

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน

1.1 เปอร์เซ็นต์ความชื้น

พบว่าดินจากพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 5 (A₁) ซึ่งมีลักษณะเป็นป่าไผ่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 30.06% และดินจากพื้นที่บริเวณริมแม่น้ำแควน้อยตำแหน่งเก็บที่ 1 (C₁) มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยต่ำที่สุด เท่ากับ 14.06% ส่วนเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลา มีค่าสูงสุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 เดือนมกราคม เท่ากับ 25.09% และต่ำที่สุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 เดือนมีนาคม เท่ากับ 20.61% ดังตารางที่ 7 (ภาพที่ 8 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความชื้นในดิน พื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี

ตัวอย่างดิน	เปอร์เซ็นต์ความชื้น			
	ครั้งที่ 1 มีนาคม 2545	ครั้งที่ 2 กรกฎาคม 2545	ครั้งที่ 3 มกราคม 2546	เฉลี่ย
A ₁	30.72	39.28	20.19	30.06
B ₁	24.22	30.85	19.47	24.85
C ₁	10.62	6.71	24.84	14.06
C ₂	16.13	20.92	35.50	24.18
C ₃	21.36	25.25	25.47	24.03
เฉลี่ย	20.61	24.60	25.09	

1.2 เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ

พบว่าดินจากพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 5 (A₁) ซึ่งมีลักษณะเป็นป่าไผ่มีเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 9.10% และดินจากพื้นที่บริเวณริมแม่น้ำแควน้อยตำแหน่งเก็บที่ 1 (C₁) มีเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุเฉลี่ยต่ำที่สุด เท่ากับ 0.52% ส่วนเปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลา มีค่าสูงสุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 เดือนมีนาคม เท่ากับ 3.86% และต่ำที่สุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 เดือนมกราคม เท่ากับ 3.07% ดังตารางที่ 8 (ภาพที่ 8 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 8 เปรอ์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดิน พื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี

ตัวอย่างดิน	เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ			
	ครั้งที่ 1 มีนาคม 2545	ครั้งที่ 2 กรกฎาคม 2545	ครั้งที่ 3 มกราคม 2546	เฉลี่ย
A_1	10.05	8.86	8.40	9.10
B_1	6.17	4.81	4.75	5.24
C_1	0.45	0.43	0.68	0.52
C_2	1.29	2.05	0.41	1.25
C_3	1.34	1.87	1.13	1.45
เฉลี่ย	3.86	3.60	3.07	

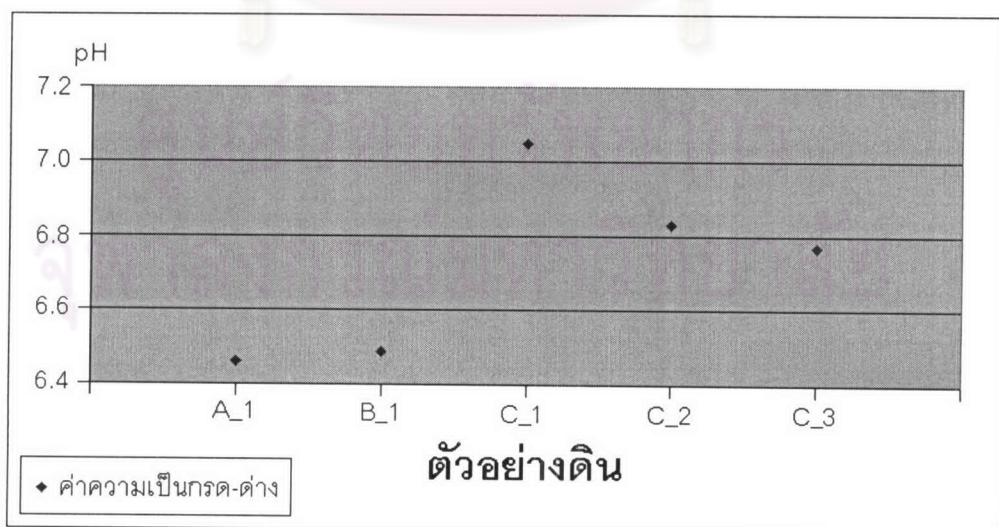
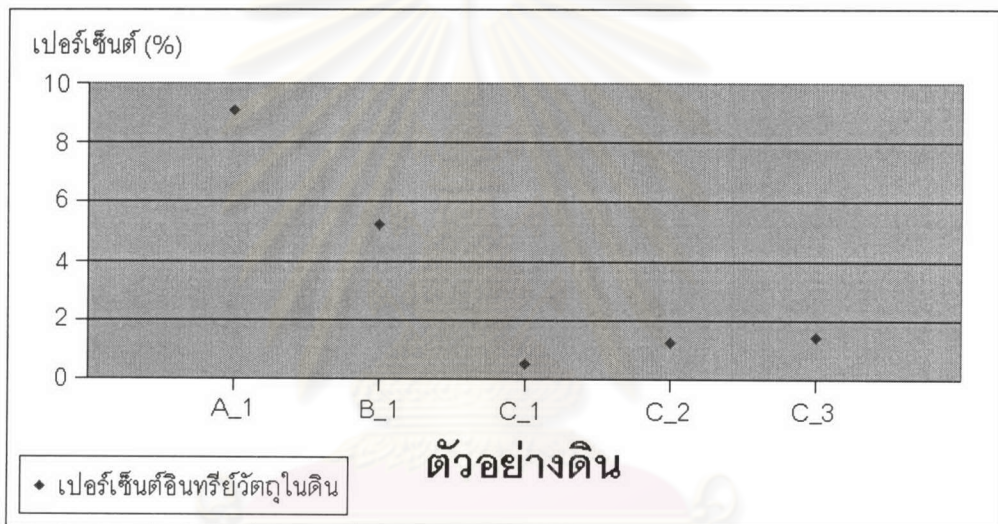
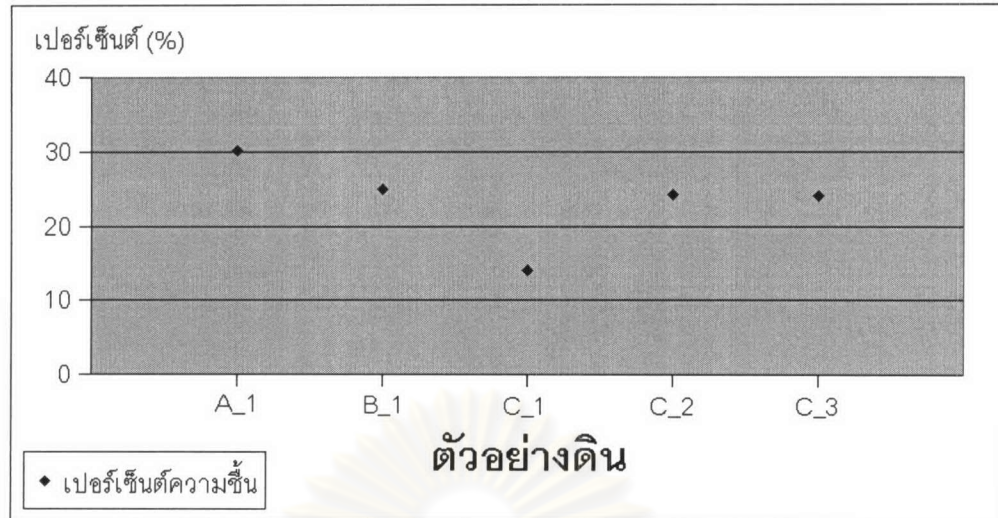
1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH)

พบว่าดินจากพื้นที่บริเวณริมแม่น้ำแควน้อยตำแหน่งเก็บที่ 1 (C_1) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 7.05 และดินจากพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 5 (A_1) ซึ่งมีลักษณะเป็นป่าไผ่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยต่ำที่สุดเท่ากับ 6.46 ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลา มีค่าสูงสุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 เดือนมีนาคม เท่ากับ 6.74 และต่ำที่สุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 เดือนกรกฎาคม เท่ากับ 6.67 ดังตารางที่ 9 (ภาพที่ 8 และภาพที่ 9)

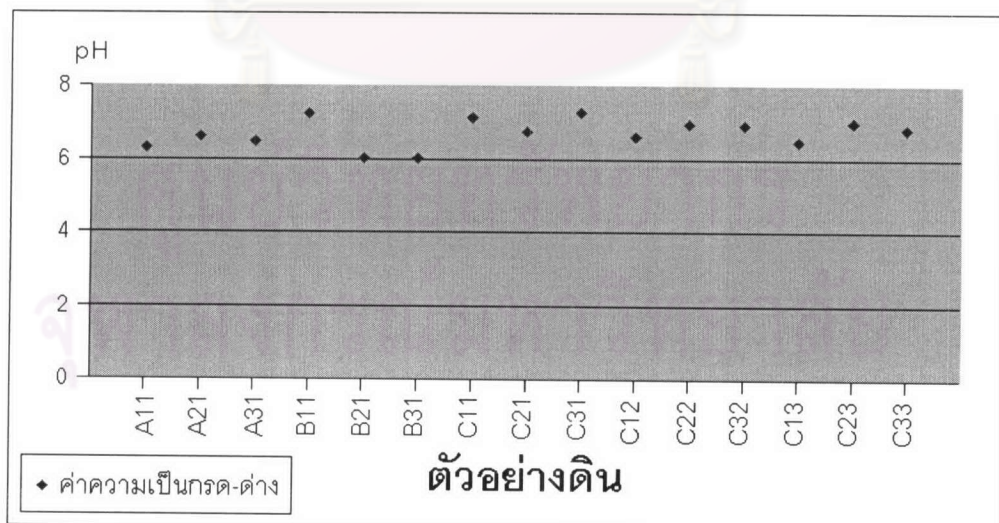
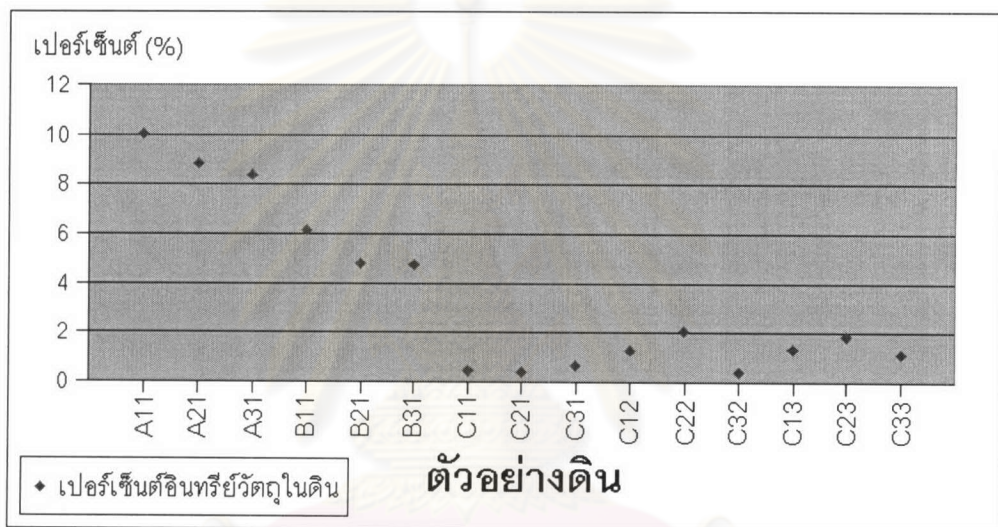
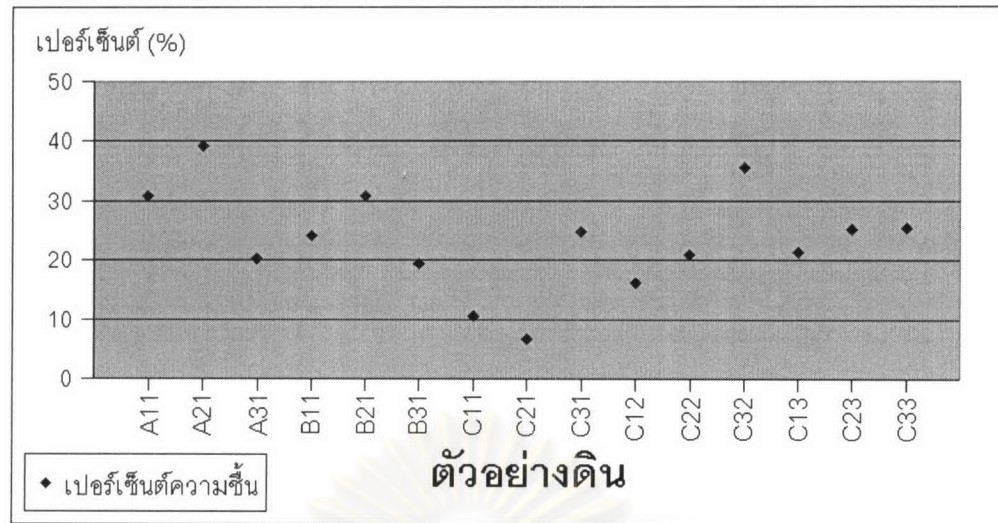
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ค่าความเป็นกรด-ด่างในดิน พื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดกาญจนบุรี

ตัวอย่างดิน	ค่าความเป็นกรด-ด่าง											
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			เฉลี่ยรวม		
	มีนาคม 2545			กรกฎาคม 2545			มกราคม 2546					
	suspension	supernatant	เฉลี่ย	suspension	supernatant	เฉลี่ย	suspension	supernatant	เฉลี่ย	suspension	supernatant	เฉลี่ย
A_1	5.97	6.61	6.29	6.21	7.03	6.62	6.37	6.57	6.47	6.37	6.57	6.46
B_1	7.19	7.30	7.25	5.84	6.20	6.02	5.86	6.17	6.02	5.86	6.17	6.49
C_1	7.00	7.25	7.13	6.95	6.55	6.75	7.44	7.07	7.26	7.44	7.07	7.05
C_2	6.15	7.05	6.60	6.86	7.07	6.97	7.09	6.75	6.92	7.09	6.75	6.83
C_3	6.35	6.61	6.48	6.96	7.04	7.00	6.68	6.96	6.82	6.68	6.96	6.77
เฉลี่ย	6.53	6.96		6.56	6.78		6.69	6.70		6.69	6.70	
เฉลี่ยรวม	6.74			6.67			6.70					



ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์ดินอินทรีย์วัตถุในดิน และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของดินที่เก็บจากแหล่งต่างๆ



ภาพที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุในดิน และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของดินที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในช่วงเวลาต่างๆกัน

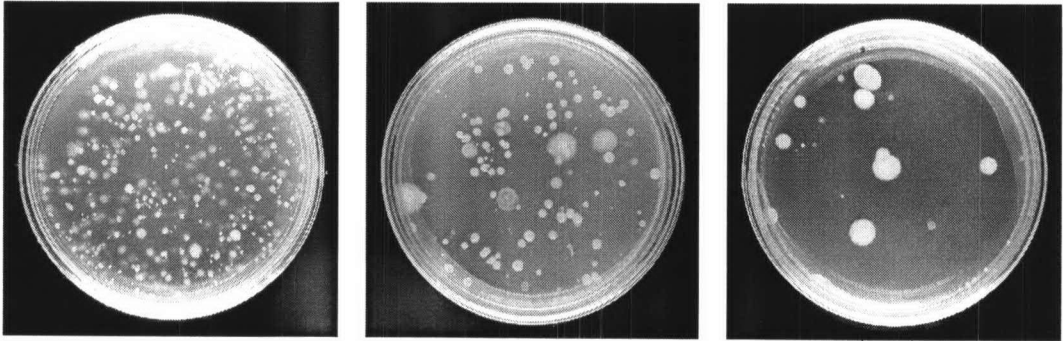
2. การคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่มดีในทริฟายเออร์จากดิน

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total count)

ตัวอย่างดินที่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากที่สุด คือ ตัวอย่างดิน C22 มี 182×10^5 CFU/g ส่วนตัวอย่างดินที่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดน้อยที่สุด คือ ตัวอย่างดิน A21 มี 107×10^3 CFU/g จากตัวอย่างดินทั้งหมดสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียตามลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการสุ่มได้ 211 ไอโซเลต ดังตารางที่ 10 โดยส่วนใหญ่ได้มาจากดินที่มีความเจือจาง 10^{-4}

ตารางที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g) และจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ (ไอโซเลต)

ตัวอย่างดิน	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g)	จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ (ไอโซเลต)
A11	6.63×10^5	11
B11	1.11×10^6	12
C11	1.86×10^5	9
C12	1.05×10^6	7
C12	1.24×10^6	12
A21	1.07×10^5	9
B21	1.88×10^5	15
C21	1.54×10^5	12
C22	1.82×10^7	24
C23	8.5×10^5	15
A31	1.81×10^5	24
B31	6.0×10^5	17
C31	2.24×10^6	16
C32	1.66×10^5	13
C33	1.10×10^6	15
รวม		211



ความเจือจาง 10^{-3}

ความเจือจาง 10^{-4}

ความเจือจาง 10^{-5}

ภาพที่ 10 การทำ soil dilution plate count

2.2 การทดสอบคุณสมบัติการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันเบื้องต้นของแบคทีเรีย

สังเกตพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตฟองก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซได้ 16 ไอโซเลต พวกที่สะสมไนโตรเจน 57 ไอโซเลต ซึ่งในจำนวนนั้นเป็นพวกที่ผลิตฟองก๊าซด้วย 7 ไอโซเลต และพวกที่ไม่ทำให้เกิดการรีดิวซ์ไนเตรตอีก 151 ไอโซเลต ซึ่งในจำนวนนั้นเป็นพวกที่ผลิตฟองก๊าซขึ้นด้วย 6 ไอโซเลต นอกจากนี้ยังพบว่าทุกไอโซเลตสามารถผลิตแอมโมเนียได้

แบคทีเรียที่ผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ สรุปลำดับตารางที่ 11 (รูปที่ 11 - รูปที่ 14)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แบบที่เรียที่ทดสอบแล้วพบว่ามีความสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนริฟิเคชัน

ลำดับที่	ไอโซเลต	ฟองก๊าซ	ไนไตรต์	ไนเตรต	แอมโมเนีย
1	B11-3	+	-	-	+
2	C11-5	+	-	-	+
3	C22-5	+	-	+	+
4	C22-14	+	-	+	+
5	C22-18	+	+	NT	+
6	C22-24	+	-	+	+
7	C23-1	+	+	NT	+
8	C23-5	+	+	NT	+
9	C23-15	+	+	NT	+
10	A31-18	+	-	+	+
11	C32-2	+	-	-	+
12	C32-5	+	-	+	+
13	C32-6	+	-	+	+
14	C32-7	+	+	NT	+
15	C32-13	+	+	NT	+
16	C33-1	+	+	NT	+
	Control	-	-	+	+

+ พบสารดังกล่าว

- ไม่พบแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต

NT ไม่ได้ทำการทดสอบ (No Test)

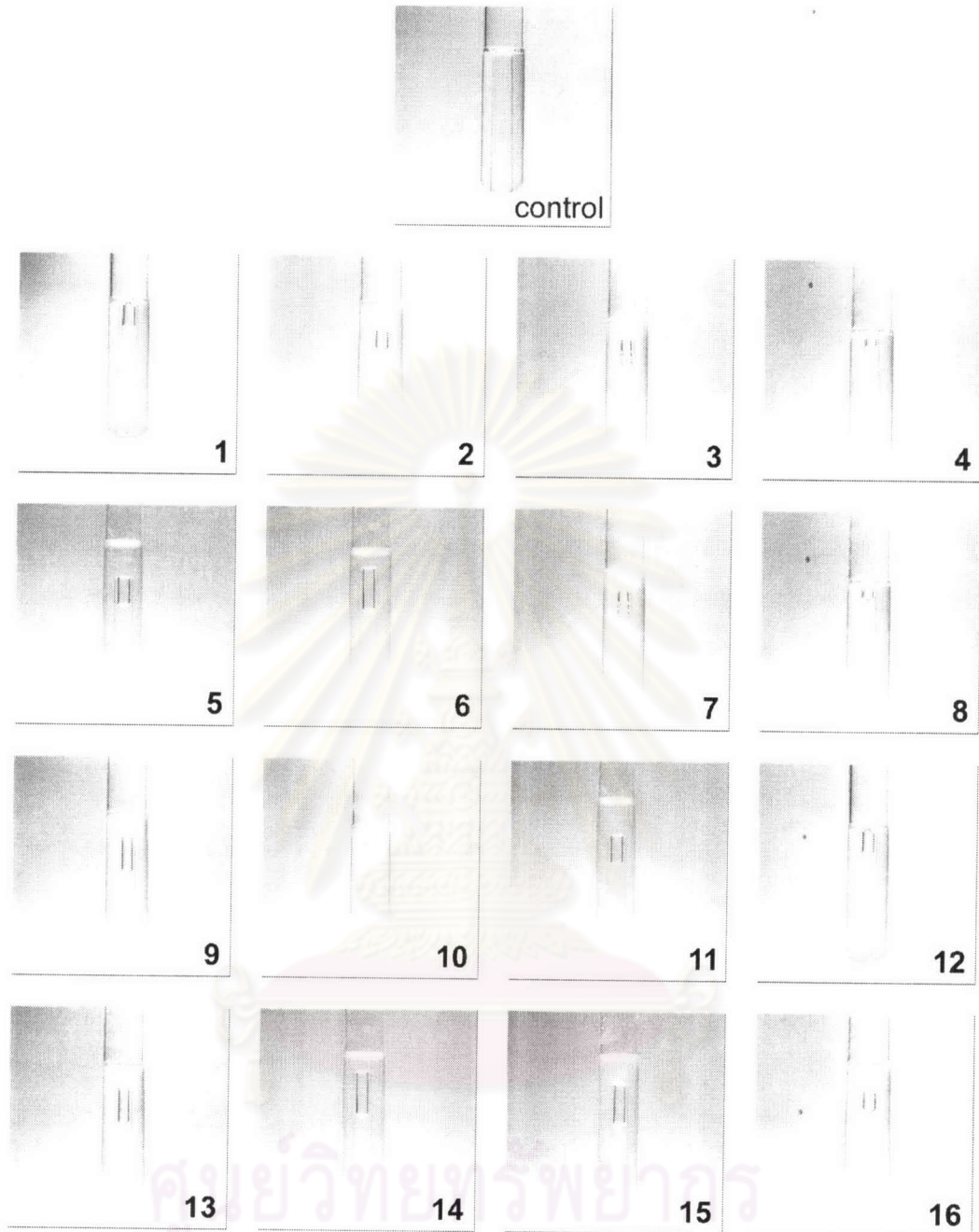
หมายเหตุ

A คือ ไอโซเลตที่แยกได้จากดินบริเวณป่าทุ่งหญ้าที่ 5

B คือ ไอโซเลตที่แยกได้จากดินบริเวณป่าทุ่งหญ้าที่ 3

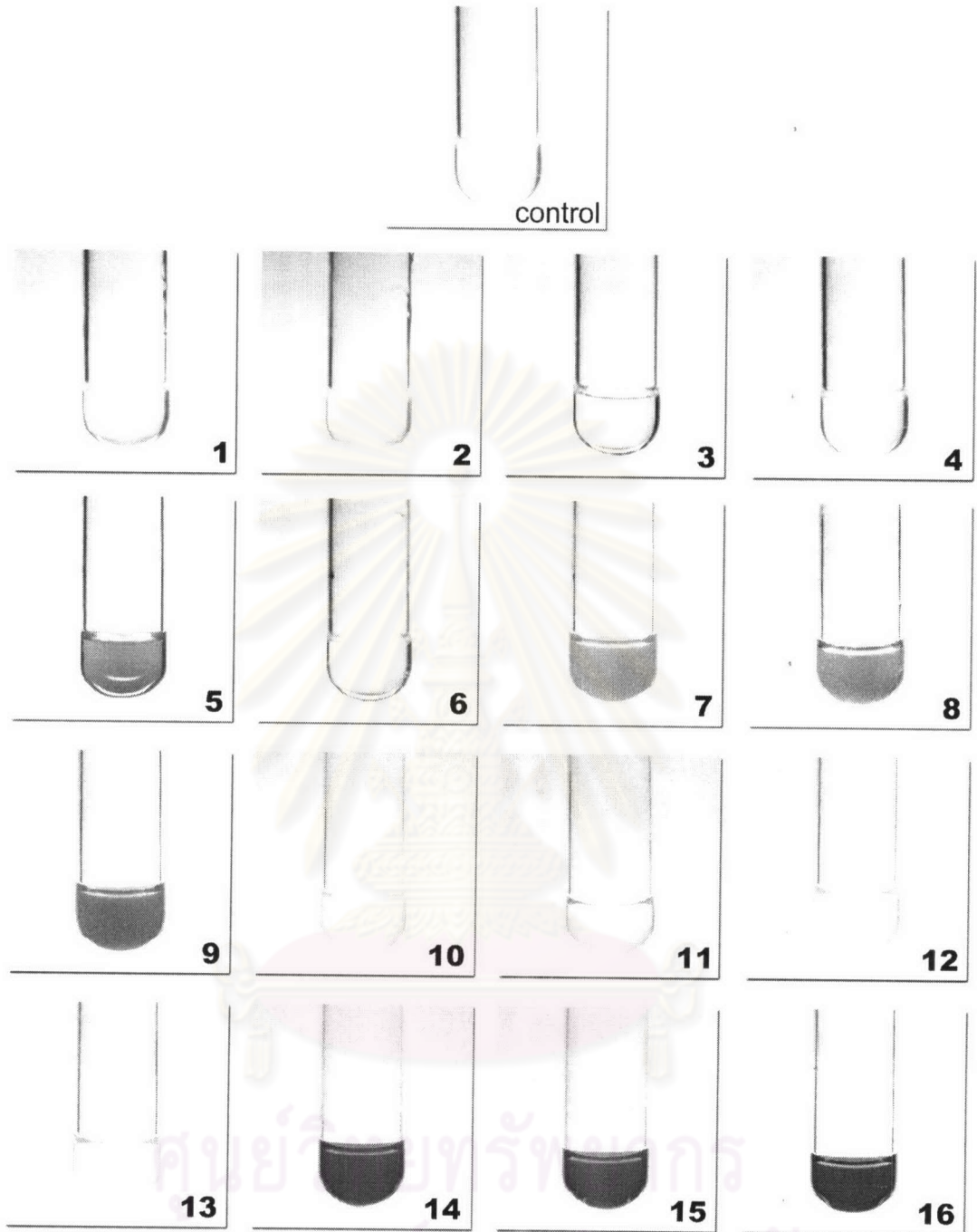
C คือ ไอโซเลตที่แยกได้จากดินบริเวณริมแม่น้ำแควน้อย

ตัวเลข คือ ครั้งที่เก็บตัวอย่าง ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง และไอโซเลต ตามลำดับ



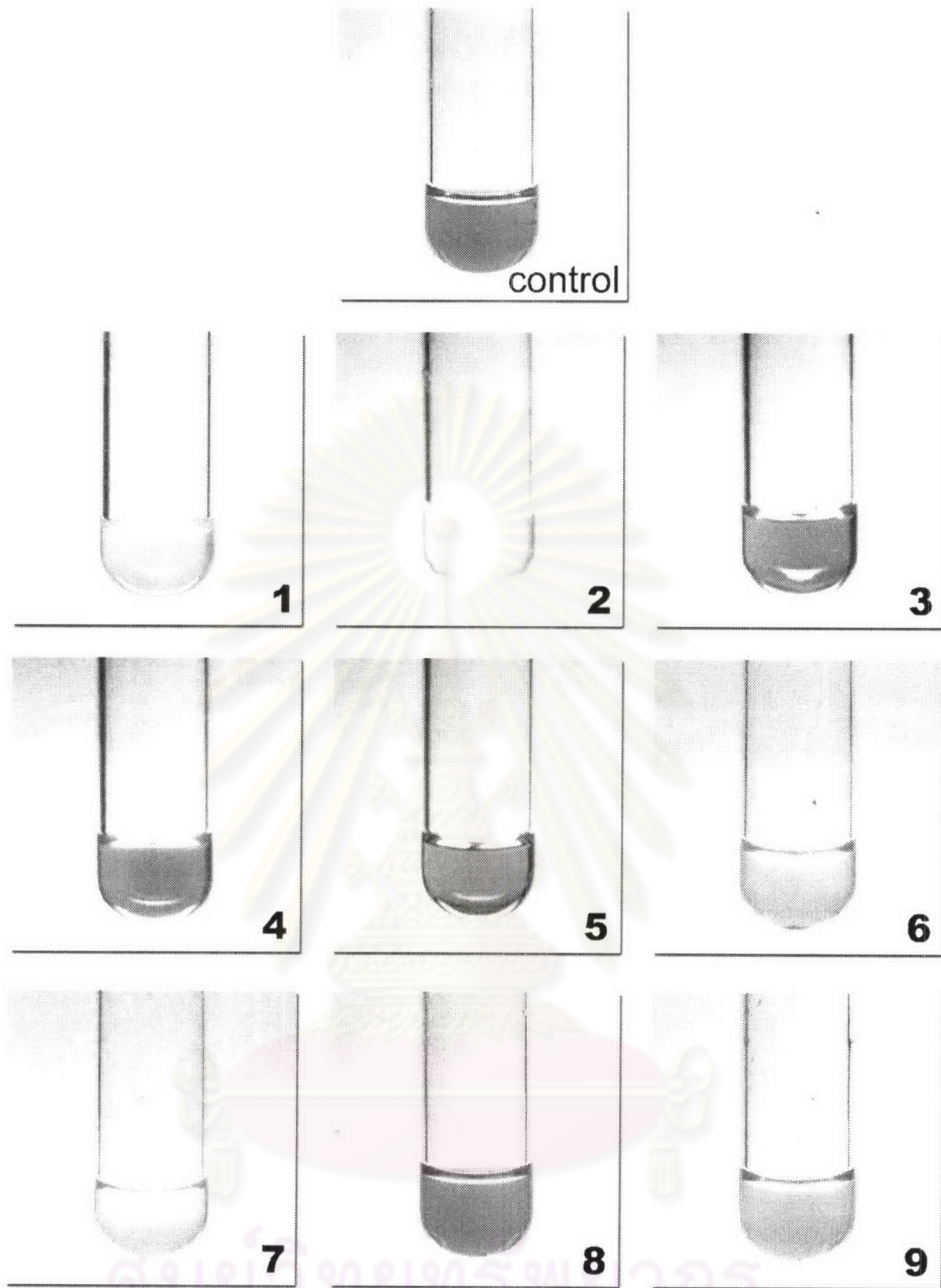
ภาพที่ 11 ผลการสังเกตฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ

- 1 = ไอโซเลต B11-3 2 = ไอโซเลต C11-5 3 = ไอโซเลต C22-5 4 = ไอโซเลต C22-14
 5 = ไอโซเลต C22-18 6 = ไอโซเลต C22-24 7 = ไอโซเลต C23-1 8 = ไอโซเลต C23-5
 9 = ไอโซเลต C23-15 10 = ไอโซเลต A31-18 11 = ไอโซเลต C32-2 12 = ไอโซเลต C32-5
 13 = ไอโซเลต C32-6 14 = ไอโซเลต C32-7 15 = ไอโซเลต C32-13 16 = ไอโซเลต C33-1



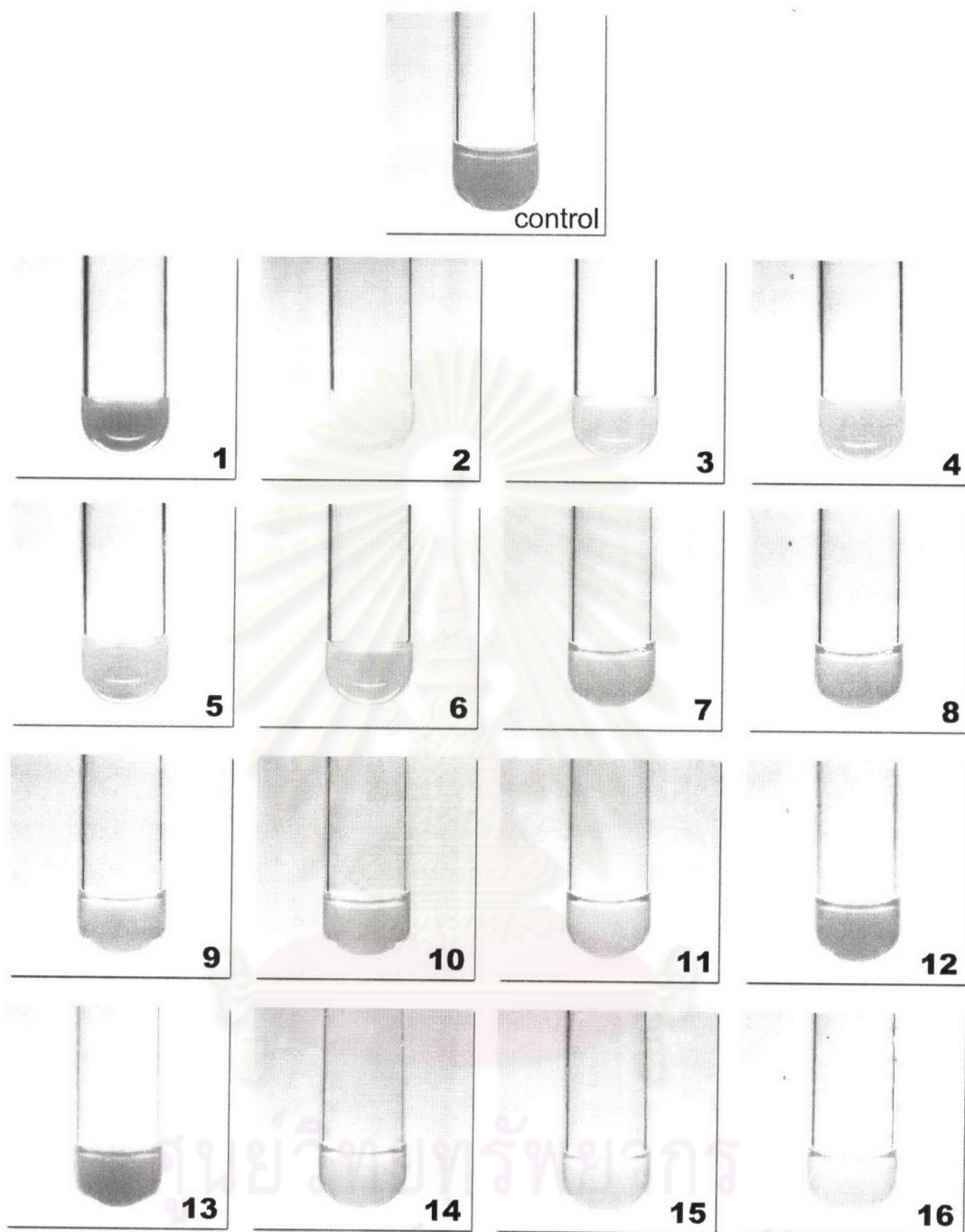
ภาพที่ 12 ผลการทดสอบไนไตรต์ หลอดที่มีไนไตรต์จะปรากฏสีแดงหรือสีน้ำตาลแดง

- | | | | |
|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| 1 = ไอโซเลต B11-3 | 2 = ไอโซเลต C11-5 | 3 = ไอโซเลต C22-5 | 4 = ไอโซเลต C22-14 |
| 5 = ไอโซเลต C22-18 | 6 = ไอโซเลต C22-24 | 7 = ไอโซเลต C23-1 | 8 = ไอโซเลต C23-5 |
| 9 = ไอโซเลต C23-15 | 10 = ไอโซเลต A31-18 | 11 = ไอโซเลต C32-2 | 12 = ไอโซเลต C32-5 |
| 13 = ไอโซเลต C32-6 | 14 = ไอโซเลต C32-7 | 15 = ไอโซเลต C32-13 | 16 = ไอโซเลต C33-1 |



ภาพที่ 13 ผลการทดสอบไนเทรต หลอดที่มีไนเทรตเหลืออยู่จะปรากฏสีแดงหรือสีน้ำตาลแดง

- | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 = ไอโซเลต B11-3 | 2 = ไอโซเลต C11-5 | 3 = ไอโซเลต C22-5 |
| 4 = ไอโซเลต C22-14 | 5 = ไอโซเลต C22-24 | 6 = ไอโซเลต A31-18 |
| 7 = ไอโซเลต C32-2 | 8 = ไอโซเลต C32-5 | 9 = ไอโซเลต C32-6 |



ภาพที่ 14 ผลการทดสอบแอมโมเนีย หลอดที่มีแอมโมเนียจะปรากฏสีเหลืองถึงสีน้ำตาล

- | | | | |
|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| 1 = ไอโซเลต B11-3 | 2 = ไอโซเลต C11-5 | 3 = ไอโซเลต C22-5 | 4 = ไอโซเลต C22-14 |
| 5 = ไอโซเลต C22-18 | 6 = ไอโซเลต C22-24 | 7 = ไอโซเลต C23-1 | 8 = ไอโซเลต C23-5 |
| 9 = ไอโซเลต C23-15 | 10 = ไอโซเลต A31-18 | 11 = ไอโซเลต C32-2 | 12 = ไอโซเลต C32-5 |
| 13 = ไอโซเลต C32-6 | 14 = ไอโซเลต C32-7 | 15 = ไอโซเลต C32-13 | 16 = ไอโซเลต C33-1 |

2.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 211 ไอโซเลต พบว่ามี 49 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจนได้ และในจำนวนนี้เป็นไอโซเลตที่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ 7 ไอโซเลต ดังสรุปในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ความสามารถของแบคทีเรียในการเจริญบน nitrate agar

ไอโซเลต	การเจริญบน nitrate agar	ไอโซเลต	การเจริญบน nitrate agar
B11-3	+	C23-15	+
C11-5	-	A31-18	+
C22-5	+	C32-2	-
C22-14	+	C32-5	-
C22-18	+	C32-6	-
C22-24	+	C32-7	-
C23-1	-	C32-13	-
C23-5	-	C33-1	-

+ พบการเจริญบน nitrate agar

- ไม่พบการเจริญบน nitrate agar

2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (identification of bacteria)

2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ

2.4.1.1 การย้อมสีแบบแกรม (gram's stain)

พบว่าในแบคทีเรีย 16 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ มี 14 ไอโซเลต ติดสีแกรมลบ และมีรูปร่างเป็นแท่ง ส่วนอีก 2 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม ดังสรุปในตารางที่ 13 และภาพที่ 13

2.4.1.2 การทดสอบออกซิเดส (oxidase test)

พบว่าในแบคทีเรีย 16 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซมี 15 ไอโซเลต ให้ผลบวกกับการทดสอบออกซิเดส ส่วนอีก 1 ไอโซเลต ให้ผลเป็นลบ ดังสรุปในตารางที่

2.4.1.3 การทดสอบคาทาเลส (catalase test)

พบว่าในแบคทีเรีย 16 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ มี 12 ไอโซเลต ให้ผลบวกกับการทดสอบคาทาเลส ส่วนอีก 4 ไอโซเลต ให้ผลเป็นลบ ดังสรุปในตารางที่ 13

นอกจากนี้ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 16 ไอโซเลต ที่เจริญบนอาหาร nutrient agar ยังสรุปไว้ในตารางที่ 13 ด้วย (รูปที่ 13)

ตารางที่ 13 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	รูปร่าง	การทดสอบออกซิเดส	การทดสอบคาทาเลส
B11-3	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	++++
C11-5	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	+++
C22-5	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	-
C22-14	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	-
C22-18	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	++
C22-24	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	-
C23-1	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	++
C23-5	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	++
C23-15	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	++
A31-18	สีเหลืองสด ผิวเรียบ ขอบเรียบเยঁม	แกรมลบ	แท่ง	-	+++
C32-2	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	-
C32-5	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมบวก	กลม	+	++++
C32-6	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมบวก	กลม	+	++++
C32-7	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	+
C32-13	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	++
C33-1	สีนวล ผิวเรียบ ขอบเรียบ เยঁม	แกรมลบ	แท่ง	+	+

สำหรับการทดสอบออกซิเดส

+ ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

- ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

สำหรับการทดสอบคาทาเลส

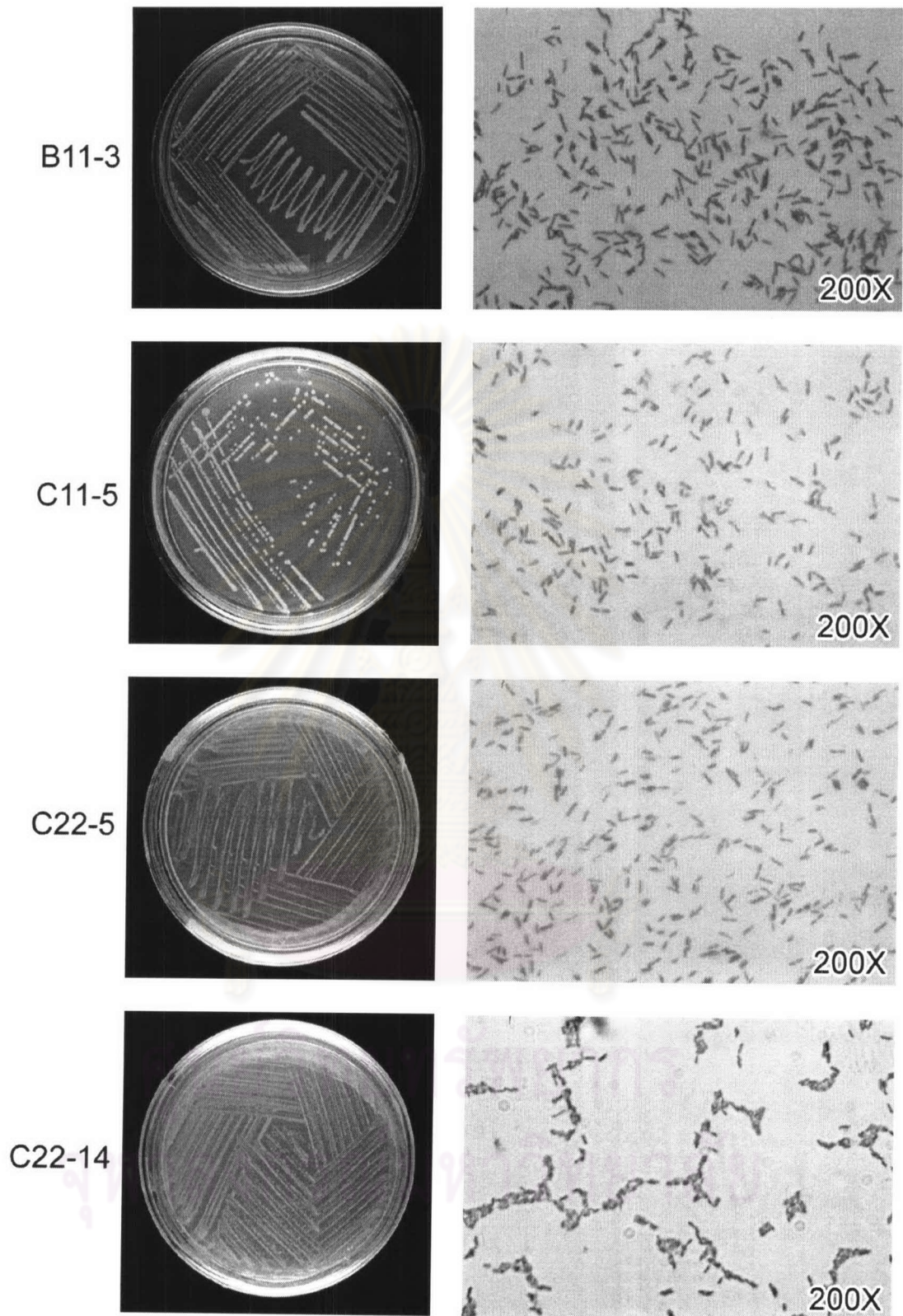
++++ เกิดฟองมากที่สุด

+++ เกิดฟองมาก

++ เกิดฟองปานกลาง

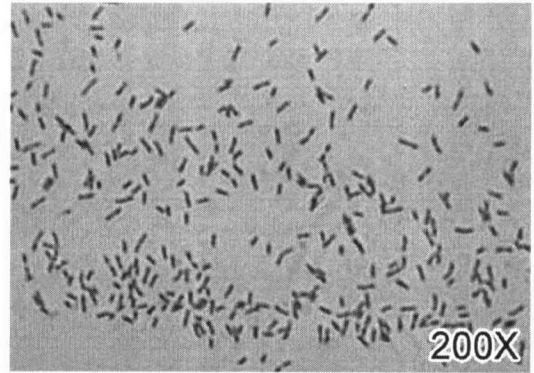
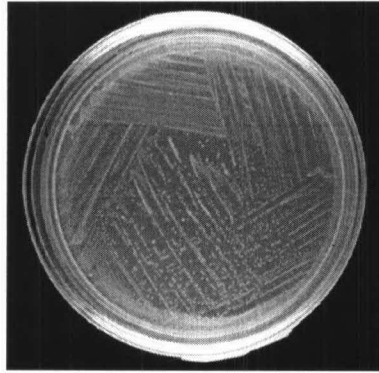
+ เกิดฟองน้อย

- ไม่เกิดฟอง

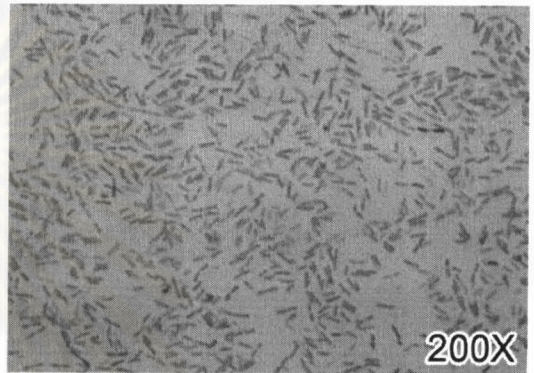
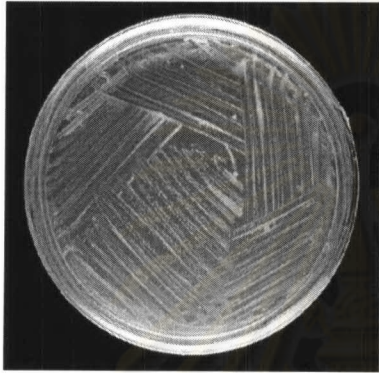


ภาพที่ 15 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar และการย้อมสีแบบแกรม

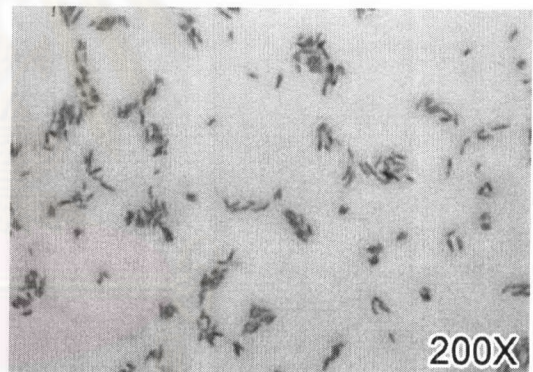
C22-18



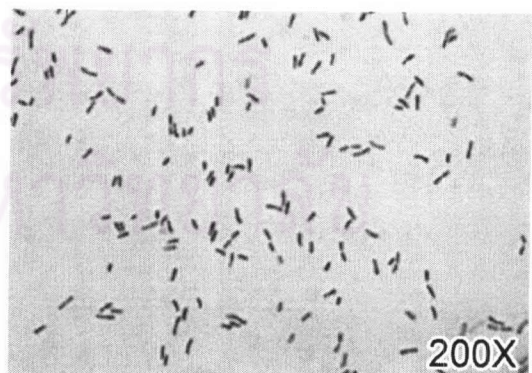
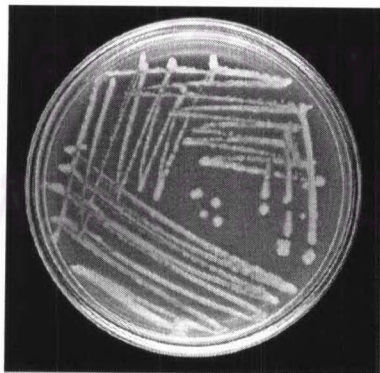
C22-24



C23-1

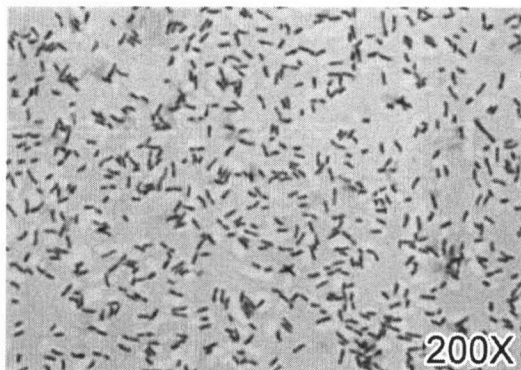
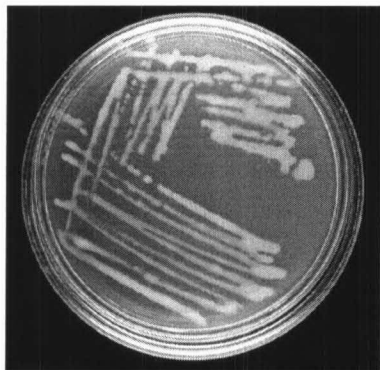


C23-5

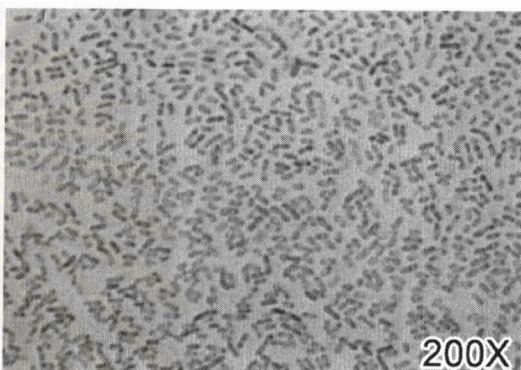
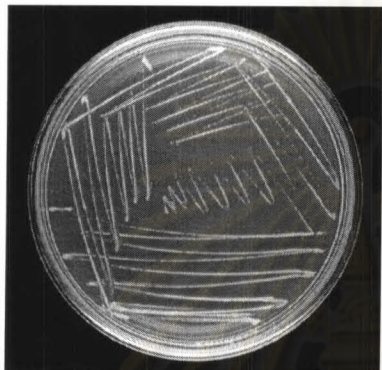


ภาพที่ 15 (ต่อ)

C23-15



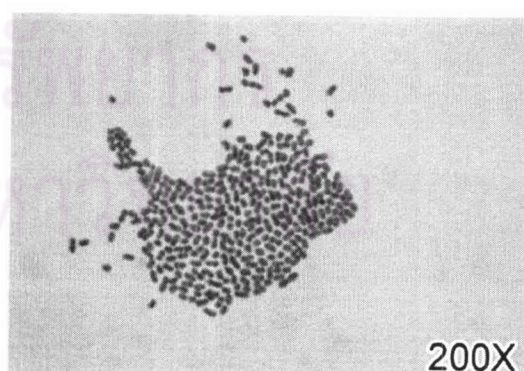
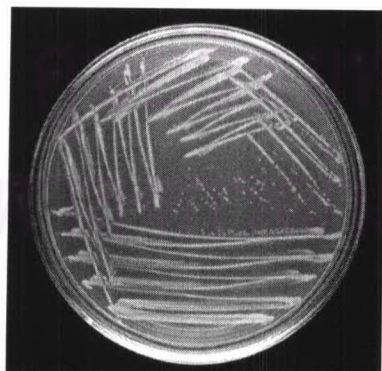
A31-18



C32-2

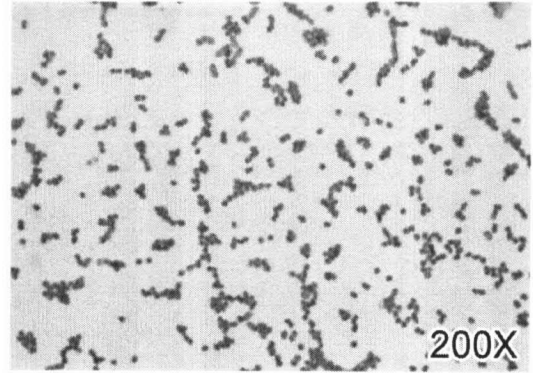
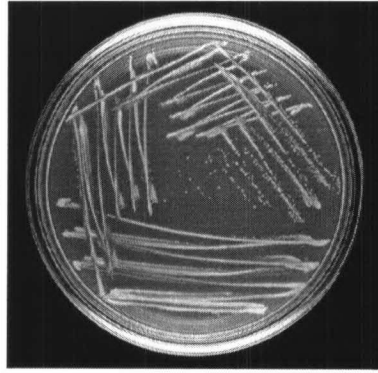


C32-5

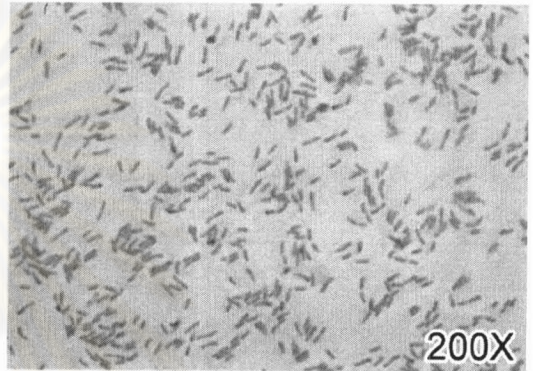
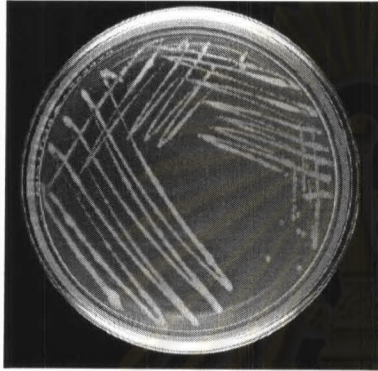


ภาพที่ 15 (ต่อ)

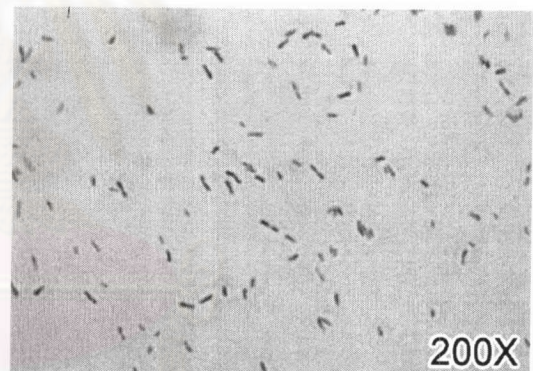
C32-6



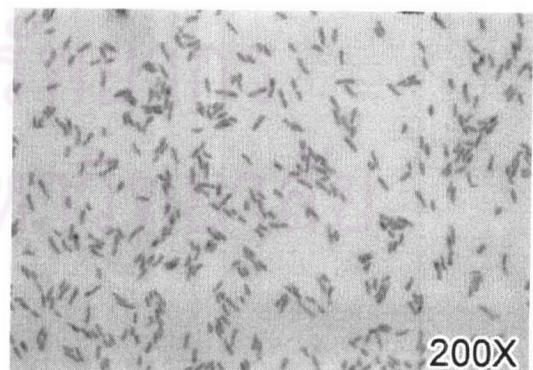
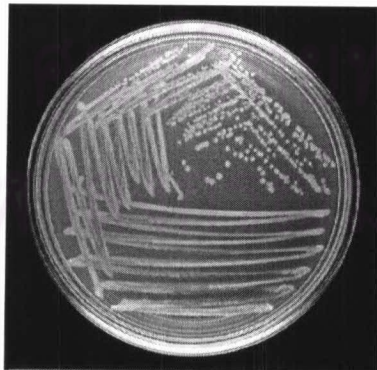
C32-7



C32-13



C33-1



ภาพที่ 15 (ต่อ)

2.4.2 การทดสอบทางชีวเคมี โดยใช้ชุดทดสอบ API

ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ ทำให้สามารถเลือกชุดทดสอบ API ได้ 3 ชุดด้วยกัน คือ API 20NE, API Staph และ API Coryne โดยที่แบคทีเรียรหัส B11-3, C11-5, C22-5, C22-14, C22-18, C22-24, C23-1, C23-5, C23-15, C32-2 และ C32-7 ใช้ชุดทดสอบ API 20NE แบคทีเรียรหัส C32-5 และ C32-6 ใช้ชุดทดสอบ API Staph ส่วนแบคทีเรียรหัส A31-18 ใช้ชุดทดสอบ API Coryne

ผลการทดสอบสรุปไว้ ดังตารางที่ 14, 15 และ 16 ตามลำดับ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 20NE

ไอโซเลต	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLUJ	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNTJ	CAP	ADJI	MLTJ	CITJ	PACJ
B11-3	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
C11-5	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
C22-5	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
C22-14	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
C22-18	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
C22-24	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
C23-1	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
C23-5	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
C23-15	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
C32-2	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
C32-7	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
C32-13	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
C33-1	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-

+ สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้

- ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้

สัญลักษณ์ในการทดสอบในชุดทดสอบ API 20NE

NO ₃	=	nitrate reduction
TRP	=	indole production
GLU	=	glucose utilization
ADH	=	arginine dihydrolase
URE	=	urease test
ESC	=	esculin hydrolysis
GEL	=	gelatine hydrolysis
PNPG	=	β-galactosidase test
[GLU]	=	glucose assimilation
[ARA]	=	arabinose assimilation
[MNE]	=	mannose assimilation
[MAN]	=	mannitol assimilation
[NAG]	=	N-acetyl-glucosamine assimilation
[MAL]	=	maltose assimilation
[GNT]	=	gluconate assimilation
[CAP]	=	caprate assimilation
[ADI]	=	adipate assimilation
[MLT]	=	malate assimilation
[CIT]	=	citrate assimilation
[PAC]	=	phenyl-acetate assimilation

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Staph

ไอโซเลต	O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
C32-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C32-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+ สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้

- ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้

สัญลักษณ์ในการทดสอบในชุดทดสอบ API Staph

O	=	Negative control of carbohydrate utilization (acidification)	NIT	=	Reduction of nitrates to nitrites
GLU	=	Positive control of carbohydrate utilization	PAL	=	Alkaline Phosphatase Test
FRU	=	D-Fructose utilization	VP	=	Voges Prosaure Test
MNE	=	D-Mannose utilization	RAF	=	Raffinose utilization
MAL	=	D-Maltose utilization	XYL	=	Xylose utilization
LAC	=	D-Lactose utilization	SAC	=	Sucrose utilization
TRE	=	D-Trehalose utilization	MDG	=	α -methyl-D-glucoside utilization
MAN	=	D-Mannitol utilization	NAG	=	N-acetyl-glucosamine utilization
XLT	=	Xylitol utilization	ADH	=	Arginine dihydrolase
MEL	=	D-Melibiose utilization	URE	=	Urease Test

ตารางที่ 16 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Coryne

ไฮโดรไลต์	NIT	PYZ	PyrA	PAL	βGUR	βGAL	αGLU	βNAG	ESC	URE	[GEL]	Q	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYG
A31-18	+	?	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- + สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้
- ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้
- ? ไม่สามารถวิเคราะห์ผลการทดสอบได้

สัญลักษณ์ในการทดสอบในชุดทดสอบ API Coryne

- NIT = nitrate reduction
- PYZ = pyrazinamide test
- PyrA = pyrrolidonyl arylamide test
- PAL = Alkaline phosphatase test
- βGUR = β-glucuronidase test
- βGAL = β-galactosidase test
- αGLU = α-glucosidase test
- βNAG = N-acetyl-β-glucosaminidase test
- ESC = esculin hydrolysis
- URE = urease test
- [GEL] = gelatine hydrolysis
- Q = control of fermentation
- GLU = glucose fermentation
- RIB = ribose fermentation
- XYL = xylose fermentation
- MAN = manitol fermentation
- MAL = maltose fermentation
- LAC = lactose fermentation
- SAC = sucrose fermentation
- GLYG = glycogen fermentation

ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียจำนวน 16 ไอโซเลต มีดังนี้

B11-3	=	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C11-5	=	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>
C22-5	=	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C22-14	=	<i>Burkholderia cepacia</i>
C22-18	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C22-24	=	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
C23-1	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C23-5	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C23-15	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
A31-18	=	<i>Corynebacterium propinquum</i>
C32-2	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C32-5	=	<i>Micrococcus lylae</i>
C32-6	=	<i>Micrococcus lylae</i>
C32-7	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C32-13	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
C33-1	=	<i>Agrobacterium radiobacter</i>

หมายเหตุ

A คือ ไอโซเลตที่แยกได้จากดินบริเวณป่าทุ่งหญ้าที่ 5

B คือ ไอโซเลตที่แยกได้จากดินบริเวณป่าทุ่งหญ้าที่ 3

C คือ ไอโซเลตที่แยกได้จากดินบริเวณริมแม่น้ำแควน้อย

ตัวเลข คือ ครั้งที่เก็บตัวอย่าง ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง และไอโซเลต ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 การทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนเตรตใน nitrate broth ของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

พบว่าแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ B11-3, C11-5, A31-18 และ C32-2 สามารถลดปริมาณไนเตรตใน nitrate broth ได้ดี และไม่สะสมไนไตรต์ โดยสามารถลดปริมาณไนเตรตลงได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 7 วัน แบคทีเรีย 1 ไอโซเลต คือ C22-14 สามารถลดปริมาณไนเตรตได้ช้าและไม่มีการสะสมไนไตรต์ ส่วนแบคทีเรียอีก 11 ไอโซเลต สามารถลดปริมาณไนเตรตได้ช้า และในวันที่ 14 ก็ยังคงมีไนไตรต์สะสมอยู่ ดังสรุปในตารางที่ 17 และตารางที่ 18 (ภาพที่ 17 – ภาพที่ 19)



ภาพที่ 16 การทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนเตรตใน nitrate broth ช้ำย คือ control ขวา คือ nitrate broth ที่มีการถ่ายเชื้อลงไป ภายหลังบ่มเป็นเวลา 14 วัน

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 การทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนเตรดใน nitrate broth

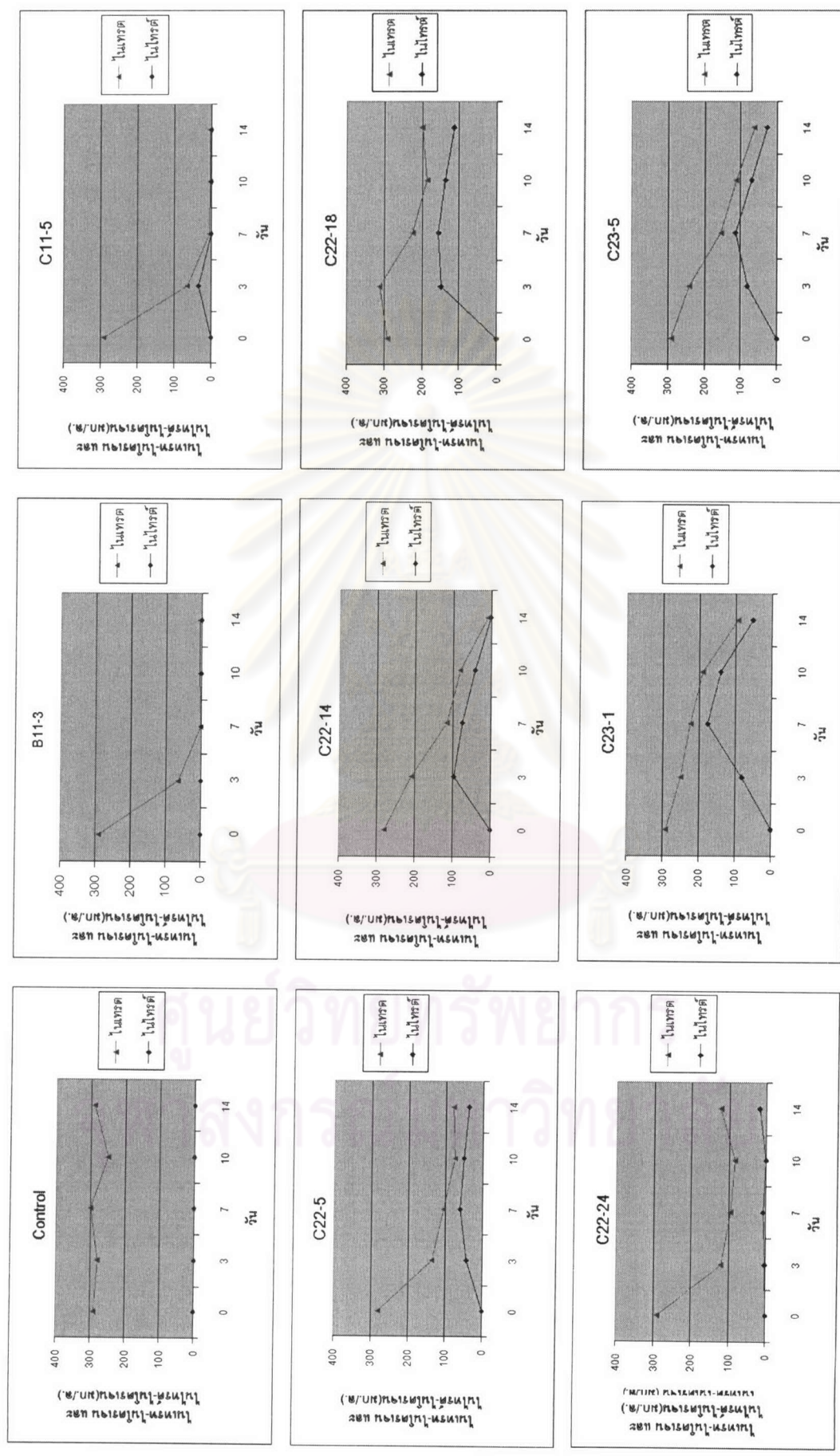
ปริมาณไนเตรด-ไนโตรเจน (มก./ล.)					
ไอโซเลต \ วันที่	0	3	7	10	14
B11-3	290.00	65.00	2.50	4.80	5.00
C11-5	290.00	65.00	5.00	3.00	2.80
C22-5	280.00	135.00	105.00	75.25	80.00
C22-14	280.00	210.00	115.00	80.50	10.00
C22-18	290.00	310.00	225.00	185.00	200.00
C22-24	290.00	120.00	95.00	82.50	122.50
C23-1	290.00	250.00	225.00	190.00	92.50
C23-5	290.00	240.00	155.00	112.50	62.50
C23-15	290.00	250.00	205.00	150.50	120.00
A31-18	280.00	215.00	7.50	5.60	5.60
C32-2	290.00	240.00	37.50	7.50	5.00
C32-5	290.00	230.00	190.00	175.00	150.00
C32-6	290.00	170.00	125.00	95.00	65.00
C32-7	280.00	300.00	225.00	175.00	176.00
C32-13	280.00	300.00	273.00	235.00	184.50
C33-1	280.00	280.00	220.00	195.00	157.50
Control	290.00	280.00	300.00	250.00	290.00

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

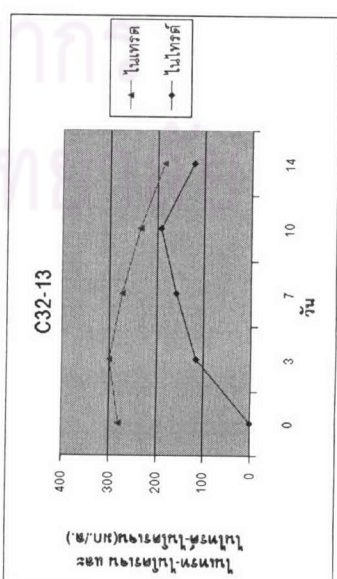
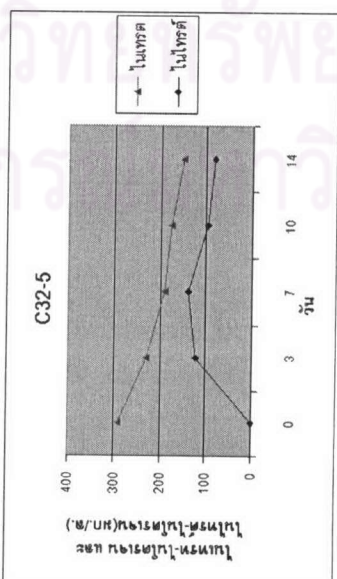
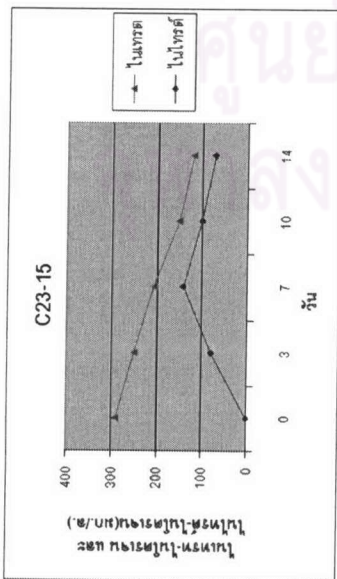
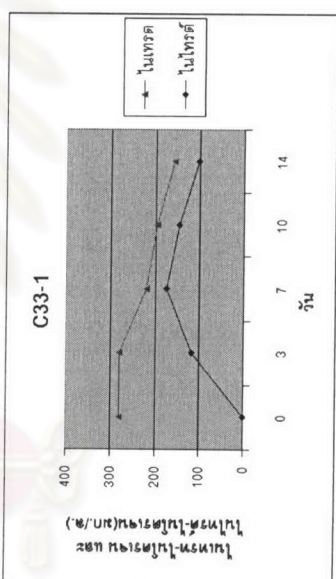
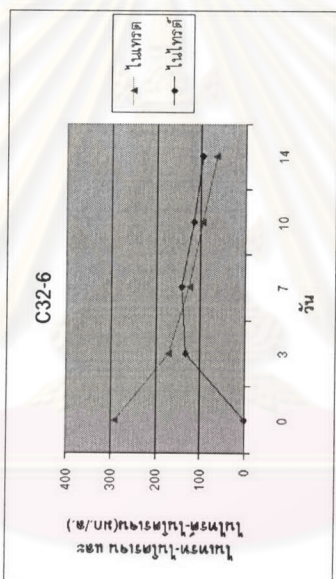
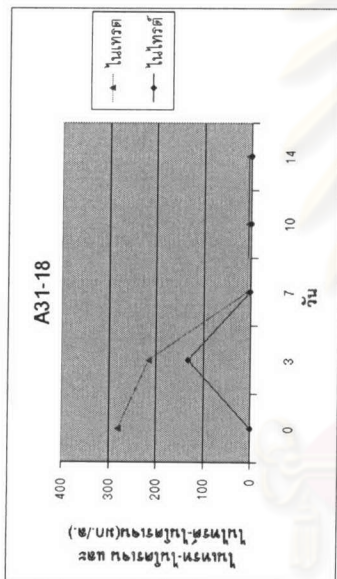
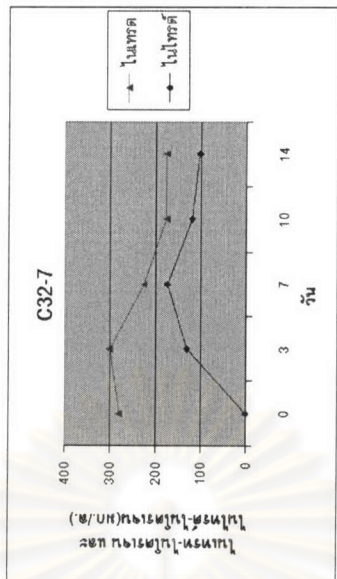
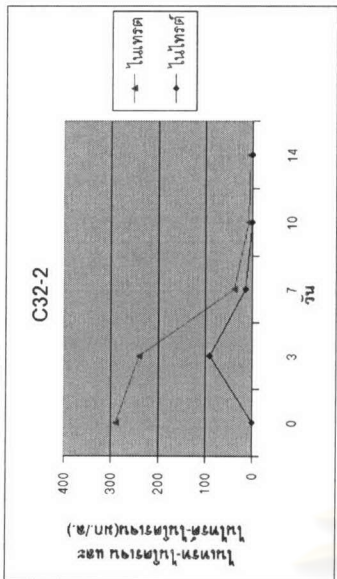
ตารางที่ 18 การทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนไตรต์ใน nitrate broth

ปริมาณไนไตรต์-ไนโตรเจน (มก./ล.)					
วันที่ ไอโซเลต	0	3	7	10	14
B11-3	0.018	0.330	0.220	0.190	0.171
C11-5	0.018	34.44	0.160	0.120	0.149
C22-5	0.014	43.20	61.20	51.00	37.80
C22-14	0.014	96.30	75.00	42.20	1.10
C22-18	0.010	147.60	156.00	138.00	115.20
C22-24	0.010	1.310	6.96	0.220	17.28
C23-1	0.018	80.75	175.45	139.80	51.60
C23-5	0.018	81.12	114.80	70.70	28.60
C23-15	0.018	79.04	141.00	100.40	72.00
A31-18	0.014	131.50	1.20	0.236	0.193
C32-2	0.018	89.59	14.00	0.50	0.164
C32-5	0.010	122.80	137.50	95.70	81.30
C32-6	0.014	131.00	142.20	116.00	95.20
C32-7	0.014	130.80	173.80	118.40	102.40
C32-13	0.014	116.40	158.00	191.80	121.60
C33-1	0.014	116.40	173.25	145.20	102.40
Control	0.014	0.024	0.022	0.022	0.128

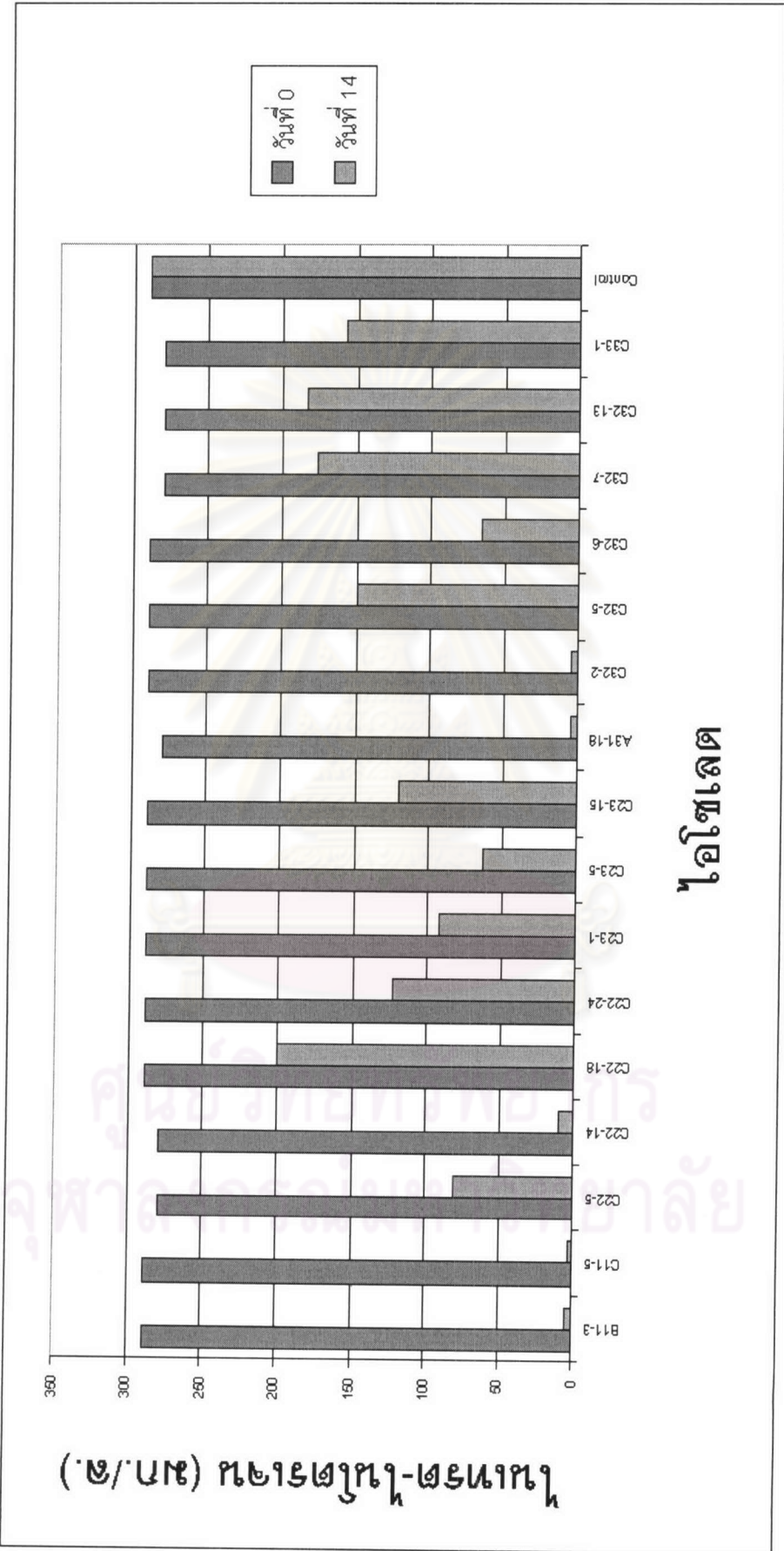
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



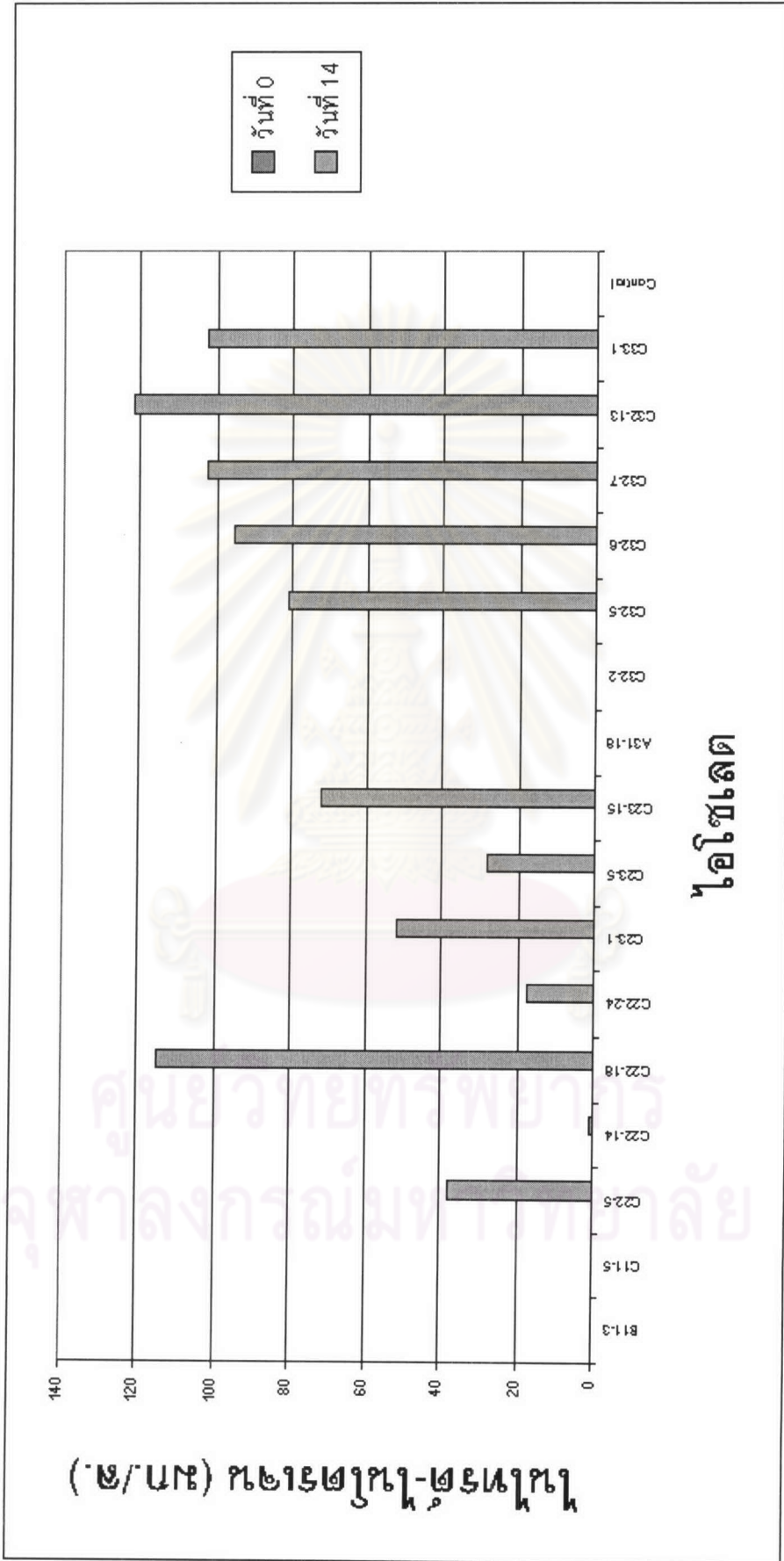
ภาพที่ 17 ความสามารถในการลดปริมาณไนเตรดและไนไตรต์ใน nitrate broth ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้



ภาพที่ 17 (ต่อ)



ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบปริมาณไนเตรต-ไนโตรเจนใน nitrate broth หลังจากบ่มเชื้อ 0 และ 14 วัน



ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบปริมาณไนเตรต-ไนไตรเจนใน nitrate broth หลังจากบ่มเชื้อ 0 และ 14 วัน

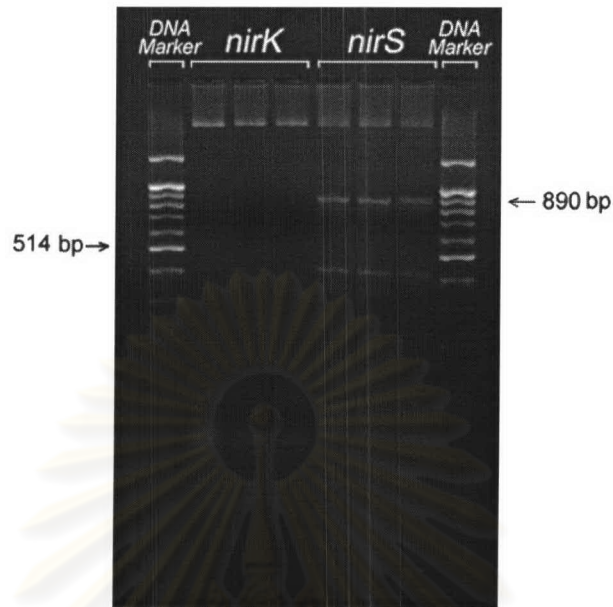
3. การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

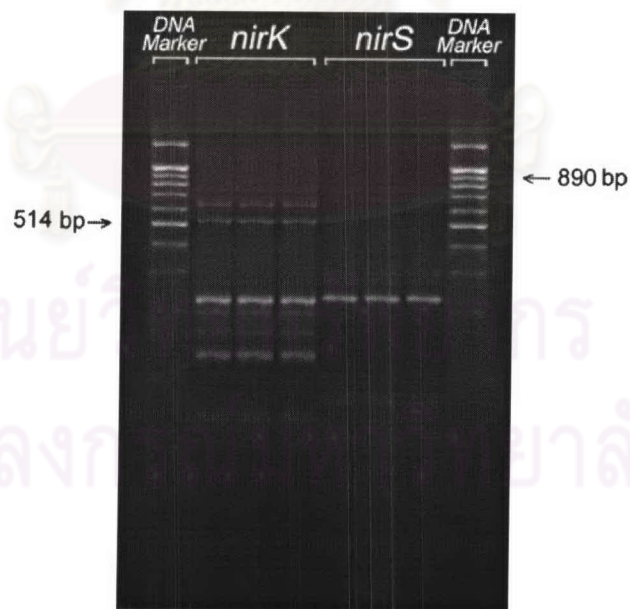
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 16 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R แล้วนำมาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอขนาด 514 bp ของยีน *nirK* ในแบคทีเรีย 9 ไอโซเลต ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ nirS1F-nirS6R พบแถบดีเอ็นเอขนาด 890 bp ของยีน *nirS* ในแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ดังสรุปในตารางที่ 19 (ภาพที่ 20 - ภาพที่ 35) นอกจากนี้เมื่อนำตัวแทนแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ ซึ่งสะสมไนไตรต์แต่ไม่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน ไม่สะสมไนไตรต์แต่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน สะสมไนไตรต์และเจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน และไม่สะสมไนไตรต์และไม่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน มาศึกษาโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการได้ ดังรูปที่ 36

ตารางที่ 19 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ไอโซเลต	ยีน <i>nirK</i>	ยีน <i>nirS</i>
B11-3	-	+
C11-5	+	-
C22-5	-	-
C22-14	-	-
C22-18	+	-
C22-24	-	-
C23-1	+	-
C23-5	+	-
C23-15	+	-
A31-18	-	+
C32-2	+	-
C32-5	-	+
C32-6	-	+
C32-7	+	-
C32-13	+	-
C33-1	+	-



ภาพที่ 20 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต B11-3 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



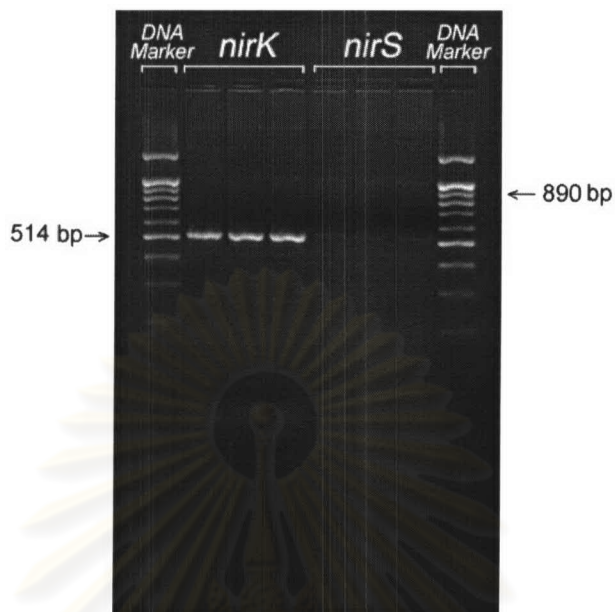
ภาพที่ 21 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C11-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 22 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



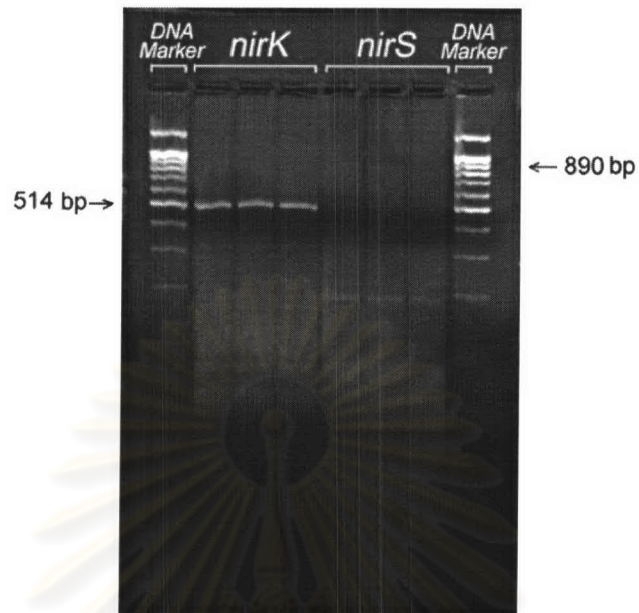
ภาพที่ 23 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-14 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 24 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-18 ด้วยไพรเมอร์ *nirK*1F-*nirK*5R และ *nirS*1F-*nirS*6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



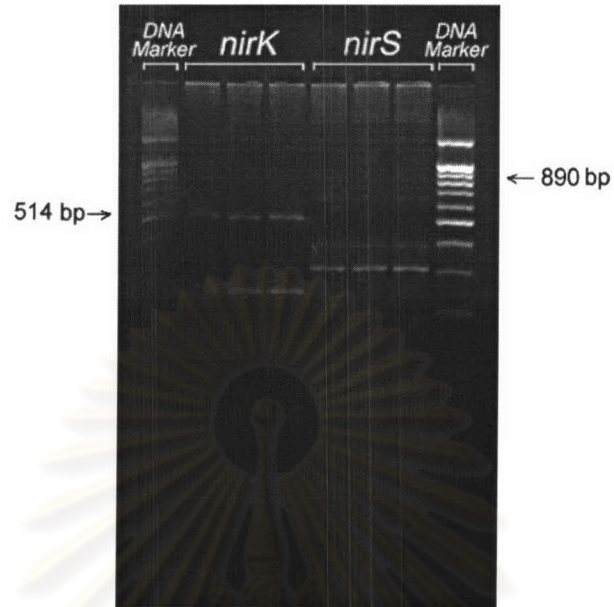
ภาพที่ 25 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C22-24 ด้วยไพรเมอร์ *nirK*1F-*nirK*5R และ *nirS*1F-*nirS*6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 26 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-1 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



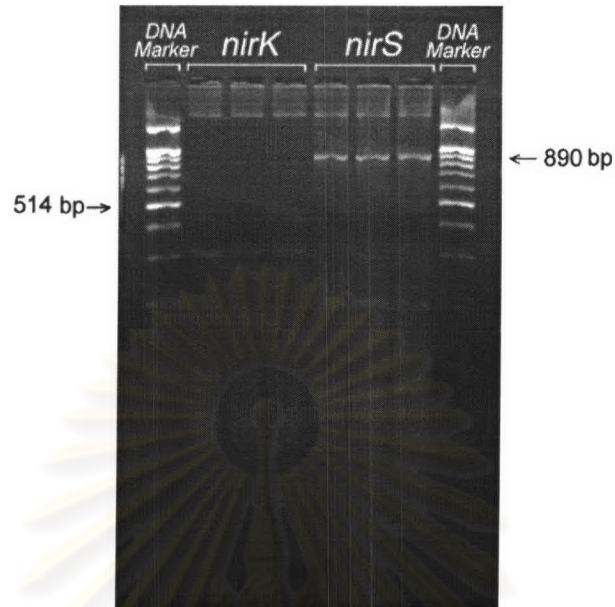
ภาพที่ 27 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C23-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 30 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-2 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 31 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-5 ด้วยไพรเมอร์ nirK1F-nirK5R และ nirS1F-nirS6R ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 32 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-6 ด้วยไพรเมอร์ *nirK1F-nirK5R* และ *nirS1F-nirS6R* ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



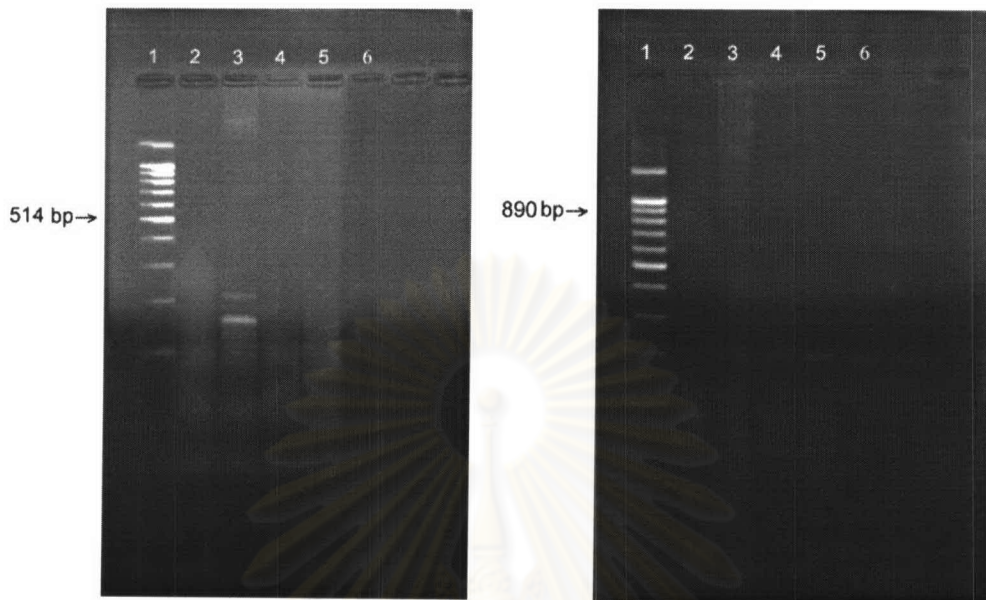
ภาพที่ 33 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-7 ด้วยไพรเมอร์ *nirK1F-nirK5R* และ *nirS1F-nirS6R* ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 34 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C32-13 ด้วยไพรเมอร์ *nirK1F-nirK5R* และ *nirS1F-nirS6R* ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 35 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไอโซเลต C33-1 ด้วยไพรเมอร์ *nirK1F-nirK5R* และ *nirS1F-nirS6R* ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp



ภาพที่ 36 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตก๊าซขึ้นในหลอดดักก๊าซ ด้วยไพรเมอร์ *nirK1F-nirK5R* (ซ้าย) และ *nirS1F-nirS6R* (ขวา) ลูกศรคือตำแหน่งของยีน *nirK* มีขนาด 514 bp และยีน *nirS* มีขนาด 890 bp

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 100 bp

lane ที่ 2 คือ แบคทีเรียที่สะสมไนไตรต์ แต่ไม่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

lane ที่ 3 คือ แบคทีเรียที่ไม่สะสมไนไตรต์ แต่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

lane ที่ 4 คือ แบคทีเรียที่สะสมไนไตรต์ และเจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

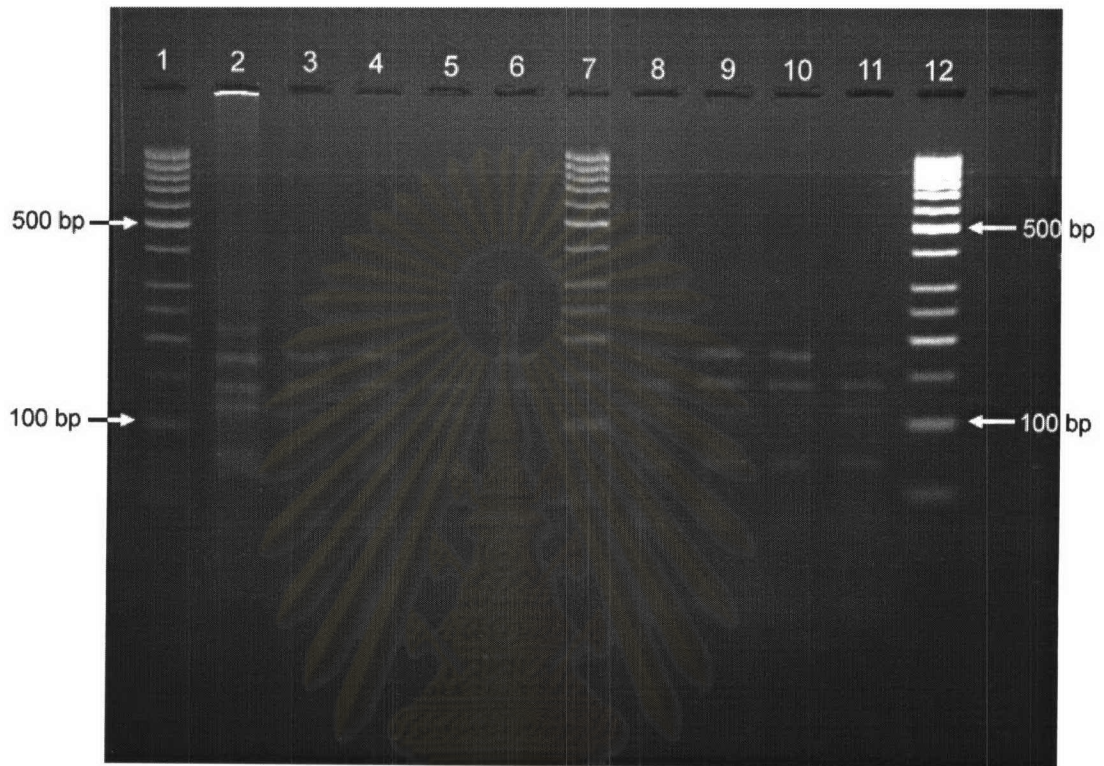
lane ที่ 5 คือ แบคทีเรียที่ไม่สะสมไนไตรต์ และไม่เจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

lane ที่ 6 คือ negative control

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

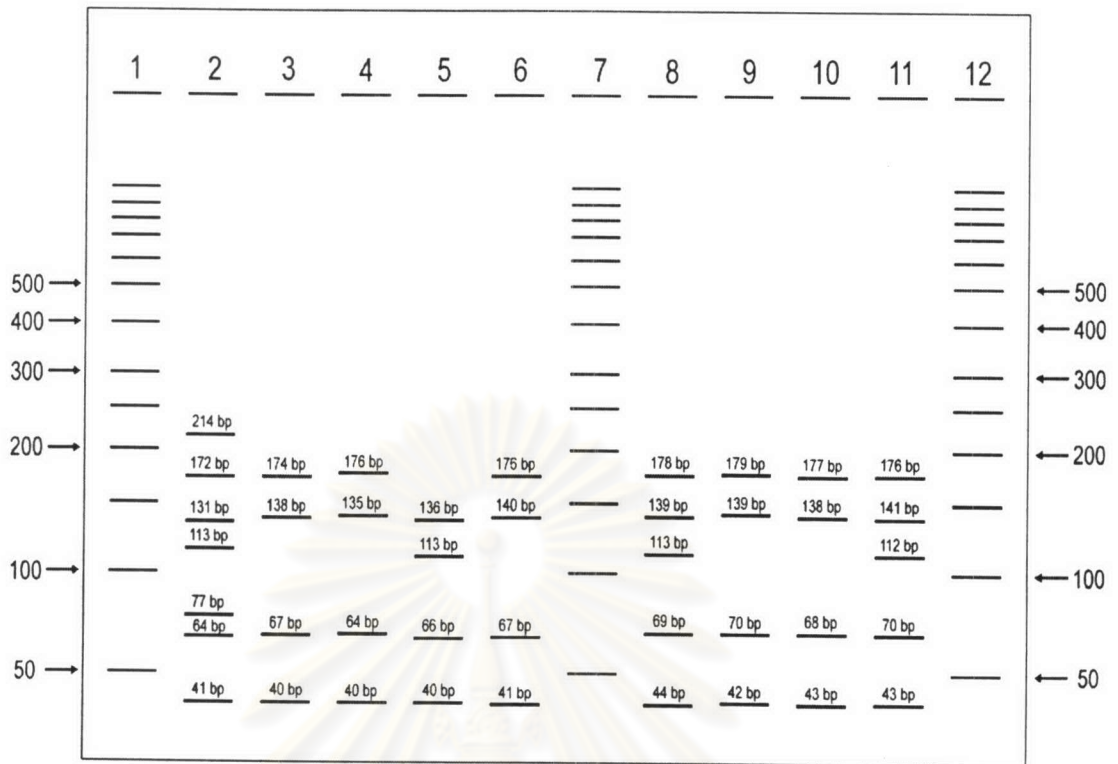
3.2 การทำ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

เมื่อตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *HaeIII* และ *MspI* จะได้รูปแบบการตัดที่แตกต่างกันดังภาพที่ 37 และภาพที่ 39 ตามลำดับ และเมื่อตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *HhaI* และ *MspI* จะได้รูปแบบการตัดที่แตกต่างกันดังภาพที่ 41 และภาพที่ 43



ภาพที่ 37 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *HaeIII*

- lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp
- lane ที่ 2 คือ *Alcaligenes xylosoxidans* (C11-5)
- lane ที่ 3 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18)
- lane ที่ 4 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-1)
- lane ที่ 5 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-5)
- lane ที่ 6 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-15)
- lane ที่ 7 คือ DNA marker ขนาด 50 bp
- lane ที่ 8 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2)
- lane ที่ 9 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)
- lane ที่ 10 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-13)
- lane ที่ 11 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C33-1)
- lane ที่ 12 คือ DNA marker ขนาด 50 bp



ภาพที่ 38 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *HaeIII*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Alcaligenes xylosoxidans* (C11-5)

lane ที่ 3 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18)

lane ที่ 4 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-1)

lane ที่ 5 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-5)

lane ที่ 6 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-15)

lane ที่ 7 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

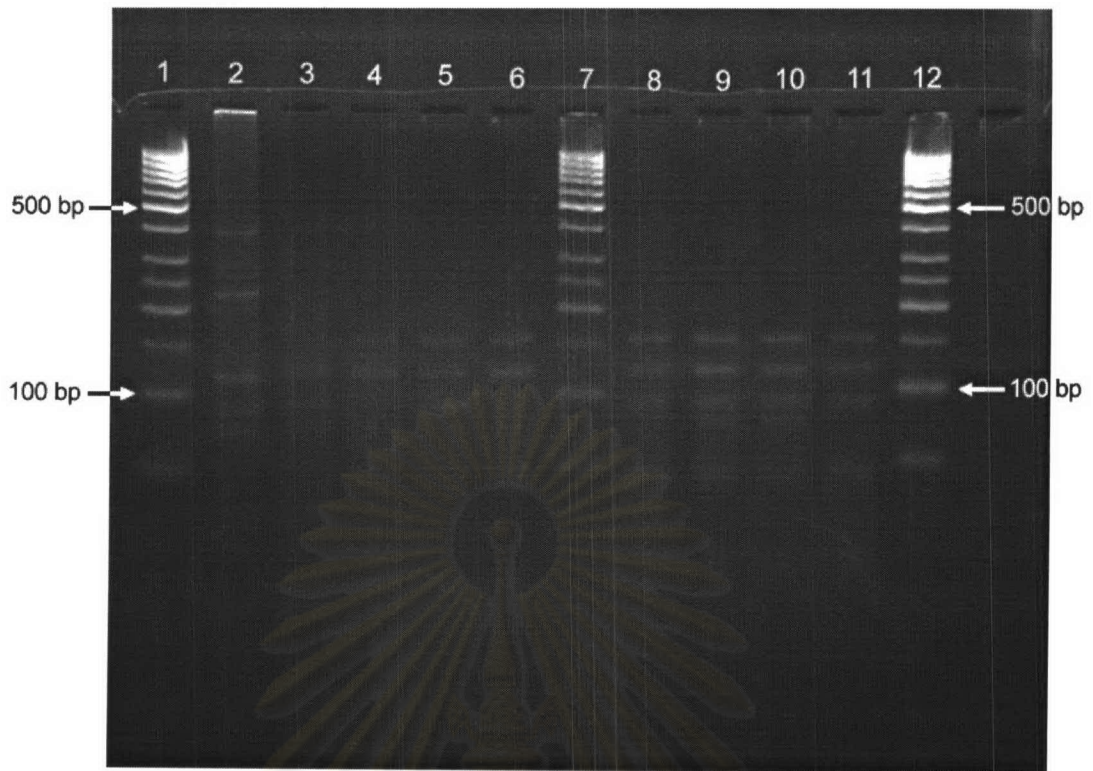
lane ที่ 8 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2)

lane ที่ 9 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)

lane ที่ 10 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-13)

lane ที่ 11 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C33-1)

lane ที่ 12 คือ DNA marker ขนาด 50 bp



ภาพที่ 39 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *MspI*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Alcaligenes xylooxidans* (C11-5)

lane ที่ 3 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18)

lane ที่ 4 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-1)

lane ที่ 5 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-5)

lane ที่ 6 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-15)

lane ที่ 7 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

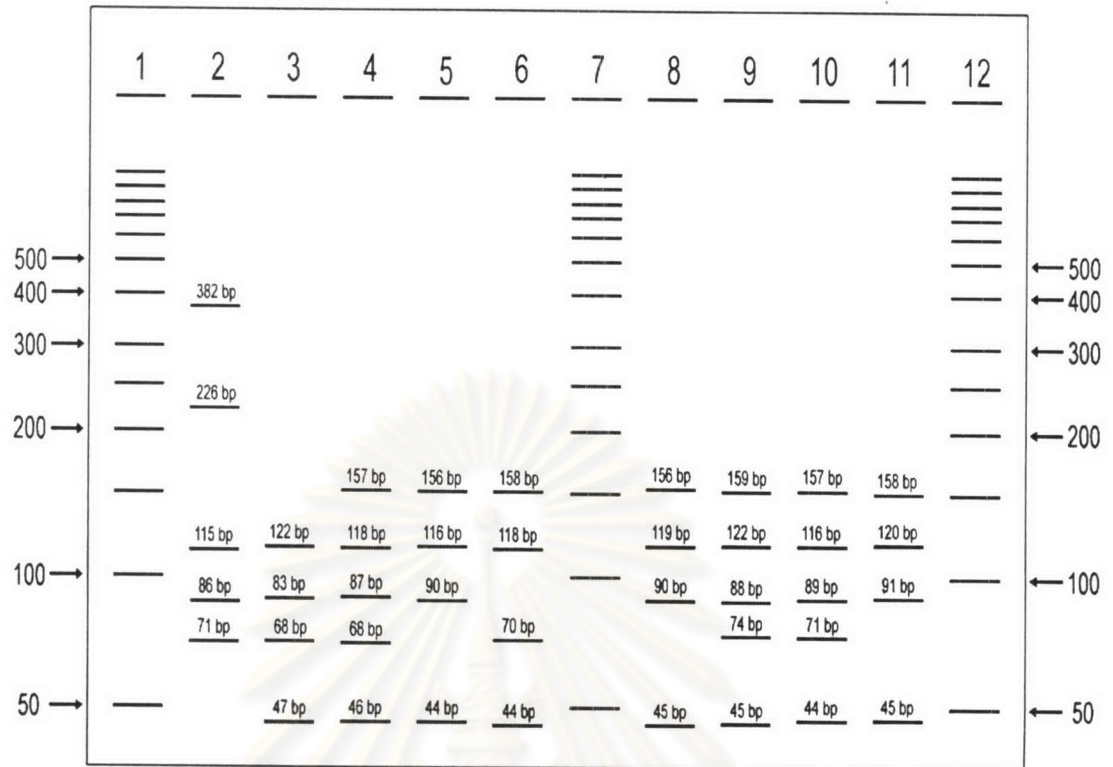
lane ที่ 8 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2)

lane ที่ 9 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)

lane ที่ 10 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-13)

lane ที่ 11 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C33-1)

lane ที่ 12 คือ DNA marker ขนาด 50 bp



ภาพที่ 40 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *MspI*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Alcaligenes xylooxidans* (C11-5)

lane ที่ 3 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C22-18)

lane ที่ 4 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-1)

lane ที่ 5 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-5)

lane ที่ 6 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C23-15)

lane ที่ 7 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

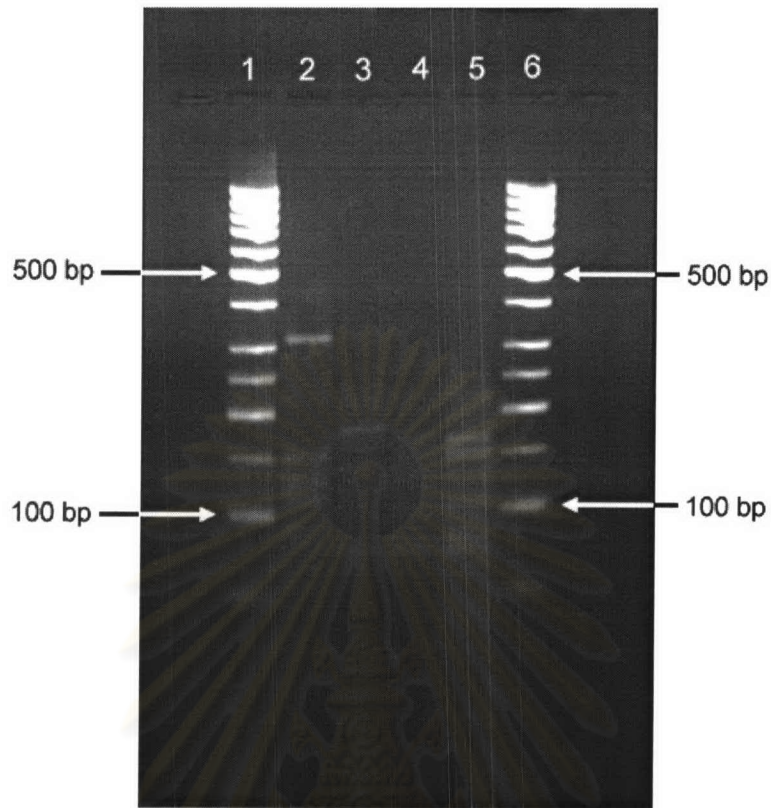
lane ที่ 8 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2)

lane ที่ 9 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)

lane ที่ 10 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C32-13)

lane ที่ 11 คือ *Agrobacterium radiobacter* (C33-1)

lane ที่ 12 คือ DNA marker ขนาด 50 bp



ภาพที่ 41 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *HhaI*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

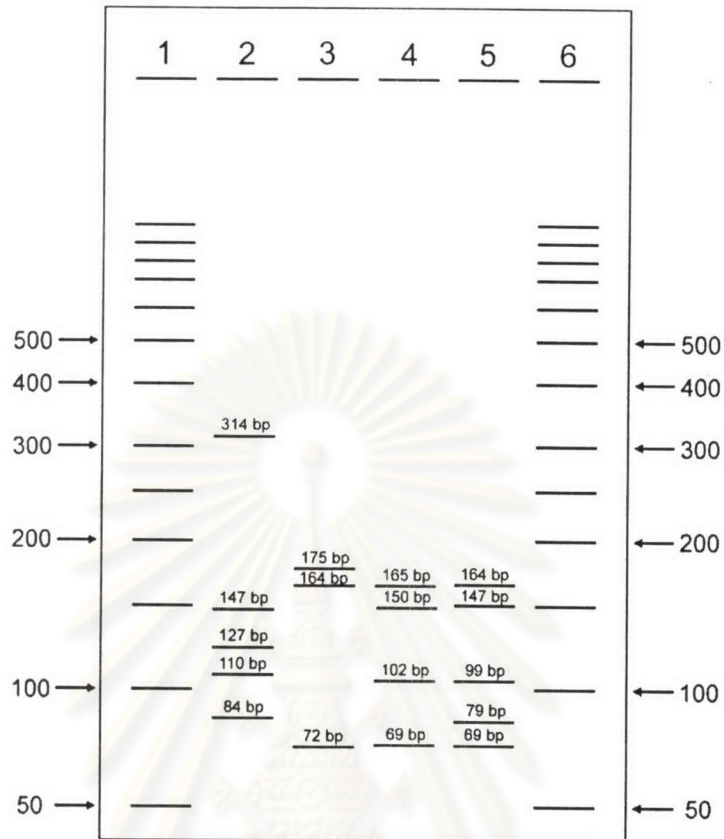
lane ที่ 2 คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3)

lane ที่ 3 คือ *Corynebacterium propinquum* (A31-18)

lane ที่ 4 คือ *Micrococcus lylae* (C32-5)

lane ที่ 5 คือ *Micrococcus lylae* (C32-6)

lane ที่ 6 คือ DNA marker ขนาด 50 bp



ภาพที่ 42 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *HhaI*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3)

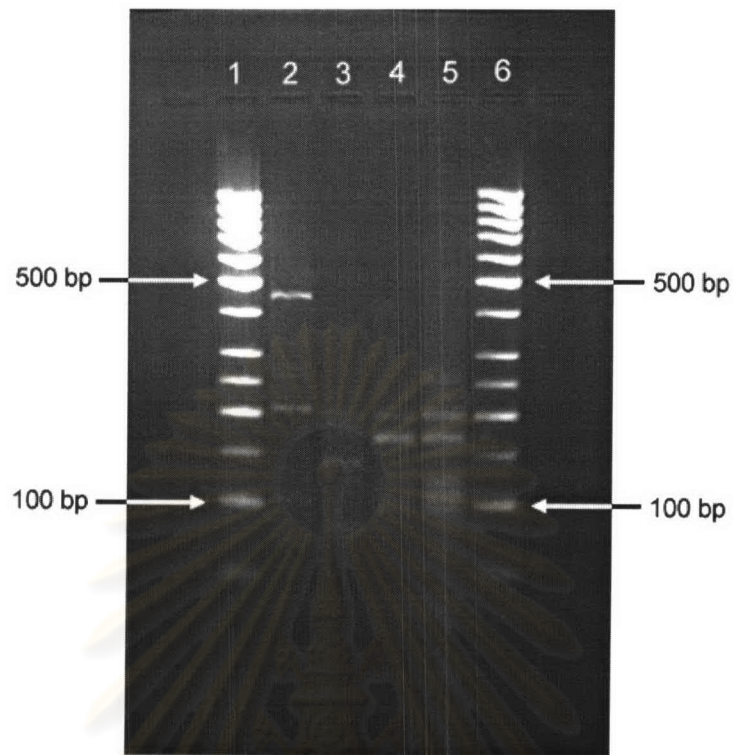
lane ที่ 3 คือ *Corynebacterium propinquum* (A31-18)

lane ที่ 4 คือ *Micrococcus lylae* (C32-5)

lane ที่ 5 คือ *Micrococcus lylae* (C32-6)

lane ที่ 6 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 43 การตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *MspI*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3)

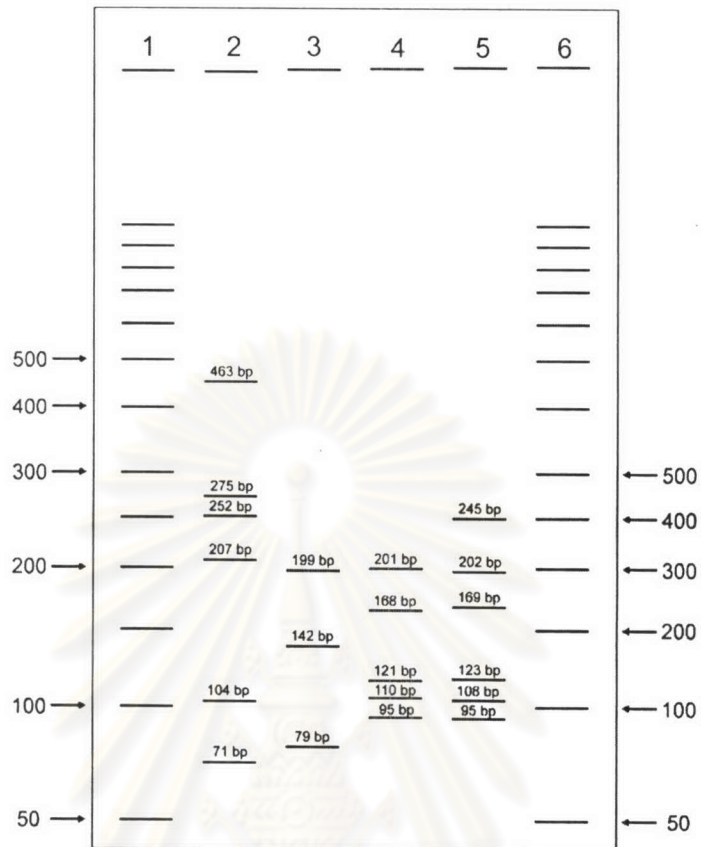
lane ที่ 3 คือ *Corynebacterium propinquum* (A31-18)

lane ที่ 4 คือ *Micrococcus lylae* (C32-5)

lane ที่ 5 คือ *Micrococcus lylae* (C32-6)

lane ที่ 6 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 44 แผนภาพการตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *MspI*

lane ที่ 1 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

lane ที่ 2 คือ *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3)

lane ที่ 3 คือ *Corynebacterium propinquum* (A31-18)

lane ที่ 4 คือ *Micrococcus lylae* (C32-5)

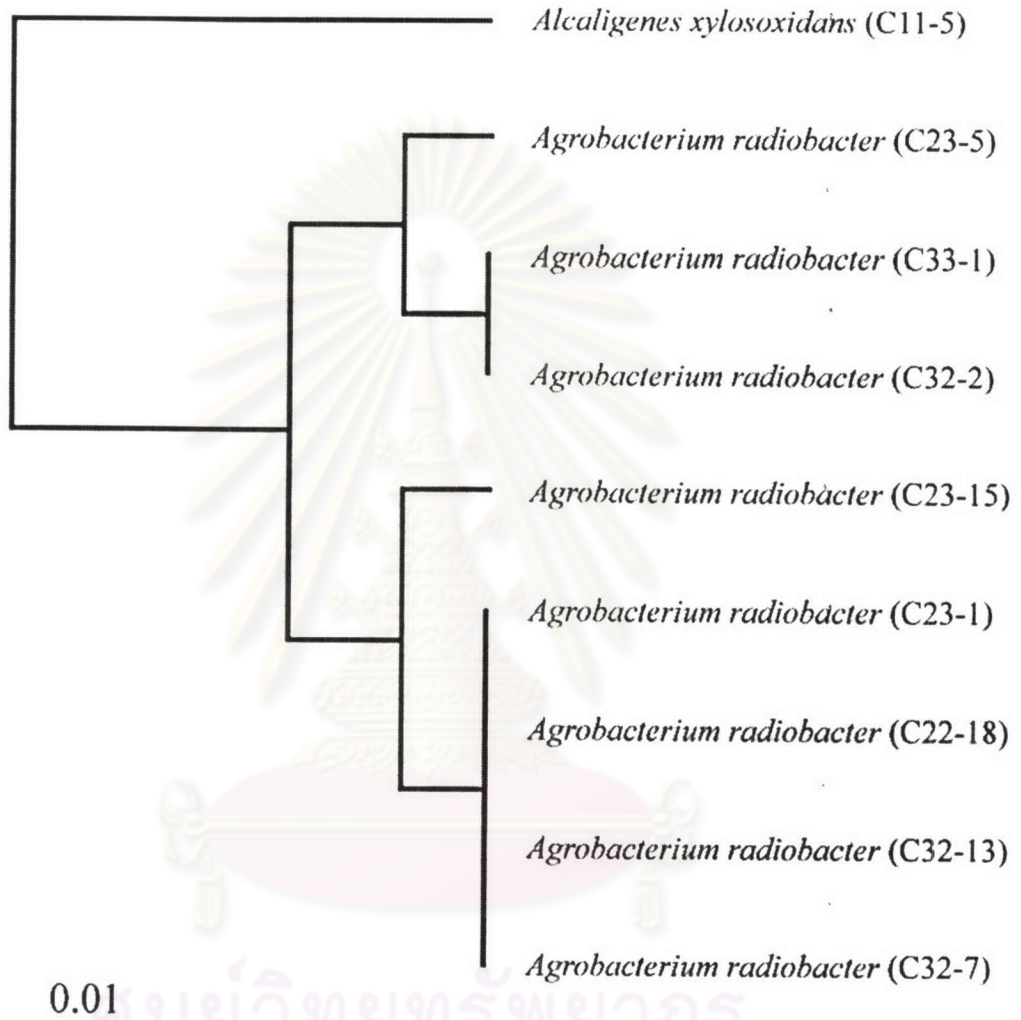
lane ที่ 5 คือ *Micrococcus lylae* (C32-6)

lane ที่ 6 คือ DNA marker ขนาด 50 bp

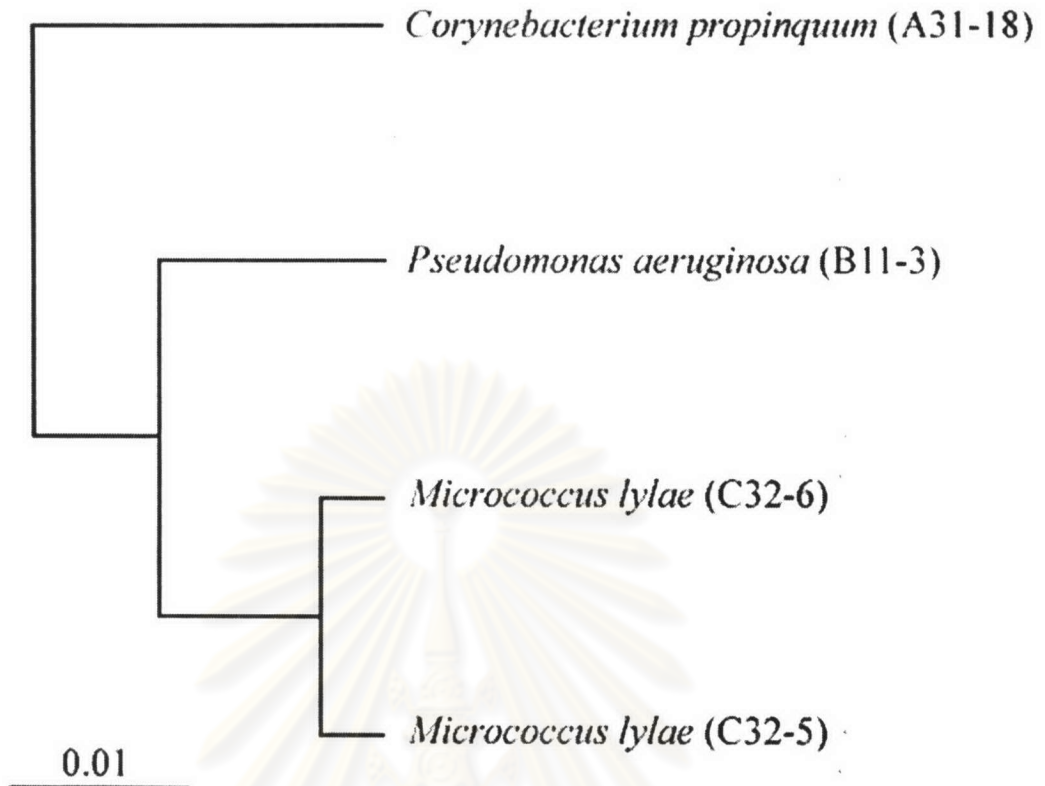
ศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพและ
จุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การวิเคราะห์ผล RFLP

เมื่อนำรูปแบบการตัดเอนไซม์ของยีน *nirK* และ *nirS* ในข้อ 3.2 มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylip Version 3.6 beta โดยใช้สมการของ Nei และ Li (1979) จะสามารถสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม TreeView (win32) Version 1.6.6 ได้ดังภาพที่ 45 และภาพที่ 46 ตามลำดับ



ภาพที่ 45 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่มียีน *nirK*



ภาพที่ 46 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในกลุ่มที่มียีน *nirS*

จากภาพที่ 45 และภาพที่ 46 สามารถแบ่งแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีน *nirK* ได้ 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Alcaligenes xylosoxidans* (C11-5) และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* ซึ่งสามารถแบ่งย่อยลงไปได้อีก 4 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* (C23-5) กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* (C33-1) และ *Agrobacterium radiobacter* (C32-2) กลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* (C23-15) และกลุ่มย่อยที่ 4 ประกอบด้วย *Agrobacterium radiobacter* (C23-1) *Agrobacterium radiobacter* (C22-18) *Agrobacterium radiobacter* (C32-13) และ *Agrobacterium radiobacter* (C32-7)

ส่วนแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีน *nirS* สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Corynebacterium propinquum* (A31-18) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Pseudomonas aeruginosa* (B11-3) ส่วนกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Micrococcus lylae* (C32-5) และ *Micrococcus lylae* (C32-6)