บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในดินทั้งหมดจากดิน 5 แปลง ในพื้นที่บ้านป่าสักงาม ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ที่ระดับความลึก 7-15 เซนติเมตร ทั้ง 3 ครั้ง พบว่าครั้งที่หนึ่งปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง $2.7x10^5$–$2.5x10^7$ โคโลนี/กรัมของดิน ครั้งที่สองปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง $1.92x10^6$–$1.3x10^7$ โคโลนี/กรัมของดิน และครั้งที่สามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง $7.2x10^5$–$9.6x10^6$ โคโลนี/กรัมของดิน ซึ่งผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Brown (1978); Edwards and Rattan (1990) ที่พบว่าในดินทั่วไป และในดินเพาะปลูกที่มีสภาพสมบูรณ์ รวมทั้งดินในป่าจะมีปริมาณแบคทีเรียอยู่ระหว่าง $1.0x10^4$–$1.5x10^7$ และ $1.8x10^6$–$7.8x10^6$ โคโลนี/กรัมของดินตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในดิน 5 แปลง ทั้งหมด 3 ครั้ง ปริมาณแบคทีเรียที่นับได้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าดินตัวอย่างที่เก็บมาจากป่าสักธรรมชาติทั้งหมด 3 ครั้ง มีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด เนื่องจากดินมีความสมบูรณ์ จึงมีปริมาณสารอินทรีย์อยู่มากที่สุด แสดงในตาราง 3 ดินมีสีดำมีเศษใบไม้ทับถมอยู่มากประกอบกันมีแสงแดดส่องถึงทำให้ดินมีอุณหภูมิสูงขึ้น จึงเป็นการช่วยเพิ่มกิจกรรมการย่อยสลายสารอินทีรีย์ของจุลินทรีย์ในดิน และส่งผลให้แบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาลักษณะของดินตัวอย่างเป็นดินร่วนมีสีดำ เป็นผลทำให้ดินมีการระบายน้ำ และอากาศได้ดีเหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนดินแปลงขยายพันธุ์พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียน้อยที่สุดเนื่องจากลักษณะของดินมีสีเทาเป็นพวกหินปูนจึงมีความสมบูรณ์ต่ำ ปริมาณสารอินทรีย์อยู่น้อย แสดงในตารางที่ 4 ลักษณะพื้นที่มีพันธุ์ไม้พวกมอสและเฟิร์น ในครั้งที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ยังพบว่ามีพันธุ์ไม้พวกดาวเรืองในครั้งที่ 3 ซึ่งเป็นผลให้มีปริมาณแบคทีเรียอยู่ในช่วงที่มีในรายงานของ Brown (1978); Edward and Rattan (1990)

ผลการทดลองในตารางที่ 3 ค่าพีเอชทั้ง 3 ครั้งมีผลไม่แตกต่างกัน คือมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง ยกเว้นแปลงป่าปลูกฟื้นสภาพมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.91–6.44 เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าวที่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าค่าพีเอชไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียมากนัก เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลางมีค่าประมาณ 7.0 ในดินป่าและในดินที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง มีแนวโนมว่าดินจะมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 4.0-6.5 (Barnes et al., 1998) ซึ่งค่าพีเอชที่ได้จากการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 5.91-7.37 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานดังกล่าว

ผลของค่าความชื้นที่วัดได้จากดินทั้ง 5 แปลง ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งที่หนึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 4.03-26.40 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่สองมีค่าอยู่ในช่วง 20.99-37.13 เปอร์เซ็นต์ และครั้งที่สามมีค่าอยู่ในช่วง 12.73-27.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าวที่มีต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าปริมาณความชื้นไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียในแต่ละแปลงมากนัก เนื่องจากว่ามีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียเข้ามามีบทบาทร่วมอยู่ด้วย เช่น ปริมาณสารอินทรีย์ที่แตกต่างกันไปในดินแต่ละแปลง ซึ่งมีผลต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าความชื้นจะมีผลต่อจำนวนความหลากหลาย การมีชีวิตรอดและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน เช่น *Bacillus* จะมีชีวิตรอดที่ความชื้นพอเหมาะ ซึ่งความชื้นที่พอเหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียและทำให้มีปริมาณสูงสุดจะมีค่าอยู่ในช่วง 50-70 เปอร์เซ็นต์ (Tate, 1995)

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณสารอินทรีย์ในตัวอย่างดิน 5 แปลง ทั้ง 3 ครั้งพบว่าไม่แตกต่างกัน คือมีค่าอยู่ในช่วง 7.12-15.73 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณอินทรีย์สารมากนัก จึงมีผลทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณแบคทีเรียทั้ง 3 ครั้ง แต่เมื่อพิจารณาในแต่ละแปลงมีค่าแตกต่างกันดังนั้นจึงมีผลต่อแบคทีเรียในแต่ละแปลง อย่างไรก็ตามน่าจะมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อปริมาณแบคทีเรียในดินซึ่งไม่ได้ศึกษาในการทดลองนี้ คือนินทรีย์สาร การระบายอากาศ อุณหภูมิ รวมถึงสภาพพื้นที่และปริมาณการใช้สารอินทรีย์ในแปลงขยายพันธุ์ แปลง 2 และแปลง 52

2. ผลการจัดจำแนกชนิดของ *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท จาก *Bacillus* 750 ไอโซเลท พบว่าผลของสมบัติทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาหรือสมบัติทางชีวเคมีให้ผลตรงตามกระบวนการจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* ของ The Bergay's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 (Sneath, Mair and Sharpe, 1986; Gordon, Haynes and Hor-noy Pang, 1973)

3. ผลการทดลอง *B. subtilis* ทั้ง 35 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 5 ชนิด ได้แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่สามาถยับยั้งการเจริญได้ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งใกล้เคียง และกลุ่มที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็นศูนย์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ นลินี จาริกภากร และคณะ (2535) ทดลองใช้ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *B. subtilis* NSRS 89-26 ยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคข้าว *Thanatephorus cucumeris* ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* NSRS 89-26 สามารถควบคุมการเจริญการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ ส่วน *B. subtilis* NSRS 89-24 ไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของ *Thanatephorus cucumeris* ได้เป็นผลเนื่องจาก *B. subtilis* แต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด

และในแต่ละสายพันธุ์สร้างสารปฏิชีวนะได้แตกต่างกัน ทำให้แต่ละสายพันธุ์มีสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชได้แตกต่างกัน (นลินี จาริกภากร และคณะ, 2535) และเนื่องจากในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย และ ascospore ของเชื้อราบางชนิด *B. subtilis* ต้องสร้างสารปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (Ferreira, Matthee and Thomus, 1991)

4. Wangh and Powell (1992) ได้รายงานเกี่ยวกับคุณภาพของ DNA ว่ามีผลต่อการวิเคราะห์ RAPD-PCR เพียงเล็กน้อย ซึ่งตรงกับรายงานของ Nilsson et al. (1998) ที่ทำการทดลอง โดยใช้ดีเอ็นเอ ที่มีคุณภาพต่ำมาทำการวิเคราะห์ RAPD-PCR ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้วิธีการสกัดดีเอ็นเอ ดัดแปลงมาจากวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Ronimus, Parker and Morgan, (1993) เช่นที่แสดงในวัสดุอุปกรณ์และวิธีการ ผลที่ได้เป็นที่น่าพอใจ คือดีเอ็นเอที่ได้มีค่าปริมาณอยู่ในช่วง 75-2225 μg/ml และมีความบริสุทธิ์สูง มีค่า OD260/OD280 อยู่ในช่วง 1.61-2.0 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ William et al. (1993) ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงมีค่า OD260/OD280 อยู่ในช่วง 1.7-2.0 นอกจากคุณภาพของดีเอ็นเอ แล้วยังมีสภาวะอื่นๆ อีกเช่น ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ Taq polymerase มีผลต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตของ RAPD-PCR นอกจากนี้มีรายงานว่าเมื่อเก็บ Taq polymerase ไว้นานเกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของ Taq polymerase ลดลง (Sobral and Honeyeutt 1992; willian et al. 1993) สำหรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ใช้ในการศึกษานี้มีค่า 4.0 mM ความเข้มข้นของเอนไซม์ Taq polymerase มีค่า 1 U และความเข้มข้นของไพรเมอร์ มีค่า 25 pM ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ronimus, Parker and Morgan, (1997) ที่ศึกษาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ และความเข้มข้นของเอนไซม์ Taq polymerase ที่เหมาะสมต่อผลผลิตของ RAPD-PCR มีค่า 4.0 mM 2.0 μM 0.5-1.5 U ตามลำดับ และพบว่าแถบดีเอ็นเอจะชัดเจนขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ Taq polymerase ส่วนผลการศึกษาอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing มีค่า 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ให้ผลผลิตของ RAPD-PCR ที่ถูกต้อง และแถบดีเอ็นมีความชัดเจนมากที่สุด เมื่อเทียบกับช่วงอุณหภูมิและเวลาอื่นๆที่ใช้ในการศึกษา ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kangfu และ Pauls (1992) ที่ศึกษาสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของ RAPD-PCR มีค่า 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที และพบว่าสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมมีความสัมพันธ์กับค่า GC-content ของไพรเมอร์ Rafalski, Tingery and Williams (1994) อ้างถึงสภาวะของปฏิกิริยา RAPD นั้น ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น จะถูกกำหนดโดย การแข่งขันกันระหว่างตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าเกาะบน DNA template มากกว่าจำนวนทั้งหมดของ ตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงไป บางครั้งความคลาดเคลื่อนในการจับคู่ (mismatching) ระหว่างไพรเมอร์และ

template ในขั้นตอนการจับคู่เบสคู่สม (annealing) ที่อุณหภูมิต่ำหรือที่เรียกว่า low stringency ที่ใช้ระหว่าง Thermal cycling บางครั้งการจับคู่ที่ถูกต้องและระดับของการจับคู่ผิดพลาดเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย เป็นผลของการแข่งขันของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ ผลผลิตที่เพิ่มจำนวนขึ้นเป็นผลของการจับคู่ที่ถูกต้องในระยะแรก ทำให้จำนวนผลผลิตของการจับคู่ที่ผิดพลาดลดลง (Ruano, Brash and Kidd, 1991).

5. ไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิดที่คัดเลือกได้ มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลองนี้ เนื่องจากไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิด ได้มาจาก Ronimus, Parker and Morgan, (1993) ไพรเมอร์ อีก 2 ชนิด ได้มาจาก Batinic et al. (1998) ส่วนอีก 1 ชนิด ได้มาจาก Vettori et al. (1996) ซึ่งได้รับการคัดเลือก และนำมาใช้ในการทดลองเพื่อจัดจำแนก *B. subtilis* ในระดับสายพันธุ์ นอกจากนี้เมื่อนำมาทำการศึกษาพบว่าให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ และ การแยกของแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน (ภาพที่ 7) ซึ่งตรงกับรายงานผลการทดลองของ Ronimus et al. (1993) ที่ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิด คือ OPR1 OPR2 OPR3 OPR4OPR5 OPR6 OPR7 OPR8 OPR9 OPR10 OPR11 OPR12 OPR13 OPR14 OPR15 OPR16 OPR17 OPR18 OPR19 และ OPR20 พบว่าไพรเมอร์ที่เหมาะสมคือ OPR13 OPR1 OPR2 OPR10 OPR16 OPR20 เนื่องจากให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ 8 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 0.3-1.6 Kb และมีการแยกของแถบดีเอ็นเอออกจากกันอย่างชัดเจน

ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ RAPD–PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด พบว่า *B. subtilis* NRS02-2 และ *B. subtilis* NRS02-3 *B. subtilis* COS02-1 และ *B. subtilis* COS03-1 *B. subtilis* AGS02-1 *B. subtilis* AGS02-2 และ *B. subtilis* AGS03-1 *B. subtilis* PS5203-6 *B. subtilis* PS5203-1 *B. subtilis* PS5202-6 และ *B. subtilis* PS5202-1 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ทำให้สามารถจัดจำแนกเชื้อที่มีลายพิมพ์เหมือนกันเป็นเชื้อเดียวกัน วิธีการนี้อธิบายโดย William et al. (1990); William (1993) ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Stephan et al. (1996) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาสายพันธุ์ของ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus* spp. อื่นๆ ทั้งหมด 46 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนก *B. licheniformis* ได้ 10 สายพันธุ์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ 10 นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้พบว่าแบบแผน RAPD สามารถบอกความแตกต่างของ *Bacillus* spp. อื่นๆ 8 สายพันธุ์ แตกต่างจาก *B. licheniformis* ทั้งหมดอย่างชัดเจน ด้วยเหตุนี้เทคนิค RAPD จึงถูกใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบลักษณะของ *Bacillus* spp. จากผลการทดลองนี้พบว่าเชื้อที่ให้แถบดีเอ็นเอตรงกันมาจากดินแปลงเดียวกันเมื่อนำมาจัดกลุ่มโดยวิธี cluster พบว่า dendrogram ที่ได้สามารถยืนยันว่าเชื้อที่มีลายพิมพ์เหมือนกันเป็นเชื้อเดียวกัน ซึ่งตรงกับรายงานของ Srinivas et al. (1992)

6. ผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม และวิเคราะห์กลุ่มโดยข้อมูลที่ได้จาก RAPD-PCR นี้มีลักษณะเป็น Ordinal หรือ Binary characters คือ การปรากฏ (1) หรือ ไม่ปรากฏ (0) แถบดีเอ็นเอ การตรวจนับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์พบว่ามีข้อผิดพลาด ในการทดลองนี้จึงทำการแก้ไขข้อผิดพลาดดังกล่าวโดยใช้วิธีของ Burr and Pepper (1997) โดยทำเครื่องหมายบนตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแต่ละแถบ ทำให้ผลการตรวจนับแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 ครั้งให้ผลตรงกัน ข้อผิดพลาดนี้เป็นผลเนื่องมาจากการที่คอมพิวเตอร์ตรวจนับส่วนที่ไม่ใช่แถบดีเอ็นเอ และส่วนที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน (Faint PCR Band) ซึ่งมีสาเหตุมาจากสภาวะต่างๆ ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และของการทำ gel electrophoresis แถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเหล่านี้เมื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อการจัดจำแนกจะทำให้เกิดการวิเคราะห์ผลผิดพลาด (Nilsson et al., 1998) ผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุ์กรรมแสดงให้เห็นว่า เชื้อทั้ง 4 กลุ่ม ที่ได้จากการวิเคราะห์กลุ่มและสร้าง dendrogram โดยวิธี nearest neighbor แต่ละกลุ่มมีสมาชิกส่วนมากมาจากดินแปลงเดียวกัน และมีค่า genetic similarity ใกล้เคียงกัน ส่วนเชื้อที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีค่าความแปรผันทางพันธุกรรมแตกต่างกัน คือให้ค่าเฉลี่ยของ genetic similarity ที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจาก *B. subtilis* ที่อยู่ในธรรมชาติมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างกัน และพบว่ามีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของเชื้อที่อยู่ในพื้นที่เดียวกันและระหว่างพื้นที่ นอกจากนี้ยังพบว่าอาจจะเกิดจากการกลายพันธุ์ ซึ่งมีอัตราใกล้เคียงกับการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (Roberts and Cohan, 1995)

ผลการวิเคราะห์กลุ่มโดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด พบว่าสามารถจัดกลุ่ม *B. subtilis* ทั้ง 28 ไอโซเลท โดยวิธี cluster analysis ออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งมีสัมพันธ์กับผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 5 ชนิด ผลการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองของ Batinic et al. (1997) ซึ่งจัดกลุ่ม *Bacillus* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium ultimum* โดยการเปรียบเทียบรูปแบบของ RAPD ที่ได้จากทำ RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน พบว่าสามารถแบ่งกลุ่ม *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ดังต่อไปนี้ *B. subtilis* FZB C *B. subtilis* FZB G *B. subtilis* FZB H *B. subtilis* FZB K *B. subtilis* FZB K *B. subtilis* FZB L *B. subtilis* JH 642 *B. subtilis* RM 125 *B. subtilis* YB 886 ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *B. subtilis* FZB C *B. subtilis* FZB G *B. subtilis* FZB H กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *B. subtilis* FZB K กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *B. subtilis* FZB L *B. subtilis* JH 642 *B. subtilis* RM 125 *B. subtilis* YB 886 ที่เป็นเช่นนี้เป็นผลเนื่องมาจากไพรเมอร์ที่ใช้มีความเฉพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งพบว่าไพรเมอร์ 1247 มีความเฉพาะกับยีนที่สร้างสาร subtilin (Batinic et al., 1997)