนการแพร่ (Diffusion) 9% เคลื่อนที่ในรูปของฟองอากาศลอยขึ้นสู่ผิวน้ำ (Ebullition) ก๊าซมีเทนส่วนใหญ่เคลื่อนที่ผ่านต้นข้าวสู่บรรยากาศโดยผ่านทาง Parencyma และ Intercellular space (Neue, 1993; Roger, 1993; Bangker et al, 1994; Yaki et al., 1998).



รูปที่ 1 แสดงการปลดปล่อยก๊าซมีเทนผ่านต้นข้าวออกสู่บรรยากาศ (Denier van de Gon, 1996)

3.2 Methanogens และ ขบวนการผลิตก๊าซมีเทน (Methanogensesis)

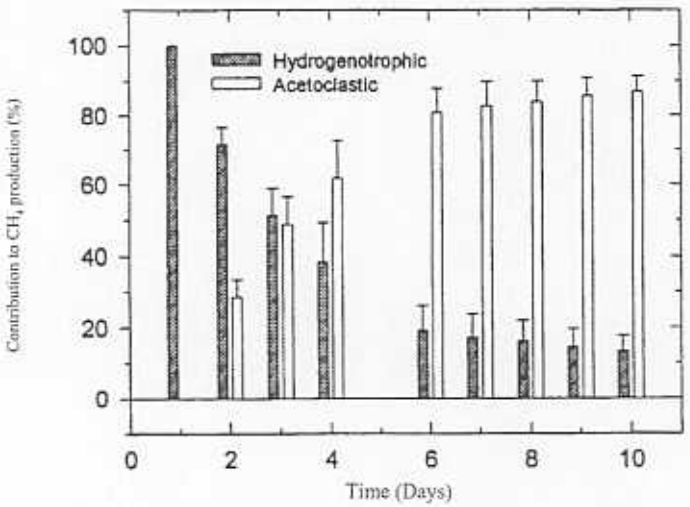
Methanogens จัดอยู่ใน Archaea Kingdom ซึ่งจะย่อยสลาย acetate เป็นก๊าซมีเทนเป็นโดยจุลินทรีย์กลุ่ม Acetoclastic methanogens และจุลินทรีย์กลุ่ม Hydrogenotrophic methanogens ที่ใช้ carbon dioxide และ H_2 เป็นวัตถุดิบในการผลิตก๊าซมีเทน (Conrad, 1999) ดังรูปภาพที่ 2 อินทรีย์สารในดินจะถูกย่อยสลายในขบวนการ Methanogensesis โดยผ่าน ขบวนการ Hydrolysis, Fermentation, Syntrophic, Acetogenesis and Methanogensesis และได้ก๊าซมีเทนจาก Hydrogenotrophic (33%) และ Acetoclastic methanogens (67%) เป็นผลิตผลในที่สุด



รูปภาพที่ 2 Pathway of anaerobic degradation of complex organic matter to methane (Conrad, 1999)

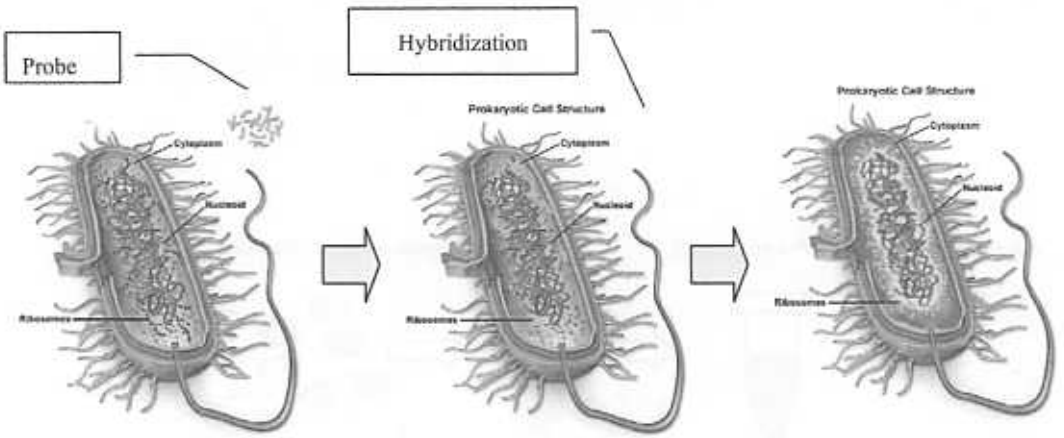
โดยปกติ ก๊าซมีเทนจะถูกผลิตจาก H_2 และ CO_2 โดยจุลินทรีย์กลุ่ม Hydrogenotrophic methanogens อย่างรวดเร็วคิดเป็น 100 % ในวันแรก และก๊าซมีเทนค่อยลดปริมาณลงเหลือประมาณ 50% ภายใน 3-6 วัน (รูปภาพที่ 3) โดยหลังจากวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อ การผลิตมีเทนจะเปลี่ยนจากจุลินทรีย์กลุ่ม Hydrogenotrophic มาเป็นจุลินทรีย์กลุ่ม Acetoclastic methanogensesis ที่ใช้ acetate เป็นแหล่งใหญ่ถึง 67% ในการผลิตก๊าซมีเทน (Roy et al., 1997) โดยปริมาณของ Hydrogenophiles จะเป็น 10 เท่า เมื่อเทียบกับ Acetoclastic methanogens ในดินนาข้าว (Mayer and Conrad, 1990) แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนการผลิตก๊าซมีเทนจาก

Hydrogenotrophic มาเป็น Acetotrophic methanogensesis พบว่า ก๊าซมีเทนที่เกิดไม่ได้เกิดมาจากจำนวนประชากร จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นเท่านั้น แต่เป็นไปได้ว่าน่าจะมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่ม Acetoclastic methanogens ซึ่งได้แก่ Methanosarcina-like population ที่บริเวณดินรากข้าว (Rice rhizosphere) มากกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดินนาข้าวมีการเปลี่ยนแปลงและเป็นตัวแทนที่สำคัญของระบบนิเวศน์ในนาข้าว (Lueders and Friedrich, 2000)



รูปภาพที่ 3 การเกิดก๊าซมีเทนจากจุลินทรีย์กลุ่ม Hydrogenotrophic และ Acetoclastic methanogens จากดินนาข้าว (Roy et al., 1997)

Fluorescent in situ hybridization (FISH) เป็นการนำเทคนิค Phylogenetic analysis โดยใช้ส่วนที่มีความเหมือนกันของลำดับเบส (Conserve region) ในจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมายมาใช้เป็น probe สำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ในกลุ่มเป้าหมายออกจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น FISH มีขั้นตอนในการตรวจสอบไม่ยุ่งยากซับซ้อนต่อการตรวจสอบ เป็นการนำกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจสอบมาเก็บรักษา 16S rRNA ที่เป็นเป้าหมายของ probe โดยเริ่มต้นจากการตรึงเซล (fixed) ด้วย Paraformaldehyde โดย Specific oligonucleotide ซึ่ง complement ต่อ conserved tract ของ 16S rRNA จากนั้นจึงนำเซลล์จุลินทรีย์ไปตรึงบน slide และย้อมด้วย probe ตามลำดับ แล้วล้างเอา probe ส่วนที่เกินออก โดย Methanogens ที่ specific กับ probes จะสามารถแยกแยะออกมาหลังจาก Hybridization และย้อมด้วยสี DAPI เมื่อนำไปดูผลด้วยกล้องจุลทัศน์เรืองแสง (Epiflorescence microscopy) (รูปที่ 4)

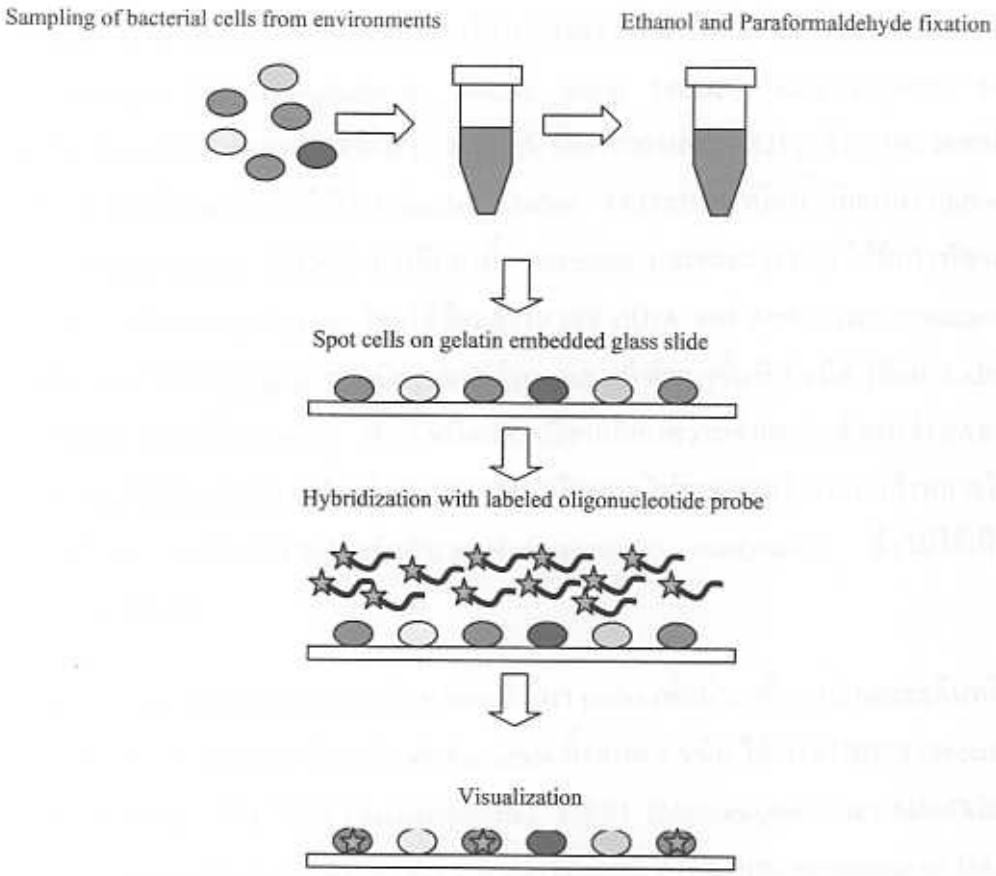


รูปที่ 4 แสดงการจับของ Methanogens probe ที่จับกับ Methanogens cell หลังจากการ Hybridyzation (Nishihara et al, 1995; Jupraputtasri, 2001)

จุลินทรีย์กลุ่ม Methanogens ใน Order Methanococcales และ Methanosarcina (Amann et al, 1990) จะถูกแยกออกมาจากการย้อมจุลินทรีย์ทั่วไปโดย General probe (Eub 338) และโดย Specific probe (ARC 915, MPB1, MSMX860) สำหรับ Archaebacteria, Methanosarcina และ Methanosaeta (Anann et al, 1990, Raskin et al, 1994, Jupraputtasri et al, 2001) เซลแบคทีเรียจะถูกย้อมด้วยสี DAPI หลังจาก Hybridization และดูเซลจุลินทรีย์โดยกล้องจุลทัศน์เรืองแสง (Epiflorescence microscopy)

เทคนิค FISH (Fluorescent in situ hybridization) นี้ ทำให้ทราบชนิด ลักษณะจากการศึกษาจุลินทรีย์ สามารถคำณวนปริมาณจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วและประหยัดเวลากว่าการศึกษาโดยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) และMPN ซึ่งใช้กันอยู่ในปัจจุบัน การตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH ง่ายและสะดวกในการตรวจสอบ ทำให้เทคนิคนี้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งวงการแพทย์ด้วยเช่นกัน โดยใช้ในการตรวจสอบเซลล์ผิดปกติ (Lipski et al., 2000) หรือใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคบางชนิดทางด้านวงการอาหาร มีการใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหารที่ทำให้เกิดโรค เช่น Salmonella sp. และทางด้านสิ่งแวดล้อมมีการใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในด้านการศึกษาจุลินทรีย์จากระบบน้ำเสียทั้งในระบบใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ (Camilleri et al., 1988; Amann et al., 1992; Sekiguchi, 1999) สำหรับในการศึกษาจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์ (Microbial ecology) ก็ได้มีการ

ใช้ FISH ศึกษาอย่างแพร่หลายเช่นกัน เช่นในการศึกษาระบบนิเวศน์วิทยาของกลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในรากข้าวเป็นต้น (Lueders et al., 2000)



รูปที่ 5 ขั้นตอนการตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Fluorescent in situ hybridization (FISH) (Nishihara et al, 1995; Jupraputtasri, 2001)

Raskin และคณะ (1994) ได้ศึกษาและออกแบบ probe ที่ใช้ในการตรวจสอบ Methanogens ในกลุ่มต่างๆ จำนวน 8 probe ซึ่ง probe ทั้ง 8 ชนิด คลอบคลุม Methanogens ได้ทั้งหมด 3 Orders 7 Families และกว่า 15 Genus ซึ่งได้ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของ 16S rDNA จาก Methanogens กว่า 29 ชนิดในการออกแบบ และได้ศึกษาความจำเพาะของ probe โดยการทดสอบกับกลุ่มเป้าหมายในแต่ละชนิดรวมทั้งหาค่าอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการเข้าจับของ probe กับกลุ่มเป้าหมาย (Optimum temperature for hybridization)

Harmsen และคณะ (1996) ได้ใช้เทคนิค FISH ในการศึกษาความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในกลุ่มของ Eubacteria., Archeabacteria, Methanogens บางกลุ่มและ Syntrophic bacteria ที่สามารถ oxidize Propionate ให้เป็น acetate, formate, CO_2 และ H_2 ที่เป็นแหล่งอาหารของ Methanogens การทดลองนี้นำ probe 7 ชนิด มาใช้ในการตรวจสอบได้แก่ EUB 388, ARC 915, MPOB1, (Specific for *Syntrophobacter woilinii* strain MPOB), KOP1 (Specific for *Syntrophobacter woilinii* strain KOPROP1), MX825, MG1200 และ MB310 ทำการตรวจสอบและตรวจหาตำแหน่งของจุลินทรีย์ใน Granular sludge จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบ Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) การศึกษานี้ Sorensen และคณะ (1997) ได้มีการพัฒนา probe สำหรับ *Methanosarcina sp.* โดยใช้ข้อมูลจาก 16S rRNA ของ Archea และ Eubacteria กว่า 42 ชนิด โดยมี Methanogens 28 ชนิดรวมอยู่ด้วย probe ที่พัฒนาขึ้นมี 2 ชนิด ได้แก่ SARC 1551 และ SARC 1645 โดย probe ทั้ง 2 ชนิดเมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะแล้วพบว่า SARC 1551 เป็น probe ที่มีประสิทธิภาพต่ำกว่า SARC 1645 เนื่องจากไม่สามารถเข้าจับกับเป้าหมายได้ตรงตามที่ได้ออกแบบไว้ แต่สามารถจับกับ *Methanococcoide methylulens* ซึ่งไม่ได้เป็นจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย

Jupraputtasri และคณะ (2005) ศึกษาและพัฒนา probe เพื่อนำมาศึกษาลักษณะจุลินทรีย์ในถังหมัก (Wastewater reactor) ในกลุ่ม Methanogens ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ EUB338 (Specific for general bacteria), ARC 915 (Archaebacteria), MPB1 (Methanogens) และ MSMX860 (*Methanosaeta* sp.และ *Methanosarcina* sp.) จำนวน Hybridized cells และ percentage of DAPI ที่ย้อมหลังจาก Hybridization แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนและเซลเฉลี่ย (%) หลังจากการ Hybridization ด้วย probes ต่างชนิดกัน (Conjugated with fluochrome -Cy 3) (Jupraputtasri et al, 2005)

Probe	Average hybridized cell (Cell/ml) [a]	Percentage of DAPI [b]
ARC 915	1.8 ± 0.25 x 109	56.7 ± 7.8
MPB1	1.6 ± 0.22 x 109	50.7 ± 6.9
MSMX860	1.2 ± 0.30 x 109	37.2 ± 9.4
EUB338	9.4 ± 3.20 x 109	29.4 ± 10

Duplicate samples were taken and measured in duplicate from 10 randomly chosen microscopic fields for each samples

[a] Average number of cell hybridized with probe ± SD (n=40)

[b] Average number of cell hybridized with probe ± SD (n=40)

เทคนิค FISH ได้ถูกพัฒนาจนมีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการที่จำไปใช้ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ความจำเพาะต่อกลุ่มของ Archeabacteria ในดินได้เป็นอย่างดี การศึกษาชนิด ลักษณะและการกระจายตัวของจุลินทรีย์กลุ่ม Methanogens ที่มีการผลิตมีเทนสูงในรากข้าวนี้ จะทำให้สามารถทราบลักษณะและตำแหน่งของกลุ่มจุลินทรีย์ Methanogens ที่รากข้าวหรือในนาข้าว เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงแก้ไขการจัดการที่เหมาะสมในนาข้าว ควบคุมและลดการปลดปล่อยมีเทนออกสู่บรรยากาศ แก้ปัญหาภาวะเรือนกระจกหรือโลกร้อน ในทศวรรษหน้า รวมทั้งประโยชน์ต่อวิจัยในการนำกลุ่มจุลินทรีย์ Methanogens มาใช้ประโยชน์ในการนำของเสียนำมาใช้ประโยชน์ (Waste utilization) เพื่อผลิตพลังงานทดแทน ในอนาคต

4. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

4.1 สถานที่เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวเพื่อใช้ศึกษาชนิดและลักษณะ Acetoclastic methanogens ในนาข้าว

เก็บตัวอย่างดินนาข้าวพร้อมรากข้าวแบบสุ่ม จำนวน 5 ตัวอย่าง จากแปลงนาข้าวหอมมะลิ บริเวณหาดคูเดื่อ อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

4.2 การเก็บตัวอย่างดินนาข้าว

การเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างดินนาข้าวในช่วงที่ข้าวกำลังตั้งท้อง (ประมาณ 90 วัน) ประมาณกลางเดือนกันยายนสำหรับนาปี หรือ เดือนมีนาคมสำหรับนาปรัง ในบริเวณนาข้าวน้ำท่วมขัง ที่มีการปลูกข้าวเจ้าหอมมะลิในท้องถิ่น เก็บตัวอย่างโดยใช้ Plastic soil core ขนาด 200 ml (5x10 cm) ที่บริเวณลึก 5-10 ซม เก็บดินพร้อมรากต้นข้าว 5 ตัวอย่าง (n=3) ใส่ถุงพลาสติกแช่ในกระติกน้ำแข็ง นำกลับมาห้องปฏิบัติการ แล้วนำดินตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหาร Acetoclastic methanogens medium ในสภาพไร้อากาศ (Chawanakul, 2002) เป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณ (Enrichment) เพื่อนำมาศึกษาลักษณะและชนิดจุลินทรีย์โดยการย้อมด้วยเทคนิค FISH (Fluorescence in-situ Hybridization)

4.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตมีเทนสูง

นำตัวอย่างดินนาข้าวมาทำการคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทน (Acetoclastic methanogens) โดยการบ่มเชื้อในอาหารเฉพาะ (Selective medium) คือ Methanogens basal medium ที่เติม acetate 5% ที่เป็นแหล่งสารอาหารเฉพาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ Acetoclastic methanogens ใน serum vial 50 ml ปิดจุก cab แล้ว flushed ด้วยก๊าซไนโตรเจน

แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มภายใต้อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยปกติแล้ว วิธีการนี้ หลังจากบ่มเชื้อ ประมาณวันที่ 3-5 ของการบ่มเชื้อ 33% ของก๊าซมีเทนที่ถูกผลิตขึ้น จะเกิดจาก H_2 และ CO_2 ในตัวอย่างถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเทน โดยจุลินทรีย์กลุ่ม Hydrogenotrophic methanogens และหลังจากนั้น ประมาณวันที่ 7 ก๊าซมีเทนอีก 66% จะถูกผลิต โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ acetate หรือจุลินทรีย์กลุ่ม Acetoclastic methanogens โดยก๊าซมีเทนที่ผลิตจะมีปริมาณมากที่สุด เริ่มหลังจากบ่มเชื้อ ที่ 37°C เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์

ก๊าซมีเทนที่เกิดทดสอบได้ 2 วิธี คือ โดยการทดสอบการจุดติดไฟของก๊าซมีเทนจากขวด serum vial ที่ทำการบ่ม เพื่อยืนยันดูการติดไฟของก๊าซมีเทนโดยตรงและวัดปริมาณโดย GC : column TCD สำหรับตรวจวิเคราะห์และวัดปริมาณก๊าซมีเทนและ CO_2 ที่เกิดขึ้นหลังจากการบ่มเชื้อ เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการคัดเลือกเชื้อและนำเทคนิค FISH มาศึกษาชนิด ลักษณะจุลินทรีย์ Acetoclastic methanogens ที่มีการผลิตก๊าซมีเทนในปริมาณสูงจากตัวอย่างดินรากข้าว ในจังหวัดอุบลราชธานีเท่านั้น ดังนั้น จุลินทรีย์ Acetoclastic methanogens ที่มีการผลิตก๊าซมีเทนจากตัวอย่าง จะถูกทดสอบการเกิดก๊าซมีเทนจากคุณสมบัติในการติดไฟของก๊าซมีเทนจากขวดตัวอย่าง จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์มาศึกษา โดยการนำเชื้อมาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Stab) จากตัวอย่างที่มีการผลิตก๊าซมีเทน ในบริเวณที่มีการเจริญของจุลินทรีย์จาก serum vial มาทำการเพิ่มปริมาณ (Enrichment) ใน serum vial ขนาด 100 ml เพื่อแยกให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่มีมากขึ้น นำมาบ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C 2-4 สัปดาห์ จนกระทั่งสังเกตการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่มีปริมาณพอสมควรในขวดตัวอย่าง จากนั้นตรึงเซล Methanogens ที่ผลิตการผลิตมีเทนมีเทนสูง ไว้ที่ -4 ^{0}C แยกจุลินทรีย์นำมาศึกษาด้วยเทคนิค FISH ต่อไป

4.4 การจำแนกชนิดของ Acetoclastic methanogens

นำเซลที่ถูกเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อจาก Methanogens medium ที่เติม acetate 0.5% สำหรับ Acetoclastic methanogens และตรึงเซลไว้ที่ -4 ^{0}C มาย้อม ตามวิธีการของ FISH (ภาคผนวก) โดยใช้ General probe (Eub 338) และ Specific methanogens probe (ARC 915, MPB1 และ MSMX860) ในการศึกษาและบันทึกลักษณะเซลจุลินทรีย์ที่แยกได้ด้วย Fluorescence microscopy หรือ Confocal microscope ที่หน่วย Biogas lab: Waste treatment and utilization Laboratory ที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า วิทยาเขตบางขุนเทียน โดยความร่วมมือของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ-สวทช (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology -BIOTEC)

5. ผลการทดลองและวิจารณ์

5.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดเลือก Acetoclastic methanogens ที่ผลิตก๊าซมีเทน

ตัวอย่างดินรากข้าว เก็บจากแปลงนาที่มีน้ำท่วมต้นข้าว (Paddy field) ในช่วง11.00-15.00 น โดยใช้ Plastic soil core ที่ระดับความลึก 5-10 ซม. จากผิวดินใต้ระดับน้ำในนาข้าว จากแปลงนาข้าวช่วงอายุประมาณ 60 วัน ที่กำลังตั้งท้องหรือออกรวง โดยเก็บดินที่น้ำท่วมถึงพร้อมกับรากข้าว จากบริเวณ ต. หาดคูเดื่อ อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี ลักษณะโดยทั่วไปของตัวอย่าง (A1-A5) เป็นดินเหนียว (Clayey soil) สีน้ำตาลและน้ำตาลเข้ม โดยทั่วไป (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ลักษณะโดยทั่วไปและการเกิดก๊าซมีเทนของดินนาข้าวตัวอย่าง จ.อุบลราชธานี

ตัวอย่าง	ดินนาข้าว			ลักษณะตัวอย่าง	การเกิดก๊าซมีเทน (4 สัปดาห์)
	pH	อุณหภูมิ (°C)	Redox potential (mV)		
A1	7.55	29.9	-231.3	ดินสีน้ำตาลเข้มคล้ำ	+++
A2	7.5	28.7	-217.2	ดินสีน้ำตาลเข้มคล้ำ	+++
A3	7.28	30.4	-202	ดินสีน้ำตาลเข้ม	++
A4	7.09	30.1	-201.2	ดินสีน้ำตาลเข้ม คล้ำ	+++
A5	6.96	29.7	-194.3	ดินสีน้ำตาล	+
Mean	7.28	29.7	-209.2	-	-

หมายเหตุ N=3

+++ มาก, ++ ปานกลาง, + น้อย

- ไม่มี

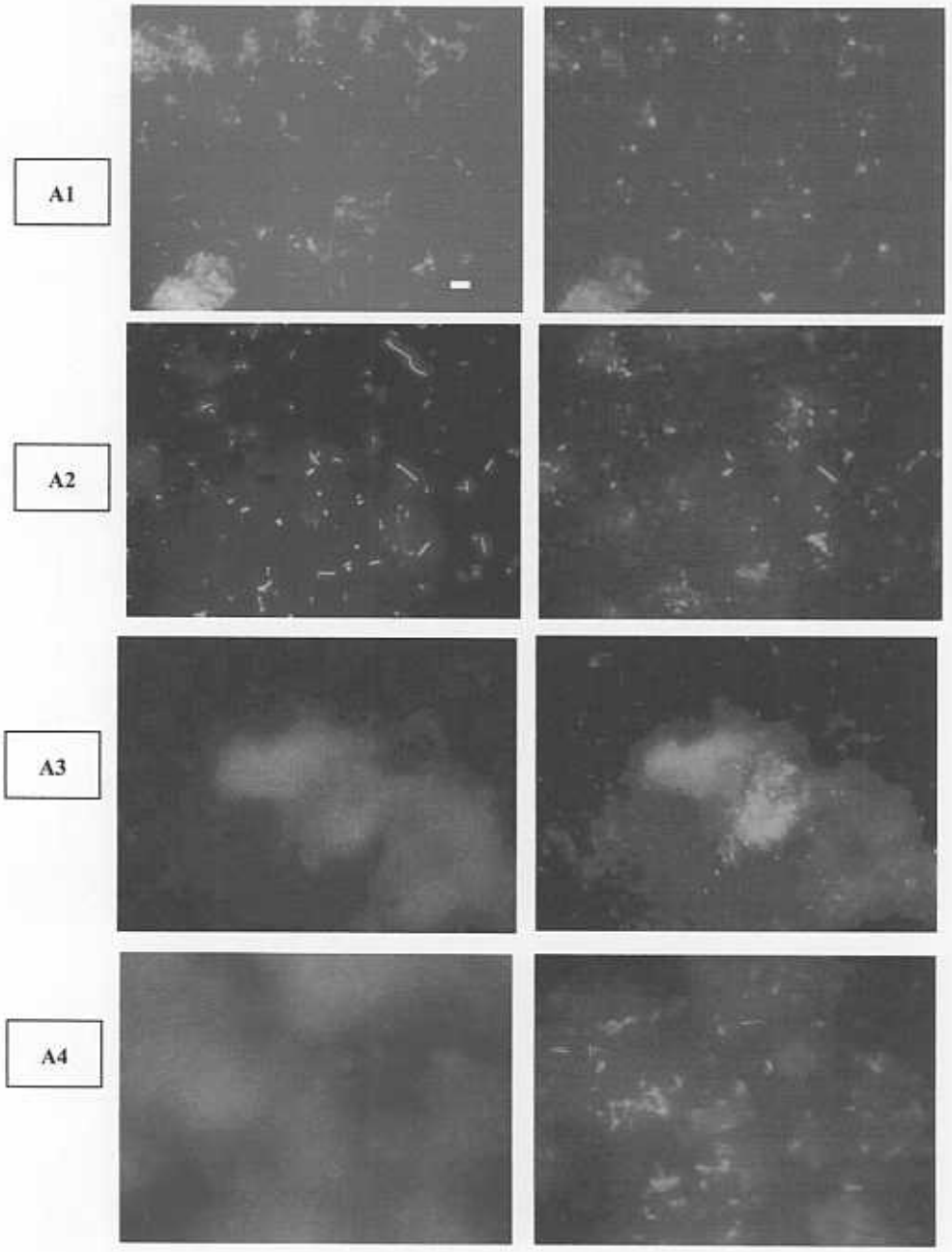
ตัวอย่างดินนาข้าวที่นำมาศึกษา จะมีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.96-7.55 ($\bar{X}$= 7.28) Soil temperature อยู่ในช่วง 28.7 °C -30.4°C ($\bar{X}$= 29.7°C) และมีค่า Soil redox potential ตั้งแต่ -194.2 จนถึง -231.3 ($\bar{X}$= -209.2) นำดินตัวอย่างมาผสมกับ Acetoclastic methanogens basal medium ในอัตราส่วนดินตัวอย่าง: อาหารเลี้ยงเชื้อ (25 gm : 25 ml หรือ 1:1) ใน serum vial 50 ml Flushed ด้วย N_2 ปิดจุก cab แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ N_2 ให้เป็นสภาพไร้อากาศ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำตัวอย่างดินที่มาบ่มเชื้อ มาทดสอบการก๊าซมีเทนที่ผลิตขึ้นจากคุณสมบัติการจุดติดไฟของก๊าซมีเทนจากขวดตัวอย่าง

ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาในการบ่มเชื้อประมาณ 4 สัปดาห์และจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี acetate ในตัวอย่างที่เป็นอาหารเฉพาะ (Selective media) สำหรับ Acetoclastic methanogens ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ จะเจริญได้นานกว่าและมีปริมาณมากกว่า Hydrogenotrophic methanogens หลังจากระยะเวลาที่บ่มเชื้อเป็นเวลานาน โดยจุลินทรีย์กลุ่มหลังใช้ H_2 และ CO_2 ในการร่วมกันผลิตก๊าซมีเทน โดยการตรวจสอบได้จากการจุดติดไฟของก๊าซมีเทนที่ถูกผลิตขึ้นมา โดยตัวอย่างที่มีปริมาณก๊าซสูงได้แก่ A1, A2 และ A4 โดย A3 และ A4 มีก๊าซมีเทนถูกผลิตในปริมาณน้อยกว่า ทั้งนี้น่าจะเป็นไปได้เนื่องจากชนิดและปริมาณของ Methanogens ในตัวอย่าง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจากขวด Serum vial ที่มีการผลิตก๊าซมีเทนจากตัวอย่าง นำมาเพิ่มปริมาณ (Enrichment) แล้วนำจุลินทรีย์มาศึกษาลักษณะ ชนิด และการกระจายตัวของ Acetoclastic methanogens ที่อาศัยอยู่ในดินรากข้าว โดย เทคนิค FISH ต่อไป

5.2 การตรวจสอบชนิดและลักษณะของ Acetoclastic methanogens จากนาข้าว โดยเทคนิค Fluorescence in-situ Hybridyzation (FISH)

นำตัวอย่างดินนาข้าวที่มีการผลิตก๊าซมีเทน จากแปลงนาข้าวบริเวณหาดคูเดื่อ จ.อุบลราชธานี หลังจากบ่มเชื้อประมาณ 2-4 สัปดาห์ ถ่ายเชื้อ เพิ่มปริมาณเชื้อ เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่ active และมีปริมาณเซลมากขึ้น แล้วนำเซลจุลินทรีย์ที่มีการเพิ่มปริมาณประมาณ 1-2 สัปดาห์ มาตรึงเซลโดยไปผสมกับ Fixative reagent (Paraformaldehyde) 750 μl ผสมกับเซลของ Methanogens นำไปบ่มที่ 4 ^{0}C ข้ามคืน (24 ชั่วโมง) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และแยกเอาส่วนใส (Supernatant) มา จากนั้นนำเซล จากนั้นใช้ Specific probe ในการทำ Hybridization ได้แก่ EUB 338 probe (ซ้าย), ARC 915 probe (A1, A2), MPB1 probe (A3) และ MSMX860 (A4) จากการย้อมด้วย FISH (รูปที่ 6) พบว่า เมื่อ Hybridized ด้วย EUB 338 (ซ้าย) และย้อมด้วยสี DAPI และดูผ่านกล้อง Fluorescence microscopy จะเห็นเซลจุลินทรีย์กระจัดกระจายอยู่โดยทั่วไปจากตัวอย่าง A1, A2, A3 และ A4 ด้านซ้ายมือ

ในรูปด้านขวามือ พบว่า ARC 915 probe (A2) เมื่อเปรียบเทียบกันกับ EUB 338 probe (ซ้าย) จะเห็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Archaebacteria แยกออกมา จากรูปด้านขวามือ MPB1 (A3) และ MSMX 860 (A4) ได้ผลคล้ายคลึงกัน โดยเมื่อย้อมด้วยสี DAPI แล้วนั้น โดย Specific probe จะจับเฉพาะเซลเป้าหมาย โดยตรวจพบเซล short-rod คล้าย *Methanosaeta* sp. จากตัวอย่างรากข้าวส่วนใหญ่ นั่นแสดงว่า จุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ในรากข้าวเป็นกลุ่ม *Methanosaeta* sp.ซึ่งเป็นกลุ่มของ Acetoclastic methanogens จากตัวอย่างดินรากข้าว



รูปที่ 6 ภาพจาก Epifluorescence microscopy แสดง Whole cell hybridizations ของ Mixed culture เซลจุลินทรีย์ทั่วไปและกลุ่ม Methanogens เป้าหมาย (ซ้าย) probe EUB338 และ specific probe (A1, A2) probe ARC 915, (A3) probe MPB1 and (A4) probe MSMX860 หลังจากย้อมสี DAPI Bar, 10 μM (applies to all photomicrographs).

7. บรรณานุกรม

สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย, 2540. "โครงการศึกษาและจัดทำบัญชีรายการแห่งชาติว่าด้วยปริมาณการปล่อยของก๊าซเรือนกระจกที่มิได้ถูกควบคุมโดยพิธีสารมอนทรีออล," (บทสรุปสำหรับผู้บริหาร), เอกสารของสถาบันสิ่งแวดล้อมไทยเสนอสำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, หน้า 1-2.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2540. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2539/40, 271 หน้า.

Amann, R I., L.Krumholz, and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. Journal of Bacteriology. 170: 760-770.

Amann, R., J. Stromley., R. Devereux., R. Key and A. D. Stahl. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. Applied and Environmental Microbiology. 58: p. 614-623.

Camilleri, C., 1988. Anaerobic digestion of food processing wastewater: industrial performance of fixed film technologies for methane recovery and pollution abatement, second, Bolona, Monduzzi press. 473-476.

Cicerone, R. J. and R. S. Oremland. 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. Global Biogeochem. Cycles. 2, 299-327.

Cole, J. R., Chai, B, Marsh, T. L, Farris, R.J, Wang, Q, KUlam, S. A., Chandra, S., McGarrell, D. M., Schmidt, T. M., Garrity, G.M., Tiedje, J. M. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Res. 31, 442-443.

Conrad, R. 1989. Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. Control of methane production in terrestrial ecosystems. in O. M. Andrae and S. D. Schimme, editors. John Wiley & Sons, USA.

Conrad, R. 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in Methanogensic soils and sediments. FEMS Microbiology Ecology **28**:193-202.

Denier van der Gon, H. A. C. 1996. Methane emission from wetland rice fields. Agricultural University, The Netherlands.

Giovannoni, S.J., Delong, E.F., Olsen, G.J. and R. N. Pach. 1988, Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. Journal of Bacteriology. 170: p. 720-726.

Harmsen, H.J., M. H. Kengen, D. A. Akkermans, J. A. Stams and M. W. de Vos. 1996. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA - based oligonucleotide. Applied and Environmental Microbiology.1656-1663.

IPCC. 1990. Climate Change. Intergovernmental Panel on Climate Change-Scientific Assessment in Houghton, T. J., Jenkins, T. G. and Ephraums, J. J. (Eds), Cambridge University Press, Cambridge, UK.

IPCC. 1996. Climate change 1995. Cambridge University Press, Cambrigde, UK. 572 p.

IRRI. 2000. Rice production, methane emissions and global warming: Links and Effects.

Jupraputtasri, W. 2001. Development of oligonucleotide probes for detection of methane producing bacteria and sulfate reducing bacteria using 16S rRNA fluorescent in situ hybridization. Master thesis. KMUTT, Bangkok, Thailand, Bangkok.

Jupraputtasri, W., Boonapatcharoen, N, Cheevadhanaruk, S, Chaiprasert, P, Tanticharoen, M and S. Techkarnjanarak. 2005. Use of an alternative Archaea-specific probe for methnaogen detection. Journal of Microbiology Methods. 61. 95-104.

Khalil, M. A. K., Shearer, M. J. and R. A. Rasmussen. 1993. Methane sources in China: Historical and current emissions. *Chemosphere*. **26,** 127-142.

Lipski, A., Friedrich, U. and K. Altendorf. 2000. Application of rRNA-targeted oligonucleotide probes in biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology. 56. 40-57.

Lueders, T. and Friedrich, M. (2000). Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. Applied and Environmental Microbiology. 66, 2733-2742.

Mayer, H. P. and Conrad, R. (1990). Factors influencing the population of Methanogensic bacteria and the initiation of methane production upon flooding of paddy soil. FEMS Microbiology Ecology. 73, 103-112.

Neue, H. U. 1993. Methane emission from rice fields: wetland rice fields may make a major contributiuon to global warming. Bioscience. 43. 466-473.

Neue, H. U. and P.A Rogers. 1994. Potential of methane emission in major rice ecologies, Climate biosphere interaction: Biogenic emissions and environmental effects of climate change, John Wiley and Sons. 65-93.

Neue, H. U. and L.R Sass. 1994. Trace gas emission from rice field in Prinn, R. G. (Ed), *Global Atmospheric-BiosphericCchemistry*. Plenum Press. New York. US. 119-147.

Neue, H. U., Wassmann, R., Lantin, R. S., Alberto, M. C. R., Aduna, J. B. and M. A. Javellana. (1996). Factors affecting methane emission from rice fields. Atmospheric Pollution 30, 1751-1754.

Nishihara, M., Akawa-Matsushita, M., Togo, Y. and Y. Koga. 1995, "Inference of Methanogensic bacteria in wastewater digestor sludges by lipids component analysis," Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol. 79. 400-402.

Prinn, R. G. 1994. Global Atmospheric-biospheric chemistry. Plenum press, New York, USA.

Raskin, L., L.K. Poulsen, D.R. Noguera, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl. 1994. Quantification of Methanogensic groups in anaerobic biological reactors by using oligonucleotide probe hybridization. Applied Environmental Microbiology. 60:1241-1248.

Roy, R., Kluber, H. D. and Conrad, R. (1997). Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. FEMS Microbiology Ecology. 24, 311-320.

Sass, L. R., M. N. Fisher, and P. A. Harcombe. 1990. Methane production and emission in a Texas rice field. Global Biogeochemical Cycles 4:47-68.

Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura., A. Ohashi and H. Harada. 1999. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of Methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. Applied and Environmental Microbiology. 65. 1280-1288.

Sorensen, A.H., Torsvik, V.L., Torsvik, T., Poulsen, L.K. and K. B. Ahring. 1997. Whole-cell hybridization of Methanosarcina cells with two new oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology, 1997. 63. 3043-3050.

Wassmann, R., Neue, H. U., Lantin, R. S., Javellana, M. J., Diego, R., Lignes, V. E., Hoffmann, H., Papen, H. and H. Rennenberg. 1996. Methane emissions from rainfed rice, Fragile Lives in Fragile Ecosystems, International Rice Research Institute, Manilla, Philippines, pp.225.

ภาคผนวก

Fluorescence in-situ Hybridization

(FISH)

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 Water bath ปรับอุณหภูมิได้ในช่วง 40 – 60 °C

1.2 ถังน้ำแข็ง

1.3 กระจกปิดสไลด์

1.4 ไมโครปิเปตต์ ขนาด 1,000 , 2,000 และ 20 μl พร้อมทิป

1.5 Fixative reagent

1.6 1 x PBS Buffer

1.7 96% Ice cold alcohol หรือ Absolute Alcohol Acid alcohol

1.8 Ethanol series 50, 80 และ 90%

1.9 Hybridization buffer

1.10 16 rRNA probe

1.11 Formamide

1.12 Washing buffer

1.13 Antifading reagent

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 Fixative reagent

เป็นสารที่ทำให้เซลล์ตายโดยไม่ทำลาย ribosomal RNA ของเซลล์ เตรียมโดยเติม 2 g Paraformal dehyde ช้าๆ ลงใน dH_2O 33 ml เติม 10 M NaOH 1 หยดลงไปผสมสารให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Stiror waterbath ที่อุณหภูมิ 60°C จนกว่าสารจะละลายเข้ากันหมด เติม 3 x PBS 16.5 ml ลงไป แล้วทำให้เย็นบนน้ำแข็ง ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วย 1 M NaOH และกรองด้วยวิธีปลอดเชื้อ Fixative reagent นี้จะต้องใช้ภายใน 24 ชม.

2.2 Acid alcohol

ใช้ทำความสะอาดสไลด์ก่อนนำไปทำ coat slide ด้วย poly – L – lysine เตรียมโดยเติม 1% HCl ลงใน 70% Ethanol ในอัตราส่วน 1/99

2.3. 3 x PBS buffer

เตรียมโดยเติม 23.4 ml ของ 5 M NaCl ลงใน 180 ml ของ 0.5 M NaPO4 buffer ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 300 ml ด้วย dH 2O

2.4. Hybridization buffer

ประกอบด้วย 0.9 M NaCl, 0.01% SDS, 20 mM Tris – HCl (pH 7.2) และ 0 – 35% Formamide (การใช้ Formamide กี่ % นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ probe) อัตราส่วนของ NaCl/ SDS/ Tris – HCl/ Formamide เท่ากับ 1/1/1/1 และอัตราส่วน Hybridization buffer/ probe เท่ากับ 9/1 (probe เข้มข้น 50 ng/μl) ปรับ pH = 7.2

2.5. Washing buffer

ประกอบด้วยสารเคมีเช่นเดียวกับ Hybridization buffer เพียงแต่ไม่มี probe และ Pormamide ตัวอย่างการเตรียม washing buffer ของการทดลองที่ใช้ Formamide 15% (ใช้ความเข้มข้นเกลือ 0.318 M) เตรียม 100 ml

จากสารละลาย stock solution

NaCl เข้มข้น 3 M

SDS เข้มข้น 10%

Tris-HCl เข้มข้น 1 M

รวมปริมาตรสารเคมีที่ต้องใช้ เท่ากับ 10.6+0.1+2 = 12.7 และจะต้องใช้น้ำกลั่นปริมาตร 100-12.7 = 87.3 ml ปรับ pH = 7.2

2.6 DAPI solution

สำหรับใช้ทำ Counter stain เตรียมสารละลาย DAPI 100 μM เก็บที่ 4°C เมื่อต้องการใช้ นำมาเจือจางเป็น 300 nM นำไปเติมลงในเซลล์ที่ผ่านการ Hybridization แล้ว บ่มที่ อุณหภูมิห้อง 5 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

เมื่อตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมแล้ว ชั่งดินบริเวณใจกลางรากข้าวให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม ย้ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 ml นำไปไล่อากาศด้วยการ flush ด้วยไนโตรเจนเป็นเวลา 5 นาที ปิดฝาขวดอาหารให้แน่น ใส่ลงในกระบอกเก็บ plate จุดเทียนข้างในกระบอกแล้วปิดฝากระบอกปิดทับช่องว่างของกระบอกทั้งหมดด้วยเทปใส บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 1 เดือน แล้วนำไปศึกษาประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค FISH (Fluorescence in-situ Hybridization)

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Acetoclastic methanogens medium (เตรียม 1 ลิตร)

- Sodium acetate	5 g
- KH_2PO_4	0.4 g
- K_2HPO_4	0.4 g
- $MgCl_2$	0.1 g
- $MgSO_4.7H_2O$	1 g
- NH_4Cl	1 g
- Mineral Solution *	10 ml
- Vitamin Solution*	10 ml
- $NaHCO_3$	5 g
- Yeast extract	1 g
- L – Lysine-HCl.H_2O	0.5 g
- $Na_2S.9H_2O$	0.5 g
- น้ำกลั่น	1,000 ml

หมายเหตุ : $NaHCO_3$ และ L-Lysine นำมาละลายแล้วกรองห้ามฆ่าเชื้อด้วยการ auto clave

สูตร Mineral Solution

- Nitriotriacetic acid	1.5 g
- $MgSO_4.7H_2O$	3 g
- $MnSO_4.2H_2O$	0.5 g
- NaCl	1 g
- $FeSO_4.7H_2O$	0.1 g
- $CoSO_4.7H_2O$	0.18 g
- $CaCl_2.2H_2O$	0.1 g
- $ZnSO_4.7H_2O$	0.18 g
- $CuSO_4.5H_2O$	0.01 g
- $KAl(SO_4)_2.12H_2O$	0.02 g
- H_3BO_3	0.01 g
- $Na_2MoO_4.2H_2O$	0.01 g
- $NiCl_2.6H_2O$	0.025 g
- $Na_2SeO_3.5H_2O$	0.3 mg
- น้ำกลั่น	1,000 ml

- การเตรียม Mineral Solution ขั้นแรก ละลาย Nitriotriacetic acid แล้วปรับ pH เป็น 6.35 ด้วย KOH จากนั้นเติมเกลือแร่ลงไป ปรับ pH เป็น 7 ด้วย KOH

สูตร Vitamin Solution

- Biotin	2 mg
- Folic acid	3 mg
- Pyrodoxine-HCl	10 mg
- Thiamine-HCl	10 mg
- Riboflavin	5 mg
- Nicotinic acid	5 mg
- DL-Ca-pantothenate	5 mg
- Vitamin B_{12}	0.1 mg
- p-Amonibenzoic acid	5 mg
- Lipoic acid	5 mg
- น้ำกลั่น	1,000 ml

4. วิธีการย้อมสีแบบ Fluorescence In situ Hybridization

1. **การ Fix ตัวอย่างเซลล์**: ใช้เซลล์ช่วง logarithmic cell โดยนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และแยกเอาส่วน supernatant มา 750 μ l จากนั้นนำเซลล์ไปผสมกับ Fixative reagent 750 μl นำไปบ่มที่ 4°C ข้ามคืน (5 นาที – 24 ชั่วโมง) จากนั้นนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นแยกเอาส่วน supernatant ออกมา ล้าง 2 ครั้งด้วย 1 x PBS buffer แยก supernatant ออก เก็บตัวอย่างเป็นสารละลาย 1/1 ของ 1 x PBS buffer และ 96% Ice cold ethanol เก็บที่อุณหภูมิ 20°C

2. **การเตรียมสไลด์**: ทำความสะอาดสไลด์ด้วย Acid alcohol (1 – 2 % HCl ใน 70% Ethanol) 5 นาที จากนั้นวางสไลด์ใน poly – L – Lysine (0.01%) ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำสไลด์ไปเป่าแห้ง 1 ชั่วโมงที่ 60 °C หรือข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง

3. **การทำ In situ hybridization**: นำตัวอย่างที่ Fixed แล้วมา 3 – 5 μl มา spot ลงบนสไลด์ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 – 15 นาทีจากนั้นนำไปกำจัดน้ำด้วย alcohol series โดยนำสไลด์ไปแช่ในสารละลาย alcohol เข้มข้น 50, 80 และ 96% ช่วงละ 3 นาที จากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปทำ Hybridization กับ 9 μl Hybridization buffer และ probe 1 μl (50 ng) เร่งการเกิด Hybridization ด้วย Formamide (0-35%) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46°C เป็นเวลา 1 ½ - 2 ชั่วโมง หลังจากผ่านการ Hybridization แล้ว ล้างสไลด์ด้วย Washing buffer ที่มีอุณหภูมิ 48°C ล้าง Washing buffer ด้วยน้ำกลั่น นำไปเป่าแห้ง mount ด้วย Anti – fading นำไปส่องด้วยกล้อง Fluorescence Olypus BX 60 ด้วย filter ที่เหมาะสม

- **ข้อควรระวัง:** หลังจากที่ทำการย้อมสีเสร็จควรรีบนำไปส่องตรวจสอบ เนื่องจากสี Fluorescence จะ fading เร็วอาจทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อน

ตารางการใช้ Formamide และ ความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสม

% Formamide	NaCl (M)
0	0.900
5	0.636
10	0.450
15	0.318
20	0.225
25	0.159
30	0.112
35	0.080
40	0.056

***หมายเหตุ:** Hybridization buffer และ Washing buffer จะเตรียมเหมือนกัน

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ: ศันสนีย์ ชวนะกุล

2. ตำแหน่ง: อาจารย์ ระดับ 7

3. หน่วยงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ถ. สถลมารค อ. วารินชำราบ

จ. อุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ภายใน 4214 โทรสาร : 045-288380

Email: csansane@sci.ubu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

Ph.D candidate (Environmental Technology), The Joint Graduate School of Energy and Environment (JGSEE), KMUTT, Thailand

Certificate in Special Research Topic, (Medicinal plants in Gifu Prefecture), Gifu University, Gifu Prefecture, Japan.

Japanese language, Gifu University, Gifu Prefecture, Japan.

University Entrance Certificate (CALUSA), University of South Australia, Adelaide, Australia

วท.ม (มลพิษวิทยา), โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (มลพิษวิทยา), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วท.บ (จุลชีววิทยา), คณะวิทยาศาสตร์และอักษรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. Publications:

Chawanakul, S., Aranyanark, J and Noparatnaraporn, N. (1996). Biodeterioration of Bacterial and Actinomycetes at Sukhothai Historical Park in Thailand. Bioderioration. 342 pps.

Chawanakul, S., Chaiprasert, P., Kerdchoechuen, O., Towprayoon, S. and Tanticharoen, M. (2001). Acetoclastic population dynamic and methane production in paddy field. Proceeding in "Biothailand". BIOTEC Conference. Sirikitr Convention Centre, Bangkok, Thailand.

Chawanakul, S., Chaiprasert, P., Kerdchoechuen, O., Towprayoon, S. and Tanticharoen, M. (2002.). Methane production and Acetoclastic methanogens at rice rhizosheric soil. Poster presentation in NCGG-3 (3rd Non-Carbondioxide Greenhouse Gase International Conference), Jan 21-23, 2002. Maastricht, The Netherland.

Chawanakul, S., Chaiprasert, P., Towprayoon, S. and Tanticharoen, M. (2002). Methane production and Acetoclastic methanogens population size at rice root. Proceeding in "World Congress of Soil Science Conference (WCSS)". Sirikitr Convention Centre, Bangkok. Thailand.

Noparatnaraporn, N., Aranyanark, J and Chawanakul, S. (1994). Biodeterioration by microorganism at Sukhothai Historiral Park. Proceeding in First International Conference of Biodeterioration. Hilton International Park. Bangkok, Thailand.

ศันสนีย์ ชวนะกุลและ ประเดิม ภาคแก้ว, 2547. ความสำเร็จของการจัดการขยะมูลฝอยแบบครบวงจร: กรณีศึกษาจังหวัดร้อยเอ็ดและยโสธร. ข่าวสิ่งแวดล้อมภาคที่ 12. ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 ตุลาคมธันวาคม 2547.

ศันสนีย์ ชวนะกุล, กัญญจนา นึกดีและ ประเดิม ภาคแก้ว, 2548. การจัดการขยะมูลฝอยแบบครบวงจร: กรณีศึกษาจังหวัดร้อยเอ็ดและยโสธร. โปสเตอร์เสนอในการประชุมวิชาการ สิ่งแวดล้อมนเรศวรครั้งที่ 1. วันที่ 18-19 กรกฎาคม 2548.

7. ประสบการณ์การสอน

Man and Environment, Environmental Management, Microbial ecology, Environmental Management, Waste treatment, utilization and minimization

8. ความเชี่ยวชาญและสาขางานวิจัยที่สนใจ

Environmental microbiology, Biodeterioration, Bioremediation, Anaerobic microbial ecology, Biogas technology, Waste treatment, utilization and minimization, Solid waste management, Energy conservation.