



รายงานการวิจัย ฉบับสมบูรณ์
เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ปีงบประมาณ 2560

ชื่อโครงการวิจัย
นิเวศจุลชีพในดินและปุ๋ยจากการเกษตรแบบอินทรีย์
Microbiota in Organic-Agricultured Soil and Fertilizer

รองศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญาเลขที่ GB-B_60_089_23_12

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะผู้ร่วมวิจัยได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัตน์มณี ชนะบุญ นางสาวอลิษา วิลันโท และ นางสาวภััสสิริ โคมกระจ่าง โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทที่	เลขหน้า
1. บทนำ	4 - 6
2. วิธีทำ	7 - 10
3. ผลการทดลองและอภิปรายผล	
3.1 ดิน	11 - 38
3.2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน	38 - 63
4. สรุปผล	64
5. เอกสารอ้างอิง	65 - 67

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาเทคนิคทางเมตาจีโนมิกส์อย่างแพร่หลายเพื่อศึกษาและทำฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพที่แท้จริง ครอบคลุม ไม่ขึ้นกับความสามารถในการเพาะเลี้ยง และใช้เวลาไม่นาน ซึ่งในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์โดยวิธีเมตาจีโนมิกส์หรือวิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงนี้ทำให้พบจุลินทรีย์อีกมากกว่า 1,000 เท่าของที่รายงานโดยอาศัยวิธีเพาะเลี้ยง ช่วยให้เกิดฐานข้อมูลจุลินทรีย์ที่แท้จริง หรือที่เรียกว่า ไมโครไบโอม (microbiome) และก่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นในความหลากหลายและบทบาทของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศ อาทิเช่น นักวิทยาศาสตร์พบจุลินทรีย์ที่คาดว่าเป็นประโยชน์ในการปรับสภาพพื้นดิน จากดินในเขตทะเลทราย ว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปรับสมดุลของน้ำ และพบไมโครไบโอมมีส่วนสัมพันธ์กับความอุดมสมบูรณ์และความทนต่อโรคของดินและต้นพืช ผลของงานวิจัยดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนาเพื่อการเกษตร ซึ่งการประยุกต์ใช้ความรู้ทางไมโครไบโอมเพื่อสร้างจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่เหมาะสมดังกล่าว นับเป็นวิธีบำบัดทางธรรมชาติที่ไม่ก่อผลกระทบใดๆ และยังยั่งยืน เพราะก่อให้เกิดระบบนิเวศที่เหมาะสมตามความสัมพันธ์ของห่วงโซ่อาหารและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ

1.1 การเกษตรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ พืชที่ปลูกกันส่วนใหญ่ในประเทศได้แก่ ข้าว (มากกว่าร้อยละ 50) ตามด้วยผักและผลไม้ต่าง ๆ (เช่น ซา ข้าวโพด และกล้วย) (NESDB, 2005)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ขนาดใหญ่ โดยคิดเป็นหนึ่งในสามของพื้นที่ทั้งหมดของประเทศ (168,854 ตารางกิโลเมตร) และประชากรส่วนใหญ่ของประเทศอาศัยอยู่ในพื้นที่นี้ ประชากรของภาคตะวันออกเฉียงเหนือส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม แต่กระนั้น คุณภาพของดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ต่ำสำหรับการทำเกษตรกรรมเมื่อเทียบกับภูมิภาคอื่น ๆ ของประเทศ (Fukai, Sittisuang and Chanphengsay, 1998) เนื่องจากดินมีลักษณะเป็นทรายเนื้อละเอียด นอกจากนี้ ลักษณะภูมิประเทศยังมีแหล่งน้ำอยู่จำกัด ปริมาณน้ำฝนก็ไม่แน่นอน กล่าวคือ บางครั้งมีฤดูแล้งที่ยาวนาน ตามด้วยฤดูฝนที่มีน้ำท่วม แม้ปัญหาจะทุเลาลงบ้างเพราะมีโครงการชลประทาน แต่การแก้ปัญหาดังกล่าวยังก่อให้เกิดปัญหาใหม่ นั่นคือ ปัญหาดินเค็ม นอกจากนี้ พื้นที่เกษตรกรรมหลายแห่งกลายเป็นสภาพมาจากการตัดไม้ทำลายป่า ปัญหาอีกอย่างหนึ่งคือ ผลผลิตต่อพื้นที่เฉลี่ยค่อนข้างต่ำ ทำให้เกษตรกรต้องพึ่งพาการทำเกษตรแบบอุตสาหกรรม (industrial agriculture) ซึ่งเป็นการเร่งให้คุณภาพดินเสื่อมเสียเร็วขึ้นไปอีก (Fedra, Winkelbauer and Pantulu, 1991; NESDB, 2005)

เมื่อสังคมสมัยใหม่กลายเป็นสังคมอุตสาหกรรม การเกษตรจึงเปลี่ยนเป็นการเกษตรอุตสาหกรรมไปด้วย เกษตรอุตสาหกรรม หมายถึง ระบบการทำเกษตรโดยใช้ปุ๋ยเคมี ยาฆ่าแมลง ยากำจัดวัชพืช และสารเคมีสังเคราะห์ และสิ่งมีชีวิตตัดต่อพันธุกรรม การให้หัวอาหารแก่สัตว์เลี้ยง และมีการทำชลประทานและไถพรวนกันอย่างแพร่หลาย วิธีการนี้ทำให้สามารถได้ผลผลิตจำนวนมากในพื้นที่น้อยและใช้แรงงานมนุษย์

น้อยลง (Seufert, Ramankutty, and Foley, 2012) แต่กิจกรรมต่าง ๆ ที่ใช้ทรัพยากรและพลังงานมาก ๆ แบบเกษตรอุตสาหกรรมส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การชะละลายของสารเคมี ความเสื่อมโทรมของดิน และการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพ งานวิจัยมากมายที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเกษตรอุตสาหกรรมและเกษตรอินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ตรงข้ามกันแสดงให้เห็นว่าเกษตรอินทรีย์ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตและความอุดมสมบูรณ์ของดินมากกว่าเกษตรอุตสาหกรรม (Bengtsson, Ahnström, and Weibull, 2005) นอกจากนี้ การใช้สารเคมี เช่น ยาฆ่าแมลง ยังทำให้มนุษย์เผชิญกับความเสียด้านสุขภาพ แต่กระนั้น เนื่องจากเกษตรอุตสาหกรรมให้ผลผลิตที่รวดเร็วกว่า เกษตรกรในประเทศไทยจึงยังเป็นที่นิยม ทำให้เกิดปัญหาดินคุณภาพต่ำอย่างต่อเนื่อง (Fukai, Sittisuang and Chanphengsay, 1998)

1.2 เกษตรอินทรีย์และความสำคัญของไมโครไบโอมในดิน

เกษตรอินทรีย์ (Organic agriculture) หรือเรียกว่า เกษตรยั่งยืน (sustainable farming) มีหลักการว่าห้ามใช้สารเคมีและสิ่งแปลกปลอม สิ่งมีชีวิตตัดต่อพันธุกรรม แต่ยังให้ใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรเพื่อลดการใช้พลังงานและแรงงานมนุษย์ (Hole et al., 2005; Paull, 2011) เช่น เกษตรอินทรีย์มีการใช้ปุ๋ยที่ได้จากสัตว์หรือพืช มีการกำจัดวัชพืชด้วยมือ ควบคุมศัตรูพืชด้วยวิธีการทางชีวภาพ เพื่อแทนการใช้ปุ๋ยเคมี สารกำจัดศัตรูพืช และยาฆ่าแมลง นอกจากนี้ เกษตรอินทรีย์ยังใช้วิธีการปลูกแบบสวนผสม (คือการปลูกพืชหลายชนิดรวมกัน) และปลูกพืชหมุนเวียนเพื่อให้ดินมีแร่ธาตุที่หลากหลาย เป้าหมายของเกษตรอินทรีย์ คือ คงสภาพความเป็นธรรมชาติที่ดี รวมถึง ดิน น้ำ สัตว์ มนุษย์ และอื่น ๆ กระบวนการของเกษตรอินทรีย์จะเป็นการพึ่งพาความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศและสายใยอาหารที่เหมาะสมกับสภาพภูมิประเทศในท้องถิ่นนั้น ๆ (Rigby and Cáceres, 2001) สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานว่า ฟาร์มเกษตรอินทรีย์ในประเทศไทยประกอบด้วย ทำนาข้าว (ร้อยละ 68) สวนผักต่าง ๆ (ร้อยละ 12) ผลไม้ (ร้อยละ 8) ไร่ชา (ร้อยละ 8) สมุนไพร และอื่น ๆ นอกจากนี้ ผลผลิตจากฟาร์มเกษตรอินทรีย์มักจะมีราคาตลาดที่สูงกว่าสินค้าเกษตรประเภทอื่น เนื่องจากมีคุณค่าด้านการทำเกษตรแบบห่วงใยสิ่งแวดล้อม

จุลินทรีย์ทำหน้าที่หลักในจุดเริ่มต้นและจุดจบ (วัฏจักร) ในเกือบทุกห่วงโซ่อาหาร เมื่อไม่นานมานี้ มีงานวิจัยที่พยายามเพิ่มผลผลิตโดยใช้การทำงานของไมโครไบโอมประเภทโปรคาริโอตและยูคาริโอต (โดยหลักแล้วจะใช้รา สัตว์จำพวกหนอนตัวกลม และ สัตว์จำพวกหนอนปล้อง) เมื่อเกษตรกรปลูกและเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้ว ดินก็จะสูญเสียสารอาหารบางอย่างออกไป และเมื่อทำเกษตรในรูปแบบนี้ติดต่อกันและระยะเวลาานาน ดินก็จะประสบปัญหาขาดธาตุอาหารและกลายเป็นดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ ดังนั้น เพื่อเติมสารอาหารให้แก่ดิน จึงจำเป็นต้องคงสมดุลความหลากหลายของจุลินทรีย์ รวมถึงแบคทีเรียโปรคาริโอตและอาร์เคีย และราประเภทยูคาริโอต โพรทิสต์ และสัตว์ขนาดเล็ก เช่น หนอนตัวกลม เพื่อเติมเต็มห่วงโซ่อาหาร ไมโครไบโอมในดินที่อุดมสมบูรณ์เป็นเป้าหมายสูงสุดของเกษตรอินทรีย์ เพราะต้องการรักษาดินให้มีจุลินทรีย์อุดมสมบูรณ์อย่างยั่งยืน และมีห่วงโซ่อาหารที่ยั่งยืน นอกจากแนวทางการปรับสังคมของจุลินทรีย์ในดินโดยการเติมจุลินทรีย์หรือสารอาหารที่จำเป็นโดยตรงแล้ว การใช้ปุ๋ยชีวภาพจากไส้เดือนดิน จากมูลหรือปัสสาวะ ขึ้นกับวิธีการใช้เช่น มูลเพื่อเทลราก หรือน้ำเพื่อฉีดพ่นลำต้นและใบ เหล่านี้นับเป็นอีกหนึ่งในแนวทางของการสภาวะและสังคมของ

จุลินทรีย์ในดิน ซึ่งในวิธีนี้สายพันธุ์ของไส้เดือนดินและวัสดุที่ใช้ในการเลี้ยงไส้เดือนดิน (เช่น หญ้าเนเปียร์) นับว่ามีความสำคัญ

งานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าเทคนิคในการทำเกษตรกรรมส่งผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ ซึ่งให้เห็นว่าการเกษตรอุตสาหกรรมในระยะยาวเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจุลินทรีย์ในดิน โดยมีแนวโน้มที่จะไปลดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตและกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตเมื่อเทียบกับเกษตรอินทรีย์ (Bossio et al., 1998; Letourneau and Goldstein, 2001; Berkelmans et al., 2003) นอกจากนี้ ดินจากเกษตรอินทรีย์ยังมีเชื้อก่อโรคพืชลดลงเนื่องจากการแข่งขันการเจริญเติบโตจากจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (Griffiths et al., 1994) และขณะที่การใช้จุลินทรีย์ชนิดเดียวจะให้ผลลัพธ์ที่ไม่นิ่ง แต่ข้อมูลจากการใช้ไมโครไบโอมหมายถึงการปรับประชากรจุลินทรีย์ที่หลากหลายในดินพบว่าช่วยแก้ปัญหาพืชการเกษตรและปัญหาเกี่ยวกับดินเรื้อรังได้หลายอย่าง เช่น พืชที่ทนความเค็มได้ และคุณภาพดินที่ดีขึ้น (Vandenkoornhuyse et al., 2015; Qin et al., 2016; Schmidt, Bowles and Gaudin, 2016) อย่างไรก็ตาม ไมโครไบโอมในดินอาจแตกต่างกันไปตามพื้นที่ทางภูมิศาสตร์และประเภทของพืช (Bulgarelli et al., 2012; Lakshmanan, 2015; Agler et al., 2016)

ข้อมูลและความรู้เรื่องไมโครไบโอมในดินที่เป็นแหล่งเพาะปลูกการเกษตรในประเทศไทยเป็นสิ่งที่ยังจำเป็น เนื่องจากข้อมูลไมโครไบโอมของเรายังมีเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับพื้นที่และปริมาณการเพาะปลูกทางการเกษตร ด้วยเทคโนโลยีเมตาจีโนมิกส์ร่วมกับการถอดรหัสพันธุกรรมของทั้งประชากรจุลินทรีย์โดยเครื่องเอ็นจีเอส (next generation sequencing: NGS) เป็นเทคนิคขั้นสูงที่เพิ่งมีการคิดค้นไม่นานมานี้ ดังนั้นงานวิจัยหลายชิ้นที่มีมาก่อนจึงยังไม่ได้มีการศึกษาทรัพยากรจุลินทรีย์ หรือศึกษาเพียงข้อมูลจากทดลองด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละตัวที่สภาวะเหมาะสมแล้วค่อยถอดรหัสพันธุกรรมของแบคทีเรียแต่ละตัวนั้น หรือการแยกโปรไฟล์ของประชากรแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์รูปแบบความแตกต่างขององค์ประกอบดีเอ็นเอด้วยอิเล็กทรอนิกส์ (เช่น วิธี automated ribosomal intergenic spacer analysis และ terminal restriction fragment length polymorphism) (Chawanakul et al., 2009; Doi and Ranamukhaarachchi, 2009; Sooksa-Nguan et al., 2010; Chaiyasen et al., 2014; Chunjaturas et al., 2014; Siripattanakul-Ratpukdi et al., 2015) ซึ่งผลที่ได้ยังไม่สามารถแสดงถึงประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แท้จริง ดังนั้น ข้อมูลไมโครไบโอม กล่าวคือประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แท้จริง จึงเป็นชิ้นส่วนที่ต้องมาเติมเต็มส่วนที่ยังขาดหาย

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- ทราบข้อมูลประชากรจุลินทรีย์แบคทีเรีย อาร์เคีย และรา ในดินจากแปลงนาเกษตรอินทรีย์เปรียบเทียบกับดินจากแปลงนาเกษตรอุตสาหกรรม และดินนาเกลือ และในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน จ.มหาสารคาม
- ระบุความแตกต่างของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ และศักยภาพหน้าที่ของประชากรจุลินทรีย์
- ความรู้เป็นประโยชน์และสนับสนุนการเกษตรอินทรีย์แก่เกษตรกร

บทที่ 2

วิธีทำ

1. เก็บตัวอย่าง

สำหรับตัวอย่างดิน เลือกพื้นที่เพาะปลูก 4 แปลงในจังหวัดสกลนคร ได้แก่

1) แปลงนา เกษตรอินทรีย์ ปลูกข้าวและสวนผสมแบบเกษตรอินทรีย์และมีการปลูกพืชหมุนเวียน
อำเภอกุสุมาลย์ (แปลงที่ 1)

2) แปลงข้าวนาปี รอยต่อกับนาเกลือ ปลูกข้าวเกษตรอินทรีย์ผสมกับข้าวเกษตรอุตสาหกรรม และมีการ
ปลูกพืชหมุนเวียน ในอำเภอวานรนิวาส (แปลงที่ 2)

3) แปลงนาเกลือ อำเภอวานรนิวาส (แปลงที่ 3) และ

4) แปลงนาข้าวและสวนแคนตาลูป เกษตรอุตสาหกรรม (ปนเปื้อนสารเคมี) และมีการปลูกพืชหมุนเวียน
อำเภอพรรณานิคม (แปลงที่ 4)

ในแต่ละแปลง ทำการเก็บตัวอย่างดิน 10 ซ้ำ ที่ระยะห่างกันทุกๆ 1 เมตรและที่ระดับความลึกจากผิวดินที่ 1-5 ซม. (surface หรือ s แทนไมโครไบโอมของชั้นหน้าดิน) และ 20-30 ซม. (bottom หรือ b แทนไมโครไบโอมระดับรากพืช) โดยแต่ละตัวอย่างซ้ำเก็บปริมาณน้ำหนัก 15 กรัม ในภาชนะที่สะอาดปลอดเชื้อ การตั้งชื่อย่อยตัวอย่างเช่น soils1 คือ หน้าดินของแปลงที่ 1 และ soilb1 คือดินระดับรากของแปลงที่ 1 เป็นต้น

สำหรับตัวอย่างปุ๋ย แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1) Bedding หรือดินที่อยู่ตั้งต้นของไส้เดือน ประกอบด้วยมูลวัว 1 ส่วน ขุยมะพร้าว 1 ส่วน และใบไม้แห้ง 1 ส่วน

2) ปุ๋ยแยกเป็น

2.1 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ไทย *Perionyx excavates* ที่เลี้ยงด้วยหญ้าเนเปียร์ โดยวัสดุเพาะเลี้ยงประกอบด้วย มูลวัว 1 ส่วน ขุยมะพร้าว 1 ส่วน ใบไม้แห้ง 1 ส่วน หญ้าเนเปียร์ 1 ส่วน และทำการเพาะเลี้ยงไส้เดือนดิน เป็นระยะเวลา 4 เดือน (ย่อว่า Pe1_with napia หรือ PE1w)

2.2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ไทย *Perionyx excavates* ที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยหญ้าเนเปียร์ โดยวัสดุเพาะเลี้ยงประกอบด้วย มูลวัว 1 ส่วน ขุยมะพร้าว 1 ส่วน ใบไม้แห้ง 1 ส่วน และทำการเพาะเลี้ยงไส้เดือนดิน เป็นระยะเวลา 4 เดือน (ย่อว่า Pe1_without napia หรือ PE1wo) *ต้องการเปรียบเทียบระหว่างเลี้ยงด้วยหญ้าเนเปียร์และไม่ได้เลี้ยงด้วยหญ้าเนเปียร์

2.3 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ต่างประเทศ *Eisenia foetida* ที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยหญ้าเนเปียร์ โดยวัสดุเพาะเลี้ยงประกอบด้วย มูลวัว 1 ส่วน ขุยมะพร้าว 1 ส่วน ใบไม้แห้ง 1 ส่วน หญ้าเนเปียร์ 1 ส่วน และทำการเพาะเลี้ยงไส้เดือนดิน เป็นระยะเวลา 4 เดือน (ย่อว่า Ef1_without napia หรือ EF1wo) *ต้องการเปรียบเทียบระหว่างไส้เดือนดินสายพันธุ์ไทย *Perionyx excavates* และไส้เดือนดินสายพันธุ์ไทย *Perionyx excavates*

Bedding และปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนแต่ละสูตร ได้มีการเก็บตัวอย่างเป็นปริมาณ 15 กรัม และดำเนินการเก็บ 5 ซ้ำ สำหรับวิเคราะห์ในขั้นต่อไป นอกจากนี้ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างละ 500 กรัม เพื่อไปวิเคราะห์หาแร่ธาตุอาหารได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH: pH meter) ปริมาณเกลือในดิน (EC meter) ปริมาณธาตุอาหารในดิน อินทรีย์วัตถุในดิน (OM: Walkley & buffer method) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดิน (Total N; Kjeldahl method) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Extractable P; Bray II & Spectrophotometer) ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Atomic Absorption Spectrophotometer) ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

2.4 ปุ๋ยน้ำหมักหรือฉีไส้เดือน เก็บตัวอย่างละ 3 ซ้ำ อันประกอบด้วย

2.4.1 น้ำหมักจากไส้เดือนดินสายพันธุ์ไทย *P. excavates* ที่เลี้ยงด้วยหญ้าเนเปียร์ (ย่อว่า Pe2_with napia หรือ PE2w)

2.4.2 น้ำหมักจากไส้เดือนดินสายพันธุ์ไทย *P. excavates* ที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยหญ้าเนเปียร์ (ย่อว่า Pe2_without napia หรือ PE2wo)

2.4.3 น้ำหมักจากไส้เดือนดินสายพันธุ์ต่างประเทศ *E. foetida* ที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยหญ้าเนเปียร์ (ย่อว่า Ef2_without napia หรือ EF2wo)

2. หาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตด้วยวิธี most probable number (MOPN)

วิเคราะห์ MOPN โดยผสมตัวอย่างในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ในหลอดแก้ว จากตัวอย่าง 1 ถึง 2.3 ในลักษณะ 10-fold dilution series ที่ความเข้มข้นละ 3-5 ซ้ำ ไม่ได้วิเคราะห์ในตัวอย่าง 2.4 เนื่องจากตัวอย่างน้ำหมักหรือฉีไส้เดือนดิน มีปริมาณน้อยมาก จึงเพียงพอเฉพาะงานวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์เท่านั้น ทำการบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิและสภาวะปกติ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นอ่านผลจำนวนหลอดที่ขุ่น (มีการเจริญของแบคทีเรีย) ที่ระดับสามความเข้มข้นสุดท้ายก่อนความเข้มข้นที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญ เช่น 5 3 1 และแปลผลจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตในหน่วย MOPN/g soil จากตาราง MOPN (<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>)

3. สกัดเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพ

สกัดเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (หรือจีโนมทั้งหมดในตัวอย่าง) ของงทุกตัวอย่าง ละอย่างน้อย 2 ซ้ำ โดยใช้ 0.25 g ในการสกัดแต่ละซ้ำสำหรับตัวอย่างส่วนดิน Bedding และปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน ส่วนปุ๋ยน้ำหมัก ใช้ 50 ml โดยใช้ Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA) ตามวิธีในคู่มือชุดสกัด

ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างที่สกัดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และ nanodrop spectrophotometry

4. วิเคราะห์ความหลากหลายด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโพรริซิส โดยเทคนิค bacterial-ribosomal

intergenic spacer analysis (B-RISA) และ fungal-ribosomal intergenic spacer analysis (F-RISA)

วิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียและราโดยเทคนิค B-RISA และ F-RISA โดยใช้ไพรเมอร์และสภาวะในปฏิกิริยา PCR ตามวิธีของ Ranjard และคณะ 2001, Hewson และคณะ 2004, และ Danovaro และคณะ 2006 วิธีนี้อาศัยการเพิ่มปริมาณของบริเวณบนดีเอ็นเอของแบคทีเรียและราที่มีขนาดความยาวแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งขนาดความยาวดังกล่าวสามารถวัดได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และสังคมแบคทีเรีย (หรือสังคมรา) ที่แตกต่างกันสามารถวิเคราะห์ได้จากรูปแบบความหลากหลายของขนาดของความยาวของแบนดีเอ็นเอที่ปรากฏ ในงานวิจัยนี้ใช้เพื่อศึกษาเบื้องต้นว่ารูปแบบประชากรแบคทีเรียและราเปรียบเทียบกับระหว่างผิวดินและดินบริเวณรากนั้นเหมือนหรือแตกต่างกันก่อนดำเนินการซีควนซ์หึ่งห้องสมุดยีน 16S และ 18S rRNA

5. สร้างห้องสมุดยีน 16S และ 18S rRNA

สร้างห้องสมุดยีนสากล 16S rRNA (สำหรับโปรคาริโอต) และ 18S rRNA (สำหรับยูคาริโอต) จากทุกตัวอย่างที่สกัด โดยใช้ไพรเมอร์ที่เชื่อมกับ 5' Illumina adapter และ Golay barcode และสภาวะ PCR ตามวิธีของ Caporaso และคณะ (2012) และใช้ PCR จำนวน 28 รอบ วิเคราะห์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อคัดแยกเฉพาะผลิตภัณฑ์ตามขนาดที่ถูกต้องมาทำความสะอาดโดยใช้ GenepHlow™ Gel Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan) มีการทำสำเนาอย่างน้อยสามชุดอิสระ กระจายกันไปเท่าเทียมกันเพื่อลด stochastic PCR bias จากนั้นวิเคราะห์คุณภาพและวัดความเข้มข้นโดยใช้ Picogreen (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) ด้วย qubit fluorometer และผสมแต่ละตัวอย่างของซ้ำที่ซ้ำกันในปริมาณดีเอ็นเอที่เท่ากัน

6. ซีควนซ์ด้วยเทคนิค next generation sequencing

ผสมทุกตัวอย่าง ละ 240 ng และใช้ลำดับ sequencing primers และ index sequence ตามของ Caporaso และคณะ (2012) เพื่อลงเครื่อง MiSeq next generation sequencing platform จำนวน 300 รอบ platform (Illumina, San Diego, CA, USA) ที่สถาบันวิจัยการแพทย์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ในแต่ละคลังห้องสมุดของแต่ละตัวอย่าง ทำการซีควนซ์ตัวอย่างละ 2 ครั้ง (independent repeats) เพื่อกัน bias ในระหว่างขั้นตอน โดยสำหรับตัวอย่างดินซีควนซ์ครั้งที่หนึ่งมาจากคลังข้อมูลที่สร้างจากตัวอย่างซ้ำที่หนึ่งถึงห้า และซีควนซ์ครั้งที่สองมาจากตัวอย่างซ้ำที่หกถึงสิบ สำหรับตัวอย่างปุ๋ยซีควนซ์ครั้งที่หนึ่งมาจากคลังข้อมูลที่สร้างจากการสกัดเมตาจีโนมิกส์ของทั้งสิบตัวอย่างซ้ำๆ ที่หนึ่ง และซีควนซ์ครั้งที่สองมาจากคลังข้อมูลที่สร้างจากการสกัดเมตาจีโนมิกส์ของทั้งสิบตัวอย่างซ้ำๆ ซ้ำที่สอง

7. วิเคราะห์ชีวสารสนเทศ

วิเคราะห์ผล จัดทำฐานข้อมูล และเปรียบเทียบข้อมูลในเชิงสัมพันธ์กับลักษณะของดิน และเชิง BIG DATA คือเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลอื่นๆ ที่มีอยู่

คัดกรองผลดิบและระบุ operational taxonomic unit (OTU) ตามมาตรฐานขั้นตอนของ Mothur (Schloss et al., 2009) ซึ่งรวมการวิเคราะห์ rarefaction curve, Good's coverage index, alpha

diversity (เช่น inverse simpson) และ beta diversity (เช่น morisita horn, NMDS) ซึ่งสัมพันธ์ สหสัมพันธ์ใน beta diversity ใช้เพื่อประเมินความเชื่อมโยงระหว่างโครงสร้างของกลุ่มสิ่งมีชีวิต OTU กลุ่ม เด่น และความสัมพันธ์กับลักษณะหรือคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างได้ โดยใช้สหสัมพันธ์ของ Spearman หรือ Pearson เข้ามาช่วยโดยใช้คำสั่งใน Mothur วิเคราะห์ศักยภาพทางเมตาบอลิซึมด้วย โปรแกรม PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States; <http://picrust.github.io/picrust/>) และคำนวณสถิติด้วย STAMP (<http://kiwi.cs.dal.ca/Software/STAMP>)

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 ดิน

คุณสมบัติทางกายภาพดิน





Site 4 surface



Site 4 bottom

รูปที่ 1 ภาพดินจากแต่ละตำแหน่งที่เก็บ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพของดิน

แปลงที่	อุณหภูมิ	pH	จุดที่เก็บ (6-10 ซ้ำต่อแปลง)	% ดิน			ลักษณะดิน
				Sand	silt	clay	
1	33	6.5	1	-	97.5	2.5	Silt
			2	23.5	67	9.4	Silt loam
			3	-	96.5	3.5	Silt
			4	22.2	83.3	5.5	Silt loam
			5	-	96.3	3.7	Silt
			6	-	98	2	Silt
			7	-	94.4	5.6	Silt
			8	-	96.6	3.4	Silt
			9	-	86.4	13.6	Silt
			10	-	95.5	4.5	Silt
2	28	5	1				
			2	-	7.7	92.3	clay
			3	-	1.3	98.7	clay
			4				
			5				
			6	-	-	100	clay
			7				
			8				
			9				
			10	-	-	100	clay
3	40	4.5	1	-	5	95	clay
			2	-	13.8	86.2	clay

			3	-	-	100	clay
			4	-	3.4	96.6	clay
			5	-	-	100	clay
			6	-	1.8	98.2	clay
			7	-	2.6	97.4	clay
			8	-	-	100	clay
			9	-	-	100	clay
			10	-	-	100	clay
4	28	6.5	1	85	-	15	Loamy sand
			2	79	-	21	Loamy sand
			3	80	-	20	Loamy sand
			4	90.8	-	9.2	Sand
			5	89.3	-	10.7	Sand
			6	92	-	8	Sand
			7	100	-	-	Sand
			8	88.9	-	11.1	Sand
			9	100	-	-	Sand
			10	92.5	-	7.5	Sand

รูปที่ 1 แสดงภาพของตัวอย่างดินที่ได้รับโดยพบว่า ดิน 1 ซึ่งมาจากแปลงเกษตรอินทรีย์ มีสีน้ำตาลเข้ม มีอนุภาคเป็นก้อนประปราย (ดินทรายแป้ง) ในทั้งดินจากผิวดินและดินบริเวณราก ขณะที่ดิน 4 ซึ่งมาจากแปลงเกษตรอุตสาหกรรม ดินมีสีน้ำตาลอ่อนและอนุภาคร่วนเป็นทรายและกระด้าง โดยเฉพาะที่ดินบริเวณราก สอดคล้องกับผลในตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของดินทั้ง 4 ตำแหน่งที่เก็บ ซึ่งค่าวิเคราะห์องค์ประกอบของดินอันได้แก่ องค์ประกอบร้อยละของอนุภาคทราย (sand) ดินทรายแป้ง (silt) และดินเหนียว (clay) พบว่าดิน 1 (10 ใน 10 จุดตัวอย่างที่เก็บซ้ำเป็น silt) มีความชุ่มชื้นสูงกว่าดิน 4 (10 ใน 10 จุดตัวอย่างที่เก็บซ้ำเป็น sand) ขณะที่ทั้งสองแปลงได้มีการปลูกพืชหมุนเวียนเช่นเดียวกัน ดิน 3 (รอยต่อ) และดิน 4 (นาเกลือ) มีลักษณะเป็นดินเหนียว ตรงตามลักษณะของดินชนิดนี้

จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตในดิน

ตารางที่ 2 ค่า most probable number ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ต่อกรัมของดิน

แปลงที่	ระดับความลึก	MOPN/g soil
1	Surface	2.4×10^6
	Bottom	0.93×10^6
2	Surface	2.4×10^6
	Bottom	0.93×10^6
3	Surface	0.93×10^4
	Bottom	0.43×10^4
4	Surface	2.4×10^6
	Bottom	2.4×10^5

ดินจากแต่ละแปลงนาและแต่ละระดับความลึกถูกนำมาเปรียบเทียบเบื้องต้นในเชิงปริมาณของแบคทีเรียที่มีชีวิตและเพาะเลี้ยงได้ต่อกรัมของดิน ด้วยวิธี most probable number (MOPN) ดังตารางที่ 2 ซึ่งดินจากนาเกลือพบความหนาแน่นของแบคทีเรียน้อยที่สุด ทั้งในระดับผิวดินและที่ระดับราก ซึ่งคาดว่าสัมพันธ์กับลักษณะของดินที่มีความเค็มสูง ขณะที่บริเวณรอยต่อหรือ ดิน 2 พบปริมาณแบคทีเรียเทียบเท่าดิน 1 อย่างไรก็ตาม ดิน 4 ที่มีการเกษตรอุตสาหกรรมพบปริมาณแบคทีเรียบริเวณราก (bottom) ลดลงประมาณ 10 เท่าจากที่พบในดิน 1 สอดคล้องกับลักษณะดินทรายในตารางที่ 1 และสนับสนุนว่าการปนเปื้อนสารเคมีมีผลต่อความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียตามที่เคยมีรายงานมาก่อน

เมตาจีโนมิกส์ของจุลินทรีย์ในดิน

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นของเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอต่อไมโครลิตรที่สกัดได้ และต่อกรัมของดิน ของแต่ละสถานที่ และระดับความลึก และมี 10 ซ้ำ

Site	ng/ μ l	Total DNA (ng) from 0.5 g soil metagenomic extraction	DNA ng/g soil
site 1			
s1.1	14	1400	2800
s1.2	22.4	2240	4480
s1.3	22.4	2240	4480
s1.4	22.4	2240	4480
s1.5	5.6	560	1120
s1.6	14	1400	2800
s1.7	20	2000	4000

s1.8	20	2000	4000
s1.9	5.6	560	1120
s1.10	10	1000	2000
b1.1	20	2000	4000
b1.2	3	300	600
b1.3	12	1200	2400
b1.4	22.4	2240	4480
b1.5	14	1400	2800
b1.6	12	1200	2400
b1.7	12	1200	2400
b1.8	2	200	400
b1.9	4	400	800
b1.10	16	1600	3200
Site 2			
s2.1	28	2800	5600
s2.2	20	2000	4000
s2.3	14	1400	2800
s2.4	12	1200	2400
s2.5	20	2000	4000
s2.6	20	2000	4000
s2.7	16	1600	3200
s2.8	12	1200	2400
s2.9	16	1600	3200
s2.10	22.4	2240	4480
b2.1	22.4	2240	4480
b2.2	22.4	2240	4480
b2.3	22.4	2240	4480
b2.4	22.4	2240	4480
b2.5	22.4	2240	4480
b2.6	16	1600	3200
b2.7	12	1200	2400
b2.8	10	1000	2000
b2.9	10	1000	2000
b2.10	11.2	1120	2240
Site 3*			
s3.1	8	800	1600
s3.2	0.45	45	90

s3.3	6	600	1200
s3.4	0.45	45	90
s3.5	0.45	45	90
s3.6	1	100	200
s3.7	9	900	1800
s3.8	0.45	45	90
s3.9	3	300	600
s3.10	2	200	400
b3.1	0.45	45	90
b3.2	0.45	45	90
b3.3	0.45	45	90
b3.4	0.45	45	90
b3.5	0.45	45	90
b3.6	0.45	45	90
b3.7	0.45	45	90
b3.8	0.45	45	90
b3.9	0.45	45	90
b3.10	0.45	45	90
Site 4			
S4.1	3.14	314	628
S4.2	8	800	1600
s4.3	20	2000	4000
s4.4	16	1600	3200
s4.5	12	1200	2400
s4.6	22.4	2240	4480
s4.7	10	1000	2000
s4.8	12	1200	2400
s4.9	3	300	600
s4.10	10	1000	2000
b4.1	1.4	140	280
b4.2	3	300	600
b4.3	1.4	140	280
b4.4	2	200	400
b4.5	2	200	400
b4.6	1.4	140	280
b4.7	8	800	1600
b4.8	10	1000	2000

b4.9	1.4	140	280
b4.10	2	200	400

*ผลของครั้งที่นำมาวิเคราะห์ B-RISA, F-RISA และสร้างห้องสมุดยีนสำหรับซีควนซ์

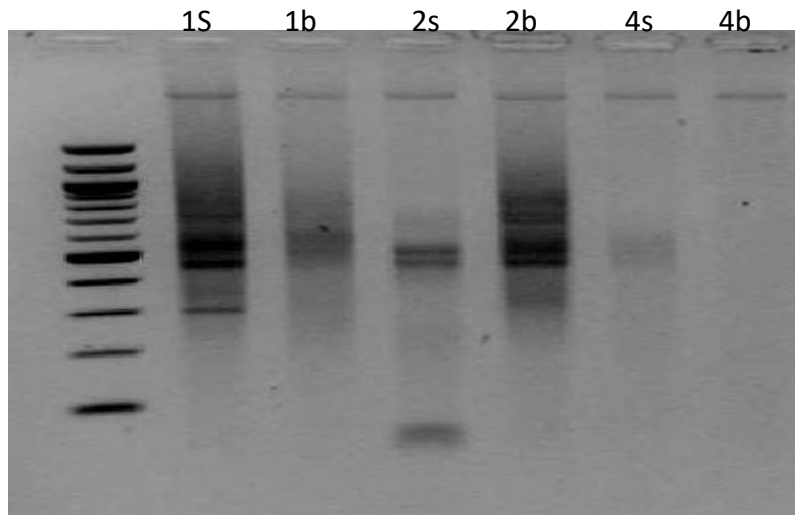
ตารางที่ 3 แสดงผลการสกัดเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ซึ่งพบว่าหลายตัวอย่างจากดิน 3 นาเกลือมีปัญหา สกัดดีเอ็นเอไม่ออกด้วยวิธีปกติตามคู่มือชุดสกัด และจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยการรันอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบไม่พบแถบดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับผลของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการวัดค่า การดูดกลืนแสงด้วย nanodrop spectrophotometer และการวัดค่าการดูดกลืนแสงพร้อมการติดสีของดีเอ็นเอสายคู่ด้วย qubit fluorometer ซึ่งให้ค่าในช่วง 0-0.7 ng/ul และยังคงมีเกลืออยู่เป็นปริมาณมากจึงทำให้ไม่สามารถใช้ในการทำ PCR เพื่อสร้างห้องสมุด (library) ของยีนในขั้นต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม จากการปรึกษา อาจารย์ที่มีประสบการณ์สกัดดีเอ็นเอจากดินเค็ม และจากการสืบค้นข้อมูลจากทางอินเทอร์เน็ต และผู้เชี่ยวชาญผลิตภัณฑ์ทางต่างประเทศ ทำให้ปรับวิธีการสกัดโดยลดปริมาณตั้งต้นและเพิ่มจำนวนครั้งของการ ล้างเพื่อทำความสะอาดเอาสิ่งปนเปื้อน (เกลือ) ออก ซึ่งผลที่ได้ยังมีค่าความเข้มข้นของเมตาจีโนมิกส์ที่ต่ำมาก จึงไม่เพียงพอต่อการทำ B-RISA และ F-RISA แต่เพียงพอในการทำห้องสมุดยีนสำหรับซีควนซ์ได้อย่างสำเร็จ

ค่าเฉลี่ยปริมาณเมตาจีโนมที่พบของดิน s1, b1, s2, b2, s3, b3, s4 และ b4 เท่ากับ 3128, 2348, 3608, 3424, 616, 90, 2330.8 และ 652 นาโนกรัมของเมตาจีโนมต่อกรัมของดิน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ดิน 1 และ 2 มีปริมาณดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน และมากกว่าดิน 4 ที่มีการใช้เกษตรอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณราก (b4) พบเมตาจีโนมน้อยมาก และพบเมตาจีโนมของจุลินทรีย์น้อยที่สุดในดิน 3 เนื่องจากเป็นนาเกลือ มีความเค็มสูง จึงไม่เหมาะแก่การอยู่อาศัยของจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตในหลายๆ ชนิด

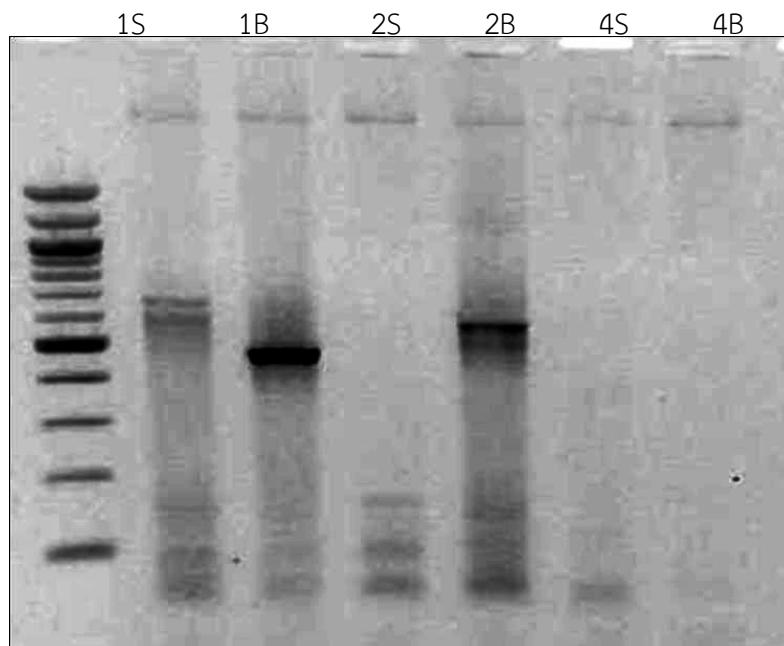
วิเคราะห์ความหลากหลายโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยเทคนิค B-RISA (แบคทีเรีย) และ F-RISA (รา)

ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์เบื้องต้นด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส ถึงความเป็นไปได้ของความหลากหลายของนิเวศ จุลชีพระหว่างผิวดินและดินบริเวณราก ดังผล B-RISA และ F-RISA ในรูปที่ 2 ที่แสดงภาพขององค์ประกอบ สังคมจุลินทรีย์ (ผลิตภัณฑ์ลำดับเบสที่แตกต่างกัน) อย่างชัดเจน เพื่อยืนยันความสำคัญของแนวทางการปรับ นิเวศจุลินทรีย์สำหรับดินบริเวณราก และการวิเคราะห์เชิงละเอียดด้วยการทำ next generation sequencing ในลำดับถัดไป ทั้งนี้ ดิน 4b พบไม่แสดงจุลินทรีย์แบคทีเรีย (ภาพบน) และรา (ภาพล่าง) และความ หลากหลายของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปนเปื้อนสารเคมีจึงทำให้จุลินทรีย์มีน้อยและความ หลากหลายมีน้อย และเป็นไปได้ที่ค่าเมตาจีโนมในตารางที่ 3 ของดิน b4 อาจไม่ใช่ของจุลินทรีย์แต่มาจากเศษ ซากของสิ่งมีชีวิตที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอจึงทำให้ถูกสกัดด้วยชุดสกัดเมตาจีโนมออกมาได้ แต่ทำการวิเคราะห์โดยใช้ ไพโรมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรียและกับราใน B-RISA และ F-RISA ไม่ขึ้น ซึ่งข้อมูลนี้จะสามารถทราบภายหลัง การซีควนซ์

B-RISA



F-RISA



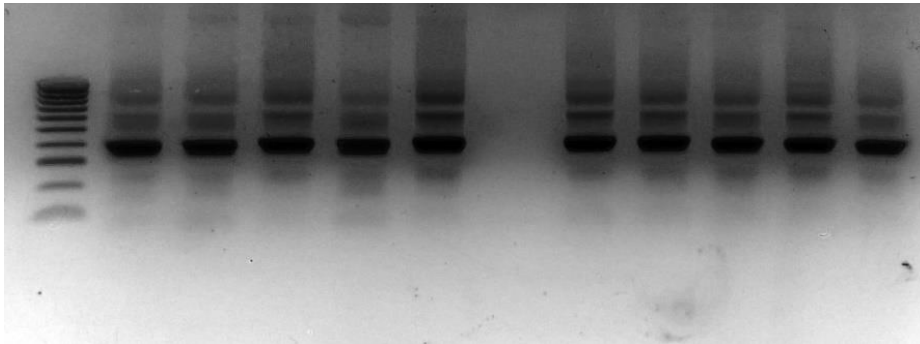
รูปที่ 2 ภาพ B-RISA และ F-RISA เพื่อเปรียบเทียบนิเวศจุลชีพระหว่างผิวดินและดินบริเวณราก

วิเคราะห์ความหลากหลายแบคทีเรียโดยซีควนซ์คลังห้องสมุดยีน 16S rRNA

คลังห้องสมุดยีน 16S rRNA ที่ติดบาร์โค้ดและตัวเชื่อมสำหรับซีควนซ์กับเครื่อง MiSeq ได้ถูกสร้างดังรูปที่ 3 แสดงตัวอย่างของการวิเคราะห์ขนาดเพื่อทำการคัดแยกเฉพาะแบนด์เอ็นเอของขนาดผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องกับไพรเมอร์ที่ใช้ และวิเคราะห์ความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบกับ DNA Ladder จากนั้นทำความสะอาดเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องและ ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นจากการวัดด้วย qubit fluorometer ของห้องสมุดยีน 16S rRNA ของแต่ละตัวอย่างซึ่งให้ผลเพียงพอ (อย่างน้อย 200 ng) ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อซีควนซ์

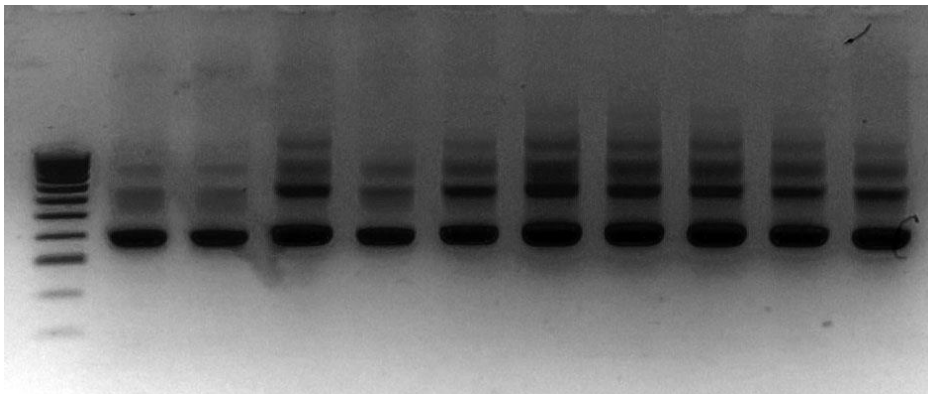
Surface

100bp s1.1 s1.2 s1.3 s1.4 s1.5 s1.6 s1.7 s1.8 s1.9 s1.10



Bottom

100bp b1.1 b1.2 b1.3 b1.4 b1.5 b1.6 b1.7 b1.8 b1.9 b1.10



รูปที่ 3 ตัวแทนภาพของคลังห้องสมุดยีน 16S rRNA ที่เตรียม (ในภาพเป็นของ ดิน 1)

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของคลังห้องสมุดยีน 16S rRNA ที่เตรียมได้และปริมาตร (ul) ที่ใช้ในการทำซีควนซ์

16S rRNA	ng/ μ l	Total DNA (ng)	200 ng = x μ l
S1_1_16s	19.8	2455.2	10.10
S1_2_16s	19.1	2368.4	10.47
B1_1_16s	18.1	2244.4	11.05
B1_2_16s	28	3472	7.14
S2_1_16s	17.4	2157.6	11.49
S2_2_16s	24.2	3000.8	8.26
B2_1_16s	22.6	2802.4	8.85
B2_2_16s	24.8	3075.2	8.06
S3_1_16s	55.8	2176.2	3.58

S3_2_16s	43	1677	4.65
B3_1_16s	49	1911	4.08
B3_2_16s	64.8	2527.2	3.09
S4_1_16s	22.4	761.6	8.93
S4_2_16s	24.6	836.4	8.13
B4_1_16s	37.4	1271.6	5.35
B4_2_16s	31	1054	6.45

ตารางที่ 5 จำนวนซีควีนของห้องสมุดยีน 16S rRNA หลังทำการ pre-process

ตัวอย่าง	จำนวนซีควีนหลังทำการ pre-process
soilb1_1	148,191
soilb1_2	120,801
soilb2_1	125,302
soilb2_2	131,059
soilb3_1	206,599
soilb3_2	181,342
soilb4_1	132,312
soilb4_2	399,188
soils1_1	222,534
soils1_2	136,121
soils2_1	125,207
soils2_2	147,917
soils3_1	59,901
soils3_2	63,699
soils4_1	77,619
soils4_2	146,255

ผลการซีควีนซึ่งห้องสมุดยีน 16S rRNA และทำการ pre-process ตาม standard operating procedures (SOP) ของ Mothur อาทิ รวม reads R1 และ R2 และตัดทิ้งซีควีนที่ไม่ผ่านเกณฑ์เช่น ความยาวหลังรวม R1 และ R2 สั้นกว่า 100 ลำดับเบส และเป็นซีควีนที่มี N เยอะ เป็นต้น ได้ซีควีนมีความยาวเฉลี่ยหลังตัดลำดับเบสของตัวเชื่อม บาร์โค้ดและไพรเมอร์ เท่ากับ 253 ลำดับเบส และจำนวนทั้งสิ้น 2,424,047 reads รายละเอียดของจำนวนผลดังตารางที่ 5 จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Greengenes เพื่อระบุ operational taxonomic units (OTUs) จนถึงระดับจิ้นส์และสปีชีส์ (หากสามารถระบุได้) ซึ่งจำนวนซีควีนที่ได้ในงานวิจัยนี้นับว่าเพียงพอต่อการวิเคราะห์ เนื่องจากค่าดัชนี Good's coverage ที่ระดับจิ้นส์ แสดงให้เห็นว่าผลของจำนวนซีควีนในแต่ละตัวอย่างมีความครอบคลุมประชากรแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในธรรมชาติถึงมากกว่าร้อยละ 99 (ตารางที่ 6) ทั้งนี้ดิน 3 ที่ผิวหน้า (soils3) พบจำนวน OTUs ต่ำกว่าบริเวณอื่น และค่าดัชนีของความหลากหลายของ OTUs ที่ระดับจิ้นส์ภายในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งวิเคราะห์จากค่า

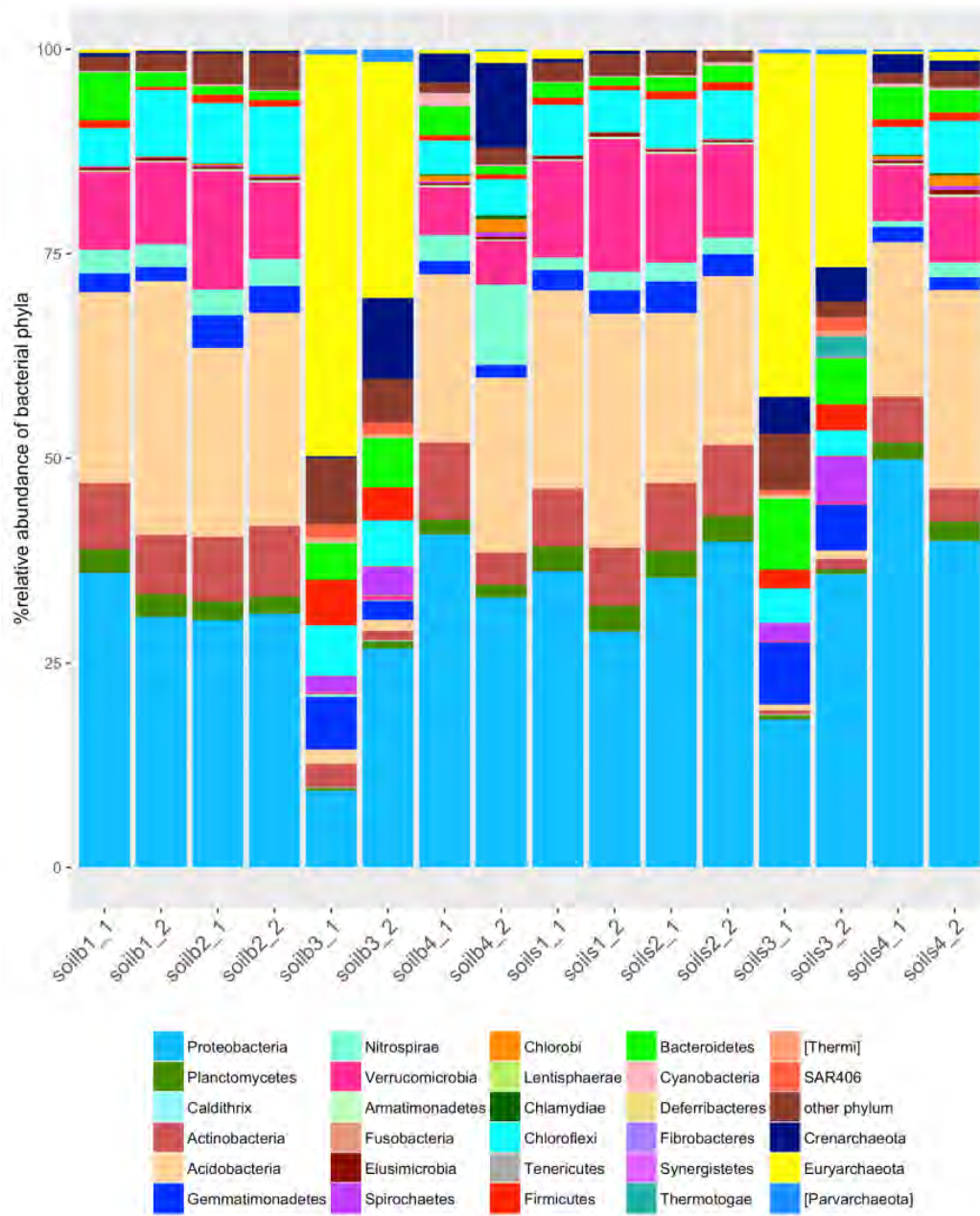
Shannon และ Chao พบว่าดินนาเกลือทั้งบริเวณ b3 และ s3 (และทั้งสองครั้งของคลังห้องสมุดซ้ำ) มีค่าต่ำกว่าในดินบริเวณอื่น สอดคล้องกับจำนวน OTUs (ตารางที่ 5) และผลของลักษณะทางกายภาพของดินในบริเวณนี้ที่มีความเค็มและเป็นกรดสูง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 6 จำนวน OTUs ค่าดัชนีความครอบคลุม และค่าดัชนีความหลากหลาย ของแต่ละคลังห้องสมุด ที่ระดับจีโนม

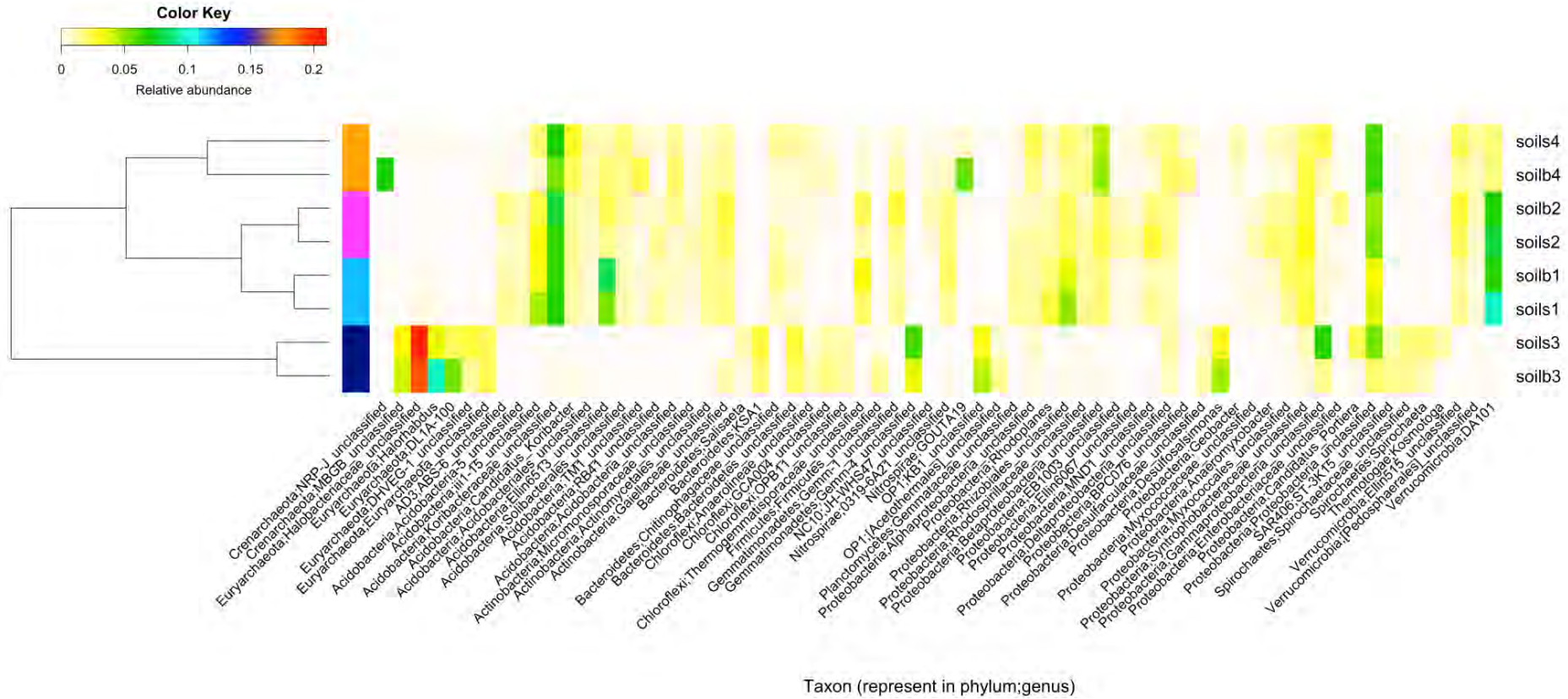
Source	OTUs	Good's coverage	Shannon	Chao
soilb1_1	793.151	99.6858	4.221068	996.0098
soilb1_2	651.718	99.7044	3.605139	841.1462
soilb2_1	644.163	99.6949	3.595704	858.7928
soilb2_2	644.203	99.705	3.666069	824.253
soilb3_1	631.453	99.6809	3.295197	840.2062
soilb3_2	620.277	99.6867	3.599921	831.6179
soilb4_1	770.547	99.6783	3.838661	971.044
soilb4_2	688.165	99.6835	3.594114	888.2162
soils1_1	680.084	99.6867	3.947486	900.0266
soils1_2	574.45	99.7475	3.627638	740.0089
soils2_1	636.195	99.7409	3.751962	800.2559
soils2_2	650.248	99.7228	3.994998	828.8404
soils3_1	534	99.7145	3.278336	750.9403
soils3_2	500.436	99.7357	3.136635	675.5857
soils4_1	812.337	99.6596	3.996522	1019.832
soils4_2	766.897	99.7004	3.954914	939.7802

รูปที่ 4 และ 5 แสดงสัดส่วนของสังคัมแบคทีเรียในระดับไฟลัมและจีโนม ตามลำดับ และเนื่องด้วยผลของคลังห้องสมุดซ้ำอิสระมีความใกล้เคียงกันจากการคำนวณทางสถิติ (*p-value*) จึงทำการรวมผลของคลังห้องสมุดซ้ำเข้าด้วยกันดังรูปที่ 6 และจากการเปรียบเทียบความหลากหลายของแบคทีเรียระหว่างกลุ่มที่มีทั้งหมด แบคทีเรียจากไฟลัม Proteobacteria มีจำนวนมากที่สุด (เฉลี่ยร้อยละ 31.43) ตามมาด้วย Acidobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria และ Chloroflexi ส่วนสิ่งมีชีวิตประเภทอาร์เคียที่พบได้แก่ Crenarchaeota, Euryarchaeota และ Parvarchaeota ในแต่ละสถานที่พบไมโครโมไอโอมของระดับผิวดินและระดับรากแสดงโครงสร้างของกลุ่มสิ่งมีชีวิตค่อนข้างใกล้เคียงกัน (Yue & Clayton theta similarity coefficient, $p=0.780$; Jaccard similarity coefficient, $p=0.824$) ขณะที่ดินจากแปลงเกษตรที่แตกต่างกันแสดงโครงสร้างที่แตกต่างกันโดยสิ้นเชิง โดยสังคัมแบคทีเรียในดิน 1 และ 4 ควรจะใกล้เคียงกันด้วยลักษณะการปลูกพืช ยกเว้นวิธีการเกษตรเปรียบเทียบระหว่างเกษตรอินทรีย์และเกษตรอุตสาหกรรม และแปลงที่ 2 ซึ่งตั้งอยู่ใกล้กับแปลงที่ 3 ซึ่งเป็นนาเกลือและมีลักษณะดินที่คล้ายกันควรจะใกล้เคียงกัน ผลการวิจัยกลับพบสังคัมแบคทีเรียในดิน 1 และ 2 มีความสัมพันธ์กันมากที่สุด ซึ่งชี้แนะว่าปัจจัยจากการทำเกษตรอินทรีย์และ

เกษตรอุตสาหกรรมมีผลต่อนิเวศแบคทีเรียในดิน ตัวอย่างแบคทีเรียที่พบมากในดิน 1 มีหลากหลายชนิดในไฟลัมเช่น Acidobacteria (เช่น iii1-15 และ Ellin6513), Thermogemmatissporaceae (ไฟลัม Chloroflexi), Gemm-1 ในไฟลัม Gemmatimonadetes, 0319-6A21 ในไฟลัม Nitrospirae, Rhodoplanes และสิ่งมีชีวิตไม่ทราบจีโนมในอันดับ Rhizobiales (ไฟลัม Proteobacteria), สิ่งมีชีวิตไม่ทราบชนิดในอันดับ Myxococcales (ไฟลัม Proteobacteria), และ DA101 ในชั้น Spartobacteria (ไฟลัม Verrucomicrobia) (รูปที่ 6) จากผลวิเคราะห์พบดิน 4 มีสังคัมแบคทีเรียที่แตกต่างออกไป เน้นให้เห็นว่าปัจจัยของเกษตรอุตสาหกรรมมีต่อสังคัมจุลินทรีย์อย่างชัดเจนและในลักษณะต่อนิเวศแบคทีเรียที่แตกต่างจากการเกษตรอินทรีย์ โดยในแปลงที่ 4 มีการใส่สารเคมี เช่น ปุ๋ยเคมีสังเคราะห์ ยาฆ่าแมลง และยาฆ่าหญ้ามากกว่าแปลงที่ 2 ซึ่งใช้แค่ปุ๋ยเคมีสังเคราะห์เท่านั้น ในทางกลับกัน ความเป็นเอกลักษณ์ของดิน 3 เติบโตด้วยโครงสร้างเฉพาะของดินที่เหมาะสมเป็นนาเกลือ โครงสร้างสังคัมแบคทีเรียก็แตกต่างไปด้วยและมีตระกูลอาร์เคียถูกพบได้บ่อย เช่น วงศ์ Halobacteriaceae และ Halorhabdus ในไฟลัม Euryarchaeota และตระกูลแบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes, Firmicutes และ Spirochaetes และดินจากแปลงที่ 3 นี้แทบจะไม่แสดงการมีอยู่ของ Acidobacteria, Actinobacteria, Nitrospirae, Proteobacteria (เหล่านี้เป็นไฟลัมที่พบได้บ่อยในดิน 1, 2 และน้อยกว่าในดิน 4) และ Verrucomicrobia (รูปที่ 6)



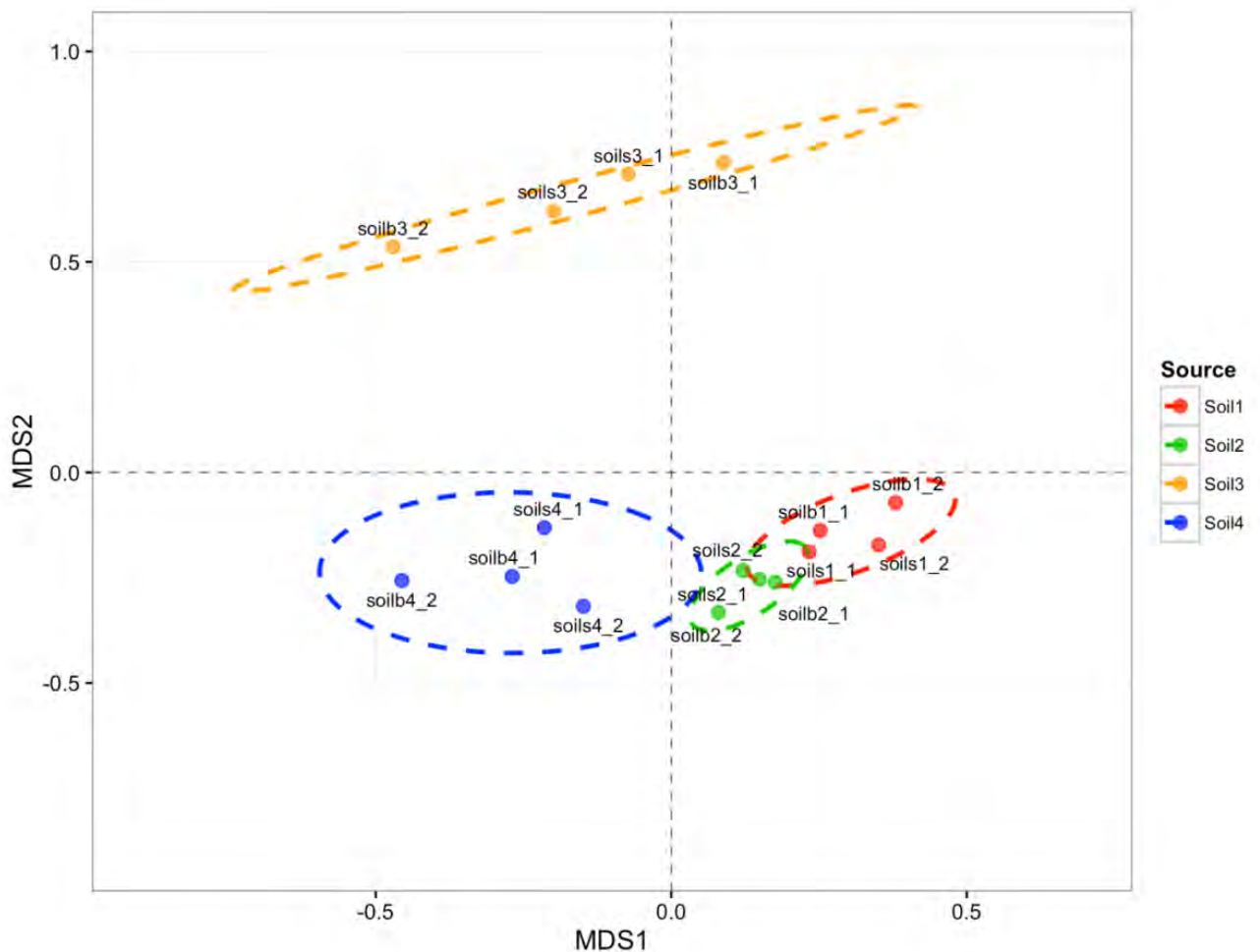
รูปที่ 4 ร้อยละสัดส่วนของสังคมแบคทีเรียในระดับฟิลา



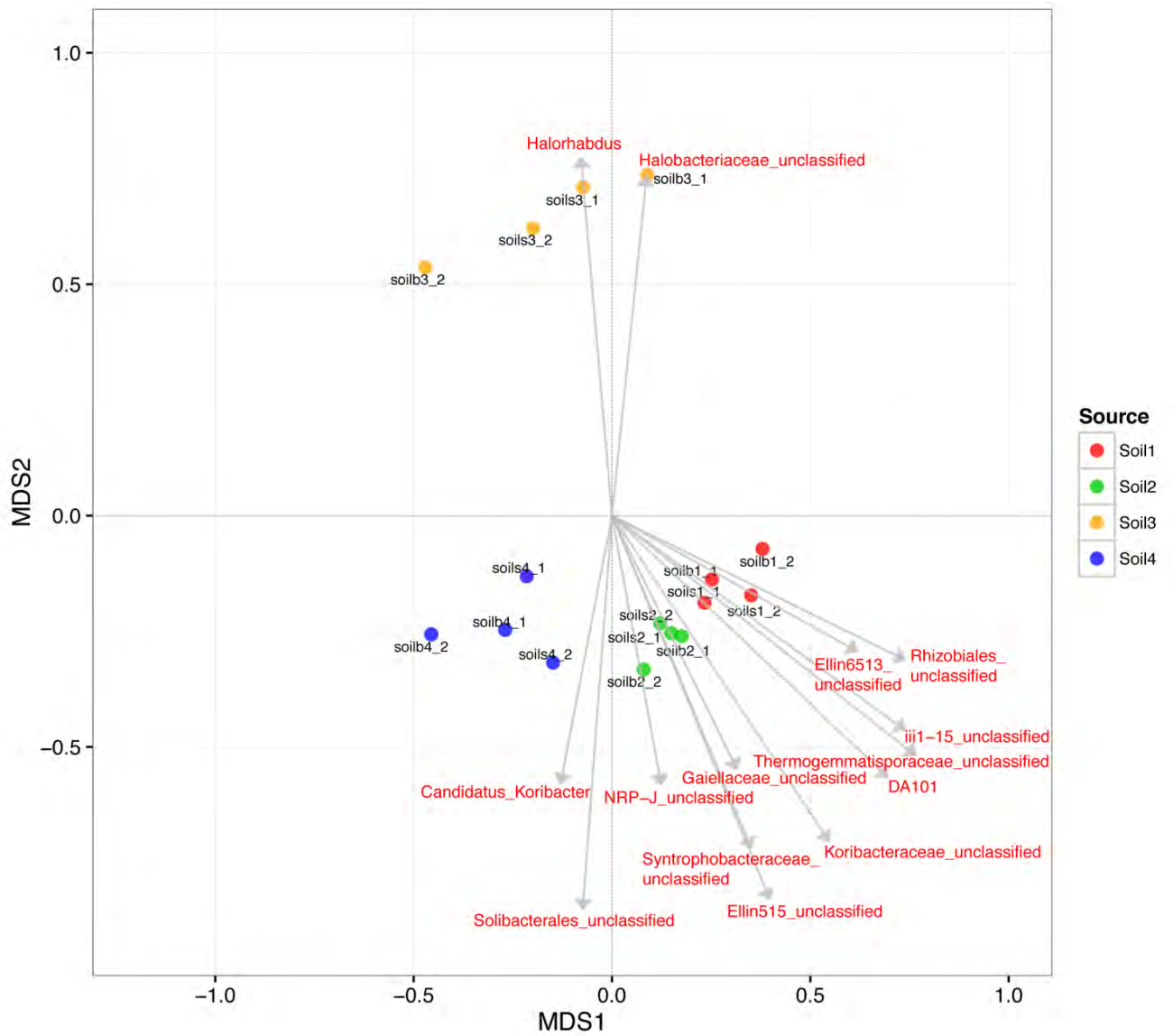
รูปที่ 6 องค์ประกอบสัดส่วนของจีโนมโปรคาริโอต พร้อมแผนภูมิต้นไม้ด้านซ้ายจากของแต่ละกลุ่ม มีการแสดงสัดส่วนสัมพันธ์ด้านความถี่ของแต่ละจีโนมที่พบบนแท่งสี่บนมุมซ้าย ด้านบนแต่ด้วยพื้นที่จำกัด จึงไม่ได้แสดงจีโนมที่มีสัดส่วนน้อยกว่าร้อยละ 1

โครงสร้างแบบคทีเรียในแต่ละลักษณะดิน ถูกนำไปสร้างเป็นสเกลแบบ non-metric multidimensional scale (NMDS) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกษตรอุตสาหกรรมอาจส่งผลกระทบต่อลักษณะไมโครไบโอมของแบคทีเรียในดินในทิศทางใด ทำให้ไมโครไบโอมของดิน 4 แตกต่างจากดินในพื้นที่และการเพาะปลูกที่คล้ายกัน (ดิน 1) ดังรูปที่ 7ก และรูปที่ 7ข แสดงถึง bacterial flora (เช่น Ellin6513, Rhizobiales, iii1-15 และ DA101) ซึ่งสถิติชี้ให้เห็นว่าเป็นตัวขับเคลื่อนลักษณะดินเกษตรอินทรีย์ในดิน 1 ซึ่งแตกต่างจากดิน 4 เมื่อความยาวของเวกเตอร์แสดงถึงความสัมพันธ์ที่มั่นคง ส่วนทิศทางของเวกเตอร์บ่งชี้ทิศทางของผลกระทบที่เกิดขึ้น สำหรับไมโครไบโอมโพรคาริโอตในนาเกลือ นั้น ไซวงศ์ Halobacteriaceae (รวมถึงจีโนม Halorhabdus) ในไฟลัม Euryarchaeota เป็นตัวแทน ผลลัพธ์ของไมโครไบโอมเหล่านี้ทำให้สามารถคาดคะเนสายใยอาหารของจุลินทรีย์และวิเคราะห์เส้นทางสายใยอาหารที่สำคัญกับจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง (ไม่มีข้อมูลแสดง) เมื่อเป็นเช่นนี้ เป็นการเปิดพื้นที่สำหรับการปรับไมโครไบโอมหลักของเกษตรอุตสาหกรรม เพื่อเปลี่ยนดินให้กลับไปสู่การเป็นแหล่งจุลินทรีย์ในดินที่เคยเป็นดินสำหรับเกษตรอินทรีย์มาก่อน นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ในลักษณะเดียวกันถึงความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของดินในตารางที่ 1 และได้ผลสอดคล้องดังรูปที่ 8

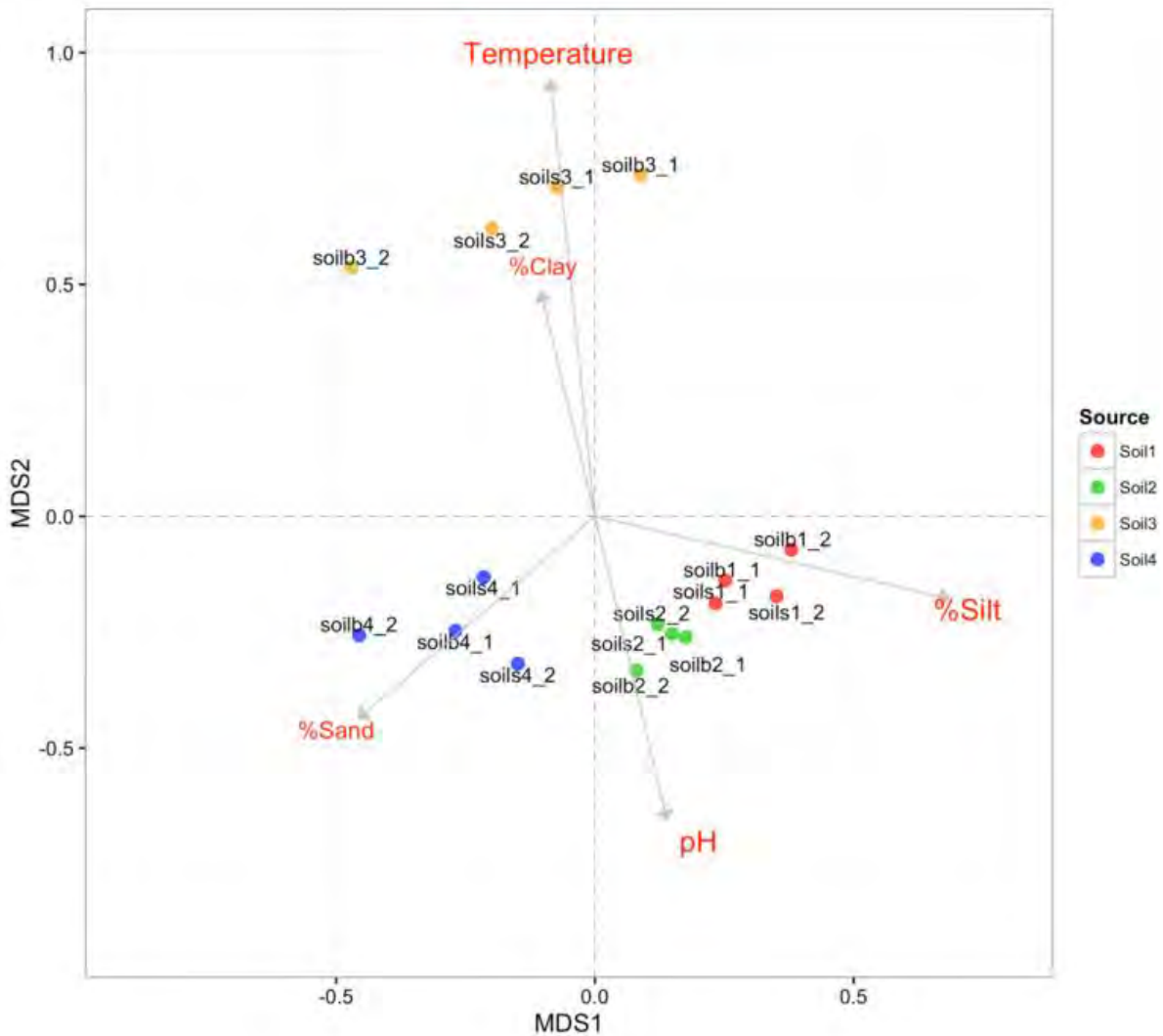
ก.



ข.



รูปที่ 7 NMDS แสดงความสัมพันธ์ของสังคมแบคทีเรียในดินแปลงต่างๆ และใน (ข) แสดงจีโนมตัวแทนคำนวณโดยสหสัมพันธ์ของ Spearman

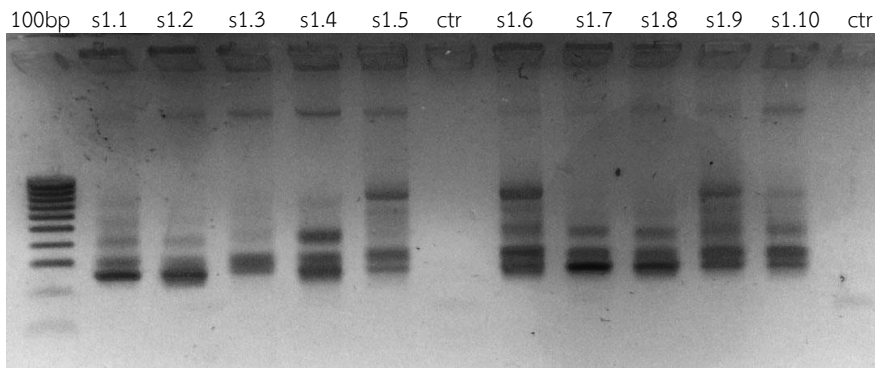


รูปที่ 8 NMDS ร่วมกับสหสัมพันธ์ของ Spearman เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของคุณลักษณะทางกายภาพแทนสังคัมแบคทีเรียในดินแปลงต่างๆ

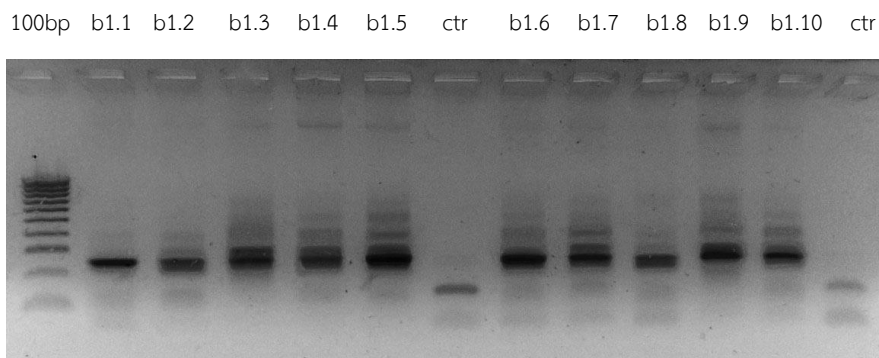
วิเคราะห์ความหลากหลายและยูคาริโอตขนาดไมครอนโดยซีควนซ์คลังห้องสมุดยีน 18S rRNA

คลังห้องสมุดยีน 18S rRNA ที่ติดบาร์โค้ดและตัวเชื่อมสำหรับซีควนซ์กับเครื่อง MiSeq ได้ถูกสร้างดังรูปที่ 9 แสดงตัวอย่างของการวิเคราะห์ขนาดเพื่อทำการคัดแยกเฉพาะแบนดีเอ็นเอของขนาดผลิตภัณฑ์ที่ถูกตัดกับไพรเมอร์ที่ใช้ และวิเคราะห์ความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบกับ DNA Ladder จากนั้นทำความสะอาดเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ถูกตัดและ ตารางที่ 7 แสดงความเข้มข้นจากการวัดด้วย qubit fluorometer ของห้องสมุดยีน 18S rRNA ของแต่ละตัวอย่างซึ่งให้ผลเพียงพอ (อย่างน้อย 240 ng) ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อซีควนซ์

Surface



Bottom



รูปที่ 9 ตัวแทนภาพของคลังห้องสมุดยีน 18S rRNA ที่เตรียม (ในภาพเป็นของ ดิน 1)

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของคลังห้องสมุดยีน 18S rRNA ที่เตรียมได้และปริมาตร (ul) ที่ใช้ในการทำซีควนซ์

18S rRNA	ng/ μ l*	Total DNA (ng)*	240 ng = x μ l
S1_1_18s	2.16	240	111.32
S1_2_18s	2.96	240	81.17
B1_1_18s	4.09	240	58.64
B1_2_18s	5.12	240	46.83
S2_1_18s	4.36	240	55.03
S2_2_18s	3.49	240	68.86
B2_1_18s	4.59	240	52.29
B2_2_18s	6.53	240	36.76
S3_1_18s	6.56	240	36.56
S3_2_18s	6.12	240	39.21
B3_1_18s	5.05	240	47.54
B3_2_18s	8.42	240	28.49

S4_1_18s	3.08	240	78.02
S4_2_18s	2.70	240	88.84
B4_1_18s	3.42	240	70.10
B4_2_18s	3.30	240	72.68

* ความเข้มข้นหน่วย ng/ μ l ของห้องสมุดยีน 18S rRNA มีค่าน้อยกว่าของห้องสมุดยีน 16S rRNA เนื่องจากใช้ ปริมาตรของบัฟเฟอร์สุดท้ายในขั้นทำความสะอาดเจลผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก

ผลการซีควีนซึ่งห้องสมุดยีน 18S rRNA และทำการ pre-process ตาม standard operating procedures (SOP) ของ Mothur เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวใน 16S rRNA ได้จำนวนซีควีนทั้งสิ้น 1,666,455 reads รายละเอียดของจำนวนผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนซีควีนของห้องสมุดยีน 18S rRNA หลังทำการ pre-process

ตัวอย่าง	จำนวนซีควีนหลังทำการ pre-process
soilb1_1	183682
soilb1_2	155929
soilb2_1	156293
soilb2_2	159838
soilb3_1	11708
soilb3_2	4008
soilb4_1	222331
soilb4_2	68856
soils1_1	169483
soils1_2	133583
soils2_1	112741
soils2_2	64748
soils3_1	5949
soils3_2	10000
soils4_1	135293
soils4_2	72013

จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล SILVA เพื่อระบุ OTUs จนถึงระดับจีนัสและสปีชีส์ (หากสามารถระบุได้) และนำผล OTUs ที่ได้ไปคำนวณค่าดัชนี Good's coverage พบว่าจำนวนซีควีนที่ได้ในงานวิจัยนี้นับว่าเพียงพอต่อการวิเคราะห์ เนื่องจากค่าดัชนี Good's coverage ที่ระดับจีนัส แสดงให้เห็นว่าผลของจำนวนซีควีนในแต่ละตัวอย่างมีความครอบคลุมประชากรยูคาริโอตในระดับจีนัสที่มีอยู่จริงในธรรมชาติถึงร้อยละ 81.66-92.17 (ตารางที่ 9) สอดคล้องกับจำนวนอ่านที่ได้ต่อตัวอย่างในปริมาณมาก (ตารางที่ 8)

สำหรับค่าดัชนีของความหลากหลายของ OTUs ที่ระดับจีโนมของภายในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งวิเคราะห์จากค่า Shannon และ Chao ทั้งในดินระดับราก พบดิน 3 (soilb3_1) มีค่าดัชนีความหลากหลายต่ำที่สุด และในผิวดิน พบดิน 3 (soils3_1) มีค่าดัชนีความหลากหลายต่ำที่สุด (ตารางที่ 9) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับความหลากหลายของประชากรโปรคาริโอตที่ต่ำในดินบริเวณนี้ และลักษณะทางกายภาพของดินในบริเวณนี้ที่มีความเค็มและเป็นกรดสูง (ตารางที่ 1) ดังนั้นพบความหลากหลายของจุลินทรีย์แบคทีเรียและราเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

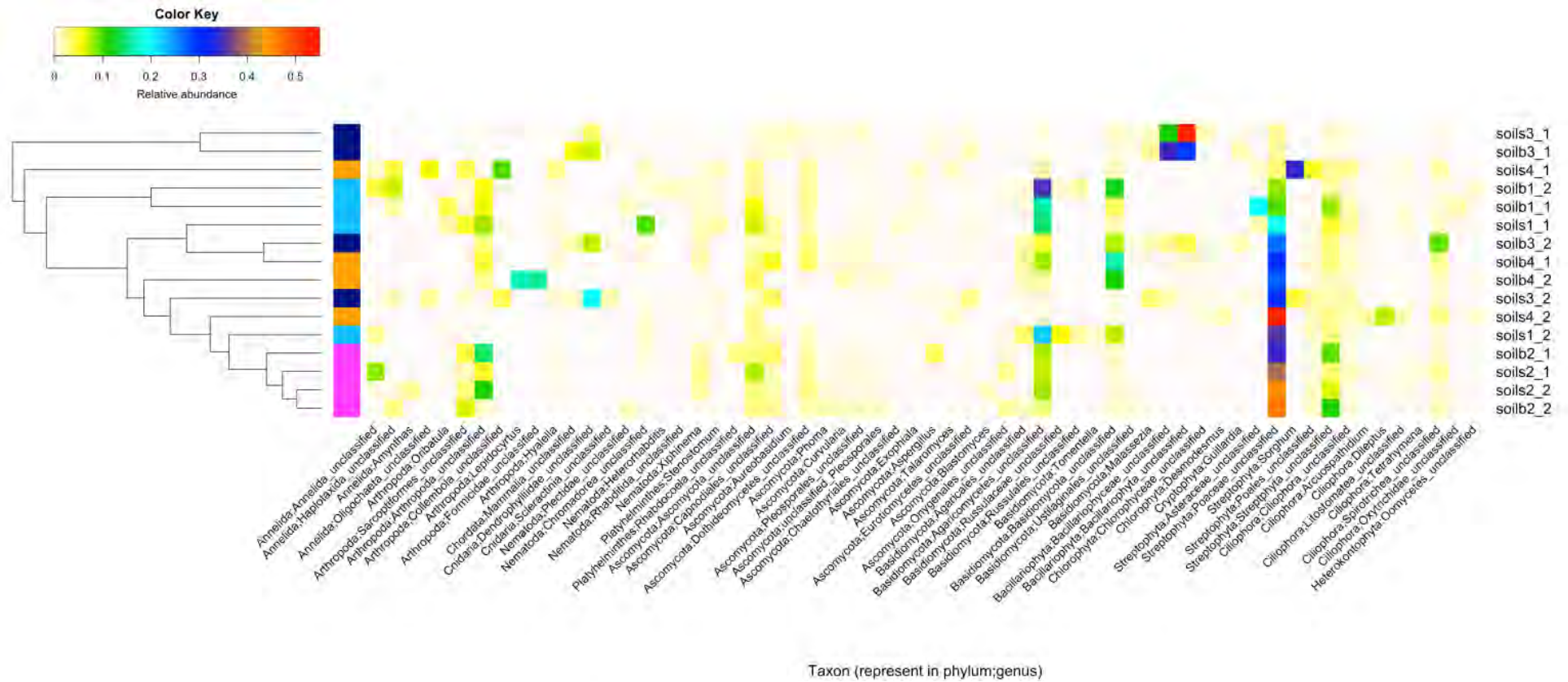
ตารางที่ 9 จำนวน OTUs ค่าดัชนีความครอบคลุม และค่าดัชนีความหลากหลาย ของแต่ละตัวอย่าง ที่ระดับจีโนม

Source	OTUs	Good's coverage	Shannon	Chao
soilb1_1	1004	81.9112	5.038319	3326.566
soilb1_2	784	85.8782	4.657594	2733.939
soilb2_1	779	87.0509	4.846067	2224.387
soilb2_2	928	83.7824	5.342928	3058.556
soilb3_1	490	92.1657	3.737053	1352.123
soilb3_2	802	86.8014	4.897436	1975.58
soilb4_1	768	85.9531	4.241721	2697.305
soilb4_2	710	87.3253	4.257041	2427.04
soils1_1	1085	81.6617	5.474434	3025.612
soils1_2	800	85.7285	4.660484	2483.567
soils2_1	1110	82.0858	5.805209	2922.697
soils2_2	998	81.6866	5.220211	3560.01
soils3_1	553	91.2924	4.112016	1321.684
soils3_2	613	89.6457	4.36928	1589.193
soils4_1	696	88.0489	4.192274	2042.835
soils4_2	1091	81.6617	5.638027	3104.022

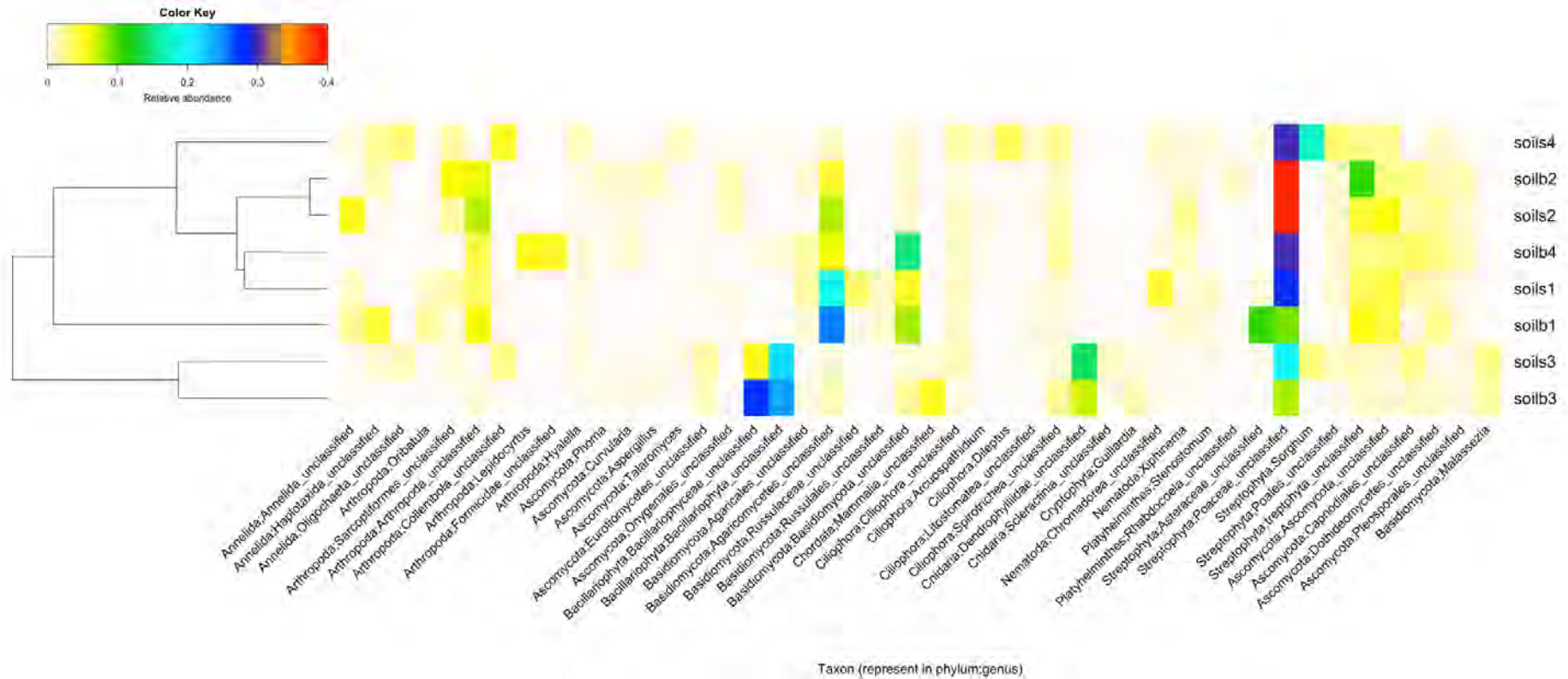
รูปที่ 10 และ 11 แสดงสัดส่วนของสังคมแบคทีเรียในระดับไฟลัมและจีโนม ตามลำดับ และรูปที่ 12 แสดงองค์ประกอบรายละเอียดจีโนมของจุลินทรีย์ยูคาริโอตของแต่ละแปลงโดยแต่ละแปลงดินเป็นการรวมผลจากคลังข้อมูลซ้ำอิสระ



รูปที่ 10 ร้อยละสัดส่วนของสังคมราและเศษซากสิ่งมีชีวิตในระดับฟอสล์



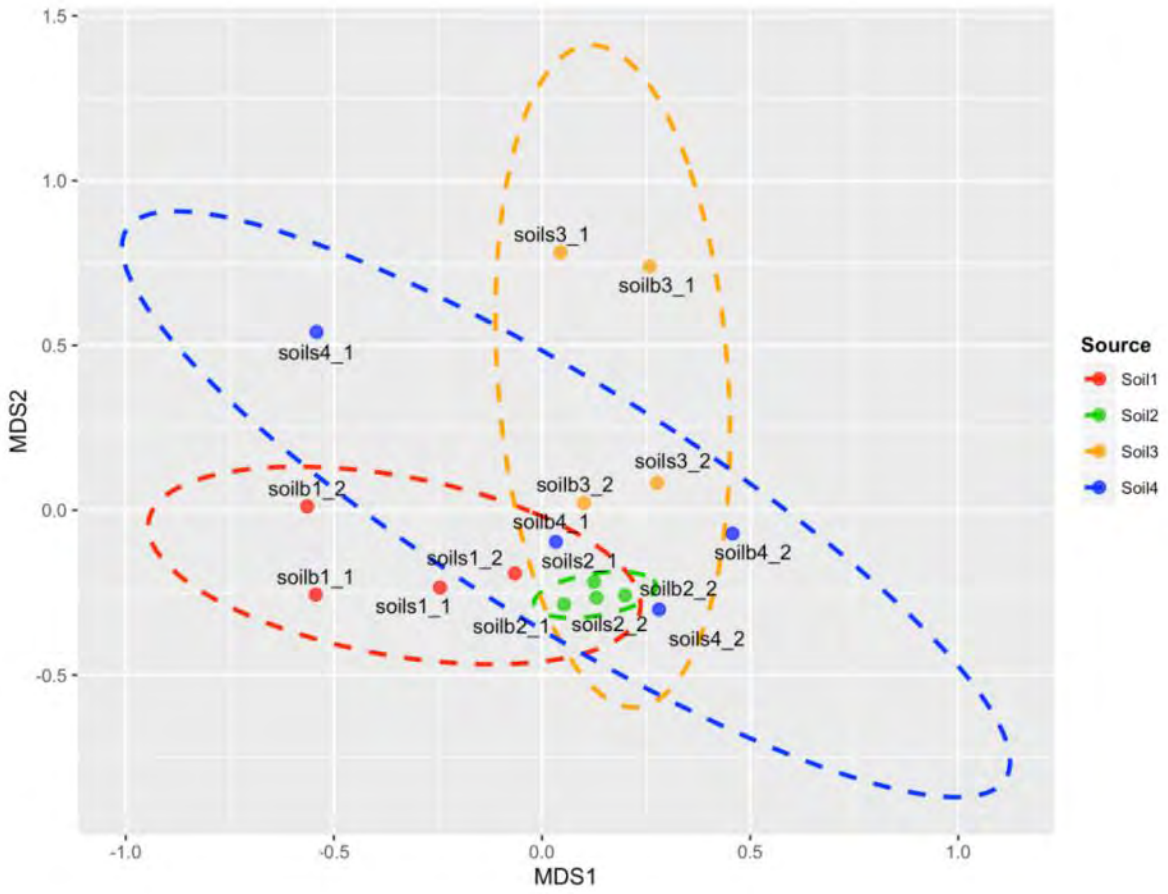
รูปที่ 11 ร้อยละสัดส่วนของสังคมราและเศษซากสิ่งมีชีวิตในระดับจลินส์



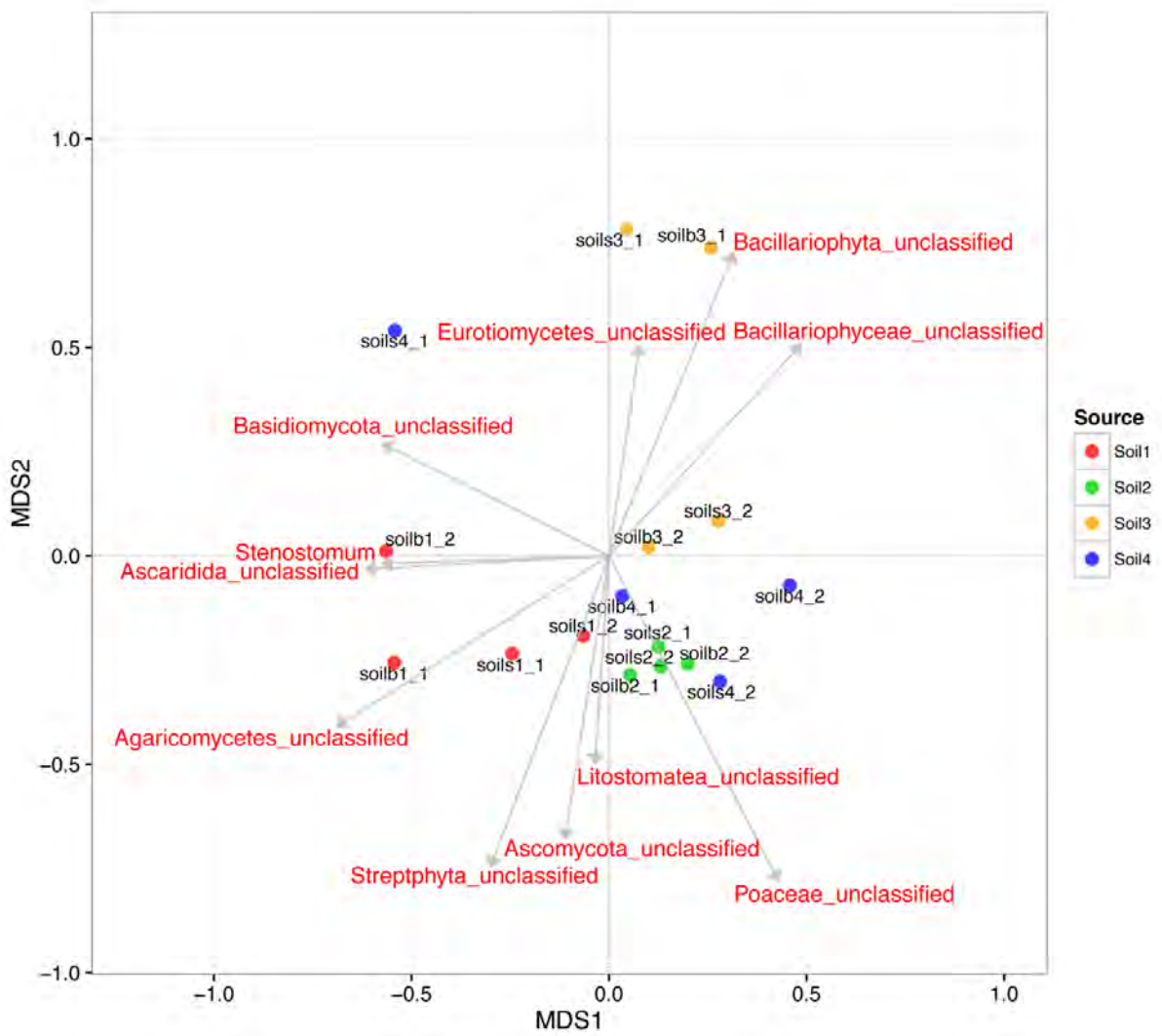
รูปที่ 12 องค์ประกอบสัดส่วนของสังคมจุลินทรีย์ในดิน พร้อมแผนภูมิต้นไม้ด้านซ้ายจากของแต่ละกลุ่ม มีการแสดงสัดส่วนสัมพันธ์ด้านความถี่ของแต่ละชนิดที่พบบนแท่งสีบนมุมซ้ายด้านบน แต่ด้วยพื้นที่จำกัดจึงไม่ได้แสดงชนิดที่มีสัดส่วนน้อยกว่าร้อยละ 1

โครงสร้างสังคมในแต่ละลักษณะดินถูกนำไปสร้างเป็นสเกลแบบ non-metric multidimensional scale (NMDS) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกษตรอุตสาหกรรมอาจส่งผลกระทบต่อลักษณะไมโครไบโอมของยูคาริโอตในดินในทิศทางใด พบว่าคลังข้อมูลซ้ำอิสระให้ผลใกล้เคียงกัน สนับสนุนความน่าเชื่อถือของวิธีการและเทคนิคการทำในงานวิจัยนี้ และที่สำคัญพบตรรกะความแตกต่างของ Jaccard (jclass) และ Yue & Clayton theta (thetaYC) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างดินในแปลง 1 มีต่อแปลง 2 มากกว่าแปลง 4 (jclass: ดิน b1 and ดิน b2 = 0.510, ดิน s1 and ดิน s2 = 0.503, ดิน b1 and ดิน b4 = 0.552, ดิน s1 and ดิน s4 = 0.548; thetaYC: ดิน b1 and ดิน b2 = 0.735, ดิน s1 and ดิน s2 = 0.218, ดิน b1 and ดิน b4 = 0.639, ดิน s1 and ดิน s4 = 0.448) ซึ่งสอดคล้องกันกับแปลงโครงสร้างสังคมใน NMDS ในรูปที่ 13 จะสังเกตว่าตรรกะความแตกต่างมีระยะตั้งแต่ 0.000 ถึง 1 และถ้าใกล้เคียงกับ 0.000 หมายถึงโครงสร้างสิ่งมีชีวิตมีความคล้ายคลึงกัน นั่นทำให้อนุมานให้เห็นความคล้ายคลึงของสิ่งมีชีวิตที่ใกล้ชิดมากกว่า เป็นไปได้ว่า ลักษณะของสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย จึงมีความต้านทานสารเคมีที่ใส่เข้าไปในดินแปลงที่ 4 ลักษณะเช่นนี้แสดงให้เห็นว่าไมโครไบโอมมีความซับซ้อน จุลินทรีย์ที่มีมากในแปลงที่ 1 ได้แก่ animal Ascaridida (ไฟลัม Nematoda) และรา Agaricomycetes (ไฟลัม Basidiomycota) และที่มีอยู่ปานกลางได้แก่ plant Poaceae (ไฟลัม Streptophyta) (รูปที่ 10 และ 12) เช่นเดียวกับในสังคมแบคทีเรียที่พบโครงสร้างสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตของแปลงที่ 3 ก็มีความเป็นเอกลักษณ์ เนื่องจากมี arthropod (เช่น ไร้เดือน) สัตว์ขาปล้อง และรา Basidiomycota ค่อนข้างน้อย แต่พบว่ามีพืชในไฟลัม Bacillariophyta เป็นจำนวนมาก ขณะที่หนอนปล้อง หนอนตัวกลม และ รา (เช่น Basidiomycota และ Ascomycota) พบได้บ่อยกว่าในฟาร์มเกษตร (ดิน 1, 2 และ 4) (รูปที่ 12) สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีประโยชน์ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมที่สำคัญสำหรับกิจกรรมด้านสารอาหารอินทรีย์ในดิน รวมถึง การไถ การผสมเกสร และเนื้อดิน (Fonte, Winsome, and Six, 2009) สารอินทรีย์ในดินมีความสำคัญต่อสายใยอาหารในระบบนิเวศ (Lal, 2004; Fonte, Winsome, and Six, 2009) นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ในลักษณะเดียวกันถึงความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของดินในตารางที่ 1 และได้ผลสอดคล้องดังรูปที่ 14

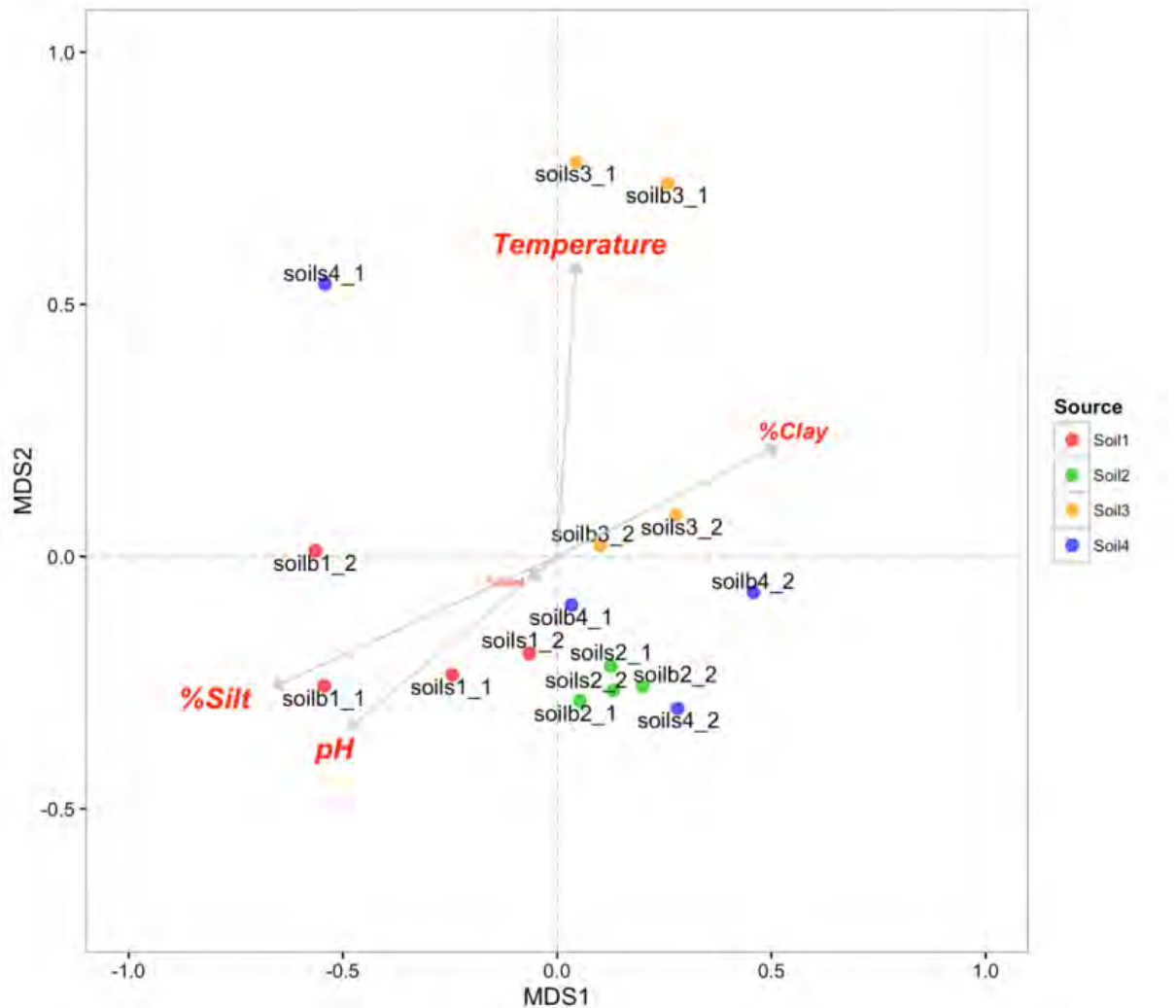
n.



ข.



รูปที่ 13 NMDS แสดงความสัมพันธ์ของสังคมนาและสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต ในดินแปลงต่างๆ และใน (ข) แสดง จินัสตัวแทนคำนวณโดยสหสัมพันธ์ของ Spearman

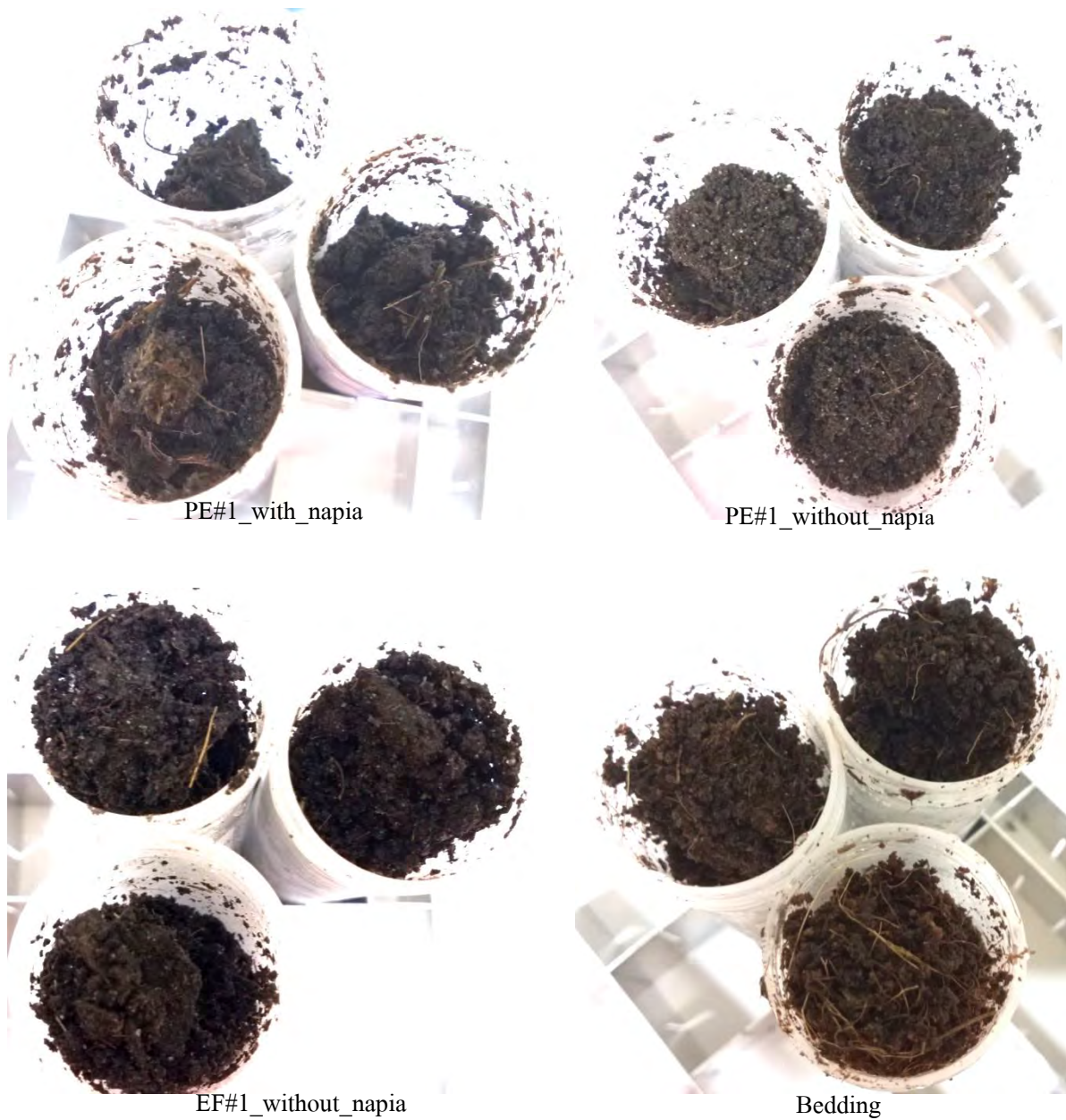


รูปที่ 14 NMDS ร่วมกับสหสัมพันธ์ของ Spearman เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของคุณลักษณะทางกายภาพแทนสังคมนาและสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตในดินแปลงต่างๆ

3.2 ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน

คุณสมบัติทางกายภาพ

รูปที่ 15 แสดงภาพของตัวอย่างซึ่งใน PE1wo และ EE1wo ไม่มีหญ้าเนเปีย (wo_napia) ปุ๋ยจะมีลักษณะเม็ดที่ค่อนข้างร่วนกว่าเมื่อเทียบกับ PE1w และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้านคุณสมบัติของดินให้ผลดังในตารางที่ 10 ซึ่งแสดงปริมาณธาตุอาหารที่พบในตัวอย่างปุ๋ยส่วนและสูตรต่างๆ พบว่าในสูตรหมักมูลไส้เดือนดิน (หรือปุ๋ยสูตร 1) ให้ผลปริมาณแร่ธาตุ สารอินทรีย์ และลักษณะกายภาพของดิน ยังไม่พบแนวโน้มที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 15 ภาพถ่ายจากตัวอย่าง Bedding และตัวอย่างปุ๋ยสูตร 1

ตารางที่ 10 คุณสมบัติและปริมาณธาตุอาหารที่พบใน Bedding และปุ๋ยสูตรหมักมูลไส้เดือน (สูตร 1)

การทดลอง	Oven dried method (%)	pH (1:5)	EC dS/m	Organic matter (%)	Total N (%)	P ₂ O ₅ (%)	K ₂ O (%)	C:N ratio
Bedding	75	6.73	0.09	27.1	0.21	0.43	0.36	74.73
PE1w	75.15	6.75	1.58	36.87	0.73	0.21	0.39	28.75
PE1wo	77.25	6.64	1.22	35.89	0.51	0.35	0.45	41.22
EF1wo	76.10	6.72	1.52	29.21	0.56	0.24	0.42	30.36

Perionyx excavates (PE), *Eisenia fetida* (EF); EC ย่อมาจาก electrical conductivity

จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต

เมื่อนำมาวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี most probable number (MOPN) พบว่า ปุ๋ยสูตร PE1w ให้จำนวนแบคทีเรียสูงกว่าส่วน Bedding และปุ๋ยสูตร 1 ในกลุ่มเดียวกัน ถึงมากกว่าสองเท่า (ตารางที่ 11) ทั้งนี้ ไม่ได้ทดลองกับตัวอย่างปุ๋ยสูตร 2 เนื่องจากตัวอย่างมีปริมาณน้อยเพียงพอแค่สำหรับการทดลองด้านเมตาจีโนมิกส์

ตารางที่ 11 ค่า most probable number ของแบคทีเรียที่มีชีวิตและเพาะเลี้ยงได้ต่อกรัมของวัสดุที่ใช้เลี้ยง และต่อกรัมของปุ๋ย

ชนิดตัวอย่าง	MOPN/g soil
Bedding	11x10 ⁶
ปุ๋ยสูตร 1	
PE_with napia	>24x10 ⁶
PE_without napia	11x10 ⁶
EF_without napia	11x10 ⁶

เมตาจีโนมิกส์ของจุลินทรีย์

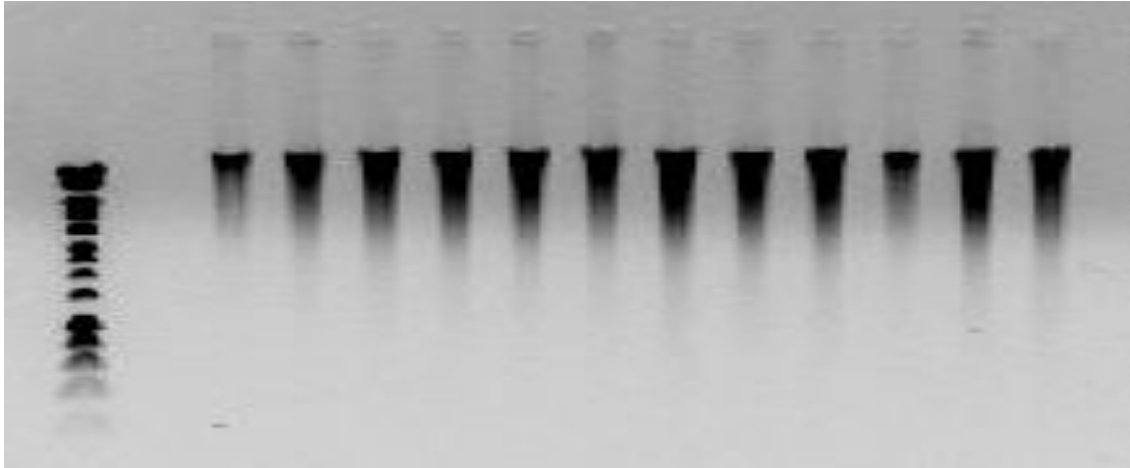
ค่าความเข้มข้นของเมตาจีโนมิกส์ที่สกัดได้ดังแสดงในตารางที่ 12 และสอดคล้องกับผลในตารางที่ 11 กล่าวคือตัวอย่าง PE1w ให้ปริมาณเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอในระดับค่อนข้างสูงที่สุดในทุก independent samplings และเช่นเดียวกันในการสกัดซ้ำที่สอง (independent repeats) ของทุกตัวอย่างซ้ำ ได้เมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ประมาณ 16,000 ng/g โดยรูปที่ 16 แสดงตัวแทนผลดิบของเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยสกัดอย่างละ 2 ซ้ำต่อซ้ำของตัวอย่าง

เมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอผ่านการตรวจคุณภาพโดยวิธี agarose gel electrophoresis ให้แบนที่เหนือ 10,000 bp ตรงตามระบุในคู่มือของชุดสกัด และวัดค่าความเข้มข้นโดย nanodrop spectrophotometry ได้ผลอยู่ในระดับบริสุทธิ์ที่สามารถเตรียมห้องสมุดยีนด้วยวิธี PCR ในขั้นต่อไป จึงนำเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอมาเตรียมห้องสมุดยีน 16S และ 18S rRNA โดยทำ PCR (ใช้ 28 รอบ) อย่างน้อยตัวอย่างละ 2 ซ้ำแล้วนำผลิตภัณฑ์มารวมกัน ได้ผลดังรูปที่ 17 และตารางที่ 13

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นของเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอทั้งหมด และต่อกรัมของดินของ Bedding หรือปุ๋ยสูตร 1 (หรือต่อมิลลิลิตรของปุ๋ยสูตร 2) ที่นำมาสกัด

ตัวอย่าง	ng/μl	Total DNA (ng) from 0.25 g soil metagenomic extraction	DNA (ng/g or ng/ml)
Bedding			
Bedding_1.1	8	800	3200
Bedding_2.1	8	800	3200
Bedding_3.1	8	800	3200
Bedding_1.2	8	800	3200
Bedding_2.2	8	800	3200
Bedding_3.2	8	800	3200
ปุ๋ยสูตร 1			
PE1.1_w	32	3200	12800
PE2.1_w	40	4000	16000
PE3.1_w	40	4000	16000
PE1.2_w	40	4000	16000
PE2.2_w	40	4000	16000
PE3.2_w	40	4000	16000
PE1.1_w/o	36	3600	14400
PE2.1_w/o	20	2000	8000
PE3.1_w/o	20	2000	8000
PE1.2_w/o	36	3600	14400
PE2.2_w/o	20	2000	8000
PE3.2_w/o	36	3600	14400
EF1.1_w/o	40	4000	16000
EF2.1_w/o	40	4000	16000
EF3.1_w/o	36	3600	14400
EF1.2_w/o	40	4000	16000
EF2.2_w/o	32	3200	12800
EF3.2_w/o	36	3600	14400
ปุ๋ยสูตร 2			
PE1.2_w	20	2000	8000
PE1.2_w/o	32	3200	12800
EF1.1_w/O	8	800	3200
EF1.2_w/O	8	800	3200

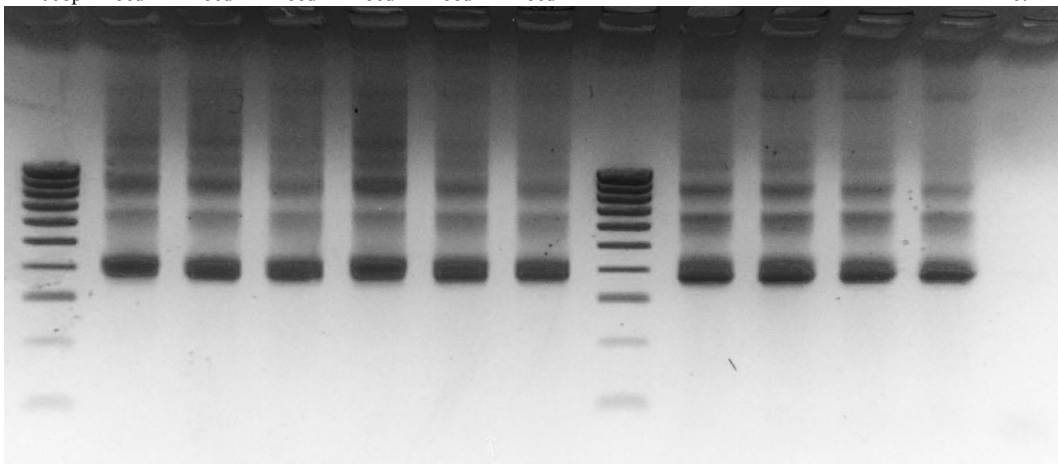
1 kb PE1.1 PE1.2 PE2.1 PE2.2 PE3.1 PE3.2 EF1.1 EF1.2 EF2.1 EF2.2 EF3.1 EF3.2



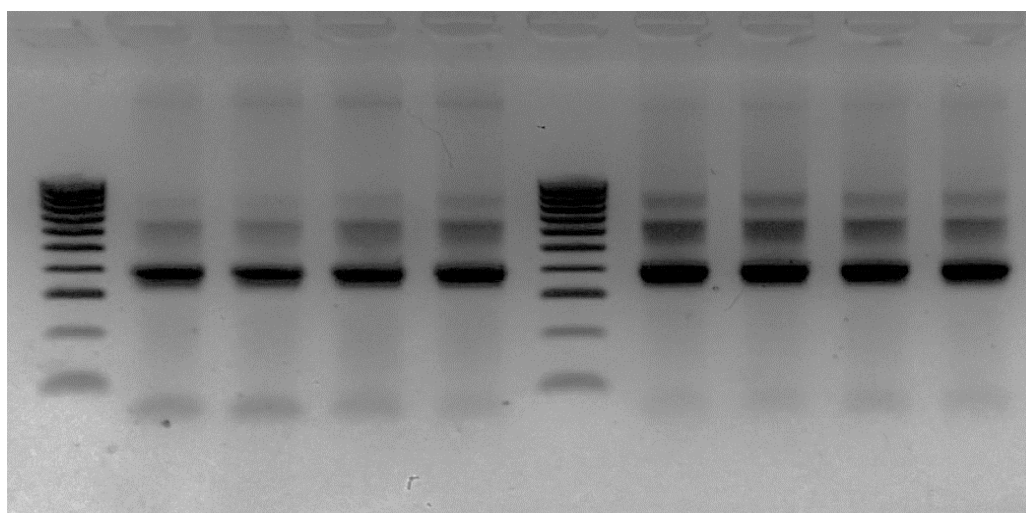
รูปที่ 16 ตัวแทนของผลเมตาจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้

16s rRNA

100bp bed1 bed1 bed1 bed2 bed2 bed2 PE1 PE1' PE2 PE2' ctr

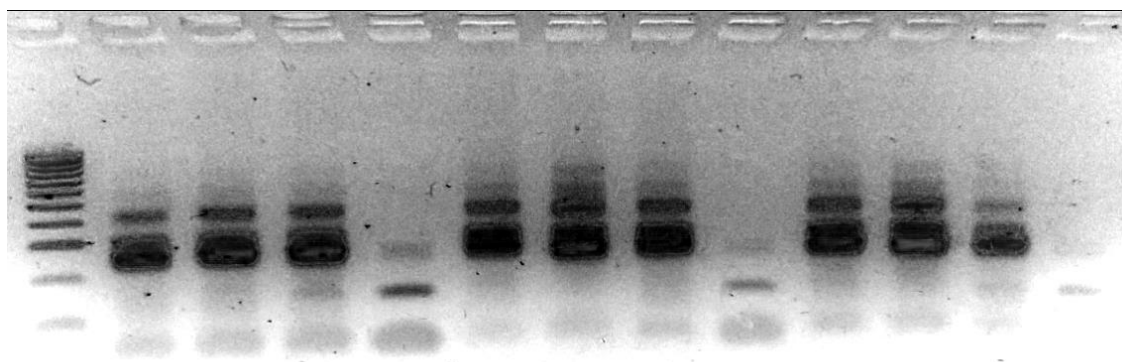


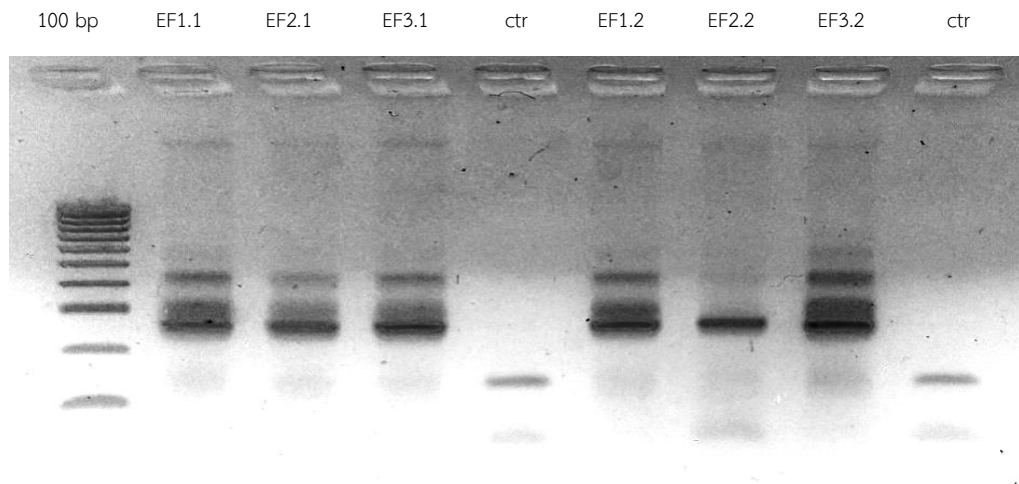
100bp PEw/o1 PEw/o1' PEw/o2 PEw/o2' EF1 EF1' EF2 EF2'



18S rRNA

100 bp PE1.2w/o PE2.2w/o PE3.2w/o ctr EF1.1 EF2.1 EF3.1 ctr EF1.2 EF2.2 EF3.2 ctr





รูปที่ 17 ตัวแทนภาพของคลังห้องสมุดยีน 16S (ภาพบน) และ 18S (ภาพล่าง) rRNA ที่เตรียมโดย Ctr แทนตัวอย่างควบคุมลบ negative control

ตารางที่ 13 ความเข้มข้นของแต่ละห้องสมุดยีน 16S และ 18S rRNA ที่เตรียมได้และปริมาตร (ul) ที่ใช้ในการทำซีควนซิ่ง

16s rRNA			
ตัวอย่าง	ng/ μ l	Total DNA(ng)	ปริมาณ pool ต่อหลอดซ้ำที่เตรียม
Bedding			80ng= x μ l
Bedding_1.1	1.85	46.25	21.62
Bedding_1.1'	13.8	276	2.90
Bedding_2.1	1.45	36.25	9.83
Bedding_2.1'	16.5	330	
Bedding_3.1	1.28	32	12.95
Bedding_3.1'	12.3	246	
Bedding_1.2	1.42	35.5	11.13
Bedding_1.2'	14.4	288	
Bedding_2.2	2.22	55.5	18.02
Bedding_2.2'	27.4	548	1.46
Bedding_3.2	1.17	29.25	7.98
Bedding_3.2'	21.1	422	
ปύยสูตร 1			80ng= x μ l
#1_PE1.1_w	8.64	216	0.37
#1_PE2.1_w	13.6	340	0.24
#1_PE3.1_w	18.7	467.5	0.17
#1_PE1.2_w	4.62	115.5	19.48

#1_PE2.2_w	2.45	61.25	25.00
#1_PE3.2_w	4.43	110.75	20.32
#1_PE1.1_w/o	3.33	83.25	24.02
#1_PE2.1_w/o	3.35	83.75	23.88
#1_PE3.1_w/o	5.65	141.25	14.16
#1_PE1.2_w/o	3.85	96.25	20.78
#1_PE2.2_w/o	4.1	102.5	19.51
#1_PE3.2_w/o	5.66	141.5	14.13
#1_EF1.1_w/o	2	50	25.00
#1_EF2.1_w/o	5.56	139	17.09
#1_EF3.1_w/o	4.45	111.25	21.35
#1_EF1.2_w/o	3.44	86	23.26
#1_EF2.2_w/o	5.18	129.5	15.44
#1_EF3.2_w/o	3.59	89.75	22.28
ปัจจัยสูตร 2			240ng= x µl
#2_PE1.1_w	21.7	434	11.06
#2_PE1.2_w	8.29	165.8	14.16
#2_PE1.2'_w	25.6	512	
#2_PE1.1_w/o	0.629	12.58	18.80
#2_PE1.1'_w/o	24.9	498	
#2_PE1.2_w/o	5.77	115.4	28.79
#2_PE1.2'_w/o	10.9	218	
#2_EF1.1_w/o	1.5	30	19.43
#2_EF1.1'_w/o	23.2	464	
#2_EF1.2_w/o	2.16	43.2	17.94
#2_EF1.2'_w/o	24.6	492	

18s rRNA			
ตัวอย่าง	ng/µl	Total DNA(ng)	ปริมาณ pool ต่อหลอดซ้ำที่เตรียม
Bedding			80ng= x µl
Bedding_1.1	1.85	46.25	21.62
Bedding_1.1'	13.8	276	2.90
Bedding_2.1	1.45	36.25	9.83
Bedding_2.1'	16.5	330	

Bedding_3.1	1.28	32	12.95
Bedding_3.1'	12.3	246	
Bedding_1.2	1.42	35.5	11.13
Bedding_1.2'	14.4	288	
Bedding_2.2	2.22	55.5	18.02
Bedding_2.2'	27.4	548	1.46
Bedding_3.2	1.17	29.25	7.98
Bedding_3.2'	21.1	422	
ปุ๋ยสูตร 1			80ng= x µl
#1_PE1.1_w	8.64	216	0.37
#1_PE2.1_w	13.6	340	0.24
#1_PE3.1_w	18.7	467.5	0.17
#1_PE1.2_w	4.62	115.5	19.48
#1_PE2.2_w	2.45	61.25	25.00
#1_PE3.2_w	4.43	110.75	20.32
#1_PE1.1_w/o	3.33	83.25	24.02
#1_PE2.1_w/o	3.35	83.75	23.88
#1_PE3.1_w/o	5.65	141.25	14.16
#1_PE1.2_w/o	3.85	96.25	20.78
#1_PE2.2_w/o	4.1	102.5	19.51
#1_PE3.2_w/o	5.66	141.5	14.13
#1_EF1.1_w/o	2	50	25.00
#1_EF2.1_w/o	5.56	139	17.09
#1_EF3.1_w/o	4.45	111.25	21.35
#1_EF1.2_w/o	3.44	86	23.26
#1_EF2.2_w/o	5.18	129.5	15.44
#1_EF3.2_w/o	3.59	89.75	22.28
ปุ๋ยสูตร 2			240ng= x µl
#2_PE1.1_w	21.7	434	11.06
#2_PE1.2_w	8.29	165.8	14.16
#2_PE1.2'_w	25.6	512	
#2_PE1.1_w/o	0.629	12.58	18.80
#2_PE1.1'_w/o	24.9	498	
#2_PE1.2_w/o	5.77	115.4	28.79
#2_PE1.2'_w/o	10.9	218	
#2_EF1.1_w/o	1.5	30	19.43

#2_EF1.1'_w/o	23.2	464	
#2_EF1.2'_w/o	2.16	43.2	17.94
#2_EF1.2'_w/o	24.6	492	

วิเคราะห์ความหลากหลายแบคทีเรียโดยซีควนซีงคลังห้องสมุดยีน 16S rRNA

ผลการซีควนซีงห้องสมุดยีน 16S rRNA และภายหลังทำการรวม reads R1 และ R2 และตัดทิ้งซีควนที่ไม่ผ่านเกณฑ์ เช่น ความยาวหลังรวม R1 และ R2 สั้นกว่า 100 คู่เบส (หลังตัดซีควน adapter ที่ใช้ในการซีควน, barcode และไพรเมอร์), การมีเบสซ้ำๆ (homopolymer) มากกว่า 8 เบส และการมีเบส N ใน reads (ambiguous) มากกว่า 8 เบส เป็นต้น ร่วมกับการคัดกรองในขั้นตอนของ pre-cluster และกำจัด chimera รวมถึงส่วนของ classify taxonomy ที่ไม่สามารถระบุ taxon (unknown) หรือมีการปะปนของ taxon อื่น เช่น Eukaryote, Chloroplast และ Mitochondria เป็นต้น หลังจากขั้นตอนการเตรียม OTUs (classify OTUs) และรวมผลซีควนของแต่ละสองซ้ำของตัวอย่างเข้าด้วยกัน ก่อนการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศต่อไป นั้น พบจำนวนซีควนทั้งหมด 1,122,097 reads และความยาวเฉลี่ยของ reads ประมาณ 252 bp รายละเอียดดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 จำนวนซีควนของห้องสมุดยีน 16S rRNA หลังทำ pre-process และระบุ OTUs ที่ระดับจีโนม

ตัวอย่าง	จำนวนซีควนหลังทำ pre-process
Bedding	107187
PE1w	80883
PE1wo	257938
EF1wo	109219
PE2w	125113
PE2wo	188075
EF2wo	253682

จากผลการ classify OTUs ที่ระดับจีโนม (0.03 dissimilarity) ซึ่งหมายถึงการจัดจำแนก reads ที่มีความเหมือนกัน 97% มาอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า taxonomy เดียวกัน และทำการ normalize ผลโดยเลือก subsample อย่างสุ่มด้วยจำนวน reads เท่ากันที่ 80,000 เพื่อลดปัญหาความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นจากจำนวน reads ที่ไม่เท่ากันในแต่ละคลังห้องสมุด จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ alpha diversity เพื่อคำนวณความหลากหลายของสังคมประชากรโปรคาริโอต (แบคทีเรียและอาร์เคีย) ภายในตัวอย่างแต่ละคลังห้องสมุด อันประกอบด้วยค่า Chao 1 index (ดัชนีประเมิน species richness จากจำนวน OTUs ที่มีสมาชิกเดี่ยว ดังนั้น ถ้าสังคมใดมีจำนวน OTUs ที่มีสมาชิกเดี่ยวเยอะจะมีแนวโน้มมีค่า Chao 1 index เยอะ) และ

Shannon-Wiener index (ดัชนีประเมินความหลากหลายของสังคมหรือ community diversity จากจำนวน OTUs และความหนาแน่นของแต่ละ OTU หมายถึงถ้าสังคมใดประชากรส่วนใหญ่อยู่ในเพียงไม่กี่ OTUs ขณะที่ OTUs อื่นๆ มีสมาชิกเดี่ยวๆ ถือว่าสังคมนั้นมีดัชนีความหลากหลาย Shannon index ต่ำ) ดังนั้นสำหรับดัชนี Chao 1 ที่วิเคราะห์ความหลากหลายจากจำนวน OTUs พบว่าใน Bedding และปุ๋ยสูตร 1 ให้จำนวน OTU richness ที่ใกล้เคียงกัน แต่น้อยกว่าประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับในสูตร 2 ปุ๋ยน้ำหมักซึ่งมี OTUs เดี่ยวๆ เป็นจำนวนมาก ซึ่งขัดกับผลวิเคราะห์ Shannon ที่รายงาน community diversity ของประชากรแบคทีเรียและรา ในปุ๋ยสูตร 1 มีค่าสูงกว่าใน Bedding และในสูตร 2 ตามลำดับ โดยระหว่างคลังข้อมูลซ้ำอิสระมีค่าไม่แตกต่างกัน และพบว่าการให้หญ้า napia ร่วมด้วยจะให้ผลความหลากหลายที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ค่าดัชนี Good's coverage index ที่บ่งชี้เปอร์เซ็นต์ความครอบคลุมของผลของความหลากหลายของ OTUs ต่อร้อยละของที่พบจริง พบ 80,000 reads อยู่ในช่วง 43.12-51% (ประมาณเฉลี่ย 49.12%) (ตารางที่ 15) ซึ่งแนะนำผลวิเคราะห์ครั้งนี้ครอบคลุมประมาณ 50% ของสปีชีส์แบคทีเรียและอาร์เคียในสังคมจริง ทั้งนี้ ในอนาคตอาจมีการซีควนคลังห้องสมุด PE1w เพิ่มเติมเพื่อให้ได้จำนวน reads หลัง pre-process ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้สามารถ normalize ข้อมูลที่จำนวน reads ต่อคลังห้องสมุดที่เพิ่มขึ้น ทำให้ได้ค่า Good's coverage index ที่เพิ่มขึ้น หรืออีกนัยหนึ่ง หากมีตัวอย่างที่สนใจแบบจำเพาะเจาะจง ให้วิเคราะห์เฉพาะคลังห้องสมุดนั้นๆ จากจำนวน reads ทั้งหมดก่อน subsample เพื่อได้ผลวิเคราะห์อีกประมาณ 50% ที่ขาดหายไป

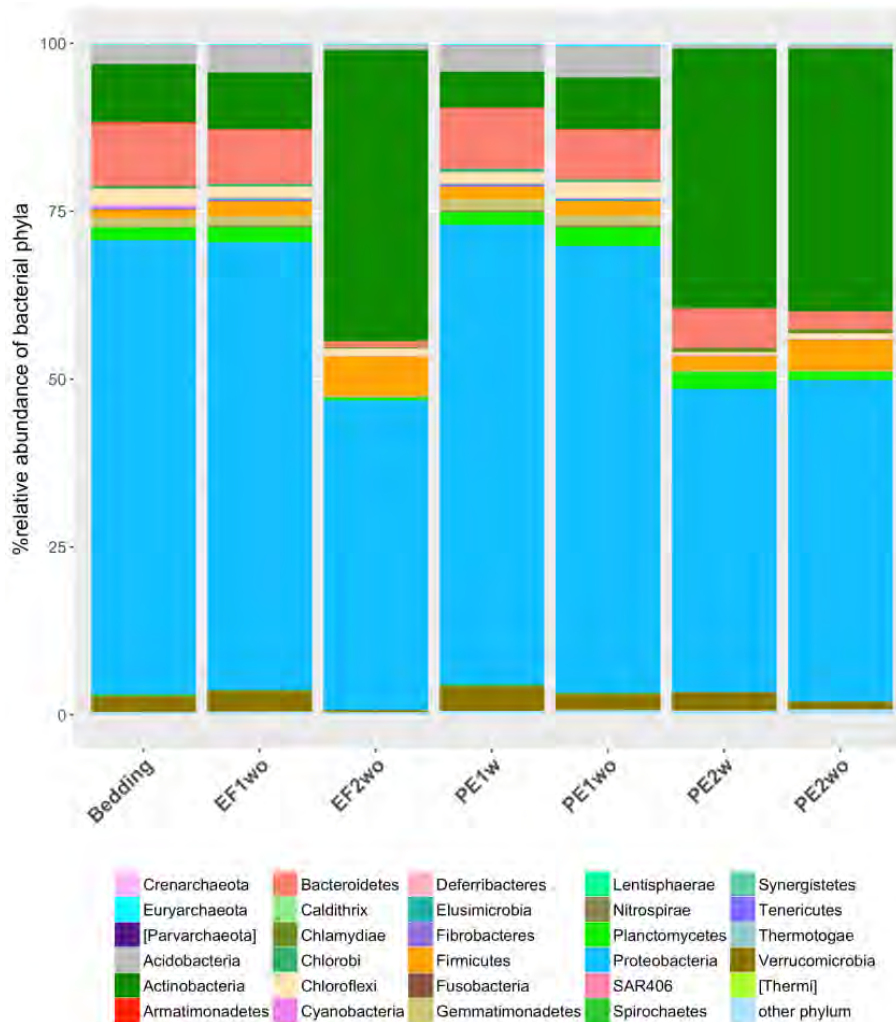
ตารางที่ 15 จำนวน OTUs ค่าดัชนีความหลากหลาย และค่าดัชนีความครอบคลุม ของแต่ละคลังห้องสมุดระดับจีโนม

การทดลอง	OTUs	Chao	Shannon	Good's coverage
Bedding	42871.26	454069.1	9.38	51.36
PE1w	45424.02	317133.7	9.67	50.14
PE1wo	44471.83	362190.6	9.62	50.86
EF1wo	44320.85	325501.8	9.61	51.18
PE2w	48043.5	822657	9.21	43.12
PE2wo	44035	713820.8	8.87	48.12
EF2wo	43129.65	706396.8	8.50	49.04

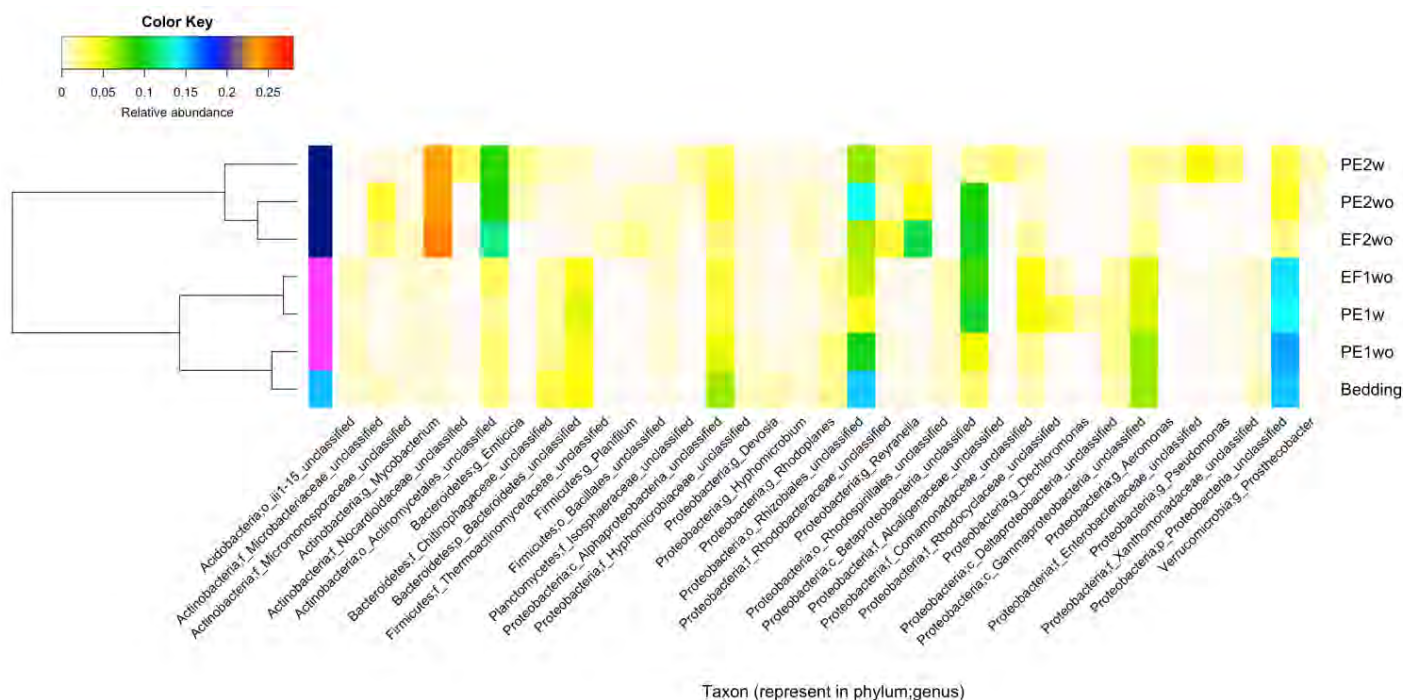
จากการเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างของ OTUs กับฐานข้อมูล Greengenes (August 2013 release of gg_13_8_99) แสดงดังรูปที่ 18 และ 19 ผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่พบกลุ่มประชากรโปรคาริโอตใน 3 phylum หลัก ได้แก่ phylum Euryarchaeota, Actinobacteria และ Bacteroidetes โดยใน Bedding และสูตร 1 คล้ายคลึงกัน และแตกต่างจากในสูตร 2 โดย Euryarchaeota พบเด่นในสูตร 1, Actinobacteria พบเด่นในสูตร 2 ส่วน Bacteroidetes พบมากใน Bedding และสูตร 1 และในสูตร 2 เฉพาะ PE2w (รูปที่ 18) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มสอดคล้องในระดับจีโนม ทำให้เกิดการจับกลุ่มที่ชัดเจน

แบ่ง Bedding และปุ๋ยสูตร 1 ออกจากปุ๋ยสูตร 2 และเป็นที่น่าสนใจอีกด้วยว่าพบประชากรใน PE1w ใกล้เคียงกับ EF1wo มากกว่า ระหว่าง PE ด้วยกัน หรือ wo ด้วยกัน แสดงว่าความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของไส้เดือน อาจมีผลเชิงละเอียดต่อความหลากหลายของโปรคาริโอตที่พบ อย่างไรก็ตามก็ดีจากผลอาจชี้แนะว่าการให้หญ้า napia มีผลต่อการปรับโครงสร้างประชากรของ PE1w ให้ใกล้เคียงกับของ EF1wo ซึ่งตรงกันข้ามกับในน้ำหมัก (สูตร 2) ที่สายพันธุ์ไม่มีผลกระทบต่อความหลากหลายของโปรคาริโอต เนื่องจาก PE2wo และ EF2wo ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน

ตัวอย่างจีโนมที่พบในปุ๋ยสูตร 1 ทั้งแบบใส่และไม่ใส่หญ้า napia ส่วนใหญ่พบใน phylum Bacteroidetes เช่นจีโนมใน family Chitinophagaceae ซึ่งมีความสำคัญในฐานะเป็นตัวย่อยสลายไคตินในผนังหรือเปลือกของสัตว์ในดินเช่น ไส้เดือน พยาธิ แมลง และเซลล์รา (Hargreaves et al., 2015, doi.org/10.1371/journal.pone.0134345) สอดคล้องกับความจำเป็นในห่วงโซ่อาหารของโปรคาริโอตในแหล่งที่อยู่ที่มีสัตว์เหล่านี้อยู่ร่วมด้วย สำหรับตัวอย่างจีโนมที่พบเด่นในสูตร 2 อาทิจีโนม *Mycobacterium* และจีโนมใน order Actinomycetales_genus unclassified ถึงแม้แบคทีเรียในกลุ่ม Actinobacteria โดดเด่นในความสามารถในการสร้าง secondary metabolites เช่นยาปฏิชีวนะ แต่การพบ *Mycobacterium* ซึ่งบางสายพันธุ์ก่อโรคในคนและในสัตว์ เป็นที่น่าพึงระวัง (รูปที่ 19)

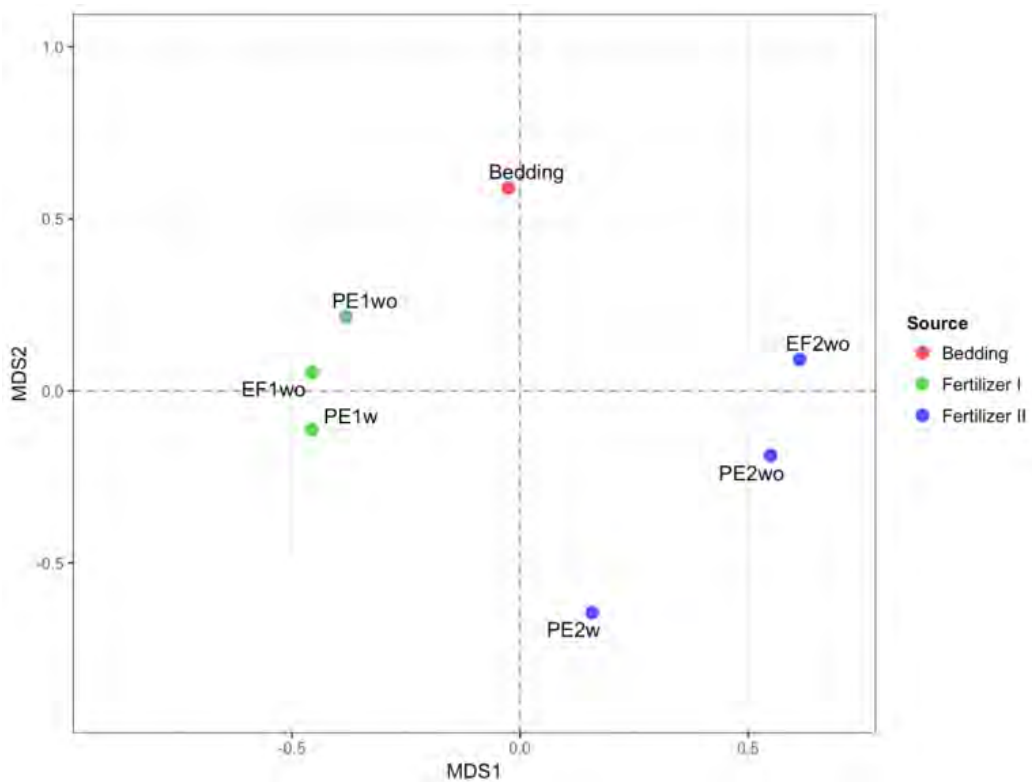


รูปที่ 18 ร้อยละสัดส่วนของสังคมแบคทีเรียในระดับฟิล์ม สำหรับ other phylum ประกอบด้วยฟิล์มต่างๆ ที่มีร้อยละของแบคทีเรียน้อยกว่า รวมกัน



รูปที่ 19 องค์ประกอบสัดส่วนของจีโนมโปรคาริโอต พร้อมแผนภูมิต้นไม้ด้านซ้ายจากของแต่ละกลุ่ม มีการแสดงสัดส่วนสัมพันธ์ด้านความถี่ของแต่ละจีโนมที่พบบนแท่งสับนวมซ้ายด้านบนแต่ด้วยพื้นที่จำกัด จึงไม่ได้แสดงจีโนมที่มีสัดส่วนน้อยกว่าร้อยละ 1 แต่ละสูตรปุ๋ยแสดงสีที่ต่างกันทางด้านซ้ายโดยสีฟ้าแทน bedding, สีม่วง กลุ่มของปุ๋ยสูตร 1 และสีน้ำเงิน กลุ่มของปุ๋ยสูตร 2

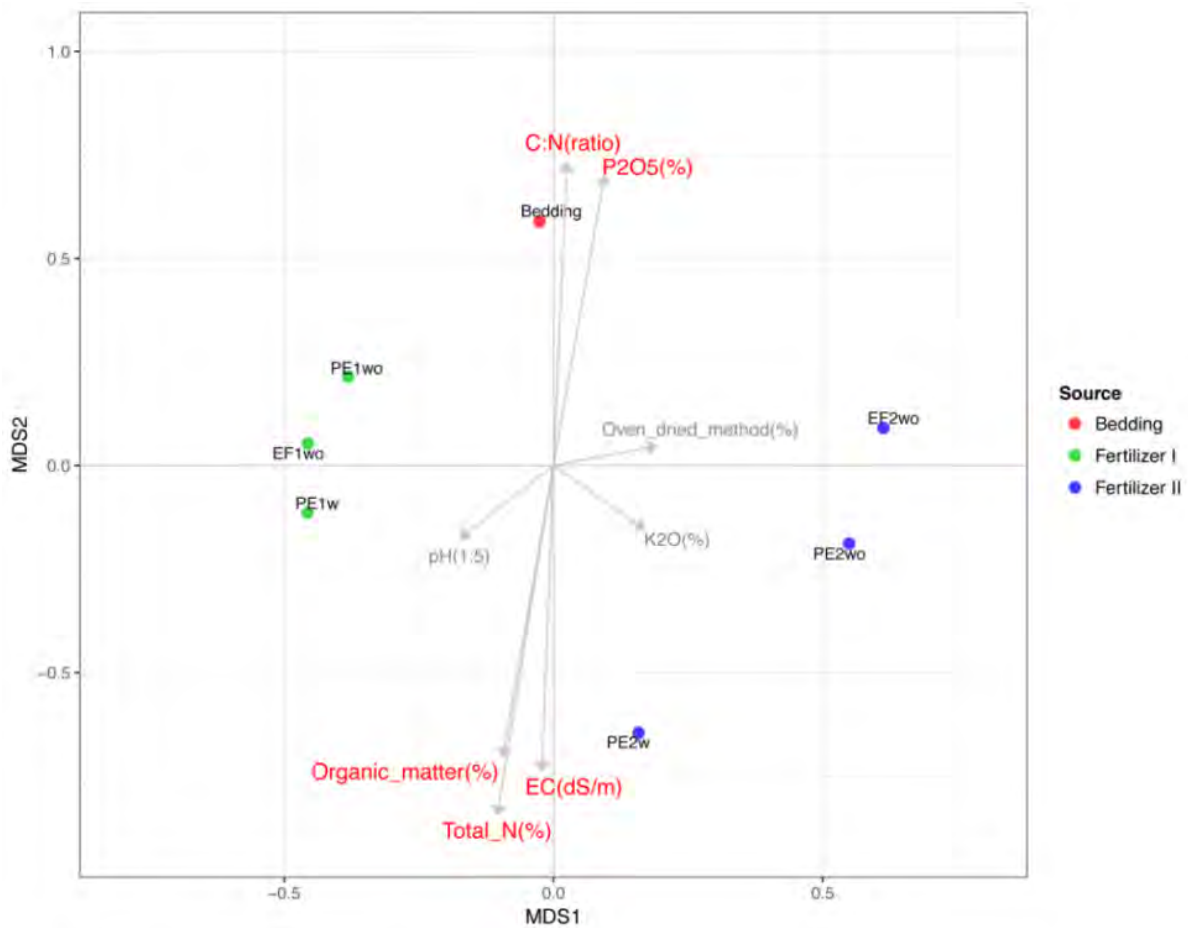
เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของสังคมโปรคาริโอตระหว่างกลุ่มด้วยค่าดัชนีทาง beta-diversity ได้แก่ Yue and Clayton (Thetayc) community dissimilarity indices ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปแบบของ NMDS เพื่อพิจารณาความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดและความแตกต่างในความหลากหลายของโครงสร้างแบคทีเรีย (รูปที่ 20) ผลการวิเคราะห์พบว่า การกระจายตัวของสังคมภายในปุ๋ยสูตร 1 ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับสังคมภายในสูตร 2 และทั้งสองสูตรค่อนข้างแยกจากกัน โดยมี Bedding อยู่ใกล้เคียงกับสูตร 1 และใน EF1wo ใกล้กับ PE1w มากกว่า PE1wo (รูปที่ 20)



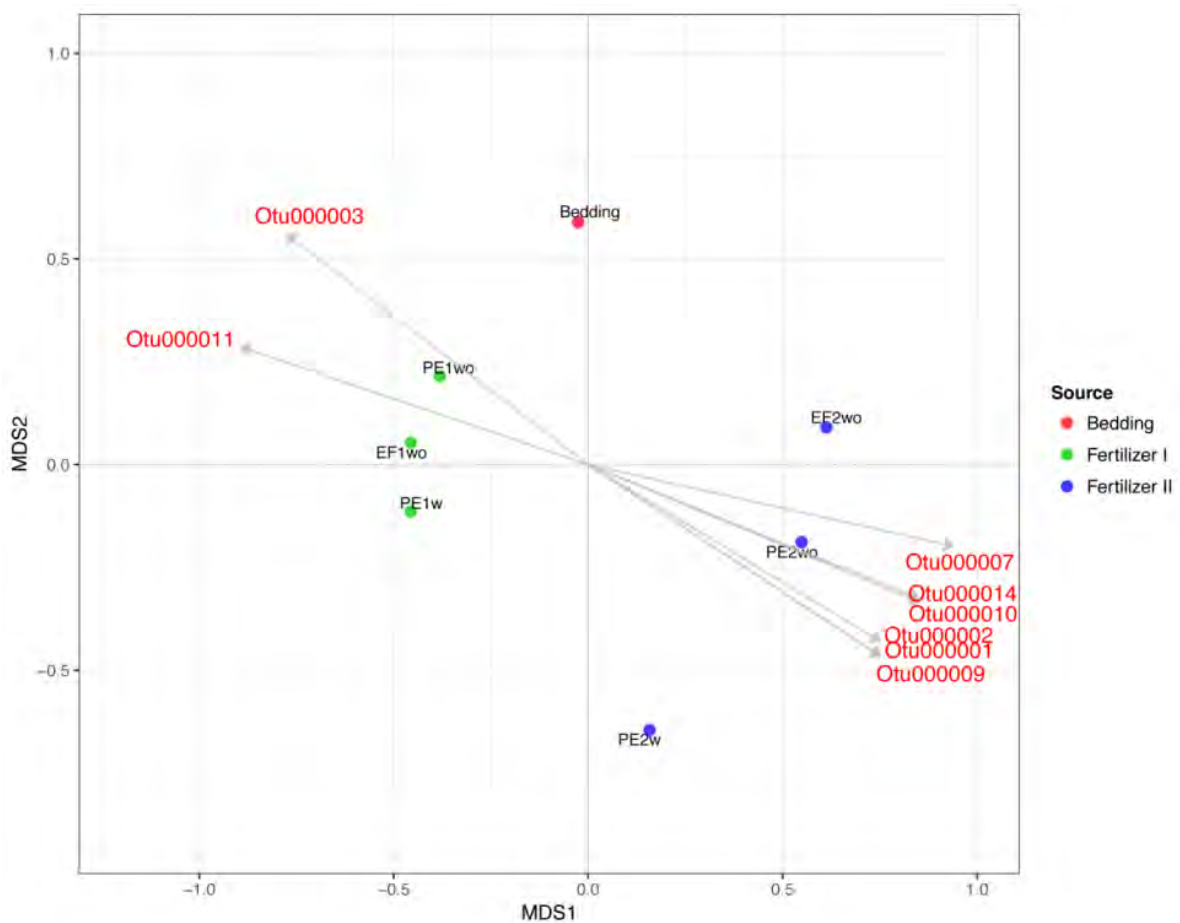
รูปที่ 20 NMDS เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสังคมแบคทีเรียที่ OTUs ระดับจีโนม อ้างอิงด้วยการประเมินจาก Thetayc dissimilarity indices

เมื่อทำการคำนวณ Pearson correlation เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง community structures กับคุณสมบัติทางกายภาพดังรูปที่ 21 พบปัจจัยที่ส่งผลต่อรูปแบบโครงสร้างของประชากรโพรคาริโอตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลายปัจจัย ได้แก่ C (C:N), P (%P₂O₅), N (% total nitrogen), ปริมาณอินทรีย์ (% organic matter) และ electrical conductivity (EC) โดย C:N และ P₂O₅ มีอิทธิพลต่อรูปแบบโครงสร้างประชากรไปในทิศทางของ Bedding และตรงข้ามกับของ organic matter, total nitrogen และ EC เหล่านี้ มีผลให้โครงสร้างแตกออกไปในรูปที่ 21 ทางซ้ายเป็นปุ๋ยสูตร 1 และทางขวาเป็นสูตร 2 ทั้งนี้ด้วยขาดผลวิเคราะห์คุณสมบัติกายภาพของปุ๋ยน้ำหมักหรือฉี่ (ตารางที่ 10) คาดว่าทำให้ทิศทางของเวกเตอร์ยังคงค่อนข้างไม่ไปทางใดทางหนึ่งชัดเจน

เมื่อทำการวิเคราะห์ถึงกลุ่ม OTUs ที่สำคัญพบ OTUs ไปในทิศทางสอดคล้องกับประชากรในสูตร 1 (รูปที่ 22: OTU3, OTU11) และสูตร 2 (รูปที่ 22: OTU1-2, OTU7, OTU9-10, OTU14) ตารางที่ 16 แสดง จีโนมของ OTUs ที่พบ ซึ่งเป็นที่น่าเสียดายที่หลาย OTUs ยังไม่สามารถระบุได้ถึงระดับจีโนมเนื่องจากขีดจำกัดของความยาวของช่วง V3-V4 ที่ทำการซีควนและของฐานข้อมูลที่ใช้แบ่งแยก OTUs



รูปที่ 21 NMDS ที่สร้างด้วย Thetayc dissimilarity กับความสัมพันธ์ของคุณสมบัติของดินในตารางที่ 10 ตัวอักษรสีแดงแสดงให้เห็นถึงธาตุอาหารที่พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ตัวอักษรสีเทาแสดงถึงไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 22 NMDS ที่สร้างด้วยค่า Thetayc dissimilarity ระหว่าง community structures พร้อมแสดง OTUs ของโปรคาริโอตที่สำคัญ ตัวอักษรสีแดงแสดง OTUs ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

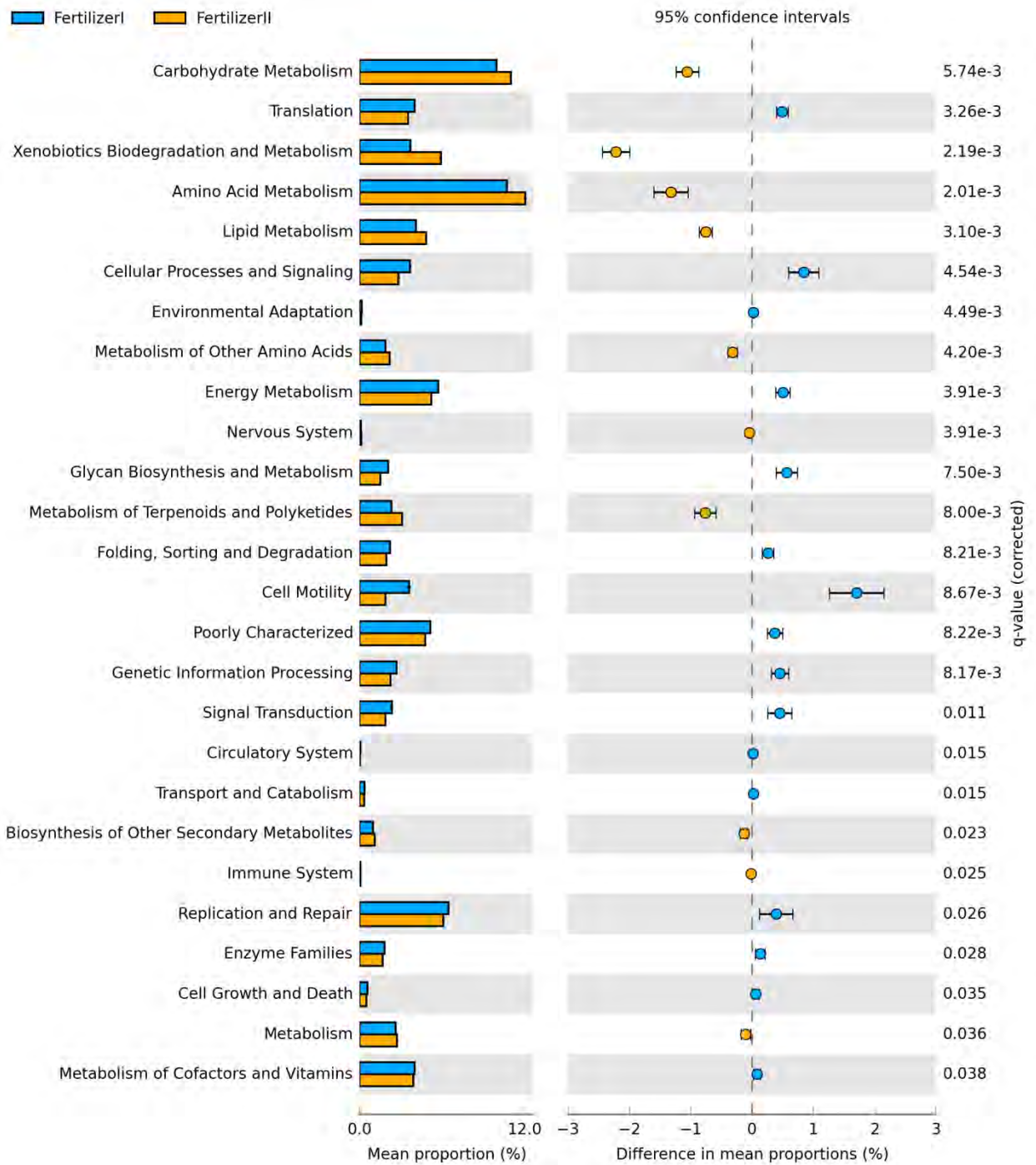
ตารางที่ 16 OTUs ในระดับจีโนม ที่มีอิทธิพลต่อการโครงสร้างประชากร

OTUs	Taxonomy
Otu000001	g__Reyranella
Otu000002	c__Betaproteobacteria_unclassified
Otu000003	f__Sinobacteraceae_unclassified
Otu000007	g__Mycobacterium
Otu000009	g__Planifilum
Otu000010	g__Rhodobacter
Otu000011	o__Myxococcales_unclassified
Otu000014	g__Mycobacterium

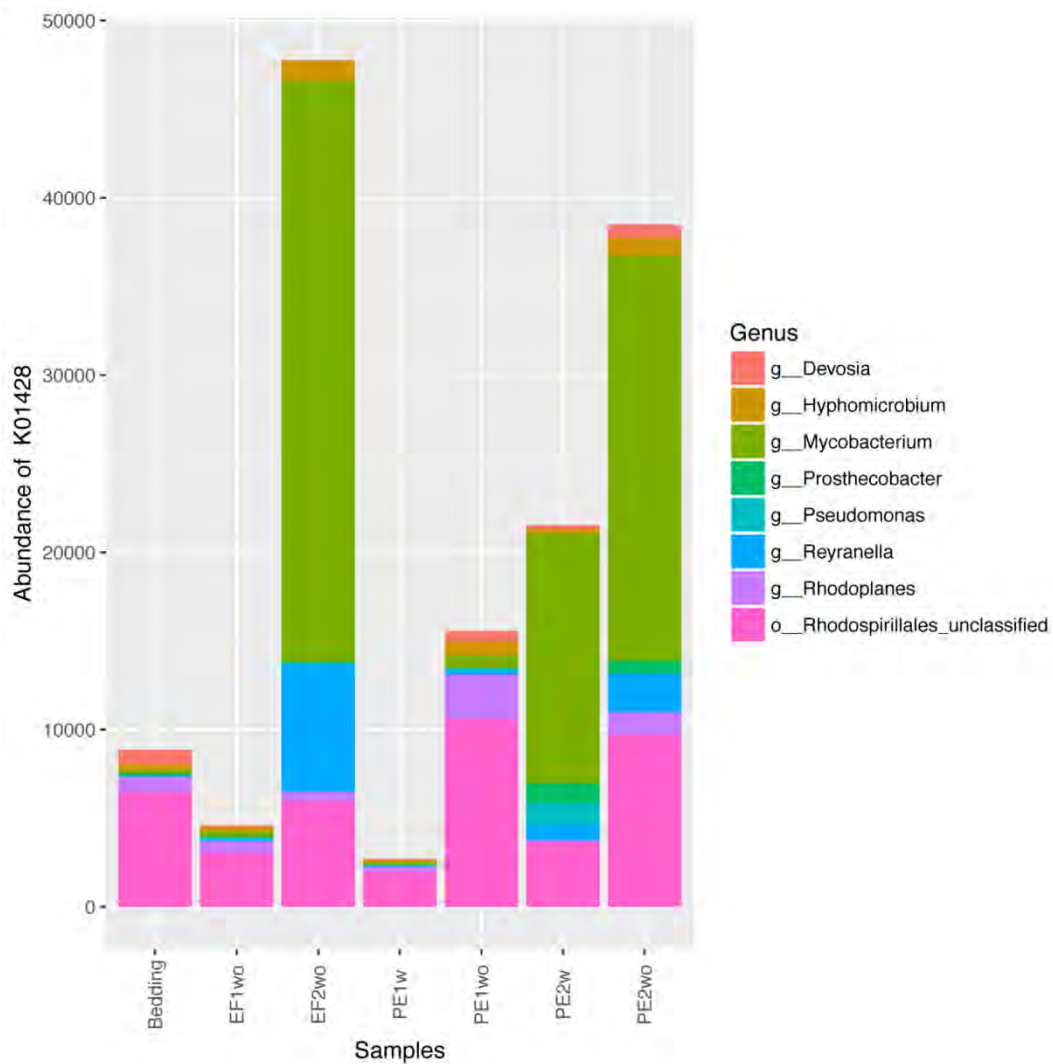
ข้อมูลสังคมแบคทีเรียสามารถนำมาวิเคราะห์ศักยภาพหน้าที่ทางเมตาบอลิซึมได้จากฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) โดยใช้ PICRUSt ดังรูปที่ 23 แสดงเมตาบอลิซึมที่ต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ระหว่างปุ๋ยสูตร 1 และ 2 อย่างไรก็ดี สัดส่วนของค่าความแตกต่างยังคงค่อนข้าง

ใกล้เคียงกัน เนื่องจากปฏิกิริยาทั้งสองสูตรผลิตขึ้นจากหลักการเดียวกัน แตกต่างกันเพียงใช้ มวลหรือฉี ทั้งนี้พบหน้าที่เกี่ยวกับการได้มาซึ่งแร่ธาตุอาหารมีสัดส่วนมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญในสูตร 2 อาทิ carbohydrate metabolism, xenobiotics biodegradation and metabolism, amino acid metabolism และ lipid metabolism เป็นต้น ขณะที่หน้าที่เกี่ยวกับการสื่อสารและปรับตัว อาทิ translation, cellular processes and signaling, environmental adaptation และ cellular motility เป็นต้น พบมากกว่าในสูตร 1

ในรูปที่ 24 เป็นตัวอย่างการวิเคราะห์เพิ่มเติมสำหรับเมตาบอลิซึมที่สนใจเพื่อหาสัดส่วนของจีโนมของแบคทีเรียในแต่ละสังคมประชากรที่รับผิดชอบในเมตาบอลิซึมต่างๆ ซึ่งสำหรับ xenobiotics biodegradation and metabolism ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มเมตาบอลิซึมที่น่าสนใจเพราะเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารเคมีที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเช่น ยาฆ่าแมลง มีการพบเมตาบอลิซึมนี้มากในปฏิกิริยาสูตร 2 และเมื่อทำการวิเคราะห์ KEGG ortholog ที่รับผิดชอบเช่น K01428 ที่เป็นเอนไซม์ ureC; urease subunit alpha [EC:3.5.1.5] ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Atrazine degradation of Xenobiotics biodegradation and metabolism พบว่าเกิดจากโปรคาริโอตในจีโนมหลักได้แก่ unclassified genus of order Rhodospirillales ซึ่งพบกระจายทั่วไปในทุกกลุ่มของตัวอย่าง และจีโนม *Mycobacterium* และ *Reyranela* ซึ่งโดดเด่นในปฏิกิริยาสูตร 2 และโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน EF2wo แสดงความแตกต่างของจีโนมของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อความสามารถทางเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลเช่นนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ การเลือกใช้สูตร 1 และสูตร 2 กับสถานการณ์ที่เหมาะสมกับกลุ่มเมตาบอลิซึมที่ต้องการ และการเลือกชนิดของแบคทีเรียเพื่อช่วยในการปรับปรุงสูตรปุ๋ยชีวภาพ อย่างไรก็ตามอย่างไรก็ดีสำหรับ *Mycobacterium* และ *Reyranela* ควรมีการชี้แจงและวิเคราะห์เพื่อระบุปฏิกิริยาที่ประโยชน์ในการนำไปใช้สำหรับเกษตรกรเพื่อลดปัญหาสารเคมีปนเปื้อน



รูปที่ 23 คักยภาพหน้าที่ของสังคัมแบคทีเรียที่ระบุจาก KEGG ระดับ 2 เปรียบเทียบโดยรวมระหว่างปุ๋ยสูตร 1 และ 2



รูปที่ 24 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความหลากหลายของจีโนมในเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับ KEGG ortholog ชื่อ K01428 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ ureC; urease subunit alpha [EC:3.5.1.5] ทำหน้าที่ใน Atrazine degradation of Xenobiotics biodegradation and metabolism

วิเคราะห์ความหลากหลายและยูคาริโอตขนาดไมครอนโดยซีควนซ์คลังห้องสมุดยีน 18S rRNA

ผลการซีควนซ์ห้องสมุดยีน 18S rRNA และภายหลังทำการรวม reads R1 และ R2 และตัดทิ้งซีควนซ์ที่ไม่ผ่านเกณฑ์เช่นเดียวกับวิธีของ 16S ร่วมกับการคัดกรองในขั้นตอนของ pre-cluster และกำจัด chimera รวมถึงส่วนของ classify taxonomy ที่ไม่สามารถระบุ taxon (unknown) หรือมีการปะปนของ taxon อื่น เช่น Prokaryote, Chloroplast และ Mitochondria เป็นต้น หลังจากขั้นตอนการเตรียม OTUs (classify OTUs) ก่อนการวิเคราะห์ทางสถิติ นั้น ประกอบด้วยจำนวนซีควนซ์ทั้งหมด 1,176,108 reads ด้วยความยาวเฉลี่ยของ reads ประมาณ 384 bp รายละเอียดดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 จำนวนซีควีนของห้องสมุดยีน 18S rRNA หลังทำการ pre-process และระบุ OTUs ระดับจีโนม

ตัวอย่าง	จำนวนซีควีนภายหลัง pre-process
Bedding	138613
PE1w	38217
PE1wo	170552
EF1wo	189345
PE2w	206454
PE2wo	256232
EF2wo	176695

จากการ classify OTUs ที่ระดับจีโนม (0.03 dissimilarity) และทำการ normalize ในการวิเคราะห์ผลด้วยการ subsample ด้วยจำนวน reads เท่ากันที่ 38,000 แต่ละกลุ่มให้ผลของจำนวน OTUs ที่แตกต่างกัน โดยประชากรยูคาริโอตในปุ๋ยสูตร 1 มีจำนวน OTUs และแนวโน้มความหลากหลายมากกว่าปุ๋ยสูตร 2 ทั้งในค่าดัชนีความหลากหลายของประชากร (Shannon index: community diversity) และค่าดัชนีจำนวน OTUs (Chao 1 index: OTU richness) ซึ่งแนะนำในเชิงจุลินทรีย์ยูคาริโอตหรือรา สูตร 1 ให้ความหลากหลายสูงกว่า นอกจากนี้ ค่าดัชนี Good's coverage ที่แสดงความครอบคลุม >92% ในทุกตัวอย่างบ่งชี้ว่าจำนวนซีควีนที่วิเคราะห์นั้นสามารถครอบคลุมประชากรยูคาริโอตที่มีอยู่จริงได้ในระดับ >92% (ตารางที่ 18)

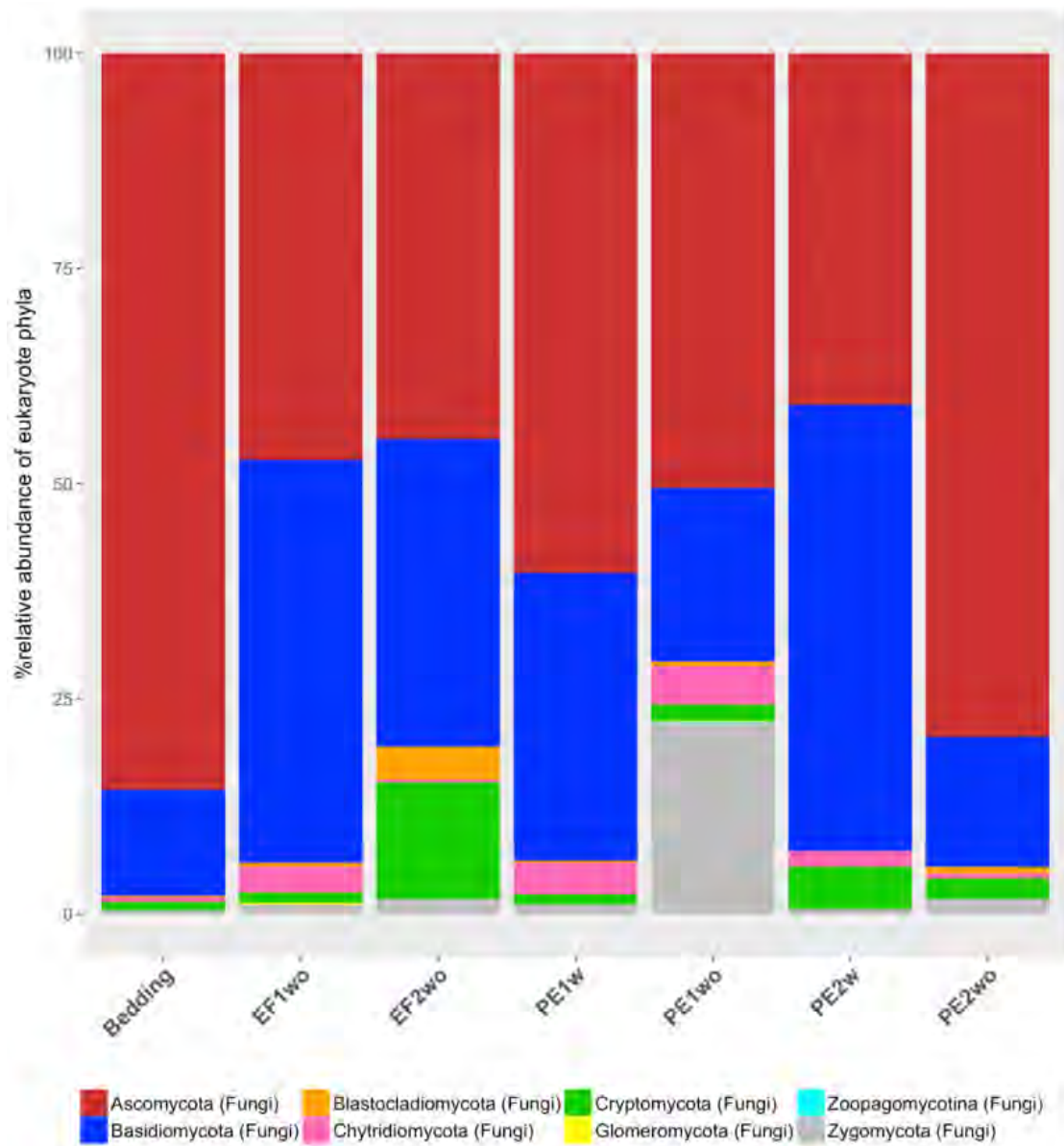
ตารางที่ 18 ค่าดัชนี alpha diversity ต่างๆ ภายในแต่ละคลังห้องสมุด 18S rRNA ที่ระดับจีโนม

Samples	OTUs	Chao	Shannon	Good's coverage
Bedding	214.61	1472.48	1.59	94.20
PE1w	275.81	1315.28	2.29	93.05
PE1wo	280.31	1060.54	2.95	93.58
EF1wo	298.18	1431.24	2.38	92.57
PE2w	161.99	637.45	2.45	96.19
PE2wo	198.36	1321.84	2.21	94.95
EF2wo	137.71	379.56	1.88	97.24

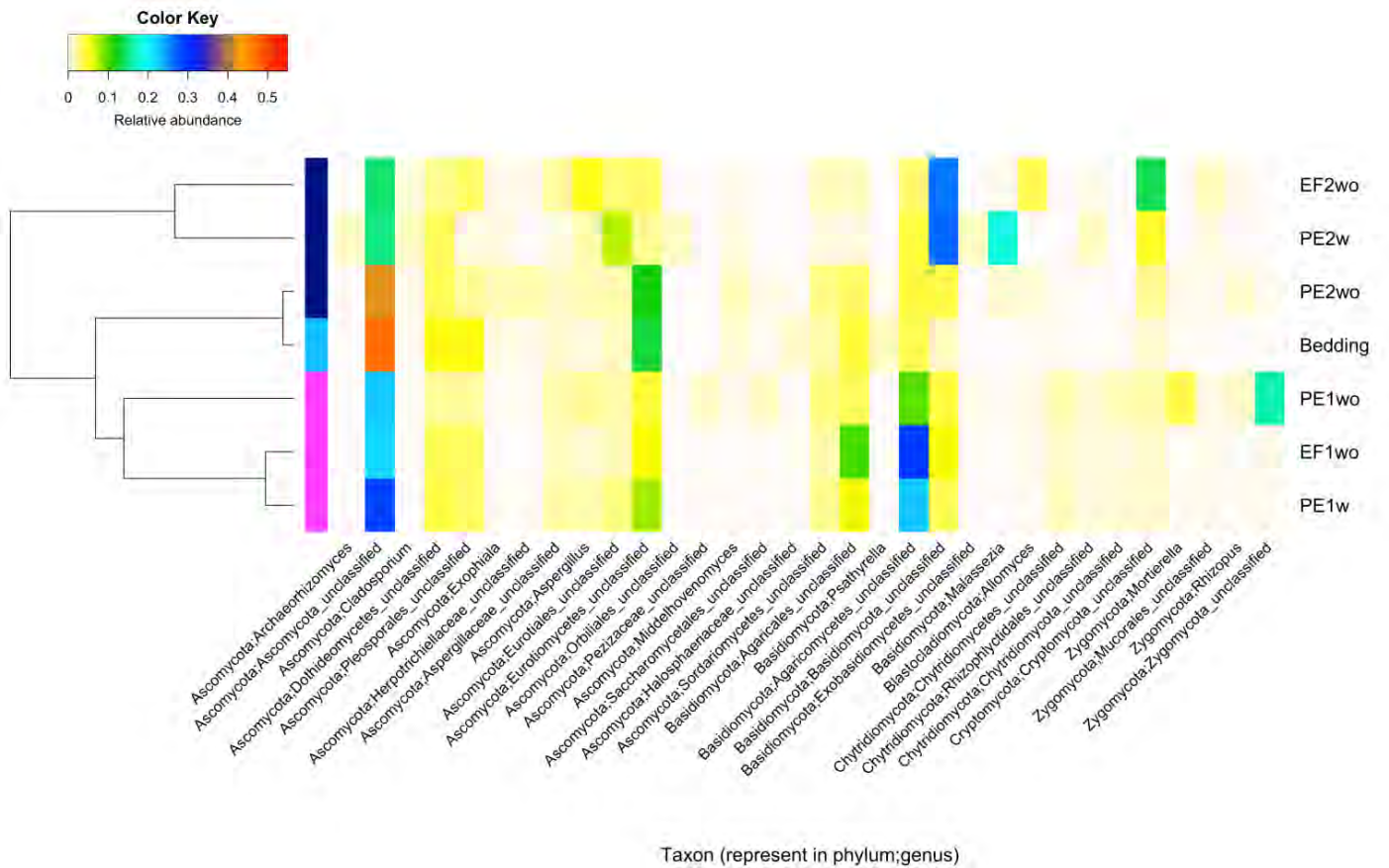
เนื่องจากพบประชากรยูคาริโอตนอกเหนือจากรา จึงทำการวิเคราะห์ต่อในเฉพาะสังคมรา โดยยึดจากที่ระบุตามฐานข้อมูล Silva เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ยูคาริโอตที่สนใจ เพราะเรามีบทบาทในการย่อยสลายเศษซากพืชและซากสัตว์ที่อยู่ในดินเช่นเดียวกับแบคทีเรีย เป็นตัว decomposers และ recyclers สารอาหารตั้งต้นทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ที่จำเป็น ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 25 และ 26 ประชากรภายในปุ๋ยแต่ละสูตร

ใกล้เคียงกัน และทั้งสองสูตรมีสังคมาที่แยกออกจากกัน และพบตัวอย่างส่วนใหญ่อยู่ใน 2 phylum หลัก ได้แก่ phylum Ascomycota และ Basidiomycota ตามลำดับ โดยใน Bedding พบ Ascomycota สูงถึง 85.57% รองลงมาคือ PE2wo (79.41%) และ PE1w (60.38%) ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่ารานี้พบกระจายปกติได้ในส่วนมูลและส่วนน้ำหมักของปุ๋ยไส้เดือน ที่น่าสนใจอีกคือ Basidiomycota ที่พบมากใน EF ทั้งสองสูตร แต่ใน PE พบมากเฉพาะกรณีเลี้ยงด้วยหญ้าเนเปีย (PE1w และ PE2w) สนับสนุนความแตกต่างของสายพันธุ์ระหว่าง PE และ EF และสนับสนุนการใช้หญ้าเนเปียกรณีต้องการให้สายพันธุ์ไทยผลิตประชากรราในสัดส่วนคล้ายคลึงกับที่ได้จาก EF สำหรับไฟลัม Cryptomycota พบเด่นเฉพาะใน EF2wo (Cryptomycota เป็นราที่พบทั่วไปในแหล่งน้ำและบริเวณที่เปียกชื้น) แสดงให้เห็นว่า EF2wo มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มรานี้มากกว่า PE ซึ่งแนะอีกหนึ่งความแตกต่างจากสายพันธุ์ของไส้เดือน

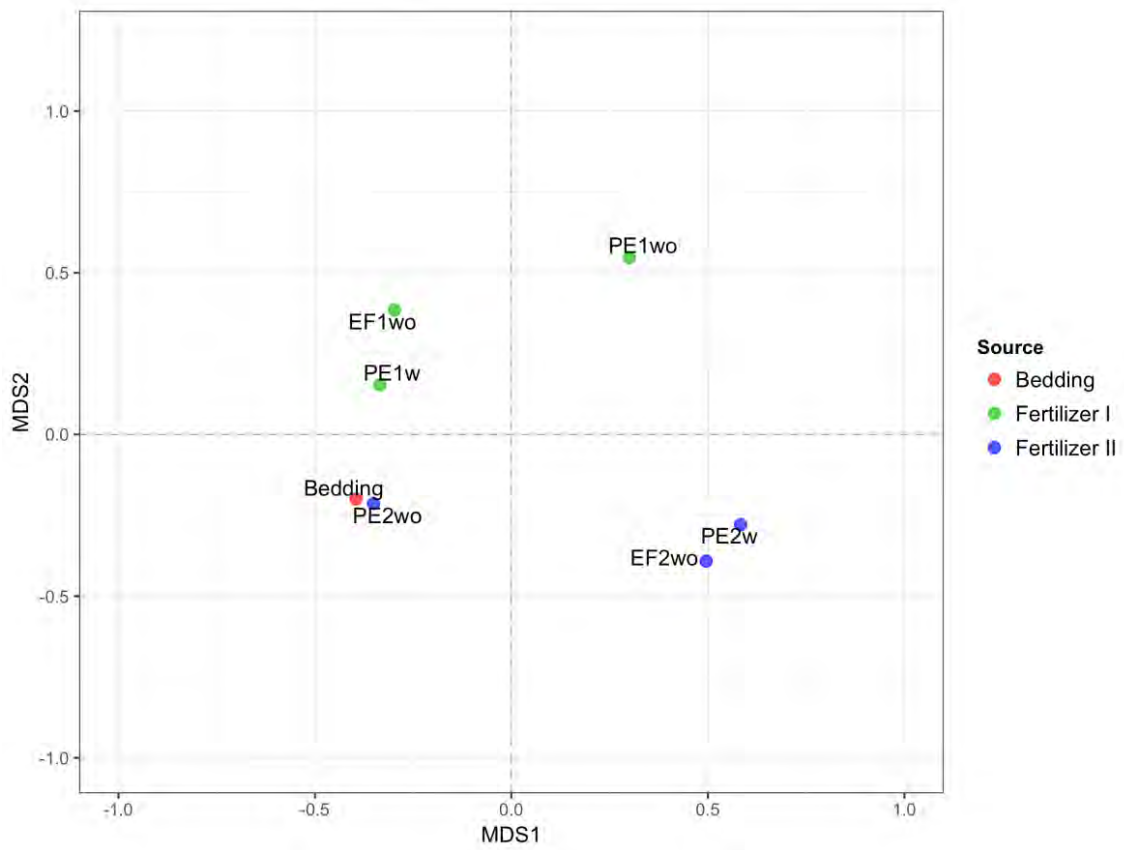
ในรูปที่ 27 เมื่อพิจารณารูปแบบโครงสร้างของสังคมาในระดับจีโนม เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม พบสังคมาในปุ๋ยสูตร 1 และสูตร 2 ค่อนข้างจับกลุ่มในทิศที่สามารถแยกจากกันได้ และสังคมาใน Bedding จะคล้ายกับในปุ๋ยสูตร 1 มากกว่าสูตร 2 เนื่องจาก สูตร 1 กับมุลมีความใกล้เคียงทางกายภาพมากกว่า นอกจากนี้ทั้งในสูตร 1 และ 2 พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไส้เดือนดิน (PE และ EF) ส่งผลต่อรูปแบบสังคมา และการเลี้ยงด้วยหญ้าเนเปียพบว่าทำให้สังคมา PE ใกล้เคียงกับ EF1/2wo ทั้งนี้สหสัมพันธ์ Pearson สามารถระบุ OTUs ที่มีผลต่อรูปแบบโครงสร้างประชากรราในปุ๋ยสูตร 1 ซึ่งมีหลายตัว อาทิ unclassified genus of families Ascomycota, Pleosporales, Sordariomycetes, Agaricales, Rhizophlyctidales, Agaricomycetes, Chytridiomycetes และ จีโนม Curvularia, Pseudorhizidium, Phyllosticta และ Mortierella เปรียบเทียบกับสูตร 2 มี unclassified genus of family Cryptomycota และยังสามารถระบุ OTUs ที่สัมพันธ์กับ PE1w (สามตัวแรกของที่ระบุก่อนหน้า) และกับ PE1wo (จีโนมที่เหลือของที่ระบุก่อนหน้า) (รูปที่ 28 และตารางที่ 19) นอกจากนี้มีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับปัจจัยคุณสมบัตินี้ แต่ไม่พบที่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อรูปแบบโครงสร้างประชากร จึงไม่ได้แสดงผล



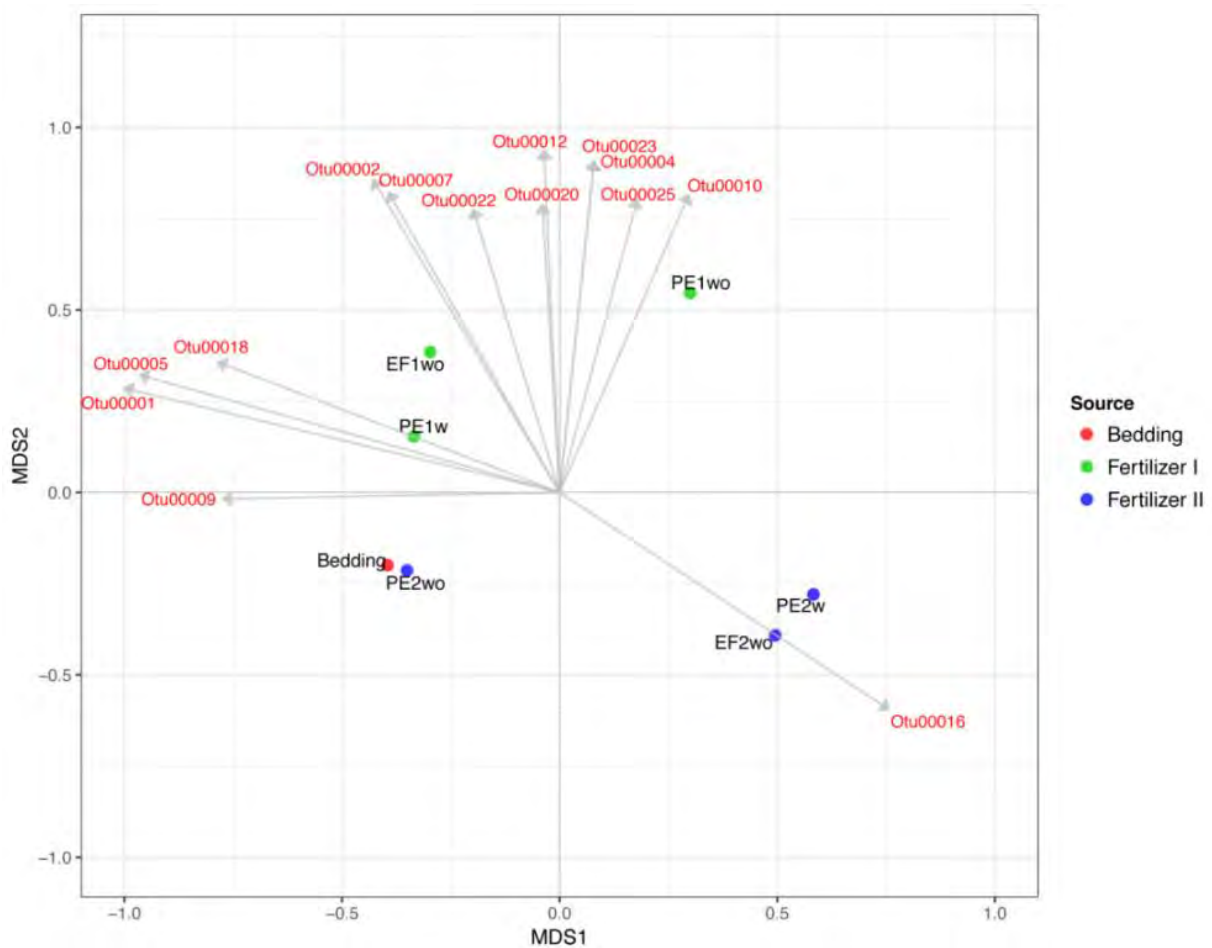
รูปที่ 25 ร้อยละของความหลากหลายของสังคมนาในระดับไฟลัม โดยสีแสดงถึงไฟลัม



รูปที่ 26 สัดส่วนความหลากหลายของราในระดับจีส ด้านซ้ายเป็นการจัดกลุ่มทางต้นไม้ ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะแสดงด้วยสีที่ต่างกัน และจีสที่มีสัดส่วนน้อยกว่า 1% ไม่ได้ถูกแสดงในภาพนี้



รูปที่ 27 NMDS แสดงระยะห่างระหว่างสังคมราที่ OTUs ระดับจีโนม อ้างอิงจาก Thetayc dissimilarity indices



รูปที่ 28 N-MDS สร้างจาก Thetayc dissimilarity พร้อมแสดง OTUs และสีแดงแสดงว่า OTUs นั้นมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับสังคมยูคาริโอต

ตารางที่ 19 OTUs ในระดับจีโนม ที่มีอิทธิพลต่อการโครงสร้างสังคมรา

OTUs	Taxonomy
Otu00001	Ascomycota_unclassified
Otu00002	Agaricales_unclassified
Otu00004	Zygomycota_unclassified
Otu00005	Pleosporales_unclassified
Otu00007	Curvularia
Otu00009	Aspergillus
Otu00010	Rhizophlyctidales_unclassified
Otu00012	Agaricomycetes_unclassified
Otu00016	Cryptomycota_unclassified
Otu00018	Sordariomycetes_unclassified
Otu00020	Pseudorhizidium
Otu00022	Phyllosticta

Otu00023 Chytridiomycetes_unclassified

Otu00025 Mortierella

สุดท้าย ข้อมูลไมโครไบโอมนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งกับแนวทางการพัฒนาปุ๋ย และในอนาคตกำลังดำเนินการวิเคราะห์ผลในรายละเอียดของแต่ละวัสดุปุ๋ยและร่วมกับผลจากแปลงเพาะปลูกว่าสอดคล้องกันกับประชากรจุลินทรีย์ที่พบหรือไม่ และผลผลิตเปรียบเทียบระหว่าง PE1/2wo และ EF1/2wo สายพันธุ์ใดให้ผลดีกว่ากัน ซึ่งสูตร 1 เหมาะสมสำหรับใส่บริเวณโคนต้น และสูตร 2 สำหรับฉีดใบและดอก และจำเป็นหรือไม่ที่ต้องปรับสายพันธุ์ PE ให้คล้าย EF

บทที่ 4

สรุปผล

ทุกวันนี้ ประชาชนทั่วไปและรัฐบาลมีความกระตือรือร้นเรื่องสิ่งแวดล้อม และประโยชน์จากทรัพยากร จุลินทรีย์มากขึ้น เพราะสังคมแบคทีเรียและราเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อสายใยอาหารที่อุดมสมบูรณ์และยั่งยืน เกิดตลาดและเทคนิคทางเกษตรสำหรับพืชอินทรีย์ขึ้น งานวิจัยนี้นำเสนอความหลากหลายที่เกี่ยวข้องกับ ปัญหาการทำไร่นาแบบเกษตรอุตสาหกรรมและปัญหาดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ค้นพบเทคนิคเกษตรกรรมและปุ๋ยในลักษณะการบรรยายที่เกี่ยวข้องกับไมโครไบโอม ทั้งประเภทโพรคาริโอต (แบคทีเรียและอาร์เคีย) และยูคาริโอต (ราและโพรโตซัว) ข้อมูลจากงานวิจัยนี้มี ประโยชน์ทั้งต่อวงวิชาการและประโยชน์ต่อสาธารณะ ทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับไมโครไบโอมที่สำคัญเพื่อ เปลี่ยนสภาพดินและแนวทางการปรับปรุงผลผลิตพืชพรรณในลักษณะที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ข้อดีและ ข้อเสียต่อนิเวศจุลินทรีย์ที่อาจสัมพันธ์กับปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินและวิธีการเตรียม (สายพันธุ์ไส้เดือนดินและ วิธีการเลี้ยงเช่น หลุ๋นาเปีย) ยกตัวอย่างเช่น ในงานวิจัยส่วนนี้พบว่า สามารถปรับไมโครไบโอมิตาของปุ๋ย หมักมูลไส้เดือนดินสายพันธุ์ไทย (PE) ให้ใกล้เคียงกับที่พบในสายพันธุ์ต่างประเทศ (EF) ได้ด้วยการใช้หญ้าเน เปียเป็นหนึ่งในวัตถุดิบในการเลี้ยง

ฐานข้อมูลทรัพยากรแบคทีเรีย อาร์เคีย และรา ที่ได้ยังเป็นข้อมูลอ้างอิงเพื่อนำไปศึกษาและ เปรียบเทียบ และการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในงานวิจัยต่อยอด ข้อมูลความแตกต่างในเชิงความหลากหลายของ ประชากรและเมตาบอลิซึม ช่วยให้เข้าใจกลไกในเชิงหน้าที่ของแต่ละตัวอย่างได้ดีขึ้น และควรมีการวิจัย เพิ่มเติมในเชิง เปรียบเทียบกับผลการเพาะปลูกเช่น อัตราผลผลิต ลักษณะของผลผลิต อาทิ แบคทีเรียบางกลุ่ม อาจช่วยให้ผลผลิตทนต่อเชื้อโรคมามากกว่าปกติ ความสัมพันธ์กับปริมาณยาหรือสารชีวภาพกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ และศึกษาเพิ่มเติมจากตัวอย่างปุ๋ยในแต่ละสูตรในเชิงการเตรียมที่ละเอียดขึ้นและในภาพรวมของทั้งระบบนิเวศ ของการเพาะปลูก ได้แก่ แหล่งน้ำ เป็นต้น

บทที่ 5

เอกสารอ้างอิง

- Agler, M., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S. -T., Weigel, D., et al. 2016. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. **PLoS Biology** 14(1): e1002352. doi: 10.1371/journal.pbio.1002352
- Bengtsson, J., Ahnström, J., and Weibull, A. -C. 2005. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a meta-analysis. **Journal of Applied Ecology** 42: 261–269.
- Berkelmans, R., Ferris, H., Tenuta, M., and van Bruggen, A. H. C. 2003. Effects of long-term crop management on nematode trophic levels other than plant feeders disappear after 1 year of disruptive soil management. **Applied Soil Ecology** 23: 223-235.
- Bossio, D. A., Scow, K. M., Gunapala, N., and Graham, K. J. 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. **Microbial Ecology** 36: 1-12.
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., et al. 2012. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature** 488: 91-95.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **International Society for Microbial Ecology** 6: 1621-1624.
- Chaiyasen, A., Young, J. P. W., Teaumroong, N., Gavinlertvatana, P., and Lumyong, S. 2014. Characterization of arbuscular mycorrhizal fungus communities of *Aquilaria crassna* and *Tectona grandis* roots and soils in Thailand plantations. **PLoS ONE** 9(11): e112591. doi:10.1371/journal.pone.0112591
- Chawanakul, S., Chaiprasert, P., Towprayoon, S., and Tanticharoen, M. 2009. Contributions of available substrates and activities of trophic microbial community to methanogenesis in vegetative and reproductive rice rhizospheric soil. **Journal of Environmental Biology** 30: 119-127.
- Chunjaturas, W., Ferguson, J. A., Rattanapichai, W., Sadowsky, M. J., and Sajjaphan, K. 2014. Shift of bacterial community structure in two Thai soil series affected by silver nanoparticles using ARISA. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 30: 2119-2124.

- Doi, R. and Ranamukhaarachchi, S. L. 2009. Correlations between soil microbial and physicochemical variations in a rice paddy: implications for assessing soil health. **Journal of Bioscience** 34: 969-976.
- Fedra, K., Winkelbauer, L., and Pantulu, V. R. 1991. **Expert systems for environmental screening. An application in the lower Mekong basin.** Laxenburg, Austria: International Institute for Applied Systems Analysis.
- Fonte, S. J., Winsome, T., and Six, J. 2009. Earthworm populations in relation to soil organic matter dynamics and management in California tomato cropping systems. **Applied Soil Ecology** 41: 206-214.
- Fukai, S., Sittisuang, P., and Chanphengsay, M. 1998. Increasing production of rainfed lowland rice in drought prone environments - a case study in Thailand and Laos. **Plant Production Science** 1: 75-82.
- Griffiths, B. S., Ritz, K., and Wheatley, R. E. 1994. Nematodes as indicators of enhanced microbiological activity in a Scottish organic farming system. **Soil Use and Management** 10: 20-24.
- Hole, D. G., Perkins, A. J., Wilson, J. D., Alexander, I. H., Grice, P. V., and Evans, A. D. 2005. Does organic farming benefit biodiversity? **Biological Conservation** 122: 133-130.
- Lakshmanan, V. 2015. Root microbiome assemblage is modulated by plant host factors. **Advance Botany Research** 75: 57-79.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. **Science** 304: 1623-1627.
- Letourneau, D. K., and Goldstein, B. 2001. Pest damage and arthropod community structure in organic vs. conventional tomato production in California. **Journal of Applied Ecology** 38: 557-570.
- National Economic and Social Development Board (NESDB). 2005. **Macro economic out look: gross regional product and national income.** National Economic and Social Development Board, Thailand [<http://www.nesdb.go.th>].
- Office of Agricultural Economics (OAE), Thailand. <http://www.oae.go.th/oaenew/OAE/index.html>
- Paull, J. 2011. Attending the First Organic Agriculture Course: Rudolf Steiner's Agriculture Course at Koberwitz, 1924. **European Journal of Social Sciences** 21: 64-70.
- Qin, Y., Druzhinina, I. S., Pan, X., and Yuan, Z. 2016. Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. **Biotechnology Advances** 34: 1245-1259.

- Rigby, D., and Cáceres, D. 2001. Organic farming and the sustainability of agricultural systems. **Agricultural Systems** 68: 21-40.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology** 75: 7537-7541.
- Schmidt, J. E., Bowles, T. M., and Gaudin, A. C. M. 2016. Using ancient traits to convert soil health into crop yield: impact of selection on maize root and rhizosphere function. **Frontiers in Plant Science** 7: 373. doi: 10.3389/fpls.2016.00373
- Seufert, V., Ramankutty, N., and Foley, J. A. 2012. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. **Nature** 485: 229-234.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S., Vangnai, A. S., Sangthean, P., and Singkibut, S. 2015. Profenofos insecticide degradation by novel microbial consortium and isolates enriched from contaminated chili farm soil. **Environmental Science and Pollution Research** 22: 320-328.
- Somboonna, N. 2015. **Microbiome representing fertile and healthy soils.** Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund 2013 of Chulalongkorn University (CU-56-463-FW).
- Sooksa-Nguan, T., Gypmantasiri, P., Boonkerd, N., Thies, J. E., and Teaumroong, N. 2010. Changes in bacterial community composition in the system of rice intensification (SRI) in Chiang Mai, Thailand. **Microbes and Environments** 25: 224-227.
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., and Dufresne, A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytology** 206: 1196-1206.